

การตรวจวัดปริมาณ vanadium ในอาหารสัตว์โดยวิธี ion interaction high-performance liquid chromatography

Determination of vanadium in animal feeds by ion interaction high-performance liquid chromatography

นฤมล วชิรปัทมา

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รังสิต ปทุมธานี 12121

บทคัดย่อ

การวิจัยเพื่อพัฒนาเทคนิค Chromatography สำหรับใช้แยกและการหาปริมาณ vanadium ในอาหารสัตว์ทำโดยเตรียมให้ vanadium อยู่ในรูป ternary complex ด้วยสาร 4-(2-pyridylazo)-resorcinol (PAR) และ hydrogen peroxide จากนั้นตรวจวิเคราะห์ vanadium ternary complex บน C_{18} column โดยใช้ระบบ on-line preconcentration ที่มีการเติมสาร ion-interaction ลงใน mobile phase ของเทคนิค reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ขั้นตอนการหาปริมาณ vanadium เริ่มต้นจาก loaded standard หรือสารตัวอย่าง (2 mL) ที่มี vanadium complex อยู่บน guard column (C_{18} , 0.4x4.6 mm) ด้วย mobile phase ที่มีองค์ประกอบเป็น 20 % v/v methanol, 5 mM acetic acid, 5 mM citric acid, 10 mM tetrabutylammonium bromide (TBABr) ที่ pH 7 (Eluent 1) flow rate เป็น 2 mL/นาที นาน 1.65 นาที สำหรับ injection loop ขนาด 2 mL โดย effluent ถูกกำจัดออกไปจากระบบ จากนั้น vanadium complex ถูกพาเข้า analytical column (C_{18} , 150x3.9 mm, 4 μ m) โดยใช้ automatic switching valve และใช้ mobile phase ที่มีองค์ประกอบเป็น 32 % v/v methanol, 5 mM acetic acid, 5 mM citric acid, 5 mM tetrabutylammonium bromide (TBABr) ที่ pH 7 ด้วย flow rate เท่ากับ 1 mL/นาที นาน 0.65 นาที หลังจากนั้น switching valve จะกลับไปอยู่ในตำแหน่งเดิม และสารที่ไม่ต้องการที่ติดอยู่บน guard column จะถูกล้างออกด้วย methanol นาน 5 นาที จากนั้น guard column จะถูก re-equilibrated ด้วย eluent 1 นาน 5 นาทีก่อนที่จะมีการฉีดครั้งต่อไป vanadium complex จะถูกตรวจวัดที่ 540 nm ค่า detection limits (ศึกษาที่ signal-to-noise ratio เท่ากับ 3) ของ vanadium แบบ on-line preconcentration มีค่า 6.9 ng/kg เทคนิคที่พัฒนาขึ้นถูกนำมาประยุกต์ใช้วิเคราะห์ vanadium ในอาหารสัตว์ที่ใช้เลี้ยงไก่เนื้อ และไก่ไข่

คำสำคัญ: วานาเดียม อาหารสัตว์

Abstract

The research presents the development of chromatographic conditions used for the separation and determination of vanadium in animal feeds. The separation and determination of the vanadium(V) as ternary complex with 4-(2-pyridylazo)-resorcinol (PAR) and hydrogen peroxide have been investigated on a C_{18} column using an on-line preconcentration ion-interaction-reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The determination started with loaded standard or sample (2 mL) on guard column (C_{18} , 0.4x4.6 mm) by using mobile phase comprising

20 % v/v methanol, 5 mM acetic acid, 5 mM citric acid, 10 mM tetrabutylammonium bromide (TBABr) at pH 7 (Eluent 1). A flow rate of 2 mL/min for 1.65 min was used for 2 mL injection loop, with the effluent directed to waste. The vanadium complex was flushed onto analytical column (C_{18} , 150x3.9 mm, 4 μ m) via an automatic switching valve, using a mobile phase comprising 32 % v/v methanol, 5 mM acetic acid, 5 mM citric acid, 5 mM tetrabutylammonium bromide (TBABr) at pH 7 with a flow rate of 1 mL/min for 0.65 min. Then the switching valve was returned to its original position and unwanted species remaining on guard column were eluted with methanol for 5 min. The guard column was re-equilibrated with eluent 1 for 5 min before the next injection. The vanadium complex was detected at 540 nm. The detection limits (determined by a signal-to-noise ratio of 3) of vanadium using on-line preconcentration was 6.9 ng/kg. This developed technique was then applied to the analysis of vanadium in animal feeds used for raising broiler and laying hen.

Keywords : vanadium, ion interaction, liquid chromatography

1. บทนำ

การปลูกพืชให้ได้ผลผลิตดีมีคุณภาพ จำเป็นต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่างเช่นคุณภาพของดินอากาศ สิ่งแวดล้อม และปริมาณธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับต่อการเจริญเติบโตของพืช พืชแต่ละชนิดเช่นไม้ผล ผัก หรือไม้ดอกไม้ประดับมีความต้องการธาตุอาหารหลัก N-P-K เหมือนกัน แต่แตกต่างกันที่ปริมาณธาตุอาหาร แต่ละตัว ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีความต้องการใช้ปุ๋ยในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก ซึ่งปุ๋ย N-P-K ที่ใช้มีทั้งที่นำเข้าจากต่างประเทศและผลิตในประเทศ สำหรับปุ๋ย N-P-K ที่ผลิตในประเทศจะมีการนำเข้าหิน phosphate เพื่อใช้เป็นแหล่งของฟอสฟอรัสที่ใช้เป็นแม่ปุ๋ย ซึ่งส่วนใหญ่นำเข้าจากประเทศในแถบแอฟริกา เนื่องจากหินฟอสเฟตส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยมีปริมาณฟอสฟอรัสปนอยู่น้อยไม่เหมาะกับการนำมาใช้ผลิตแม่ปุ๋ย

หินฟอสเฟตประกอบด้วยแร่ธาตุหลายชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น ฟอสฟอรัส เหล็ก แมกนีเซียม เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุบางตัวที่เป็นสารพิษเช่น vanadium ที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ที่บริโภคพืชที่มี vanadium ปนเปื้อนเข้าไป หินฟอสเฟตส่วนมากจะมี vanadium ปนเปื้อนอยู่ปริมาณมากน้อย

ต่างกัน ธาตุ vanadium ไม่ว่าจะอยู่ในรูปใดก็เป็นสารพิษ ความเป็นพิษรุนแรงพอๆกับ สารหนู (Arsenic) แต่เกษตรกรหรือผู้ใช้ปุ๋ยตลอดจนผู้บริโภคพืชผักส่วนใหญ่ทราบข้อมูลเกี่ยวกับเรื่องนี้้น้อยมาก นอกจากนี้การปนเปื้อนของ vanadium ในสิ่งแวดล้อมยังมีมาจากสาเหตุอื่นคือการพังทลายของหิน การเผาไหม้ของถ่านหินและน้ำมัน รวมทั้งการใช้วัสดุเหลือใช้จากโรงงานเหล็กกล้ามาทำเป็นปุ๋ย

มีการวิจัยเกี่ยวกับผลของ vanadium ที่มีต่อสุขภาพของคน สัตว์และพืชเช่น งานวิจัยของ Tosukhowong [1] พบว่าผู้ที่อาศัยอยู่ในแหล่งที่ดินบริเวณนั้นมีการปนเปื้อนของ vanadium ในระดับสูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ ไทย มีปัญหาเกี่ยวกับการกำจัดกรดออกของไต และยังพบว่าปริมาณของ vanadium ในน้ำปัสสาวะของคนไข้ที่อาศัยในบริเวณนี้มีมากกว่าคนไข้ที่อาศัยอยู่ในแหล่งที่ดินไม่มี Vanadium ปนเปื้อน งานวิจัยของ Srivastava [2] ชี้ให้เห็นว่าความเป็นพิษของ vanadium มีผลเสียต่อคนและสัตว์ที่เป็นโรคเบาหวาน สัตว์ที่เป็นโรคเบาหวานเมื่อได้รับ vanadium ที่อยู่ในรูป sodium metavanadate เข้าไปจะมีผลข้างเคียง คือทำให้กระเพาะอาหารทำงานผิดปกติและน้ำหนักตัวลดลง และยังพบอีกว่าความเป็นพิษของเกลือ vanadium มีผลเสียต่อดับและไต McCrindle [3] รายงานว่า

วัว 8 ตัวตายหลังจากเหมือง vanadium มีการรั่วไหลใกล้แหล่งที่วัวกินหญ้า Frank [4] รายงานว่าลูกวัวที่เลี้ยงในทุ่งหญ้าในประเทศสวีเดนทางตอนเหนือ จำนวน 23 ตัวจาก 98 ตัวตายเนื่องจากมีการใส่ปุ๋ยซึ่งมาจากวัสดุเหลือใช้ (slag) ที่มีปริมาณ vanadium ปนเปื้อนอยู่ 3% ในทุ่งหญ้า 8 เดือนก่อนที่จะใช้เลี้ยงวัว โดยปุ๋ยที่ใส่นั้นใส่เฉพาะหน้าดินไม่ซึบลึกลงไป ส่งผลให้ วัวที่กินหญ้าสดจะได้รับ vanadium เข้าไปด้วย พบว่าวัวแสดงอาการเจ็บป่วยครั้งแรกหลังจากกินหญ้าไปเพียง 11 วัน และวัวตัวแรกตายหลังแสดงอาการแล้ว 14 วัน เมื่อวิเคราะห์เนื้อเยื่อของสัตว์ที่ตาย พบว่า ความเข้มข้นของ vanadium สูงในส่วน ของตับ ไต ม้าม และ urine สำหรับพืช Wang [5] พบว่า ยอดและรากของถั่วเหลืองเจริญเติบโตน้อยลงและใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเหี่ยว เมื่อปลูกในดินที่เติม vanadium ลงไปเกิน 30 mg ต่อดิน 1 kg นอกจากนี้ยังมี รายงานว่า vanadate ที่พืชดูดเข้าไปจะขัดขวางการทำงานของ plasma membrane hydrogen (H^+)-translocating ATPase ซึ่งเป็นตัวที่มีบทบาทสำคัญในการดูดแร่ธาตุที่จำเป็นของเนื้อเยื่อพืช

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ vanadium ในสารตัวอย่างมีหลายวิธีเช่น Atomic absorption spectrophotometry (AAS) [6] Inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometry (ICP-AES) [7] และ Inductively coupled plasma-mass spectrophotometry (ICP-MS) [8] ซึ่งข้อเสียของ AAS คือ sensitivity ต่ำ (detection limit = 2 mg/L) ขณะที่ ICP-AES และ ICP-MS มีปัญหาจาก interference ของ sample matrix และกรดที่ใช้ในการย่อยสลายสารตัวอย่าง นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ใช้ chelating agents เช่น 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR) และ hydrogen peroxide [9] ซึ่งประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณ vanadium ในปุ๋ยเคมีได้ดี โดยใช้ injection loop ขนาด 100 μ L เพราะ sample matrix ในปุ๋ยเคมีมีน้อยสำหรับตัวอย่างอื่นที่มี sample matrix มากแต่การปนเปื้อนของ vanadium ปริมาณน้อยๆเช่นในอาหารสัตว์ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับเรื่องนี้โดยใช้เทคนิค Ion Interaction Reversed

Phase High Performance Liquid Chromatography ด้วยสาเหตุนี้จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ที่ต้องการพัฒนาเทคนิค Ion Interaction Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography เพื่อใช้แยกและหาปริมาณของ vanadium โดยทำให้ได้วิธีการที่ไม่มี matrix ions รบกวนและมี sensitivity สูง โดยการทดลองจะใช้ injection loop ขนาด 2 mL และกำจัด sample matrix ออกจากสารตัวอย่างก่อนที่จะให้เข้าสู่ analytical column เพื่อยืดอายุของ column และประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ จากนั้นประยุกต์วิธีการที่พัฒนาขึ้นสำหรับหาปริมาณ vanadium ในอาหารสำหรับเลี้ยงไก่เนื้อและไข่

2. การทดลอง

2.1 เครื่องมือ

อุปกรณ์สำหรับย่อยสารตัวอย่าง: Screw-top Savillex[®]

Teflon vials (Savillex, Minnesota, USA)

เครื่องวัด absorption spectra ของ ternary complex ของ Vanadium: UV-VIS spectrometer , (Perkin Elmer Lambda 35 , U.S.A)

เครื่อง HPLC สำหรับทำ sample clean-up และ on-line Preconcentration ในเวลาเดียวกัน (รูป 1) ประกอบด้วย pump 2 ตัวคือ Model 600E gradient pump และ Model 510 pump ของ Waters (Milford, MA, USA), Rheodyne (Cotani, CA, USA) model 7125 stainless steel injector (2 mL) , guard column เป็น concentrator column packed ด้วย NovaPak C_{18} silica gel, ยาว 4 mm (Waters), ใช้ UV-VIS Detector (Jasco, Tokyo, Japan) วัดที่ 540 nm, NovaPak C_{18} reversed-phase column (150x3.9 mm I.D., particle size 4 μ m, Waters) เป็น analytical column และ vanadium complex จะถูก switched จาก sample clean-up flow-path โดย automated Rheodyne six-port switching valve (Waters) สำหรับ flow-rate ของ mobile phase ผ่าน guard column เท่ากับ 2 mL/min ขณะที่ flow-rate ของ mobile phase ที่ใช้ elute vanadium complex จาก guard

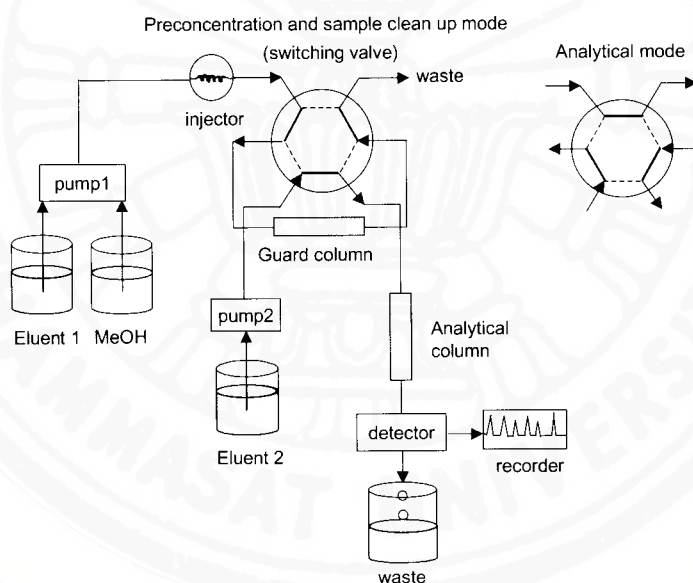
column เข้าสู่ analytical column เท่ากับ 1.0 mL/min
อุณหภูมิ column ควบคุมให้เท่ากับ 30°C

2.2. สารเคมี

Standard ammonium metavanadate (99.99% NH_4VO_3 , Aldrich, Milwaukee, WI, USA.) stock solution 1000 $\mu\text{g/mL}$ NH_4VO_3 ถูกเตรียมในสารละลาย 1 M HNO_3 น้ำที่ใช้เป็นน้ำที่ผ่านการกลั่นและ deionised จนมีการนำไฟฟ้าเท่ากับ 18 M Ω , HPLC grade methanol มาจาก Merck (Darmstadt, Germany), 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR) monosodium salt hydrate จาก Aldrich และสารละลายของ dye ต้องเตรียมขึ้นใหม่ ๆ ก่อนใช้ สารตัวอื่นๆ เช่น citric acid (99.5%, Aldrich),

tetrabutylammonium bromide (TBABr, Sigma, St. Louis, MO, USA), ammonium hydroxide (Ajax Chemicals, Sydney, Australia), acetic acid (BDH, Poole, UK), hydrochloric acid (BDH), nitric acid (Ajax) and hydrogen peroxide (30% w/v, BDH, Victoria, Australia) เป็น analytical grade.

สารตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยนี้คือ สูตรอาหารเลี้ยงไก่ไข่ 4 สูตรและสูตรอาหารเลี้ยงไก่เนื้อ 4 สูตรซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร. ไพโชค ปัญจะ ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตรคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์



รูปที่ 1 แผนภาพ diagram ของ sample clean-up และ on-line pre-concentration RP-HPLC แบบ direct-flushing

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์

นำอาหารสัตว์แต่ละสูตรมาคั่วให้ละเอียดและร่อนผ่าน sieve ขนาด 50 mesh จากนั้นชั่งน้ำหนักให้อยู่ในช่วง 0.2-0.3 g สูตรละ 3 ซ้ำโดยใช้สารตัวอย่างใน

Screw-top Savillex[®] Teflon vials ทำการย่อยด้วยกรดโดยเติม HNO_3 เข้มข้น (3.0 mL) และ HCl เข้มข้น (1.0 mL) ย่อยสารบน hotplate ที่ 70°C รอนจนฟองหมดก่อนจะปิดฝาภาชนะขณะย่อยมีการเปิดฝา 2-3 ครั้งเพื่อลดความดันภายในภาชนะเมื่อสารละลายใสเปิดฝาดูออก

และเติมน้ำประมาณ 2 mL และให้ความร้อนต่อเพื่อไล่กรด HNO_3 ออกให้เหลือน้อยๆ จากนั้นยก vials ลงจาก hotplate และปล่อยให้เย็น ปรับปริมาตรของสารเป็น 25 mL ด้วยน้ำและกรองผ่าน 0.45 μm filter

2.3.2 Pre-column complex formation

สำหรับ standard solution จะเติม Acetic acid (2.50 mL, 0.1 M) ลงใน beaker ขนาด 25 mL ตามด้วยน้ำประมาณ 5 mL และสารละลาย PAR ที่เตรียมขึ้นใหม่ (0.75 mL, 5×10^{-3} M) จากนั้นเติมสารละลาย standard NH_4VO_3 และปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 6 ด้วยสารละลาย ammonia และเติม hydrogen peroxide (0.20 mL, 30% w/v) จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายเป็น 25 mL ใน volumetric flask และทำให้ถึงขีดปริมาตรด้วยน้ำ

สำหรับสารตัวอย่าง จะเติมสารละลายอาหารสัตว์ 4 mL ลงในสารละลาย acetic acid 2.50 mL (0.1 M) ตามด้วยสารละลาย PAR ที่เตรียมขึ้นใหม่ปริมาตร 1.50 mL (5×10^{-3} M). ปรับ pH ของสารละลายเป็น 6 ด้วยสารละลาย ammonia จากนั้นเติม 0.2 mL hydrogen peroxide (30% w/v) ปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 25 mL ใน volumetric flask และทำให้ถึงขีดปริมาตรด้วยน้ำ

กรองสารตัวอย่างผ่าน 0.45 μm filter ก่อนฉีดสารละลายเข้า HPLC column หาปริมาณของ vanadium โดยใช้วิธี standard addition

2.3.3 On-line pre-concentration และ sample clean up

ใช้ two-way switching valve เป็นตัวควบคุม on – line preconcentration ของ vanadium และกำจัดสารที่ไม่ต้องการที่อยู่ในสารละลายออกไป หลังจากฉีด standard หรือสารตัวอย่างเข้าสู่ HPLC, vanadium complex จะเกาะติดกับ guard column เมื่อใช้ eluent 1 (ตาราง 1) จะใช้เวลาในการ loaded complex 1.65 นาที ด้วย flow rate 2 mL/นาที เมื่อใช้ samples loops ขนาด 2 mL จากนั้น switching valve จะเปลี่ยนตำแหน่งให้ guard column ต่อตรงไปยัง analytical column และ vanadium complex จะถูก eluted ออกจาก guard column ด้วย eluent 2 (ตาราง 1) ด้วย flow rate เท่ากับ 1 mL/นาที หลังจาก 0.65 นาที switching valve จะกลับไปอยู่ในตำแหน่งเริ่มต้นและ guard column จะถูกล้างด้วย pure methanol นาน 6 นาที เพื่อกำจัดสารที่ไม่ต้องการที่ยังติดอยู่บน guard column ออกจากนั้น guard column จะถูก re-equilibrated ด้วย eluent 1 นาน 5 นาทีก่อนจะฉีดสารครั้งใหม่

ตาราง 1 องค์ประกอบของ mobile phase ที่ใช้ในการวิจัย

Eluent	Methanol (%, v/v)	[Acetic acid] (mM)	[TBABr] (mM)	[Citric acid] (mM)	Eluent pH
1	20	5	10	5	7
2	32	5	3	5	7

3 ผลและการวิจารณ์ผล

3.1 Preconcentration system และ separation

parameters

องค์ประกอบของ mobile phase ที่ใช้ load vanadium complex บน guard column จะศึกษาองค์ประกอบของ methanol และ tetrabutylammonium bromide (TBABr) ที่ไม่ทำให้ peak ของ vanadium complex แผลออก หาก methanol มีค่ามาก peak จะแผลออก และถ้า TBABr มีค่าน้อยเกินไปจะไม่สามารถยัดให้ vanadium complex ติดอยู่กับ guard column ได้ซึ่งจากการศึกษาโดยแปรค่าทั้ง methanol, TBABr, buffer และ pH พบว่า mobile phase ที่ประกอบด้วย 20% (v/v) methanol, 5 mM acetic acid, 5 mM citric acid, 10 mM TBABr ที่ pH 7 จะสามารถทำให้ vanadium complex ติดอยู่บน guard column ได้และทำให้ได้ maximum peak height ของ vanadium complex จึงเลือกองค์ประกอบนี้เป็น optimum loading mobile phase.

องค์ประกอบของ analytical mobile phase ที่เหมาะสมคือ 32% (v/v) methanol, 5 mM acetic acid, 5 mM citric acid และ 3 mM tetrabutylammonium bromide (TBABr) ที่ pH 7 องค์ประกอบของ mobile phase นี้จะทำให้การแยก vanadium ออกจาก matrix ในอาหารสัตว์ได้ผลดี และพบว่า Cu(II), Ni(II), Cr(III), Mn(II), Zn(II), Fe(III), Pb(II), Ti(IV) และ Cd(II)

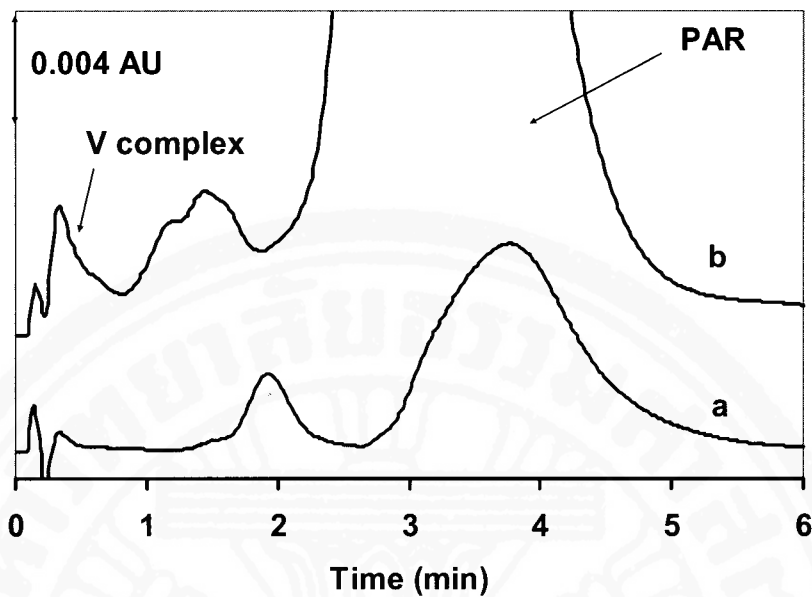
ไม่ interfere ในการหาปริมาณ vanadium เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มี vanadium complex สูญหายจากระบบขณะทำการวิเคราะห์ จึงจำเป็นต้องศึกษาระยะเวลาของการ preconcentrate ของ standard, sample และ sample ที่ spiked ด้วย standard และจากการทดลองพบว่า การหาปริมาณ vanadium complex ในอาหารสัตว์ โดยใช้ injection loops ขนาด 2 mL เวลาที่ใช้ในการ load สารที่เหมาะสมคือ 1.65 นาที เวลาที่เหมาะสมสำหรับ elute vanadium complex ออกจาก guard column และเข้าสู่ analytical column คือ 0.65 นาที (ตาราง 2) โดยดูข้อมูลจากรูป 2 ซึ่งเป็น chromatogram ที่ได้จากการผ่านสารตัวอย่างเข้าเฉพาะ guard column อย่างเดียว

3.2 Analytical performance parameters

Detection limits (ศึกษาที่ signal-to-noise ratio เท่ากับ 3) ของ vanadium แบบ on-line preconcentration (injection loop ขนาด 2 mL) มีค่าเท่ากับ 6.9 ng/kg จากการฉีด standard vanadium [8 µg/mL] ซ้ำ 5 ครั้ง พบว่า percentage relative standard deviations (% RSD) ของ retention time และ peak area เท่ากับ 0.18 % และ 0.46 %, ตามลำดับ external standard calibration curve ให้เส้นตรงอย่างน้อยถึง 20 µg/L ($r^2=1.000$) และ standard addition calibration curves สำหรับอาหารสัตว์ให้เส้นตรงที่ดี ($r^2=0.9978-0.999$).

ตาราง 2 เวลาที่เหมาะสมสำหรับ on-line preconcentration และ sample clean up ของ vanadium complex บน C₁₈ guard column

วัตถุประสงค์	ปริมาตรที่ฉีด	เวลาที่เหมาะสม (นาที) สำหรับ	
		ฉีด V complex เข้าสู่ guard column	Elute V complex จาก guard column เข้าสู่ anal. column
preconcentration และ sample clean up	2 mL	1.65	0.65

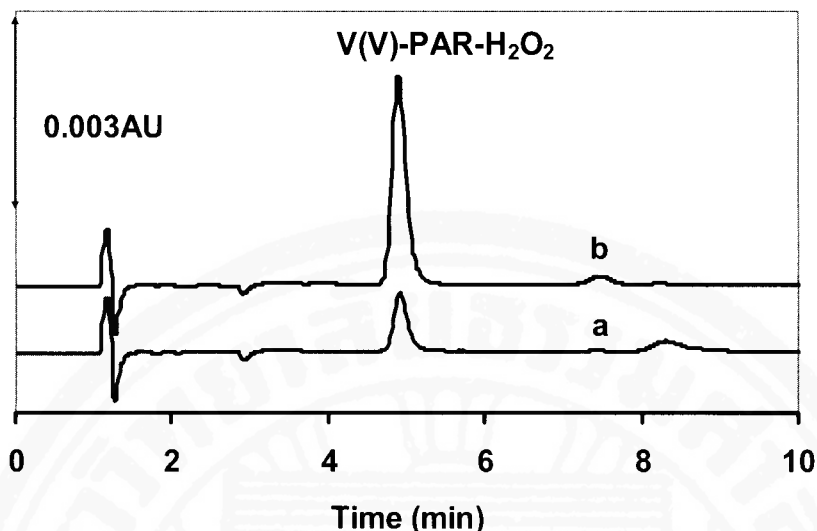


รูป 2 Chromatogram ของ (a) blank (0.15 mM PAR, 7.1 mM H₂O₂ และ 10 mM acetate buffer ที่ pH6) และ (b) อาหารสัตว์ที่ใช้เลี้ยงไก่ไข่สูตร T4 ได้มาจากการใช้ระบบ preconcentration และ sample clean up ของ vanadium complex บน C₁₈ guard column, mobile phase คือ eluent 1 ด้วย flow rate 2 mL/นาที นาน 1.60 นาที ตามด้วย eluent 2 ด้วย flow rate 1 mL/นาที สำหรับ elute complex จาก guard column เข้า detector นาน 0.65 นาที injection loop: 2 mL, อุณหภูมิ 30°C, detection wavelength ที่ 540 nm.

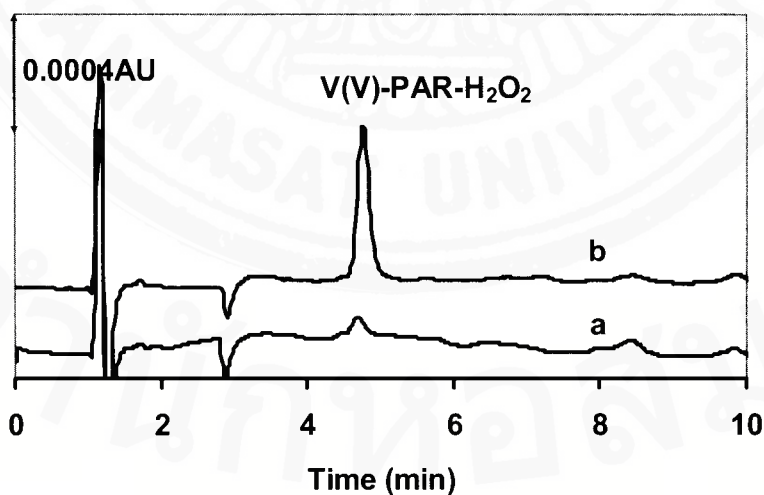
3.3 การหาปริมาณ vanadium ในสารตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาปริมาณ vanadium ในตัวอย่างอาหารสัตว์ที่ใช้เลี้ยงไก่ไข่และไก่เนื้อ โดยวิธี preconcentration และ sample clean up บน C₁₈ guard column โดยใช้ injection loop ขนาด 2 mL พบว่า ปริมาณ vanadium ที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์สูตรต่าง ๆ มีค่าน้อยกว่า 3 µg/g ดังตาราง 3 ดังนั้น vanadium ที่ปนเปื้อนใน

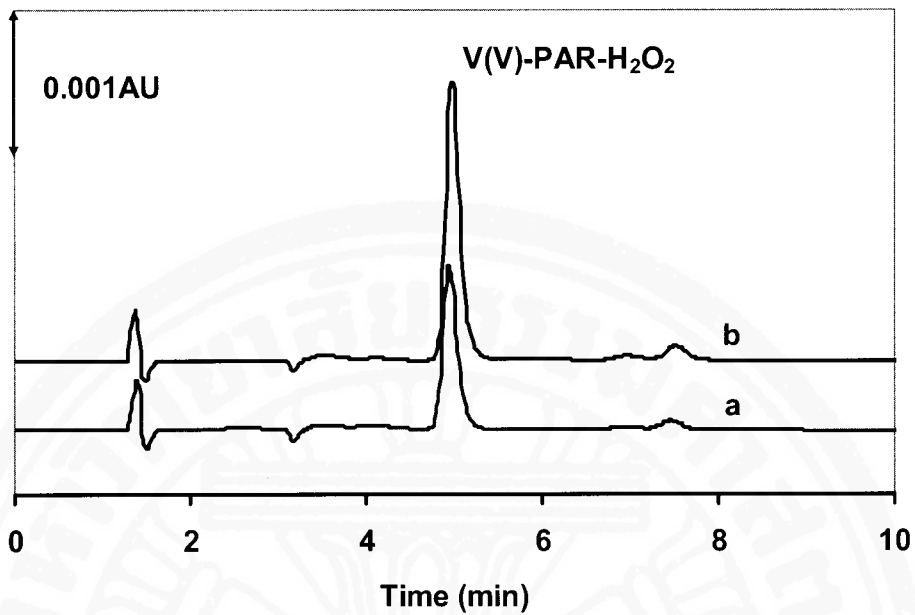
ระดับที่ต่ำมาก จึงไม่น่าจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค และตัวอย่าง chromatogram ของอาหารไก่ไข่สูตร T1 และข้าวโพดแสดงในรูป 3 และรูป 4 ตามลำดับ สำหรับรูป 5 เป็น chromatogram ของอาหารสัตว์ที่ใช้เลี้ยงไก่เนื้อสูตร M1 จากรูปทั้งหมดจะเห็นว่า peak ของ vanadium complex แยกออกจาก peak อื่นๆ ได้ดี และมีการ spiked ด้วย standard vanadium เพื่อ confirm identity ของ peak



รูป 3 Chromatogram ของ vanadium ใน อาหารสัตว์สำหรับเลี้ยงไก่ไข่สูตร T1 (a) และอาหารสัตว์สำหรับเลี้ยงไก่ไข่สูตร T1 ที่ spiked ด้วย 4 ng/mL vanadium (b) สารตัวอย่างเตรียมมาจาก 4 ml digested solution; [PAR]=0.30 mM; [acetate]=10 mM, $[H_2O_2]$ =0.71 mM และ pH 6. Mobile phase สำหรับระบบ clean up ที่ guard column คือ eluent 1 (20% v/v metanol+5 mM acetic acid+10 mM tetrabutylammonium bromide +5 mM citric acid ที่ pH 7) และ analytical column คือ eluent 2 (32% v/v metanol+5 mM acetic acid+3 mM tetrabutylammonium bromide +5 mM citric acid ที่ pH 7). Guard column: NovaPak C₁₈; length 4 mm; injection loop: 2 mL; temperature 30 °C; detection: 540 nm. Analytical column: NovaPak C18; 150 mmx3.9 mm i.d., particle size 4 μ m



รูป 4 Chromatogram ของ vanadium ในข้าวโพดที่ใส่ผสมในอาหารสัตว์ (a) และข้าวโพดที่ใส่ผสมในอาหารสัตว์ที่ spiked ด้วย 4 ng/mL vanadium (b) ข้อมูลอื่นๆเหมือน chromatogram ในรูป 3



รูป 5 Chromatogram ของ vanadium ใน (a) อาหารสัตว์สำหรับเลี้ยงไก่เนื้อสูตร M1 (b) อาหารสัตว์สำหรับเลี้ยงไก่เนื้อสูตร M1 ที่ spiked ด้วย 3.5 ng/mL vanadium, ข้อมูลอื่นๆเหมือน chromatogram ในรูป 3

ตาราง 3 ปริมาณ vanadium ที่พบในอาหารสัตว์และข้าวโพดโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC. ข้อมูลที่แสดงได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

อาหาร	สูตรอาหาร	ปริมาณ vanadium ที่พบในอาหารสัตว์, $\mu\text{g/g}$
ไก่ไข่ ข้าวโพด ไก่เนื้อ	T1	1.08
	T2	2.52
	T3	2.86
	T4	2.51
	-	0.11
	M1	2.58
	M2	2.04
	M3	0.88
	M4	0.53

4. สรุปผลการทดลอง

การหาปริมาณปนเปื้อนของ vanadium ในอาหารสัตว์ ประสบความสำเร็จเมื่อศึกษาโดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography ซึ่งมี tetrabutylammonium เป็น ion interaction reagent ใน mobile phase และต่อระบบแบบ on-line preconcentration โดยมีระบบ clean up ไปพร้อมกันบน guard column ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้อย จากผลการทดลองพบว่า มี vanadium ปนเปื้อนในอาหารสัตว์น้อยมาก

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย นายจิระพงษ์ เปลี่ยนสี และนายอรรถพล ประสารสุกลาก รวมทั้งแหล่งทุนจากงบประมาณของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2548

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Tosukhowong, P., Tungsanga, K., Eiam-Ong, S. and Sitprijia, V., Environmental Distal Renal Tubular Acidosis in Thailand: An Enigma, American Journal of Kidney diseases, Vol. 33(6), pp. 1180-1186, 1999.
- [2] Srivastava, A.K., Anti-diabetic and Toxic Effects of Vanadium Compounds, Molecular and Cellular Biochemistry, Vol. 206, pp. 177-182, 2000.
- [3] McCrindle, C.M.E., Mokantla, E. and Duncan, N., Peracute Vanadium Toxicity in Cattle Grazing Near a Vanadium Mine, Journal of Environmental Monitoring, Vol. 3(6), pp. 580-582, 2001.
- [4] Frank, A., Madej, A., Galgan, V. and Petersson, L. R., Vanadium Poisoning of Cattle with Basic Slag. Concentrations in Tissues from Poisoned Animals and from a Reference, Slaughter-house Material, The Science of the Total Environment, Vol.181, pp. 73-92, 1996.
- [5] Wang, J.F. and Liu, Z., Effect of Vanadium on the Growth of Soybean Seedlings, Plant and Soil, Vol. 216(1-2), pp. 47-51, 1999.
- [6] Adachi, A., Sawada, S., Shida, K., Nakamura, E. and Okano, T., Determination of Vanadium in Foods by Atomic Absorption Spectrophotometry, Anal. Lett., Vol. 32(11), pp. 2327-2334, 1999.
- [7] Wuilloud, R.G., Salonia, J. A., Gasquez, J. A., Olsina, R. A. and Martinez, L. D., On-line Pre-Concentration System for Vanadium Determination in Drinking Water using Flow Injection-inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, Analytica Chimica acta, Vol. 420, pp. 73-79, 2000.
- [8] Townsend, A.T., the Accurate Determination of the First Row Transition Metals in Water, Urine, Plant Tissue and Rock Samples by Sector Field ICP-MS, J Anal. At. Spectrom., Vol. 15(4), pp. 307-314, 2000.
- [9] Vachirapatama, N., Dicinoski, G., Townsend, A. T. and Haddad, P. R., Determination of Vanadium as 4-(2-pyridylazo) Resorcinol-hydrogen Peroxide Ternary Complexes by Ion Interaction Reversed-phase Liquid Chromatography, J. Chromatogr. A, Vol. 956, pp. 221-227, 2002.