

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. HP ^{3D} Capillary Electrophoresis System (Hewlett-Packard, Germany)
2. Fused-silica Capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 365 ไมโครเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ความยาวทั้งหมด 42 เซนติเมตร (Polymicro Technologies, USA)
3. เครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic Bath, Model 690D, Crest, Germany)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด 4 ตำแหน่ง (AG 204, Mettler Toledo, Switzerland)
5. เครื่องพีเอชมิเตอร์ (Φ34 pH Meter, Beckman, USA)
6. ตัวกรองที่ใช้กับเข็มฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร (Nalgene, USA)

สารเคมี

1. ไธอามีน ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamin Hydrochloride, $C_{12}H_{17}ClN_4OS.HCl$, M.W. = 337.27) 99.0% เกรดไบโอเคมี จาก Fluka (Switzerland)
2. ไรโบฟลาวิน (Riboflavin, $C_{17}H_{20}N_4O_6$, M.W = 376.38) 98.0% เกรดไบโอเคมี จาก Fluka (Switzerland)
3. ไพริดอกซิน ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine Hydrochloride, $C_8H_{11}NO_3.HCl$, M.W. = 205.64) 99.0% เกรดไบโอเคมี จาก Fluka (Switzerland)
4. นิโคตินาไมด์ (Nicotinamide, $C_6H_6N_2O$, M.W. = 122.13) 99.5% เกรดไบโอเคมี จาก Fluka (Switzerland)
5. กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic Acid, $C_6H_8O_6$, M.W. = 176.3) 99.7% เกรดวิเคราะห์ จาก Riedel-de Haen (Germany)
6. คาเฟอีน (Caffeine, $C_8H_{10}N_4O_2$, M.W. = 194.20) 99.9% จากกองวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
7. ไดโซเดียมเตตระโบเรตเดคาไฮเดรต (Di-sodium Tetraborate Decahydrate, $Na_2B_4O_7.10H_2O$, M.W. = 381.37%) 99.5% เกรดวิเคราะห์ จาก Merck (Germany)

8. กรดบอริก (Boric Acid, H_3BO_3 , M.W. = 61.83) 99.8% เกรดวิเคราะห์ จาก Merck (Germany)
9. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate, $C_{12}H_{25}OSO_3Na$, M.W. = 288.38) 99.0% เกรดวิเคราะห์ จาก Fisher Chemicals (UK)
10. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide Solution, M.W. = 40.0) สำหรับ HPCE เข้มข้น 1.0 โมลาร์ จาก Hewlett Packard (Germany)
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide, NaOH, M.W. = 40.0) 98.0% เกรดวิเคราะห์ จาก APS Ajax Finechem (Australia)
12. อะซิโตไนไตร์ (Acetonitrile, CH_3CN , M.W. = 41.05) 99.9% เกรดวิเคราะห์ จาก Mallinckrodt (USA)
13. เครื่องต้มฆ่าล้าง 5 ตัวอย่าง
14. น้ำกลั่น 2 ครั้งและผ่านระบบ Compact Ultra Pure Water System (Barnstead, USA)

วิธีดำเนินการ

1. การเตรียมสารละลายเคมี

1.1 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งโคโซเดียมเตตระบอเรตเคะไฮเดรตหนัก 3.8137 กรัม ใส่บีกเกอร์และละลายด้วยน้ำกลั่น นำไปใส่ในเครื่องอัลตราโซนิกเพื่อช่วยในการละลาย ถ่ายสารละลายที่ได้ไปยังขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่น

1.2 สารละลายกรดบอริก ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่งกรดบอริกหนัก 3.0915 กรัม ใส่บีกเกอร์และละลายด้วยน้ำกลั่น นำไปใส่ในเครื่องอัลตราโซนิกเพื่อช่วยในการละลาย ถ่ายสารละลายที่ได้ไปยังขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่น

1.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์หนัก 0.20 กรัม ใส่บีกเกอร์และละลายด้วยน้ำกลั่น นำไปใส่ในเครื่องอัลตราโซนิกเพื่อช่วยในการละลาย ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

1.4 สารละลายโซเดียมโคเคซิลซัลเฟต ความเข้มข้น 100.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งโซเดียมโคเคซิลซัลเฟตหนัก 2.8840 กรัม ใส่บีกเกอร์และละลายด้วยน้ำกลั่น ถ่ายสารละลายที่ได้ไปยังขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่น

1.5 สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 อย่างละ 10 มิลลิลิตร

เปิดสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100.0 มิลลิโมลาร์ 1.00 มิลลิลิตรลงใน บีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ประมาณ 10 มิลลิลิตรและนำ สารละลายที่ได้ปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายกรดบอริกให้ได้ค่าพีเอช 7.0 ถ่ายสารละลายผสมลงใน ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ทำเช่นเดียวกันแต่ ปรับค่าพีเอชให้ได้ 8.0 และ 9.0 ส่วนค่าพีเอช 10.0 ปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์

1.6 สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ และโซเดียม โคเคซิลซัลเฟตเข้มข้น 10.0, 20.0, 25.0 และ 30.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0 อย่างละ 10 มิลลิลิตร

เปิดสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100.0 มิลลิโมลาร์ 1.00 มิลลิลิตร และเปิด สารละลายโซเดียมโคเคซิลซัลเฟตเข้มข้น 100.0 มิลลิโมลาร์ 1.00 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ประมาณ 10 มิลลิลิตรและนำสารละลายที่ได้ ปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายกรดบอริกให้ได้ค่าพีเอช 9.0 ถ่ายสารละลายผสมลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ได้สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ และมีโซเดียมโคเคซิลซัลเฟตเข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0และทำ เช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนปริมาตรการเปิดสารละลายโซเดียมโคเคซิลซัลเฟตเข้มข้น 100.0 มิลลิ โมลาร์ เป็น 2.00, 2.50 และ 3.00 มิลลิลิตรแทน จะได้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีโซเดียมโคเคซิล ซัลเฟตเข้มข้น 20.0, 25.0 และ 30.0 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ

1.7 สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10.0, 15.0 และ 20.0 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมโคเคซิลซัลเฟตเข้มข้น 25.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0 อย่างละ 10 มิลลิลิตร

เปิดสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100.0 มิลลิโมลาร์ 1.00 มิลลิลิตร และเปิด สารละลายโซเดียมโคเคซิลซัลเฟต เข้มข้น 100.0 มิลลิโมลาร์ 2.50 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ประมาณ 10 มิลลิลิตรและนำสารละลายที่ได้ ปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายกรดบอริกให้ได้ค่าพีเอช 9.0 ถ่ายสารละลายผสมลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ได้สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์

เข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ และมีโซเดียมโคเคซิลซัลเฟตเข้มข้น 25.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0 ทำเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนปริมาตรการปิเปตสารละลายบอเรตต์ฟเฟอร์เข้มข้น 100.0 มิลลิโมลาร์เป็น 1.50 และ 2.00 มิลลิลิตร จะได้สารละลายบอเรตต์ฟเฟอร์เข้มข้น 15.0 และ 20.0 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ

1.8 สารละลายบัพเฟอร์ที่มีบอเรตต์ฟเฟอร์เข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมโคเคซิลซัลเฟตเข้มข้น 25.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0 และมีอะซิโตนไทรอยุ่ 1%, 2% และ 3% อย่างละ 10 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายบอเรตต์ฟเฟอร์เข้มข้น 100.0 มิลลิโมลาร์ 1.00 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายโซเดียมโคเคซิลซัลเฟตเข้มข้น 100.0 มิลลิโมลาร์ 2.50 มิลลิลิตร และปิเปตอะซิโตนไทร 0.10 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ประมาณ 10 มิลลิลิตร และนำสารละลายที่ได้ปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายกรดบอริกให้ได้ค่าพีเอช 9.0 ถ่ายสารละลายผสมลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ได้สารละลายบอเรตต์ฟเฟอร์เข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ มีโซเดียมโคเคซิลซัลเฟตเข้มข้น 25.0 มิลลิโมลาร์ และอะซิโตนไทร 1% พีเอช 9.0 ทำเช่นเดียวกันแต่ปิเปตอะซิโตนไทรเป็น 0.20 และ 0.30 มิลลิลิตร จะได้สารละลายบัพเฟอร์ที่มีอะซิโตนไทรอยู่ 2% และ 3% ตามลำดับ

1.9 สารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างละ 50 มิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิด 0.0025 กรัม ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตร ละลายด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอขวดวัดปริมาตร

1.10 สารละลายมาตรฐานผสม (Standard Mixture) เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิด 0.0025 กรัม ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ลงขวดวัดปริมาตรขวดเดียวกัน ละลายด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอขวดวัดปริมาตร

1.11 สารละลายมาตรฐานผสม (Standard Mixture) เข้มข้น 0.3, 0.8, 1.2, 1.5, 2.0, 3.0 และ 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสม 0.06 มิลลิลิตรลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ได้สารละลายมาตรฐานผสมเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนปริมาตรการปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมเป็น 0.16, 0.24, 0.30, 0.40, 0.60 และ 0.70 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานผสมเข้มข้น 0.8, 1.2, 1.5, 2.0, 3.0 และ 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

1.12 สารละลายมาตรฐานผสม (Standard Mixture) เข้มข้น 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสม 1.00 มิลลิลิตรลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกระดับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ได้สารละลายมาตรฐานผสมเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนปริมาตรการปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมเป็น 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, และ 6.00 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานผสมเข้มข้น 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

1.13 สารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มชูกำลังเจือจาง 2 เท่า และเจือจาง 20 เท่า

ปิเปตสารตัวอย่างจากในขวดเครื่องดื่มชูกำลัง 5.00 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกระดับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ได้สารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มชูกำลังเจือจาง 2 เท่า ทำเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนปริมาตรการปิเปตสารตัวอย่างจากในขวดเครื่องดื่มชูกำลัง เป็น 0.50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มชูกำลังเจือจาง 20 เท่า

1.14 สารละลายเครื่องดื่มชูกำลังตัวอย่างที่ 1 เจือจาง 20 เท่า ปริมาตร 10 มิลลิลิตร Spike สารละลายมาตรฐานนิโคตินาไมด์ และคาเฟอีน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารตัวอย่างจากในขวดเครื่องดื่มชูกำลังตัวอย่างที่ 1 0.50 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานนิโคตินาไมด์เข้มข้น 50 มิลลิลิตร 1.00 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนเข้มข้น 50 มิลลิลิตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกระดับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายเครื่องดื่มชูกำลังตัวอย่างที่ 1 เจือจาง 20 เท่า ปริมาตร 10 มิลลิลิตร Spike สารละลายมาตรฐานนิโคตินาไมด์ และคาเฟอีน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำเช่นเดียวกันเปลี่ยนปริมาตรการปิเปตสารละลายมาตรฐานนิโคตินาไมด์และคาเฟอีนเป็น 2.00 มิลลิลิตร จะได้สารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มชูกำลังตัวอย่างที่ 1 เจือจาง 20 เท่า ปริมาตร 10 มิลลิลิตร Spike สารละลายมาตรฐานนิโคตินาไมด์ และคาเฟอีน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.15 สารละลายเครื่องดื่มชูกำลังตัวอย่างที่ 1 เจือจาง 2 เท่า ปริมาตร 10 มิลลิลิตร Spike สารละลายมาตรฐานวิตามินบีหก 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารตัวอย่างจากในขวดเครื่องดื่มชูกำลังตัวอย่างที่ 1 5.00 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินบีหกเข้มข้น 50 มิลลิลิตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกระดับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มชูกำลังตัวอย่างที่ 1 เจือจาง 2 เท่า ปริมาตร 10 มิลลิลิตร Spike สารละลายมาตรฐานวิตามินบีหก 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำเช่นเดียวกัน เปลี่ยนปริมาตรการปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินบีหกเป็น 2.00 มิลลิลิตร จะได้สารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มชูกำลังตัวอย่างที่ 1 เจือจาง 2 เท่า ปริมาตร

10 มิลลิลิตร Spike สารละลายมาตรฐานวิตามินบีหก 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.16 เครื่องดื่มชูกำลังตัวอย่างที่ 1 Spike วิตามินบีสอง และวิตามินบีหนึ่ง
เทเครื่องดื่มชูกำลังตัวอย่างที่ 1 ประมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด

25 มิลลิลิตร ตักสารวิตามินบีสองปริมาณเพียงเล็กน้อยด้วยปลายช้อนโลหะใส่ลงในบีกเกอร์
คนสารตัวอย่างและนำไปใส่ในเครื่องอุลตราโซนิกเพื่อช่วยในการละลาย ทำเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนเป็น
วิตามินบีหนึ่งแทน

1.17 เครื่องดื่มชูกำลังตัวอย่างที่ 5 Spike วิตามินซี

เทเครื่องดื่มชูกำลังตัวอย่างที่ 5 ประมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด

25 มิลลิลิตร ตักสารวิตามินซีปริมาณเพียงเล็กน้อยด้วยปลายช้อนโลหะใส่ลงในบีกเกอร์ คนสาร
ตัวอย่างและนำไปใส่ในเครื่องอุลตราโซนิกเพื่อช่วยในการละลาย

1.18 การเตรียมสารละลายเข้าสู่ขวดบรรจุสาร

สารละลายทุกชนิดก่อนนำไปเข้าสู่ขวดบรรจุสารต้องผ่านการกรองด้วยตัวกรองขนาด

13 มิลลิลิตรและขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร

2. การตั้งสภาวะเครื่องแคปิลารีอิเล็กทรอนิกส์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์

ตั้งสภาวะของเครื่องที่ใช้ในการทดลอง โดยการนำสารเข้าสู่แคปิลารี ใช้โหมคความดันที่

50.0 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 5 วินาที สักยภาพที่ใช้ในการทดลอง 10 กิโลโวลต์ อุณหภูมิของแคปิลารี

25 องศาเซลเซียส ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด 220 นาโนเมตร และ 265 นาโนเมตร

ความกว้างของช่องแสง 20 นาโนเมตร การปรับสภาพผิวภายในแคปิลารีระหว่างการฉีดเข้าคือ

ชะล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 1 นาที และสารละลายบัฟเฟอร์
เป็นเวลา 1 นาที

3. ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการแยกสารละลายมาตรฐานผสม

3.1 ศึกษาผลของค่าพีเอชของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ที่มีผลต่อค่าไมเกรชัน ไซม์

ค่าการแยก และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสม ซึ่งสารละลายบัฟเฟอร์ประกอบ

ด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ โดยพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ทำการศึกษาคือ

ค่าพีเอชที่ 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0

3.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นโซเดียมโคเดซิลซัลเฟตในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์

ที่มีผลต่อค่าไมเกรชัน ไซม์ ค่าการแยก และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสม โดย

ความเข้มข้น โซเดียมโคเดซิลซัลเฟตในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ทำการศึกษา 10.0, 20.0, 25.0 และ

30.0 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ 10.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0

3.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นบอเรตในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่มีผลต่อค่าไมเกรชันใหม่ ค่าการแยก และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสม โดยความเข้มข้นบอเรตในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ทำการศึกษา 10.0, 15.0 และ 20.0 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของโซเดียมโคเคซัลเฟต 25.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0

3.4 ศึกษาผลของอะซิโตนไทรในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ที่มีผลต่อค่าไมเกรชันใหม่ ค่าการแยก และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสม โดยความเข้มข้นอะซิโตนไทรในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ทำการศึกษา 1%, 2% และ 3% ความเข้มข้นบอเรตบัฟเฟอร์ 10.0 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของโซเดียมโคเคซัลเฟต 25.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.0

3.5 ศึกษาผลของอุณหภูมิของแคปิลารีที่มีผลต่อค่าไมเกรชันใหม่ ค่าการแยก และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสม โดยอุณหภูมิของแคปิลารีที่ทำการศึกษาคือ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส

3.6 ศึกษาผลของเวลาในการฉีดสารเข้าสู่แคปิลารี ที่มีผลต่อค่าการแยกสารละลายมาตรฐานผสม ทดลองโดยใช้โหมดความดันในการนำสารเข้าสู่แคปิลารีด้วยความดันคงที่ที่ 50.0 มิลลิบาร์ โดยศึกษาเวลาในการฉีดสาร 3, 4, และ 5 วินาที

4. ศึกษาความถูกต้องของวิธีที่ทำการวิเคราะห์ (Method Validation) (L. Huber, Agilent technologies, 1998)

4.1 การหาขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD)

เป็นการวิเคราะห์หาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจพบปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ แต่ไม่สามารถรายงานว่าตรวจวัดเป็นปริมาณเท่าใด ทดลองโดยการนำสารละลายมาตรฐานผสมมาทำการเจือจางและทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแคปิลารีอิเล็กโตรโฟรีซิสตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 โดยความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละตัวที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise Ratio) มีค่าอยู่ในช่วง 2 – 3 เป็นค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด

4.2 การหาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ตรวจวัดได้ โดยสามารถรายงานเป็นปริมาณที่แน่นอนได้ ทดลองโดยการนำสารละลายมาตรฐานผสมมาทำการเจือจางและทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแคปิลารีอิเล็กโตรโฟรีซิสตามสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง โดยความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละตัวที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise Ratio) มีค่าอยู่ในช่วง 10 – 12 เป็นค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ

4.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน

สร้างกราฟมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้น โดยความเข้มข้นอยู่ในช่วง 5.0 – 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแคปิลารีเล็กโพรโพริชิตตามสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ทำการวัดที่ระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ นำผลที่ได้สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ที่พิกกับค่าความเข้มข้น หาค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (r^2)

4.4 การหาความเที่ยงของการวิเคราะห์ (Precision)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสม 3 ระดับความเข้มข้น โดยความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10.0 – 20.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมโดยทำการวิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ แสดงความเที่ยงของการวิเคราะห์ในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่พิก และค่าไม่แปรผันใหม่ของสารแต่ละชนิด

4.5 การหาความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Accuracy)

วิเคราะห์เครื่องคัมพูกำลังตัวอย่างที่ 1 Spike ด้วยสารละลายมาตรฐาน นิโคตินาไมด์ คาเฟอีน และวิตามินบีหก 2 ระดับความเข้มข้นภายใต้สภาวะที่เหมาะสมโดยทำการวิเคราะห์ซ้ำความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ หาค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์โดยรายงานผลเป็นค่าร้อยละการกลับคืนของสารแต่ละชนิด

5. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

วิเคราะห์เครื่องคัมพูกำลัง 5 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินาไมด์และคาเฟอีนในสารละลายตัวอย่างเครื่องคัมพูกำลังเจือจาง 2 เท่า และวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบีหก 6 ในสารละลายตัวอย่างเครื่องคัมพูกำลังเจือจาง 2 เท่า วิเคราะห์ในสภาวะที่เหมาะสม นำค่าพื้นที่พิกที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน และคำนวณปริมาณสารที่วัดได้ในหน่วย มิลลิกรัมต่อ 150 ลูกบาศก์เซนติเมตร

6. การคำนวณ

6.1 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

เมื่อ X_i แทน ค่าที่วัดได้ในแต่ละครั้ง
 $\bar{X}$ แทน ค่าเฉลี่ยของการวัด n ครั้ง
 n แทน จำนวนครั้งของการวัด

6.2 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, RSD)

$$RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

เมื่อ SD แทน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
 $\bar{X}$ แทน ค่าเฉลี่ย

6.3 ร้อยละการกลับคืน (%Recovery)

$$\% \text{Recovery} = \frac{|C_{(\text{std}+\text{samp})} - C_{\text{samp}}|}{C_{\text{std}}} \times 100$$

เมื่อ C_{std} แทน ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป
 C_{samp} แทน ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน
 $C_{(\text{std}+\text{samp})}$ แทน ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน

6.4 Resolution Factor

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{W_2 + W_1} \right)$$

เมื่อ t_{R_1} แทน ค่า Retention Time ของพีคที่ 1
 t_{R_2} แทน ค่า Retention Time ของพีคที่ 2
 W_1 แทน ความกว้างของฐานพีคที่ 1
 W_2 แทน ความกว้างของฐานพีคที่ 2