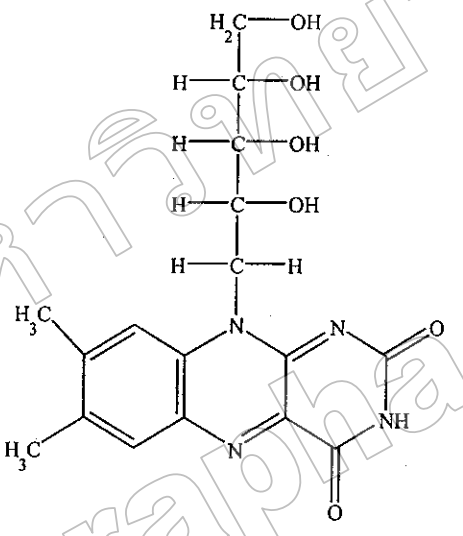
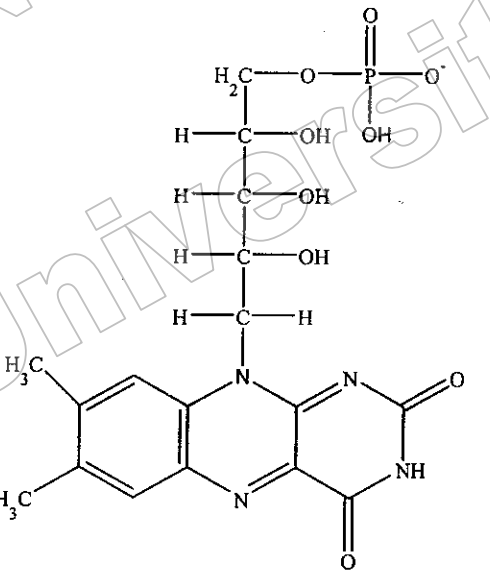
บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

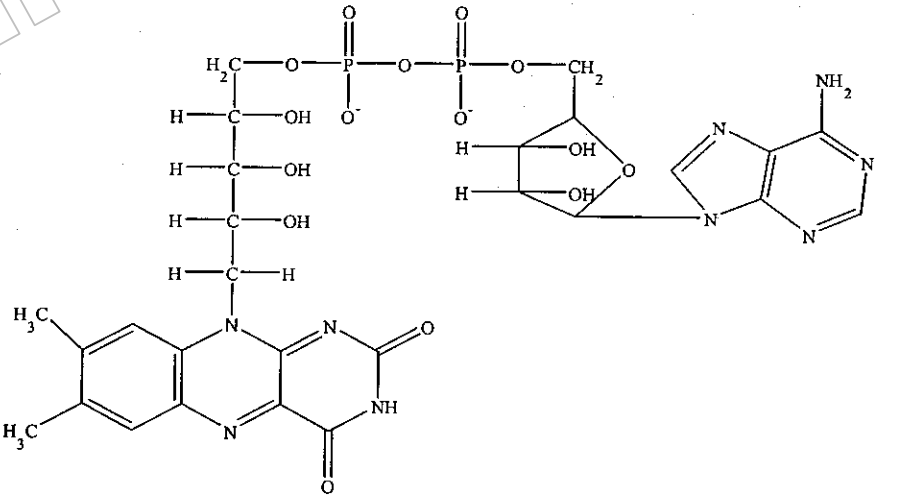
สารไรโบฟลาวิน (Riboflavin, RF) เป็นอนุพันธ์ของไอโซอัลลอกซาซีน (Isoalloxazine) และวิตามินบีหมู่ไรบิทอล (Ribitol) เป็นสายด้านข้าง เมื่อไรโบฟลาวินถูกดูดซึมจากลำไส้เล็กส่วนต้น ไรโบฟลาวินจะถูกเปลี่ยนเป็นฟลาวินโมโนนิวคลิโอไทด์ (Flavin mononucleotide, FMN) กับฟลาวิน อะดินิน ไดนิวคลิโอไทด์ (Flavin adenine dinucleotide, FAD) ที่เยื่อบุของลำไส้เล็ก สูตรโครงสร้างของไรโบฟลาวิน ฟลาวินโมโนนิวคลิโอไทด์ และฟลาวิน อะดินิน ไดนิวคลิโอไทด์ ดังแสดงในภาพที่ 1



Riboflavin (RF), pK_a=10.2



Flavin mononucleotide (FMN)

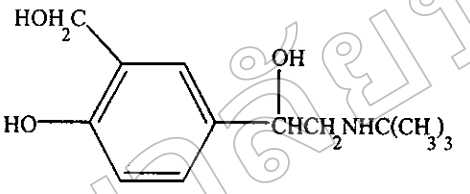


Flavin adenine dinucleotide (FAD)

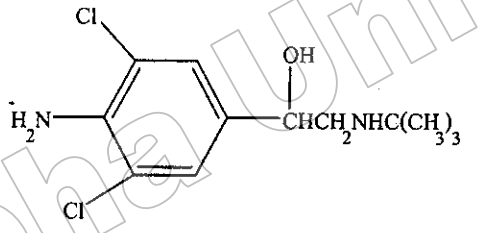
ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของสารไรโบฟลาวินและอนุพันธ์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล เป็นสารในกลุ่มเบต้า-อะโกนิสต์ (β-agonist) ซึ่งเป็นสารเคมีที่นำมาใช้ผลิตยาสำหรับรักษาโรคหอบหืด ในช่วงระยะเวลาหลายปีนี้ได้มีการนำมาใช้เป็นสารกระตุ้นสำหรับนักกีฬา รวมถึงนิยมใช้เป็นสารเร่งเนื้อแดงในการเลี้ยงสุกรและโคขุน ซึ่งจะก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายกับผู้บริโภคได้ จึงได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาสารตกค้างในเนื้อสุกร ให้ได้วิธีที่ให้ความแม่นและความเที่ยงสูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย ซึ่งสูตรโครงสร้างของสารเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอลแสดงในภาพที่ 2



Salbutamol (SB), pK_a= 10.3



Clenbuterol (CB), pK_a= 9.6

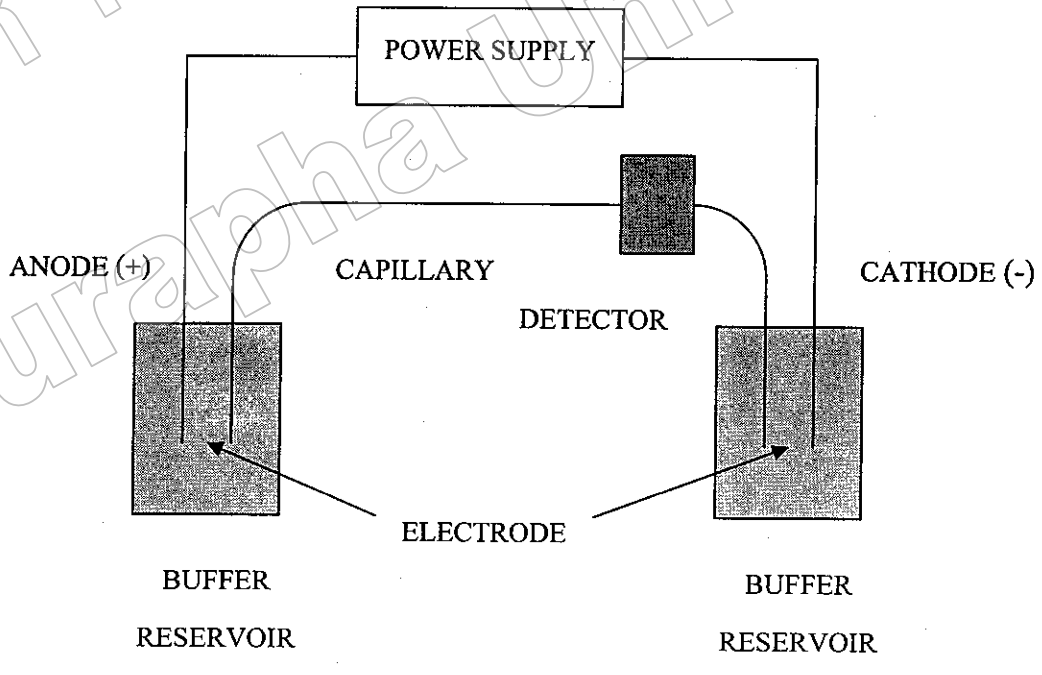
ภาพที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของสารซาลบูทามอลและเคลนบูเทอรอล

ทฤษฎีเทคนิคแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีส

แคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีสเป็นเทคนิคการแยกที่อาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของไอออนภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า เครื่องแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีส (แสดงดังภาพที่ 3) ประกอบด้วย 2 อิเลคโทรด (Electrode) คือขั้วอาโนด (Anode) ซึ่งเป็นขั้วบวกและขั้วคาโทด (Cathode) ซึ่งเป็นขั้วลบ เครื่องให้ศักย์ไฟฟ้า (High voltage power supply) แคปิลารี ภาชนะบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์และตัวตรวจวัด (Detector) ซึ่งวางอยู่ทางด้านขั้วคาโทด หลอดแคปิลารีโดยทั่วไปทำจากฟิวส์ซิลิกา (Fused silica) ปลายเปิดทั้งสองข้างมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประมาณ 50-200 ไมโครเมตร แคปิลารีคือสารซิลิกา ภายนอกเคลือบด้วยโพลีเอไมด์ (Polyimide) ภายในแคปิลารีบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์และปลายทั้งสองข้างจุ่มอยู่ในภาชนะที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ปลายของแคปิลารีด้านขั้วคาโทดระยะห่างจากปลายประมาณ 150-200 มิลลิเมตร จะเป็นตำแหน่งที่ติดตั้งเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้ ได้แก่ ตัวตรวจวัดยูวี เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้าทั้งสอง ทำให้เกิดอิเลคโทรออสโมติคโฟล (Electroosmotic flow, EOF) และอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตี (Electrophoretic mobility, μ_{ep}) ซึ่งทำให้สารเคลื่อนที่ภายในแคปิลารี ไอออนที่มีประจุบวกเคลื่อนที่ไปยังขั้วคาโทดด้วยแรงดึงดูดระหว่างประจุและอิเลคโทรออสโมติคโฟล โมเลกุลที่เป็นกลางเคลื่อนที่ไปพร้อมกับอิเลคโทรออสโมติคโฟล ไอออนที่มีประจุลบเคลื่อนที่ไปยังขั้วคาโทดด้วยอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตี ซึ่งเป็นแรงที่มีทิศทางตรงกันข้ามกับอิเลคโทรออสโมติคโฟล โมเลกุลจะถูกแยกภายในท่อแคปิลารีและเคลื่อนที่เข้าสู่ปลายด้านขั้วคาโทดของแคปิลารี ผ่านเครื่องตรวจวัดแล้วแสดงผลออกมาเป็นอิเลคโทรฟีโรแกรม (Electropherogram) ซึ่งถูกบันทึกโดยเครื่องบันทึกข้อมูล การนำสารเข้าสู่แคปิลารีมีหลายวิธี วิธีที่นิยมคือ การใช้ความดัน (Hydrodynamic injection) หรือการใช้ศักย์ไฟฟ้า (Electrokinetic injection)



ภาพที่ 3 ระบบของแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หลักการแยกพื้นฐานของเทคนิคแคปิลารีโซนอิเลคโทรโฟรีซีส

แคปิลารีโซนอิเลคโทรโฟรีซีสมีจุดมุ่งหมายเพื่อแยกโมเลกุลของสารที่มีจำนวนประจุหรือขนาดของประจุต่างกัน โดยอาศัยแรงอิเลคโทรออสโมติคโฟล เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าเข้าสู่แคปิลารี ประจุของโมเลกุลจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วอิเลคโทรดที่มีประจุตรงข้าม การแยกจะเกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลของสารตัวอย่างเคลื่อนที่ภายในท่อแคปิลารีด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน โมเลกุลจะเคลื่อนที่ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า ผลลัพธ์ขึ้นกับประจุสุทธิบนโมเลกุล ขนาดและรูปร่างโมเลกุล รวมทั้งผลจากแรงอิเลคโทรออสโมติคโฟลภายในแคปิลารี โดยแรงในการเคลื่อนที่ ซึ่งมีผลต่อการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของสารในสนามไฟฟ้ามีดังนี้

1. อิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตี เป็นการเคลื่อนที่ของสารที่เกิดจากแรงดึงดูดระหว่างไอออนกับขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงกันข้าม โดยแรงนี้ขึ้นอยู่กับประจุและขนาดของโมเลกุล โมเลกุลที่มีประจุสูงมีการเคลื่อนที่เร็วกว่าโมเลกุลที่มีประจุต่ำ และโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก

อิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตีสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 1 (Weinberger, 1993, p. 19)

$$\mu_{ep} = \frac{L_d / t_m}{V / L_t} \qquad (1)$$

เมื่อ

μ_{ep} คือ อิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตี ($cm^2V^{-1}sec^{-1}$)

L_d คือ ความยาวของแคปิลารีที่ใช้ในการแยก (cm)

L_t คือ ความยาวทั้งหมดของแคปิลารี (cm)

t_m คือ ไมเกรชันไทม์ (sec)

V คือ ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ (V)

2. อิเลคโทรออสโมติคโฟลเป็นการไหลของประจุของสารละลายภายในแคปิลารี ซึ่งเป็นผลจากการกระทำระหว่างประจุภายในพื้นผิวของท่อแคปิลารี ไอออนของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีประจุ และแรงดันไฟฟ้าที่ให้กับระบบ พื้นผิวภายในของแคปิลารีประกอบด้วยซิลิกา เมื่อถูกชะล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชสูง ๆ ค่าความต่างศักย์ซีต้า (Zeta potential, ξ) จำนวนน้อย ๆ ที่บริเวณพื้นผิวซิลิกา เหนี่ยวนำให้เกิดประจุลบจำนวนมากบนผิวซิลิกา ซึ่งเกิดจากการแตกตัวของหมู่ซิลินอล (-SiOH) บนพื้นผิวภายในแคปิลารี ประจุลบที่เกิดขึ้นจะรวมตัวกับประจุบวกของไอออนในสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อให้เกิดสภาวะที่เป็นกลาง ไอออนเหล่านี้รวมตัวกันเป็นสองชั้น (Double layer) ที่พื้นผิวของแคปิลารี เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าเข้าไปในแคปิลารี ชั้นของประจุบวกจะวิ่ง

เข้าหาขั้วลบของอิเลคโทรด ทำให้เกิดการไหลของบัฟเฟอร์ในทิศทางเดียวกันจากขั้วอาโนดไปยังขั้วคาโทด

อิเลคโทรออสโมติคโมบิลิตีของสารละลายตัวอย่าง สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 2 นอกจากนี้อิเลคโทรออสโมติคโฟลมีความสัมพันธ์กับความหนืดและความ เข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ดังแสดงในสมการที่ 3

$$\mu_{eof} = \frac{V_{eof}}{V_i} L \qquad (2)$$

เมื่อ

μ_{eof} คือ อิเลคโทรออสโมติคโมบิลิตีของสารละลายตัวอย่าง ($cm^2V^{-1}sec^{-1}$)

V_{eof} คือ ความเร็วอิเลคโทรออสโมติคของสารละลายตัวอย่าง ($cm\ sec^{-1}$)

V_i คือ ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ (V)

L คือ ความยาวของแคปิลารี (cm)

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \qquad (3)$$

สำหรับค่าศักย์ไฟฟ้าบริเวณดับเบิ้ลเลเยอร์ (Zeta potential, ζ) สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 4 (Tsuda, Nomura,& Nakagawa, 1982 cited in Weinberger, 1993)

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\varepsilon} \qquad (4)$$

ความหนาของชั้นดับเบิ้ลเลเยอร์ (δ) สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 5

$$\delta = \left[3 \times 10^7 |Z| C^{1/2}\right]^{-1} \qquad (5)$$

เมื่อ

μ_{eof} คือ อิเลคโทรออสโมติคโมบิลิตี ($cm^2V^{-1}sec^{-1}$)

ζ คือ ค่าศักย์ไฟฟ้าบริเวณดับเบิ้ลเลเยอร์ (V)

ε คือ ค่าคงที่ไดอิเลคตริคของสารละลายบัฟเฟอร์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

η คือ ความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ ($g\ cm^{-1}sec^{-1}$)

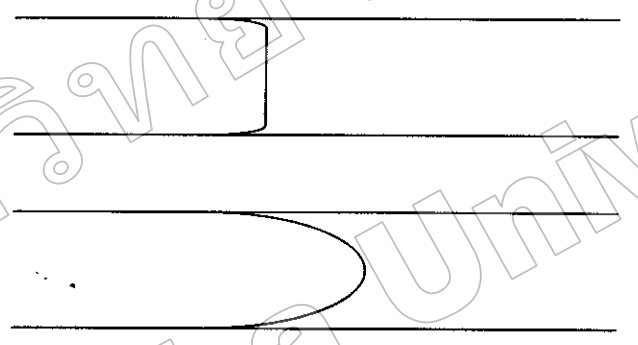
e คือ ประจุทั้งหมดในสารละลายต่อหน่วยพื้นที่

δ คือ ความหนาของดับเบิ้ลเลเยอร์

Z คือ จำนวนเวเลนซ์อิเลคตรอน

C คือ ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ($mole\ cm^{-3}$)

ลักษณะการเคลื่อนที่ภายในแคปิลารีมีลักษณะแบบ flat profile ดังแสดงในภาพที่ 4 (1) ซึ่งการเคลื่อนที่ลักษณะนี้ก่อให้เกิดการกระจายตัวของสารน้อย ทำให้มีประสิทธิภาพในการแยกดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่แบบ laminar ที่พบในเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ดังภาพที่ 4 (2)

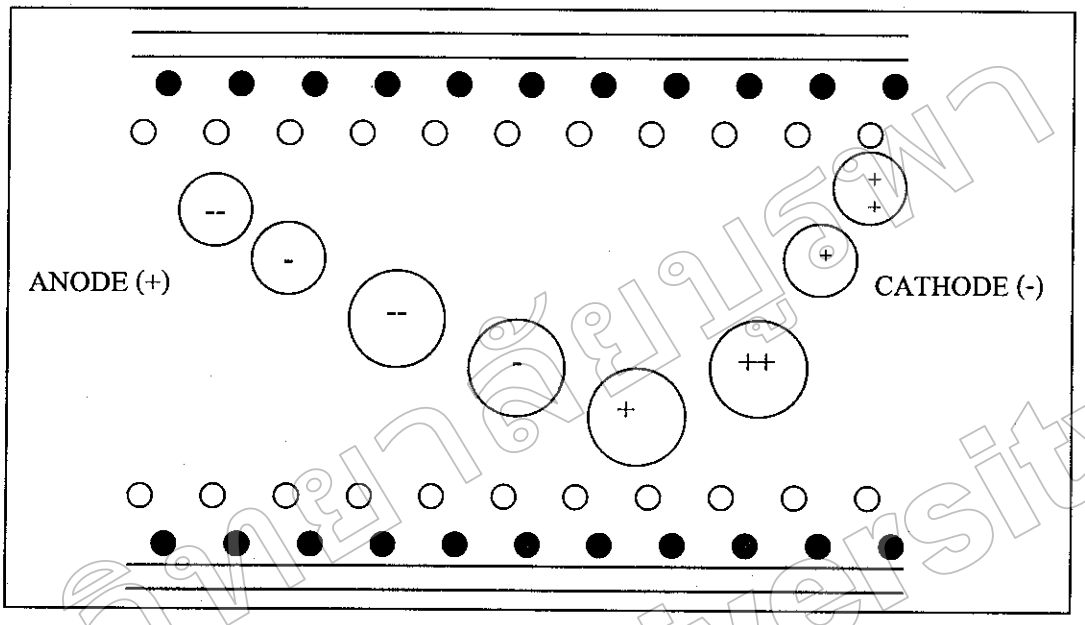


ภาพที่ 4 (1) การเคลื่อนที่แบบ electroosmotic flow ในเทคนิคแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีส
(2) การเคลื่อนที่แบบ laminar ในเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีและเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิดโครมาโทกราฟี

การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโมเลกุล เป็นผลรวมของการเคลื่อนที่ทั้งสองแบบคือ อิเลคโทรออสโมติคโฟลและอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตี การตรวจวัดเกิดขึ้นเมื่อสารละลายตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านตัวตรวจวัดซึ่งอยู่ที่ปลายขั้วคาโทด โดยทั่วไปอิเลคโทรออสโมติคโฟลมีค่ามากกว่าอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตี ทำให้โมเลกุลที่มีประจุบวกและโมเลกุลที่มีประจุลบเคลื่อนที่สู่ขั้วคาโทดซึ่งมีตัวตรวจวัด โมเลกุลที่มีประจุบวกจะมีแรงดึงดูดให้เคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วคาโทดร่วมกับอิเลคโทรออสโมติคโฟลซึ่งเคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วคาโทดเช่นเดียวกัน ทำให้ประจุบวกเคลื่อนที่ออกมาได้เร็วที่สุด จากนั้นจึงเป็นโมเลกุลที่เป็นกลางซึ่งเคลื่อนที่ด้วยอิทธิพลของอิเลคโทรออสโมติคโฟลเท่านั้น ส่วนโมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ด้วยแรงอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตี ในทิศทางตรงข้ามกับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อิเลคโทรออสโมติคโฟล ซึ่งจะมีแรงผลักโดยขั้วคาโทด ทำให้เคลื่อนที่ออกมาช้าที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การเคลื่อนที่ของโมเลกุลในแคปิลารีภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า

วิธีการนำสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารี

การนำสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารีสามารถจำแนกได้ 3 วิธี ดังนี้

1. การนำสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารีโดยใช้ความดัน (Hydrodynamic injection) ดังภาพ 6 (1) แสดงการนำสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารีโดยใช้หลักการความแตกต่างของความดัน ซึ่งวิธีนี้ทำโดยการจุ่มปลายด้านหนึ่งของแคปิลารีลงในภาชนะบรรจุสารละลายตัวอย่างและอีกด้านหนึ่งจุ่มอยู่ในภาชนะที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วทำการให้ความดันจนกระทั่งสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารีในปริมาณที่ต้องการจึงหยุดให้ความดัน ปริมาตรของสารตัวอย่างที่เข้าสู่แคปิลารีจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ใช้ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของแคปิลารี ความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ และความดันที่ใช้

ปริมาตรของสารตัวอย่างที่เข้าสู่แคปิลารีสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 6 (Shintani & Polonsky, 1997, p. 18)

$$V_i = \frac{\Delta P \pi r^4 t}{8 \eta L} \qquad (6)$$

เมื่อ

V_i คือ ปริมาตรของสารตัวอย่างที่เข้าสู่แคปิลารี (cm^3)

ΔP คือ ค่าความแตกต่างของความดัน (Pa)

r คือ รัศมีภายในของแคปิลารี (cm)

t คือ เวลาในการนำสารเข้าสู่แคปิลารี (sec)

η คือ ความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ (Pa sec)

L คือ ความยาวของแคปิลารี (cm)

2. การนำสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารีโดยใช้ความแตกต่างของระดับ (Hydrostatic injection) ดังภาพ 6 (2) แสดงการนำสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารีโดยใช้หลักการความแตกต่างของระดับ ซึ่งวิธีการนี้ทำโดยการจุ่มปลายด้านหนึ่งของแคปิลารีลงในภาชนะบรรจุสารละลายตัวอย่าง และอีกด้านหนึ่งจุ่มอยู่ในภาชนะที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นยกภาชนะด้านที่มีสารละลายตัวอย่างขึ้น เพื่อให้ปลายแคปิลารีที่จุ่มอยู่ในสารละลายตัวอย่างอยู่สูงกว่าปลายที่มีเครื่องตรวจวัด โดยอาศัยความแตกต่างของระดับความสูงทำให้สารตัวอย่างไหลเข้าสู่แคปิลารีด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก ปริมาณสารตัวอย่างที่เข้าสู่แคปิลารีจะขึ้นกับเวลาที่แคปิลารีจุ่มในสารละลายตัวอย่าง

ปริมาณของสารตัวอย่างที่เข้าสู่แคปิลารีสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 7 (Jandik & Bonn, 1993)

$$Q = \frac{\rho g \pi r^4 \Delta h t}{8 \eta L} C \qquad (7)$$

เมื่อ

Q คือ ปริมาณของสารตัวอย่างที่เข้าสู่แคปิลารี (mole)

ρ คือ ความหนาแน่นของสารละลายตัวอย่าง ($g\ cm^{-3}$)

h คือ ความแตกต่างของระดับความสูงของปลายแคปิลารีทั้งสองด้าน (cm)

g คือ ค่าคงที่แรงโน้มถ่วงของโลก ($9.81\ cm\ sec^{-1}$)

η คือ ความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ ($g\ cm^{-1}\ sec^{-1}$)

L คือ ความยาวของแคปิลารี (cm)

C คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง ($mole\ cm^{-3}$)

t คือ เวลาที่แคปิลารีจุ่มอยู่ในสารละลายตัวอย่าง (sec)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การนำสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารีโดยใช้ศักย์ไฟฟ้า (Electrokinetic injection) ดังแสดงในภาพที่ 6 (3) ซึ่งทำการนำสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารีโดยอาศัยความแตกต่างของศักย์ไฟฟ้า โดยการจุ่มปลายด้านหนึ่งของแคปิลารีลงในภาชนะบรรจุสารละลายตัวอย่าง และปลายอีกด้านหนึ่งจุ่มอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วทำการให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วไฟฟ้าทั้งสองด้านเป็นระยะเวลาสั้น ๆ ทำให้สารตัวอย่างเคลื่อนที่เข้าสู่แคปิลารี หลังจากสารตัวอย่างเคลื่อนที่เข้าสู่แคปิลารีให้ปลายแคปิลารีทั้งสองจุ่มอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์แล้วให้ศักย์ไฟฟ้าแก่ขั้วทั้งสอง ซึ่งทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของไอออนในสารตัวอย่างภายในแคปิลารีไปยังด้านที่มีตัวตรวจวัด ปริมาณของสารตัวอย่างที่เข้าสู่แคปิลารีจะขึ้นอยู่กับเวลาที่ให้ศักย์ไฟฟ้า ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้และอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตีของไอออนที่ต้องการวิเคราะห์

ปริมาณของสารตัวอย่างที่เข้าสู่แคปิลารีสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 8 (Rose & Jorgenson, 1988)

$$Q = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eof})\pi r^2 V t}{L} C \qquad (8)$$

เมื่อ

Q คือ ปริมาณของสารตัวอย่างที่เข้าสู่แคปิลารี (mole)

μ_{ep} คือ อิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตี ($cm^2 V^{-1} sec^{-1}$)

μ_{eof} คือ อิเลคโทรออสโมติคโมบิลิตี ($cm^2 V^{-1} sec^{-1}$)

r คือ รัศมีภายในของแคปิลารี (cm)

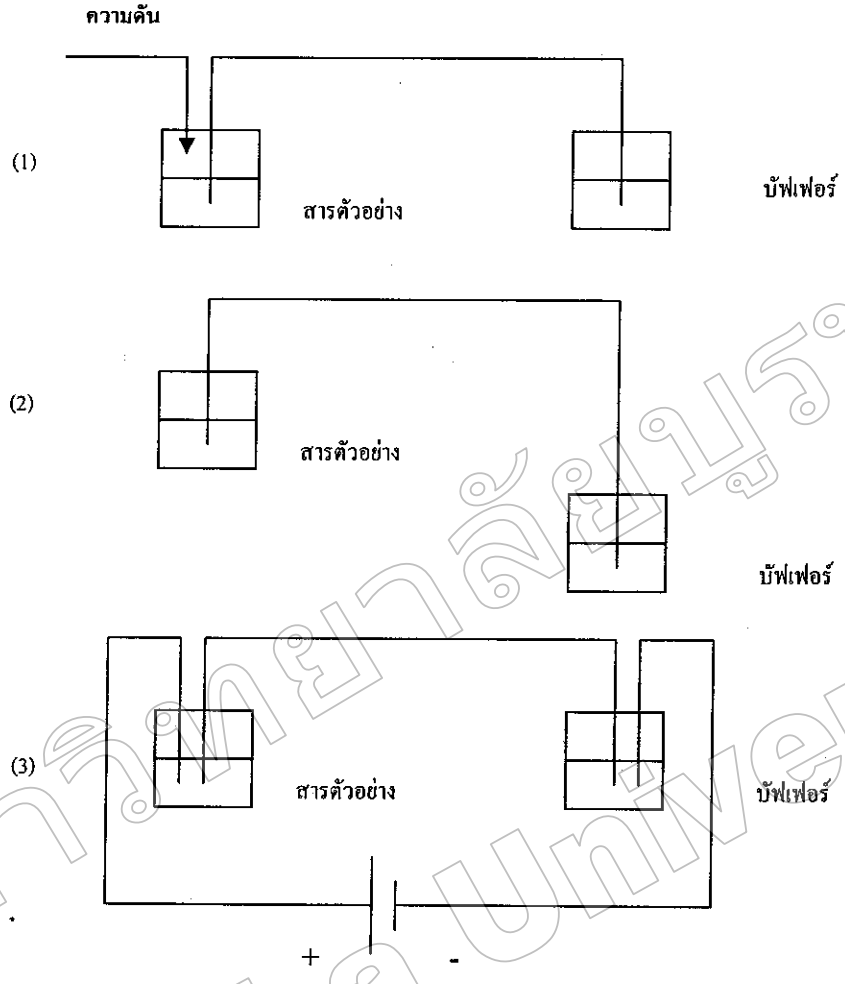
V คือ ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ (V)

L คือ ความยาวของแคปิลารี (cm)

C คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง (mole cm^{-3})

t คือ เวลาในการนำสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารี (sec)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 6 วิธีการนำสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารี

(1) ใช้ความดัน

(2) ใช้ความแตกต่างของระดับ

(3) ใช้ศักย์ไฟฟ้า

ประสิทธิภาพการแยกของเทคนิคแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีส สามารถอธิบายได้จากสมการ

$$N = \frac{\mu V}{2D} \qquad (9)$$

เมื่อ

N คือ จำนวนเพลททางทฤษฎี (Number of theoretical plates)

μ คือ ผลรวมของแรงอิเลคโทรโมบิลิตีและอิเลคโทรออสโมติคโมบิลิตี ($cm^2\ V^{-1}s^{-1}$)

V คือ ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก (V)

D คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (Diffusion coefficient) ของสาร (cm^2s^{-1})

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากสมการ (9) จะสังเกตได้ว่าการแยกสารขึ้นกับค่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้กับระบบ แต่ไม่ขึ้นกับความยาวของแคปิลารี และถ้าจำนวนเพลททางทฤษฎีมีค่ามาก แสดงว่าการแยกมีประสิทธิภาพสูง ดังนั้นการใช้ศักย์ไฟฟ้าสูง ๆ จะให้จำนวนเพลททางทฤษฎีมาก เนื่องจากการแยกเร็วขึ้นจะลดผลของการแพร่ สารเคลื่อนที่ด้วยความเร็วจะให้จำนวนเพลทที่สูงเช่นกันเพราะสารผ่านแคปิลารีโดยใช้เวลาน้อยจะลดเวลาในการแพร่ของสารลง และสารที่มีค่าสัมประสิทธิ์การแพร่น้อย ๆ จะให้ค่าประสิทธิภาพในการแยกดี ซึ่งการที่สารจะเคลื่อนที่ได้เร็วและมีค่าสัมประสิทธิ์การแพร่น้อย ๆ นั้นเป็นไปไม่ได้ เพราะว่าสารที่เป็นโมเลกุลขนาดเล็กจะมีการเคลื่อนที่ได้เร็ว แต่การแพร่ก็เกิดได้มาก ในขณะที่สารที่เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่เคลื่อนที่ได้ช้า แต่ก็เกิดการแพร่ได้น้อย ทำให้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีสไม่ว่าโมเลกุลจะขนาดเท่าใดก็สามารถให้ค่าประสิทธิภาพการแยกสูงสุดได้

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาเกี่ยวกับการแยก และการหาปริมาณสารอนุพันธ์ของไรโบฟลาวิน ในตัวอย่างอาหารและสารเร่งเนื้อแดง เช่น ซาลบูทามอล เคลนบูเทอรอล ในตัวอย่างต่าง ๆ เช่น เลือด ปัสสาวะ ตับ เนื้อแดงสุกร โคขุน สารจากธรรมชาติ หรือผลิตภัณฑ์ทางด้านเภสัชกรรมได้มีการศึกษามาบ้างดังรายละเอียดที่แบ่งเป็นงานวิจัย 2 ส่วนดังต่อไปนี้

การศึกษาในส่วนของสารไรโบฟลาวินและอนุพันธ์

ไบลิค และไซเบอร์ (Bilic & Sieber, 1990) ได้ทำการวิเคราะห์สารฟลาวินในผลิตภัณฑ์นมโดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ซึ่งเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซีโตไนไตรล์ 14% ใน 100 มิลลิโมลาร์ของสารโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4) ค่าพีเอชเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2.9 คอลัมน์ชนิดรีเวิร์สเฟสซี-18 (Reversed phase C-18) ความยาวคอลัมน์ 7.5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร สารที่ใช้บรรจุภายในคอลัมน์มีขนาด 3 ไมโครเมตร ตรวจวัดสารด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์ สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (Fluorescence spectrophotometer) ความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength, λ_{ex}) 450 นาโนเมตร ความยาวคลื่นตรวจวัด (Emission wavelength, λ_{em}) 530 นาโนเมตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าร้อยละของการกลับคืน (%Recovery) ของ FMN, FAD และ RF เท่ากับ 105.8, 99.7 และ 100.2% ตามลำดับ ปริมาณสารที่สามารถตรวจวัดได้ต่ำสุดสำหรับ FAD คือ 3 นาโนโมลต่อลิตร FMN และ RF คือ 2.5 นาโนโมลต่อลิตร

บาร์นา และดวอร์สแชค (Barna & Dworschak, 1994) ทำการตรวจวัดไธอามีน และไรโบฟลาวินในเนื้อและตับ โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ตรวจวัดด้วยยูวีดีเทคเตอร์ ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระบบการวิเคราะห์ประกอบด้วยคอลัมน์ ซี-18 ขนาด

ความยาว 150 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ 3 ไมโครเมตร การ์ดคอลัมน์ขนาดยาว 20 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ภายในบรรจุ ซี-18 ขนาด 10 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.01 โมลาร์ บัฟเฟอร์โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต พีเอช 3.0-อะซีโตไนไตร์ล (84 : 16 ปริมาตรต่อปริมาตร) และ 5 มิลลิโมลาร์โซเดียม เฮพเทนซัลโฟเนต สำหรับตัวอย่างเนื้อ และใช้อัตราส่วน 85 : 15 ปริมาตรต่อปริมาตร สำหรับตัวอย่างตับ ขีดจำกัดการตรวจวัดของไธอามีน และไรโบฟลาวินคือ 0.1 และ 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ร้อยละการกลับคืนของไธอามีน และไรโบฟลาวิน ในตัวอย่างเนื้อคือ 85% และ 71% ตามลำดับ ในตัวอย่างตับร้อยละการกลับคืนของไธอามีน และไรโบฟลาวินเท่ากับ 83% และ 89%

รัสเซล, บรูค และแมคเร (Russell, Brooks & McRae, 1998) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ในอาหาร โดยเปรียบเทียบเทคนิคการสกัดด้วยการสกัดที่ทำเองและใช้เครื่องมือ ทำการติดตามผลด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์ ความยาวคลื่นกระตุ้น 450 นาโนเมตร ความยาวคลื่นตรวจวัด 522 นาโนเมตร ระบบลิควิดโครมาโทกราฟีประกอบด้วยการ์ดคอลัมน์ขนาดยาว 5 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3 มิลลิเมตร ภายในบรรจุเรซินโพลีสไตรีนไดไวนิลเบนซีน คอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์ประกอบด้วยคอลัมน์รีเวิร์สเฟส 2 คอลัมน์ คอลัมน์แรกยาว 15 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร คอลัมน์ที่สองยาว 25 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ภายในบรรจุเรซินโพลีสไตรีนไดไวนิลเบนซีน ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย อะซีโตไนไตรล์ : 0.1% โซเดียม เอไซด์ ใน 10 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์ซิเตรท-ฟอสเฟต พีเอช 5.5 ใช้ระบบกราเดียนท์ 3 : 97 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ 0 นาที ที่เวลา 43 นาที ลิเนียร์กราเดียนท์ เป็น 6 : 94 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเปลี่ยนเป็น 14 : 86 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่เวลา 51 นาที และใช้ไอโซเครติกที่ 14 : 86 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จนถึงเวลา 70 นาที เปลี่ยนเป็นลิเนียร์กราเดียนท์ 3 : 97 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ 80 นาที และเปลี่ยนเป็นไอโซเครติกที่ 3 : 97 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จนถึง 90 นาที อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาทีในช่วงเวลา 0-43 นาที 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ในช่วงเวลา 43-80 นาที และเปลี่ยนเป็น 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ 90 นาที ซึ่งได้ผลค่าความเที่ยงของทั้งสองวิธีสกัดได้ผลเหมือนกัน และร้อยละการกลับคืนของทั้งสองวิธีอยู่ในช่วง 85-115%

กลิสซินสกา และโคสิโอโลวา (Gliszczynska & Koziolowa, 1998) ได้ทำการศึกษาการแยกอนุพันธ์ฟลาวินในตัวอย่างยีสต์ทำขนมปัง โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี เปรียบเทียบกับธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography, TLC) ระบบไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ประกอบด้วยคอลัมน์ชนิดซี-18 ความยาว 30 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่มี 3 ระบบดังนี้ ระบบที่ 1 ประกอบด้วย

เมทานอล–แอมโมเนียม ไฮโดรเจนคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 7.0 ใช้ระบบลิเนียร์กราเดียนท์ เมทานอล-แอมโมเนียม ไฮโดรเจนคาร์บอเนต (30 : 70) ที่ 0 นาทีและเปลี่ยนเป็น 80 : 20 ภายในเวลา 20 นาที อัตราการไหลเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ระบบที่ 2 ประกอบด้วย เมทานอล-แอมโมเนียมอะซีเตด (Ammonium acetate) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าพีเอช 6.0 ใช้เมทานอล-บัฟเฟอร์ (30 : 70 v/v) ภายใน 1 นาที และเปลี่ยนไปเป็น 70 : 30 ภายในเวลา 10 นาที ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ระบบที่ 3 ประกอบด้วย เมทานอล-น้ำ ใช้ระบบกราเดียนท์ (Gradient) : ไอโซเครติค (Isocratic) ใช้เมทานอล-น้ำ (30 : 70 v/v) ใน 1 นาที ใช้ลิเนียร์กราเดียนท์เปลี่ยนเป็น 80 : 20 ภายใน 4 นาที และไอโซเครติคที่ 80 : 20 ถึง 10 นาที ที่อัตราการไหลเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดสารด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์ดีเทคเตอร์ ความยาวคลื่นกระตุ้น 450 นาโนเมตร ความยาวคลื่นตรวจวัด 530 นาโนเมตร วิธีที่ 1 ไม่สามารถใช้ในการแยกสาร 10-ไฮดรอกซีเอทิลฟลาวิน (10-Hydroxyethylflavin, 10-HEF) และ 7α-ไฮดรอกซีไรโบฟลาวิน (7-Hydroxyriboflavin, 7α-HRF) เวลาที่ใช้แยกสาร RF, FAD และ FMN ทั้งหมด 21.45 นาที วิธีที่ 3 ไม่สามารถใช้แยกสาร FAD และ FMN ออกจากกัน ใช้เวลาในการวิเคราะห์ RF, FAD และ FMN ทั้งหมด 15.38 นาที วิธีที่ 3 สามารถแยกได้ทั้ง RF, FAD และ FMN เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมดประมาณ 13 นาที ค่าร้อยละของการกลับคืนของ RF, FAD และ FMN มีค่ามากกว่า 92%

แอนเดรส-ลาคูวา, แมททิวิ และโทนอน (Andress-Lacueva, Mattivi & Tonon, 1998) ได้ศึกษาการแยกของสาร FMN, FAD และ RF ในตัวอย่างไวน์และยีสต์ โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ใช้ระบบกราเดียนท์ คอลัมน์ชนิดซี-18 ความยาว 20 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.1 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ 5 ไมโครเมตร ปริมาตรสารที่ฉีด 20 ไมโครลิตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 2 ตัวทำละลายบัฟเฟอร์โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium dihydrogen phosphate, NaH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอช 3.0 และอะซีโตไนไตรล์ ตรวจวัดสารด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์ดีเทคเตอร์ ความยาวคลื่นกระตุ้น 265 นาโนเมตร ความยาวคลื่นตรวจวัด 525 นาโนเมตร เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด ประมาณ 7 นาที ปริมาณสารต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ของ RF, FAD และ FMN เท่ากับ 0.49, 1.97 และ 0.85 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าปริมาณสารต่ำสุดที่คำนวณได้ของ RF, FAD และ FMN เท่ากับ 1.72, 6.57 และ 2.80 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์มีค่ามากกว่า 0.99

คาโป-ชิชิ และคณะ (Capo-chichi & et.al., 2000) ได้ทำการวิเคราะห์สารไรโบฟลาวิน และอนุพันธ์ของไรโบฟลาวินในเลือด โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ระบบประกอบด้วยคอลัมน์รีเวิร์สเฟส ซี-18 ความยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคภายในคอลัมน์ 5 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 15 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียม อะซีเตท ค่าพีเอช 3.4 และ 15% อะซีโตไนไตรล์ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ระบบไอโซเครติก ตรวจวัดด้วยสเปคโตรฟลูออโรมิเตอร์ ความยาวคลื่นกระตุ้น 445 นาโนเมตร ความยาวคลื่นตรวจวัด 530 นาโนเมตร การสกัดตัวอย่างได้ค่าร้อยละการกลับคืนของ FAD, FMN, GF (กาแลคโตฟลาวิน) และ RF เท่ากับ 101.0±5.6, 97.0±6.5, 97.0±2.0 และ 95.0±4.1% และปริมาณ FAD, FMN และ RF ในตัวอย่างเลือดของเด็กทารก อยู่ในช่วง 53.5-108.2, 9.0-25.1 และ 12.7-53.4 นาโนโมลาร์ และในผู้ใหญ่อยู่ในช่วง 36.5-157.2, 7.1-24.6 และ 8.2-57.8 นาโนโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่ง GF ใช้เป็น Internal standard เพื่อพัฒนาการหาปริมาณของวิตามินบีสองและอนุพันธ์

แมททิวิ, มอเนททิ, วะฮอฟเซค, โทนอน และลาคูวา (Mattivi, Monetti, Vrhovsek, Tonon & Lacueva, 2000) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของสารไรโบฟลาวินในไวน์ขาว 85 ตัวอย่าง จากแหล่งผลิต 3 ประเทศ (อิตาลี, สเปน และสโลวาเนีย) โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ซึ่งระบบประกอบด้วยคอลัมน์ ซี-18 ขนาดความยาวเท่ากับ 200 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.1 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคที่บรรจุภายในคอลัมน์ คือ 5 ไมโครเมตร อุณหภูมิที่ใช้เท่ากับ 22 องศาเซลเซียส และพรีคอลัมน์ (Pre-column) ขนาดความยาว 20 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.1 มิลลิเมตร ภายในบรรจุอนุภาคชนิดเดียวกับคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร ทำการตรวจวัดสารด้วยเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์ ความยาวคลื่นกระตุ้น 265 นาโนเมตร ความยาวคลื่นตรวจวัด 525 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลายเอ คือ บัฟเฟอร์โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ค่าพีเอช 3.0 และตัวทำละลายบี คือ อะซีโตไนไตรล์ ทำการทดลองด้วยระบบกราเดียนท์ 0-8 นาที ใช้ เอ-บี (95 : 5 v/v) 8-12 นาทีใช้ เอ-บี (75 : 25 v/v) นาทีที่ 12 ใช้ เอ-บี (95 : 5 v/v) เป็นเวลา 3 นาที อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าปริมาณสารต่ำสุดที่คำนวณได้ของ RF คือ 1.72 ไมโครกรัมต่อลิตร เวลาในการวิเคราะห์ 8 นาที ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณ RF ที่พบในตัวอย่างไวน์ขาว เท่ากับ 98.63 ไมโครกรัมต่อลิตร และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงถึง 41.91 ไมโครกรัมต่อลิตร

โมเรโน และซาลวาโด (Moreno & Salvado, 2000) ได้ศึกษาการหาปริมาณวิตามินที่ละลายในน้ำ และวิตามินที่ละลายในไขมันรวม 8 ชนิดในตัวอย่างวิตามินรวม โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ตรวจวัดด้วยยูวีดีเทคเตอร์ ระบบประกอบด้วยคอลัมน์

ซี-18 ความยาวคอลัมน์ 150 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3.9 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 4 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่สำหรับวิตามินละลายน้ำประกอบด้วย 0.05 โมลาร์ แอมโมเนียมอะซีเตท (ตัวทำละลายเอ)-เมทานอล (ตัวทำละลายบี) ใช้ระบบกราเดียนท์ดังนี้ ในช่วง 0-1.5 นาที 92.5 : 7.5 ที่ 1.6 นาที 84 : 16 ที่เวลา 15 นาที 70 : 30 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร ยกเว้นวิตามินบี 12 ตรวจวัดที่ 362 นาโนเมตร ในส่วนของวิตามินละลายในไขมันใช้เฟสเคลื่อนที่ เมทานอล- เมทิลไซยาไนด์ (95 : 5 ปริมาตรต่อปริมาตร) อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 285 นาโนเมตร ใช้เวลาในการแยกทั้งหมดประมาณ 15 นาที ความแม่นของการวิธีวิเคราะห์ทดสอบโดยดูค่าร้อยละการกลับคืน ซึ่งอยู่ในช่วง 78-116% ขีดจำกัดการตรวจวัดของวิตามินบี1, บี2, บี6, บี12, เอ, ดีและอี เท่ากับ 3.18, 1.84, 1.37, 0.04, 5.00, 0.05 และ 3.09 มิลลิกรัมต่อลิตร

กลิสซินสกา-สวิงโล และโคซิโอโลวา (Gliszczynska-Swinglo & Koziolowa, 2000) ได้ศึกษาการแยกของไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ 9 ชนิดในไข่, นม, โยเกิร์ต และตับ โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ซึ่งมีวิธีแตกต่างกัน 3 วิธีชะล้าง และคอลัมน์ต่างกัน 2 รูปแบบ คือ วิธีที่ 1 เฟสเคลื่อนที่ใช้ระบบกราเดียนท์ ประกอบด้วยเมทานอล-แอมโมเนียมอะซีเตด ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอช 6.0 ใช้คอลัมน์อัลฟาบอนด์ ซี-18 (Alphabond C-18) ความยาวคอลัมน์ 300 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ 10 ไมโครเมตร วิธีนี้ไม่สามารถวิเคราะห์สาร 7 อัลฟา-ไฮดรอกซีไรโบฟลาวิน (7α-Hydroxyriboflavin, 7α-HRF) วิธีที่ 2 เฟสเคลื่อนที่ระบบกราเดียนท์ ประกอบด้วย เมทานอล-น้ำ ใช้คอลัมน์อัลฟาบอนด์ ซี-18 ขนาดเท่ากับคอลัมน์ที่ใช้ในวิธีที่ 1 วิธีนี้สามารถทำการแยกโคเอนไซม์ฟลาวินจากสารประกอบฟลาวินอื่น ๆ ได้ รวมทั้งวิเคราะห์ 7α-HRF และ 10-HEF ในตัวอย่างได้ วิธีที่ 3 เฟสเคลื่อนที่ระบบกราเดียนท์ ประกอบด้วย เมทานอล-แอมโมเนียมอะซีเตด ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ใช้คอลัมน์ ซิมเมตตรี ซี-18 (Symmetry C-18) คอลัมน์ความยาว 150 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3.9 มิลลิเมตรระบบนี้สามารถแยกสารฟลาวินในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด ทำการตรวจวัดสารด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์ดีเทคเตอร์ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 450 นาโนเมตร ความยาวคลื่นตรวจวัด 530 นาโนเมตร เวลาที่ใช้ในการแยกสาร RF, FAD และ FMN คือ 10.74, 5.27 และ 7.05 นาที ร้อยละของการได้กลับคืนของ RF, FAD และ FMN มีค่ามากกว่า 95%

คาทาลดี, นาดิเอโล, สคาโน และสโคปา (Cataldi, Nardiello, Scrano & Scopa, 2002) ศึกษาการตรวจวัดสาร FMN, FAD และ RF ในตัวอย่างไวน์ด้วยเทคนิคแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีสและทำการตรวจวัดด้วยเลเซอร์อินดิวซ์ฟลูออเรสเซนซ์ (Laser-induced fluorescence detector, LIF)

ใช้แคปิลารีชนิดฟิวส์ซิลิกาที่ไม่ผ่านการเคลือบ ความยาวทั้งหมด 92 เซนติเมตร ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง 75 ไมโครเมตร อุณหภูมิของแคปิลารี 15 องศาเซลเซียส ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก 30 กิโลโวลต์ นำตัวอย่างเข้าสู่ระบบโดยใช้ความดัน 54 มิลลิบาร์เป็นเวลา 10 วินาที ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอชของบัฟเฟอร์เท่ากับ 9.8 ความสามารถในการตรวจวัดต่ำสุดสำหรับ RF เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร FMN เท่ากับ 4.0 ไมโครกรัมต่อลิตร และ FAD เท่ากับ 6.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ค่าร้อยละการกลับคืนของสารไรโบฟลาวินในไวน์ให้ค่ามากกว่า 95%

คาทาลดี, นาดิเอโล, เบเนเดตโต และบูโฟ (Cataldi, Nardiello, Benedetto & Bufo, 2002) ได้ทำการศึกษาการแยกสาร RF, FAD และ FMN โดยเทคนิคแคปิลารีโซนอิเลคโทรโฟรีซีส ระบบประกอบด้วยแคปิลารีฟิวส์ซิลิกาขนาดความยาวถึงเครื่องตรวจวัด เท่ากับ 84 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร นำสารเข้าสู่ระบบโดยใช้ความดัน 54 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 10 วินาที อุณหภูมิแคปิลารี 15 องศาเซลเซียส ใช้ศักย์ไฟฟ้า 30 กิโลโวลต์ บัฟเฟอร์ประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟต ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอช 9.8 ตรวจวัดสารด้วยเครื่องตรวจวัดเลเซอร์-อินดิวซ์ ฟลูออเรสเซนส์ ความยาวคลื่นกระตุ้น 442 นาโนเมตร ความยาวคลื่นตรวจวัดมากกว่า 515 นาโนเมตร เวลาที่ใช้แยกสารน้อยกว่า 13 นาที ค่าช่วงของความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดของ RF, FAD และ FMN คือ 0.5-350 ไมโครกรัมต่อลิตร, 6-280 ไมโครกรัมต่อลิตรและ 4-350 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณสารต่ำสุดที่ตรวจวัดได้คือ 0.5, 6.0 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน คือ 2.6, 1.9 และ 2.6 ตามลำดับ

ซู และลิน (Su & Lin, 2003) ได้ศึกษาการวิเคราะห์หาสารไรโบฟลาวินในปัสสาวะโดยเทคนิคแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีสร่วมกับเทคนิคสแตคกิง (Stacking) ซึ่งระบบประกอบด้วยแคปิลารีฟิวส์ซิลิกาความยาวทั้งหมด 71 เซนติเมตร ความยาวถึงเครื่องตรวจวัด เท่ากับ 65 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ 18 กิโลโวลต์ บัฟเฟอร์ประกอบด้วย โซเดียมเตตระบอเรตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตความเข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอช 9.2-9.3 ตัวอย่างเตรียมในสารละลายโซเดียมเตตระบอเรต ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ระบบสแตคกิงนำสารเข้าสู่ระบบโดยวิธีไฮโดรไดนามิค เวลา 90 วินาที ความยาว 54 มิลลิเมตร ตรวจวัดสารด้วยเครื่องบลูไลท์ อีมิทติง ไดโอด-อินดิวซ์ ฟลูออเรสเซนส์ (Blue light emitting diode-induced fluorescence) ความยาวคลื่นประมาณ 467 นาโนเมตร ได้ค่าปริมาณสารต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9999 สำหรับระบบแยกแบบปกติ ใช้วิธีไฮโดรไดนามิคในการนำสารเข้าสู่ระบบเป็นเวลา 3 วินาที ความยาว 2 มิลลิเมตร ค่าปริมาณสารต่ำสุดที่ตรวจวัดเท่ากับ 0.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ เท่ากับ 1.0 ใช้เวลาในการแยก 6.5 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การศึกษาในส่วนของสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์

ลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ (2544) ทำการศึกษาวิธีตรวจวัดสารซาลบูทามอลที่ตกค้างอยู่ในตัวอย่างเนื้อ ตับ และไตสุกร โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ทำการตรวจวัดสารด้วยเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 226 นาโนเมตร ความยาวคลื่นตรวจวัด 310 นาโนเมตร ได้ค่าร้อยละของการกลับคืนอยู่ในช่วง 73.5-86.0 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, RSD) อยู่ในช่วง 0.8-6.3 ปริมาณสารต่ำสุดที่คำนวณได้ เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในตัวอย่างเนื้อ ส่วนในตัวอย่างตับและไตสุกรได้ค่าร้อยละของการกลับคืนอยู่ในช่วง 63.0-82.0 และ 62.8-80.3 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 2.4-8.1 และ 5.2-10.6 ตามลำดับ ตับและไตสุกรมีค่าปริมาณต่ำสุดที่คำนวณได้เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ใช้เวลาในการแยกสารประมาณ 10 นาที

มาล์คคี และแทมมิลอิทโต (Malkki & Tammilehto, 1990) ได้ทำการศึกษาการสลายตัวของซาลบูทามอลซัลเฟต (อัลบูเทอรอลซัลเฟต) โดยศึกษาผลของค่าพีเอช, อุณหภูมิและความเข้มข้นของสารละลายซาลบูทามอล ทำการศึกษาค่าพีเอชในช่วง 1.9-8.8 ซึ่งการสลายตัวของซาลบูทามอลซัลเฟตจะสังเกตการตกตะกอน อุณหภูมิทำการศึกษาในช่วง 55-85 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเริ่มต้นของซาลบูทามอลทำการศึกษาในช่วง 0.018-0.072 โมลาร์ โดยทำการตรวจวัดการสลายตัวโดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ตรวจวัดด้วยยูวีดีเทคเตอร์ที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร คอลัมน์ชนิดรีเวิร์สเฟส ซี-18 ขนาดความยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร อนุภาคที่บรรจุภายในคอลัมน์มีขนาด 10 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซีโตไนไตรล์ และ 0.02 โมลาร์ โซเดียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 3.0 ไตรเอทิลลามีน 750 ไมโครลิตรต่อบัฟเฟอร์ 1 ลิตร (3 : 97 ปริมาตร/ปริมาตร) ได้ผลการทดลองดังนี้ ค่าพีเอชที่สารซาลบูทามอลเสถียรที่สุดคือ 3.5 การเพิ่มอุณหภูมิมีผลเพิ่มการสลายตัวและการเพิ่มความเข้มข้นเริ่มต้นมีผลเพิ่มการสลายตัวของสารซาลบูทามอล

แอคเคอร์มานส์, เบกเคอร์, เอเวอเรทส์ และซีเรน (Ackermans, Beckers, Everaerts & Seelen, 1992) ได้ทำการเปรียบเทียบเทคนิคไอโซแทคโคโฟรีซีส (Isotaccophoresis, ITP) เทคนิคแคปิลารีโซนอิเลคโทรโฟรีซีสและเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี สำหรับการวิเคราะห์สารซาลบูทามอล, เทอบูทาลีนซัลเฟต (Terbutaline sulphate) และฟีโนเทอรอลไฮโดรโบรไมด์ (Fenoterol hydrobromide) ในยาเม็ด ระบบไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีประกอบด้วยคอลัมน์ชนิดซี-18 ขนาดความยาว 125 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ 5 ไมโครเมตร ตรวจวัดสารด้วยเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย น้ำ-เมทานอล (60 : 40) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.002 โมลาร์ และกรดเฮกซาโนอิก (Hexanoic acid) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์

อัตราการไหลเท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้เวลาในการแยกสาร 6 นาที ปริมาณสารต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 7.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระบบ CZE ประกอบด้วยแคปิลารีขนาดความยาวทั้งหมด 57 เซนติเมตร ความยาวถึงเครื่องตรวจวัด 50 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร อุณหภูมิแคปิลารี 25 องศาเซลเซียส นำสารเข้าสู่ระบบโดยใช้ความดันเป็นเวลา 5 วินาที ตรวจวัดสารด้วยเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับเป็นแบคกราวน์ คือ ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) อะมีโนมีเทน [Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Tris] ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ค่าพีเอช 5.0 เวลาในการวิเคราะห์สารคือ 9 นาที ปริมาณสารต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 6.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระบบ ITP ตรวจวัดสารด้วยยูวีดีเทคเตอร์ และคอนดัคติวิตี (Conductivity) นำสารเข้าสู่ระบบโดยใช้เข็มฉีดปริมาตร 3 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2 อิเลคโทรไลท์ คือ ระบบที่ 1 อิเลคโทรไลท์นำ (Leading electrolyte) ประกอบด้วย ฮีสทิดีน (Histidine) 0.01 โมลาร์ ค่าพีเอชเท่ากับ 4.75 ระบบที่ 2 อิเลคโทรไลท์นำประกอบด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.75 ใช้เวลาในการแยกสาร 30 นาที ปริมาณสารต่ำสุดที่ตรวจวัดได้สำหรับเครื่องตรวจวัดคอนดัคติวิตีเท่ากับ 41.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสำหรับยูวีดีเทคเตอร์เท่ากับ 58.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

อัลเทรีย (Altria, 1993) ทำการตรวจหาสารเจือปนของสารซาลบูทามอลในตัวอย่างยาเม็ด โดยใช้เทคนิคแคปิลารีโซนอิเลคโทรโฟรีซีส ซึ่งประกอบด้วยฟิวส์ซิลิกาแคปิลารี ความยาวทั้งหมด 57 เซนติเมตร ความยาวถึงเครื่องตรวจวัด 50 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 7.5 ไมโครเมตร ตรวจวัดสารด้วยเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร ใช้ศักย์ไฟฟ้า 30 กิโลโวลต์ อุณหภูมิแคปิลารี 25 องศาเซลเซียส บัฟเฟอร์ที่ใช้ประกอบด้วยโซเดียมซิเตรท ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอชบัฟเฟอร์เท่ากับ 2.5 ใช้เวลาในการแยกสารประมาณ 10 นาที ค่าร้อยละของความแปรปรวนน้อยกว่า 2

มาล์คคี-เลน, พูรรา, แคโคเน็น และแทมมิลอิทโต (Malkki-Laine, Purra, Kahkonen & Tammilehto, 1995) ได้ทำการศึกษาผลของชนิดของบัฟเฟอร์, ค่าพีเอช, ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ และสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีผลต่อการสลายตัวของสารละลายซาลบูทามอล วิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี คอลัมน์รีเวิร์สเฟส ซี-18 ขนาดคอลัมน์ยาว 125 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคภายในคอลัมน์ 5 ไมโครเมตร ตรวจวัดด้วยระบบโฟโต-ไดโอดแอเรย์ เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย อะซีโตไนไตรล์, โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 40 มิลลิโมลาร์ และไตรเอททิลลามีน 5.74 มิลลิโมลาร์ พีเอชบัฟเฟอร์ 3.0 อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาทีโดยศึกษาบัฟเฟอร์สารซาลบูทามอลที่เตรียมในบัฟเฟอร์อะซีเตท, ซิเตรท, ฟอสเฟต และบริททอน-โรบินสันบัฟเฟอร์ พบว่าการสลายตัวของสาร

ซาลบูทามอลในบัฟเฟอร์ซิเตรทจะสลายตัวเร็วกว่าในฟอสเฟตและอะซีเตท เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซิเตรทจะเพิ่มการสลายตัวมากขึ้น ทดสอบผลของพีเอชโดยศึกษาในซิเตรทที่พีเอช 2-6 ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส พบว่าซาลบูทามอลเสถียรที่สุดที่พีเอช 3 ผลการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ และโซเดียมไบซัลไฟท์ มีผลกระทบต่อความเสถียรเล็กน้อย และเมื่อทดสอบสารละลายซาลบูทามอลที่พีเอช 3 โดยให้ความร้อน 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ไม่พบการสลายตัวของสารซาลบูทามอล

คาร์ดักซี, ลูแคนจิโอลิ, โรดริกูซ และโอเทโร (Carducci, Lucangioli, Rodriguez & Otero, 1996) ได้ทำการศึกษาสารเคลนบูเทอรอลและเลโวไธรอกซินในยาเม็ด โดยเทคนิคแคปิลารีโซนอิเลคโทรโฟรีซีส ซึ่งประกอบด้วยฟิวส์ซิลิกาแคปิลารี ความยาวทั้งหมด 60 เซนติเมตร ความยาวถึงเครื่องตรวจวัด 53 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ตรวจวัดสารด้วยเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร ใช้ศักย์ไฟฟ้า 16 กิโลโวลต์ อุณหภูมิแคปิลารี 25 องศาเซลเซียส สารละลายบัฟเฟอร์ประกอบด้วย 30 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.7 ใช้เวลาในการแยกสารประมาณ 5 นาที ได้ค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยมากกว่า 94.0% จากกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีกของเคลนบูเทอรอลและเลโวไธรอกซิน (Levothiroxin) เป็นเส้นตรงในช่วง 0.5-80.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.0-30.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

มาลค์คี-เลน และฮาร์ทิไคเนน (Malkki-Laine & Hartikainen, 1996) ทำการศึกษาสารซาลบูทามอลและสารที่เกิดจากการสลายตัวของซาลบูทามอล โดยใช้เทคนิคไมเซลลาร์อิเลคโทรไคเนติกแคปิลารีโครมาโทกราฟี (Micellar electrokinetic chromatography, MECC) ซึ่งประกอบด้วยฟิวส์ซิลิกาแคปิลารีความยาวทั้งหมด 57 เซนติเมตร ความยาวถึงเครื่องตรวจวัด 50 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 ไมโครเมตร ตรวจวัดสารด้วยเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร ใช้ศักย์ไฟฟ้า 16 กิโลโวลต์ อุณหภูมิแคปิลารี 25 องศาเซลเซียส บัฟเฟอร์ประกอบด้วย ซิทริลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ [*N*-cetyl-*N,N,N*-trimethylammonium bromide (CTAB)] ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมเตตระบอเรตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ เท่ากับ 7.6 ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมดประมาณ 15 นาที ค่าร้อยละการกลับคืนของซาลบูทามอลเท่ากับ 100.5 ค่าร้อยละของความแปรปรวนน้อยกว่า 2.3

กอนซาเลซ และคณะ (Gonzalez et al., 1997) ได้ทำการศึกษาการวิเคราะห์สารเคลนบูเทอรอลที่ตกค้างในตับวัวในฟาร์มที่มีการให้ยา โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ตรวจวัดด้วยแมสสเปคโตรเมตรีของอนุพันธ์ไตรเมทิลไซลิลของเคลนบูเทอรอล ใช้เทคนิคการสกัดด้วย

2 เฟส พบว่าสารละลายที่เหมาะสมสำหรับการทำโฮโมจีไนซ์ตับคือ แบเรียม ไฮดรอกไซด์-แบเรียม คลอไรด์บัฟเฟอร์ ตัวทำละลายที่เหมาะสมกับการสกัดคือ t-บิวทิลเมทิล อีเทอร์ สกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วิธีการสกัดโดยใช้แบเรียมบัฟเฟอร์สามารถเพิ่มร้อยละการกลับคืนเป็น 99.3% รวมถึงการทำอนุพันธ์เพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวัดมากขึ้น ได้ขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการวัดปริมาณ ต่ำถึง 250 พีพีทีและ 500 พีพีที ตามลำดับ

ลอเรนซ์ และเมนาร์ด (Lawrence & Menard, 1997) ได้ศึกษาการหาปริมาณเคลนบูเทอรอลในตับวัวและเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เตรียมตัวอย่างโดยทำการสกัดด้วยกรดให้โปรตีนตกตะกอน แล้วนำสารละลายผ่านเฟสของแข็งชนิดแลกเปลี่ยนไอออนบวก จากนั้นผ่านด้วยเฟสของแข็งชนิด Immunoaffinity วิเคราะห์โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ระบบประกอบด้วยคอลัมน์ ซี-18 ความยาวคอลัมน์ 15 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3.9 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 10 มิลลิโมลาร์ กรดอะซิติก-บัฟเฟอร์แอมโมเนียม อะซีเตท พีเอช 4.6–เมทานอล ใช้ระบบลิเนียร์กราเดียนท์ เพิ่ม 30% จนถึง 70% เมทานอล ในช่วงเวลา 5 นาที อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร ขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.3 นาโนกรัมต่อกรัม ร้อยละการกลับคืนของเคลนบูเทอรอลในตัวอย่างตับวัวและกล้ามเนื้อ เมื่อเติมสารเคลนบูเทอรอล 2 และ 5 นาโนกรัมต่อกรัม เท่ากับ 63±11% (ช่วง 53-74%) ร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐาน (30 นาโนกรัม) คือ 70±5% เวลาในการวิเคราะห์ 5 นาที ข้อดีของการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีนี้คือใช้เวลาน้อย เพิ่มความจำเพาะในการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์สารปริมาณน้อยได้ถึงช่วง 1-5 นาโนกรัมต่อกรัม

เอสควิซาเบล และคณะ (Esquisabel et al., 1997) ได้ศึกษาการแยกอิแนนทิโอเมอร์ของสารซาลบูทามอลในยาเม็ด โดยเทคนิคแคปิลารีโซนอิเลคโทรโฟรีซีส โดยเติมไซโคลเด็กซทริน (Cyclodextrin) ในบัฟเฟอร์เพื่อทำหน้าที่แยกไครัล ระบบประกอบด้วยฟิวส์ซิลิกาแคปิลารี ความยาวทั้งหมด 48.5 เซนติเมตร ความยาวถึงเครื่องตรวจวัด 40 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 ไมโครเมตร ทำการตรวจวัดสารด้วยไดโอด แอเรย์ ดีเทคเตอร์ (Diode array detector) ใช้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ 15 กิโลโวลต์ อุณหภูมิแคปิลารีเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส บัฟเฟอร์ประกอบด้วย เฮปตะคิส (2,6-ได-ออร์โท-เมทิล) -เบต้า-ไซโคลเด็กซทริน [heptakis(2,6-di-*O*-methyl)-β-cyclodextrin] ใน 40 มิลลิโมลาร์ ทริส (Tris) พีเอชบัฟเฟอร์เท่ากับ 2.5 เวลาที่ใช้ในการแยกสารประมาณ 14 นาที

นธการกิตกุล (Natakankitkul, 1997) ศึกษาการแยกอิแนนทิโอเมอร์ของเคลนบูเทอรอล โดยใช้เทคนิคแคปิลารี อิเลคโทรโฟรีซีส โดยใช้ไฮดรอกซีโพรพิล-เบต้า-ไซโคลเด็กซทริน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(HP-β-CD) เป็นตัวเลือกไครัล (Chiral selector) ระบบประกอบด้วยฟิวส์ซิลิกาแคปิลารี ความยาวทั้งหมด 32 เซนติเมตร ความยาวถึงเครื่องตรวจวัด 24.5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 50 ไมโครเมตร ตรวจวัดสารด้วยเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร ใช้ศักย์ไฟฟ้า 16 กิโลโวลต์ อุณหภูมิแคปิลารี 25 องศาเซลเซียส บัฟเฟอร์ประกอบด้วย 0.03 โมลาร์ ไฮดรอกซีโพรพิล-เบต้า-ซัยโคลเด็กซตริน ใน 0.05 โมลาร์ บอเรตบัฟเฟอร์/ฟอสเฟต (Borate/Phosphate) ค่าพีเอชของบัฟเฟอร์เท่ากับ 5.0 ใช้เวลาในการแยกสาร 3.5 นาที ประสิทธิภาพของการแยกพีกสาร (Resolution, R_s) มีค่าเท่ากับ 2.9

กอซเซพอลและบลาส์ค (Gausepohl & Blaschke, 1998) ได้ทำการแยกสเตอริโอไอโซเมอร์ (Stereo isomer) ของสารเคลนบูเทอรอลจากปัสสาวะ โดยเทคนิคแคปิลารีโซนอิเลคโทรโฟรีซีส ซึ่งประกอบด้วยฟิวส์ซิลิกาแคปิลารี ความยาวทั้งหมด 48.5 เซนติเมตร ความยาวถึงเครื่องตรวจวัด 40 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 360 ไมโครเมตร ตรวจวัดสารด้วยเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ใช้ศักย์ไฟฟ้า 20 กิโลโวลต์ อุณหภูมิแคปิลารี 20 องศาเซลเซียส สารละลายบัฟเฟอร์ประกอบด้วยกรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) ค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ เท่ากับ 3.3 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของไฮดรอกซีเอทิล-เบต้า-ไซโคลเด็กซทรินเป็นสารที่ทำหน้าที่แยกไครัล ใช้เวลาในการแยกสารทั้งหมด 15 นาที ได้ค่าปริมาณต่ำสุดที่คำนวณได้ เท่ากับ 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

คูล, บอสแมน, แฟรง และซีว (Koole, Bosman, Franke & Zeeuw, 1999) ได้ทำการศึกษาการวิเคราะห์สารเบต้า-อะโกนิสต์ 4 สาร (เคลนบูเทอรอล, บรอมบูเทอรอล, มาบูเทอรอล และมาเพนเทอรอล) ในปัสสาวะคนและวัว สกัดสารด้วยการใช้เฟสของแข็งผสม หรือใช้ Immunoaffinity Chromatography (IAC) ร่วมกับการสกัดด้วยเฟสของแข็งผสม สารสกัดจะถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดไฟฟ้าเคมี ระบบประกอบด้วยคอลัมน์รีเวิร์สเฟส เฟสเคลื่อนที่บัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 และสารที่ทำ Ion-pair ผลการทดลองเมื่อไม่ใช้ขั้นตอน IAC จะได้ร้อยละการกลับคืนสูงกว่าเมื่อใช้ IAC (90-105% และ 65-75%) เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 25 นาที ขีดจำกัดการตรวจวัดของสารเคลนบูเทอรอล เท่ากับ 100 พิโคกรัม บรอมบูเทอรอล เท่ากับ 250 พิโคกรัม มาบูเทอรอลและมาเพนเทอรอล เท่ากับ 500 พิโคกรัม

ศรีชนะ และซื่อดี (Srichana & Suedee, 2000) ได้ทำการศึกษาการแยกอิแนนทิโอเมอร์ (Enantiomer) ของสารซาลบูทามอลที่เติมในตัวอย่างปัสสาวะ โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย เฮกเซน (Hexane), ไดคลอโรมีเทน (Dicloromethane), เมทานอล และกรดไตรฟลูออโรอะซีติก (Trifluoroacetic acid) ในอัตราส่วนต่อปริมาตร (60 : 35 : 5 : 0.1) ตรวจวัดสารด้วยเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่น

กระตุ้น 230 นาโนเมตร ความยาวคลื่นตรวจวัด 310 นาโนเมตร ใช้เวลาในการแยกสาร 20 นาที ได้ค่าปริมาณต่ำสุดที่คำนวณได้เท่ากับ 0.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวอย่างปัสสาวะ

สโตล, แมสเซอเรียล, จาเดนและกรีฟ (Stol, Mazereeuw, Tjaden & Greef, 2000) ได้ทำการเพิ่มประสิทธิภาพของการแยกสารผสมโพลีไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอนและยาที่มีประจุบวกรวมถึงเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล โดยเทคนิคแคปิลารีอิเลคโทรโครมาโทกราฟี โดยใช้เอ็มโอเอส ไฮเปอร์ซิล (MOS hypersil) ขนาดอนุภาค 3 ไมโครเมตร เป็นสารสำหรับบรรจุในคอลัมน์ฟิวส์ซิลิกาแคปิลารี ขนาดความยาวทั้งหมด 16 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 375 ไมโครเมตร ใช้ศักย์ไฟฟ้า 30 กิโลโวลต์ ตรวจวัดสารด้วยเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร บัฟเฟอร์ประกอบด้วย 25 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์อะซีเตด ค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 ในอะซีโตไนไตรต์-น้ำ อัตราส่วนปริมาตรต่อปริมาตรเท่ากับ 90 : 10 ใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 15 นาที จำนวนเพลทมากกว่า 150,000 เพลท/เมตร งานวิจัยนี้มีข้อดีคือสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ได้ดี แต่ขั้นตอนการบรรจุสารในคอลัมน์ทำได้ยาก มีปัญหาในการควบคุมคุณภาพของคอลัมน์และการฟริท (frit) คอลัมน์

ซาว, ฮู, ยู และแฟง (Zhou, Hu, Yu & Fang, 2001) ได้ทำการศึกษาการแยกของสารเบต้า-อะโกนิสต์ 3 ชนิดในซีรั่ม คือ อะดรีนาลีน (Adrenaline), สารซาลบูทามอล และสารซาลเมเทอรอล (Salmeterol) โดยใช้เทคนิคแคปิลารีโซนอิเลคโทรโฟรีซีส และทำการตรวจวัดสารด้วยเครื่อง ตรวจวัดแอมเปอโรเมตริค ระบบ CZE ประกอบด้วยแคปิลารีฟิวส์ซิลิกาเคลือบภายในด้วยโพลีอิไมด์ (Polyimide-coated) ความยาวของแคปิลารีเท่ากับ 70 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 25 ไมโครเมตร นำสารเข้าสู่ระบบด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้าใช้ศักย์ไฟฟ้า 12 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 8 วินาที ขั้วอิเลคโทรดคาร์บอนใช้เป็นขั้วทำงาน และขั้วซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์เป็นขั้วอ้างอิง สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารประกอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.06 โมลาร์ ค่าพีเอช 6.6 ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก 12 กิโลโวลต์ ใช้เวลาในการแยกทั้งหมด ภายใน 18 นาที ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของ ซาลบูทามอลเท่ากับ 0.998 ค่าช่วงของความเป็นเส้นตรงของซาลบูทามอลอยู่ในช่วง 3.0×10^{-7}-5.0×10^{-7} โมลาร์ ปริมาณสารต่ำสุดที่ตรวจวัดซาลบูทามอลได้เท่ากับ 2.0×10^{-7} โมลาร์ ค่าร้อยละของการกลับคืนทั้งหมดอยู่ในช่วง 92.2-99.5% ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉลี่ยน้อยกว่า 4.71% (n=5)

บลอมเกรนและคณะ (Blomgren et al., 2002) ได้ทำการสกัดสารเคลนบูเทอรอลจากปัสสาวะวัว โดยใช้เทคนิค Molecularly imprinted polymer (MIT) ซึ่งเทคนิคนี้มีความจำเพาะสูงมาก โดยใช้บรอมบูเทอรอลเป็นต้นแบบและทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ตรวจวัดด้วยยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยระบบ

ประกอบด้วย คอลัมน์ ซี-18 ขนาดอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ 5 ไมโครเมตร ความยาวคอลัมน์ 150 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.1 มิลลิเมตร การ์ดคอลัมน์ขนาด 10×2.1 มิลลิเมตร ภายในบรรจุเทอร์โมไฮเปอร์ซิลดีย์สโตน อุณหภูมิคอลัมน์ 20 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ แอมโมเนียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 2-เมทานอล (75 : 25) อัตราการไหล 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีด 100 ไมโครลิตร ผลการทดลองได้ช่วงความเป็นเส้นตรง 0.5-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ความเที่ยงศึกษาที่ความเข้มข้น 0.6 และ 6.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 4.3% และ 2.1% ตามลำดับ ความแม่น 96.7% สำหรับทั้ง 0.6 และ 6.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 75% ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ คือ 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ข้อดีของวิธีการสกัดแบบ MIT คือเพิ่มสภาพไวและความจำเพาะของการวิเคราะห์ แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถใช้กับสารที่มีความเข้มข้นสูง

ฟิโอริ, คาร์โทนิ, บอคคา และบลามบิลลา (Fiori, Cartoni, Bocca & Brambilla, 2002) ได้ทำการศึกษาการวิเคราะห์สารเคลนบูเทอรอลในตับวัว โดยให้ความสำคัญกับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโดยใช้เฟสของแข็งหลายชนิด โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างไซยาโนโพรพิล, ซัลโฟนิค แคทไอออน-เอ็กซ์เชนจ์, เฟสผสม (ซี-18 และซัลโฟนิค แคทไอออน-เอ็กซ์เชนจ์) และซี-18 ทำการติดตามผลด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ควบคู่กับแมส-สเปคโตร จากการทดลองในส่วนของเฟสของแข็งได้ผลดังนี้ ไซยาโนโพรพิล, ซัลโฟนิค แคทไอออน-เอ็กซ์เชนจ์, เฟสผสม (ซี-18 และซัลโฟนิค แคทไอออน-เอ็กซ์เชนจ์) ได้ร้อยละการกลับคืนน้อยกว่า 10% ในขณะที่ ซี-18 เมื่อมีการเติมสารมาตรฐานเคลนบูเทอรอลในตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.5 , 1.0 และ 2.0 ppb ให้ร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยเท่ากับ 93%

โค, ซาเลห และแทน (Koh, Saleh & Tan, 2003) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มความจำเพาะในการสกัดซาลบูทามอลจากตัวอย่างเลือดคนโดยใช้กรดฟีนิลโบโรนิก ในการเตรียมตัวอย่างสกัดสารเชิงซ้อน ฟีนิลโบโรเนต-ซัลบูทามอลด้วยเฟสของแข็ง ซี-18 ใช้โพรพราโนลอล เป็น Internal standard ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ระบบประกอบด้วย คอลัมน์ ซี -18 ความยาวคอลัมน์ 150 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 46 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 1% ไตรเอทิลเอมีน พีเอช 2.80-เมทานอล (85 : 15 ปริมาตรต่อปริมาตร) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์ดีเทคเตอร์ ความยาวคลื่นกระตุ้น 230 นาโนเมตร ความยาวคลื่นตรวจวัด 320 นาโนเมตร ได้ค่าร้อยละการกลับคืนของสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดมากกว่า 90% เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 12 นาที

ซอง และคณะ (Song et al., 2003) ได้ทำการศึกษาการหาปริมาณของเคลนบูเทอรอล อีแนนทิโอเมอร์ ในตัวอย่างเลือดโดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี คอลัมน์ชนิด

ไครเร็กซ์ 3005 ภายในคอลัมน์ประกอบด้วย (อาร์)-1-แนฟทิลไกลซีน และ 3,5-ไดไนโตรเบนโซอิค แอซิด ขนาดคอลัมน์ยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ตรวจวัดด้วยยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 247 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย นอร์มอลเฮกเซน 1,2-ไดคลอโรอีเทน และเมทานอล (54 : 38 : 8 ต่อปริมาตร) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ช่วงความเป็นเส้นตรงของอิแนนทิโอเมอร์ชนิด อาร์- และ เอส- คือ 26.1-1045.8 และ 5.7-229.6 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์เท่ากับ 0.9999 ของทั้งสองอิแนนทิโอเมอร์ ขีดจำกัดการตรวจวัดของอาร์- และเอส- อิแนนทิโอเมอร์เท่ากับ 0.47 และ 1.04 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

พอสินีแอค, ซูมัคซะดี และนีสซีลสกา (Posyniak, Zmudzki & Niedzielska, 2003) ได้ทำการศึกษาการหาปริมาณสารเคลนบูเทอรอลที่ตกค้างในปัสสาวะวัวและตับวัว โดยใช้เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เปรียบเทียบกับลิควิดโครมาโทกราฟี (LC) ทำการตรวจวัดด้วยยูวีดีเทคเตอร์ที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร โดยตัวอย่างตับวัวนั้นจะทำการสกัดด้วยสารผสมเอทิลอะซีเตท-ไอโซโพรพานอล (7 : 3 ปริมาตร/ปริมาตร) ตามด้วยการเติมกรดเปอร์คลอริกเพื่อกำจัดสิ่งรบกวนการวิเคราะห์ และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านการแยกด้วยเฟสของแข็งผสม (mixed mode SPE) ส่วนปัสสาวะวัวทำการเจือจางด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.5 และทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านการแยกด้วยเฟสของแข็งผสม ร้อยละการกลับคืนมากกว่า 80% ขีดจำกัดการตรวจวัด 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสรุปได้ว่าเทคนิค ELISA สามารถตรวจวัดสารเคลนบูเทอรอลได้ดีเท่ากับเทคนิค LC

เทรย์นอร, ครุกส์, บาวเวิร์ส และเอลเลียท (Traynor, Crooks, Bowers & Elliott, 2003) ได้ทำการวิเคราะห์สารเบต้า-อะโกนิสต์ที่ตกค้างในตับวัว โดยใช้เทคนิค Surface plasma resonance biosensor การนำวิธีนี้มาใช้เพื่อแก้ปัญหาการวิเคราะห์ยาที่มีความเข้มข้นต่ำ ในสารทางชีวภาพที่มีองค์ประกอบซับซ้อนทำให้ยากต่อการวิเคราะห์ ในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างตับ 16 ตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์หาสารเบต้า-อะโกนิสต์หลายชนิดที่ตกค้างในตับ ภายในระยะเวลา 1.5 วัน ตัวอย่างตับเตรียมโดยย่อยสลายโปรตีน ทำให้แตกตัวด้วยเอนไซม์ และสกัดด้วยเฟสของแข็งโอเอชีส ซึ่งเป็นเฟสของแข็งผสม สารสกัดที่ได้จะเติมแอนติบอดีก่อนฉีดบนชิ้นส่วนตัวตรวจวัด (Sensor chip) ที่เคลือบด้วยเคลนบูเทอรอล การวิเคราะห์ใช้เวลา 10 นาทีต่อการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง ขีดจำกัดการตรวจวัดของมาบูเทอรอลเท่ากับ 0.02 นาโนกรัมต่อกรัม เคลนบูเทอรอล 0.11 นาโนกรัมต่อกรัม และ ซาลบูทามอล 0.19 นาโนกรัมต่อกรัม ส่วนสารเบต้า-อะโกนิสต์อื่น ๆ จะได้ขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำกว่า 1.5 นาโนกรัมต่อกรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University