บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. HP^{3D} Capillary Electrophoresis System (Hewlett-Packard, Germany)

2. แคปิลารีฟิวส์ซิลิกา เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 365 ไมโครเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ความยาวทั้งหมด 34 เซนติเมตร (Polymicro Technologies, USA)

3. เครื่องอัลตร้าโซนิค (Ultrasonic bath, Model 690D, Crest, Germany)

4. เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AG 204, Mettler Toledo, Switzerland)

5. เครื่องพีเอชมิเตอร์ (ϕ 34 pH Meter, Beckman, USA)

6. ตัวกรองที่ใช้กับเข็มฉีดยา ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร (Nalgene, USA)

7. เครื่องปั่นแยกตะกอน (Centrifuge, Sorvall TC , Du Pont , USA)

8. เครื่องเขย่า (Shaker, B.Bram Biotech international)

9. คอลัมน์ SPE t-C18 ขนาด 500 มิลลิกรัม (Waters, USA)

10. ไมโครปิเปต (Micropipet, Gilson, France)

สารเคมี

1. ไรโบฟลาวิน (Riboflavin, $C_{17}H_{20}N_4O_6$) เกรดไบโอเคม จาก Fluka (Switzerland)

2. ฟลาวินอะดินินไดนิวคลีโอไทด์ (Flavin adenine dinucleotide, $C_{27}H_{31}N_9Na_2O_{15}P_2.2H_2O$) เกรดไบโอเคม จาก Fluka (Switzerland)

3. ฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ (Flavin mononucleotide, $C_{17}H_{20}N_4NaO_9P.2H_2O$) เกรดไบโอเคม จาก Fluka (Switzerland)

4. เคลนบูเทอรอล (Clenbuterol, $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O.HCl$) สำหรับ HPLC จาก Sigma-Aldrich (Germany)

5. ซาลบูทามอล (Salbutamol, $C_{13}H_{21}NO_3$) สำหรับ HPLC จาก Sigma-Aldrich (Germany)

6. ไดโซเดียมเตตระบอเรตเดคะไฮเดรต (Disodium tetraborate decahydrate, $Na_2B_4O_7.10H_2O$) เกรดวิเคราะห์ จาก Merck (Germany)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4) เกรดวิเคราะห์ จาก Merck (Germany)

8. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide solution, NaOH) สำหรับ HPCE ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จาก Hewlett Packard (Germany)

9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ เกรดวิเคราะห์ จาก APS Ajax Finechem (Australia)

10. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 36% (Hydrochloric acid, HCl) เกรดวิเคราะห์ จาก Ajax Chemical (Australia)

11. น้ำกลั่น 2 ครั้งและผ่านระบบ Milli-Q water purification (Barnstead, USA)

12. เมทานอล (Methanol, CH_3OH) เกรดวิเคราะห์ จาก Merck (Germany)

13. อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile, CH_3CN) เกรดวิเคราะห์ จาก BDH Chemical (England)

วิธีดำเนินการ

1. การเตรียมสารละลายเคมี

1.1 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งสารไดโซเดียมเตตระบอเรตเดคะไฮเดรต น้ำหนัก 3.8137 กรัม ใส่ในบีกเกอร์และละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วถ่ายสารละลายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่น

1.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งโซเดียมฟอสเฟต น้ำหนัก 1.4200 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ และละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วถ่ายสารละลายใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

1.3 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้นประมาณ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ตวงกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 36% ปริมาตร 4.3 มิลลิลิตรใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 40 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร 50 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ น้ำหนัก 2.00 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ และละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

1.5 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.5, 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ปีเปต 7.50 มิลลิลิตร สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ประมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปรับพีเอชให้ได้ค่าพีเอช 6.5, 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5 ที่พีเอช 6.5-8.5 ปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ส่วนพีเอช 9.5 และ 10.5 ปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.6 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10, 15, 20, 25, 30 และ 40 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอช 8.5 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ปีเปต 2.50, 3.75, 5.00, 6.25, 7.50 และ 10.00 มิลลิลิตร สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ประมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปรับพีเอชให้ได้ค่าพีเอช 8.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.7 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.5 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ปีเปต 7.50 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ประมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปรับพีเอชให้ได้ค่าพีเอช 8.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.8 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.5, 7.5, 8.5 และ 9.5 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ปีเปต 5.0 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ประมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปรับพีเอชให้ได้ค่าพีเอช 6.5, 7.5, 8.5 และ 9.5 ที่ค่าพีเอช 6.5-8.5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริก ค่าพีเอช 9.5 ปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.9 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอช 9.5 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ปีเปต 1.25, 2.50, 5.00 และ 7.50 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ประมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปรับพีเอชให้ได้ค่าพีเอช 9.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.10 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ที่มี 10% และ 20% เมทานอล พีเอช 8.5 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ปีเปต 6.25 มิลลิลิตร สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ และปีเปตเมทานอลปริมาตร 2.50 และ 5.00 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในบีกเกอร์แต่ละใบ ผสมให้เข้ากัน ปรับพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกให้ได้พีเอช 8.5 ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.11 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ที่มี 10% และ 20% อะซิโตไนไตรล์ พีเอช 8.5 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ปีเปต 6.25 มิลลิลิตร สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ และปีเปตอะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 2.50 และ 5.00 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในบีกเกอร์แต่ละใบ ผสมให้เข้ากัน ปรับพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกให้ได้พีเอช 8.5 ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.12 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่มี 10% และ 20% เมทานอล พีเอช 9.5 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ปีเปต 2.50 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ และปีเปตเมทานอลปริมาตร 2.50 และ 5.00 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในบีกเกอร์แต่ละใบ ผสมให้เข้ากัน ปรับพีเอชด้วยสารละลายโซเดียม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ไฮดรอกไซด์ให้ได้พีเอช 9.5 ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.13 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่มี 10% และ 20% อะซิโตไนไตรล์ พีเอช 9.5 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ปีเปต 2.50 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ และปีเปตอะซิโตไนไตรล์ ปริมาตร 2.50 และ 5.00 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในบีกเกอร์แต่ละใบ ผสมให้เข้ากัน ปรับพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้พีเอช 9.5 ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.14 สารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวิน, ฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์และฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 100.0 ppm ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ชั่ง RF 0.0025 กรัม, FAD 0.0025 กรัม และ FMN 0.0025 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร 3 ใบ ละลายสารแต่ละชนิดในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.15 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมไรโบฟลาวิน, ฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์ และฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ 3 ความเข้มข้น (1.0, 3.0 และ 5.0 ppm) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปีเปต สารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวิน, ฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์และฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ 100.0 ppm ปริมาตร 50 ไมโครลิตรสำหรับความเข้มข้น 1.0 ppm, 150 ไมโครลิตร สำหรับความเข้มข้น 3.0 ppm และ 250 ไมโครลิตร สำหรับความเข้มข้น 5.0 ppm ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตรแต่ละใบ แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

1.16 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมไรโบฟลาวิน, ฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์และฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 0.8-1.0 ppm ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ปีเปต สารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวิน, ฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์และฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ 100.0 ppm ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์และฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ 100.0 ppm 250 ไมโครลิตรใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

1.17 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมไรโบฟลาวิน, ฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์และ ฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 0.5-0.8 ppm ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวิน 100.0 ppm 125 ไมโครลิตร, ปิเปต ฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์ 100.0 ppm 200 ไมโครลิตรและ ฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ 100.0 ppm 200 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

1.18 ไดนิวคลีโอไทด์และฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 10.0 ppm ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวิน, ฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์และฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 100.0 ppm ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

1.19 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมไรโบฟลาวิน, ฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์และฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 20.0 ppm ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวิน, ฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์และฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 100.0 ppm ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

1.20 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมไรโบฟลาวิน, ฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์ และฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 30.0 ppm ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวิน, ฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์และฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 100.0 ppm ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

1.21 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวิน ความเข้มข้น 50.0 ppm ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวิน ความเข้มข้น 100.0 ppm ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตรใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

1.22 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 50.0 ppm ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟลาวิน อะดินีน ไดนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 100.0 ppm ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.23 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 50.0 ppm ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 100.0 ppm ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

1.24 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล ความเข้มข้น 100.0 ppm ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งสารเคลนบูเทอรอล 0.0010 กรัม และซาลบูทามอล 0.0010 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร 2 ใบ ละลายสารแต่ละชนิดในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.25 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล ความเข้มข้น 0.1-0.2 ppm ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเคลนบูเทอรอล 100.0 ppm ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและซาลบูทามอล 100.0 ppm ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

1.26 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล ความเข้มข้น 0.05 ppm ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล 100.0 ppm ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

1.27 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล 3 ความเข้มข้น (1.0, 3.0 และ 5.0 ppm) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล 100.0 ppm ปริมาตร 50 ไมโครลิตรสำหรับความเข้มข้น 1.0 ppm, 150 ไมโครลิตร สำหรับความเข้มข้น 3.0 ppm และ 250 ไมโครลิตร สำหรับความเข้มข้น 5.0 ppm ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แต่ละใบ แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

1.28 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล ความเข้มข้น 10.0 ppm ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล 100.0 ppm ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

1.29 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล ความเข้มข้น 20.0 ppm ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล 100.0 ppm ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

1.30 ตัวอย่างเบียร์

เบียร์ที่นำมาศึกษา 5 ชนิด ได้แก่ เบียร์ช้าง เบียร์สิงห์ เบียร์ไฮเนเก้นท์ เบียร์ลีโอ และเบียร์คาร์ลสเบิร์ก เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยปิเปตสารตัวอย่างเบียร์ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ t-C18 ตามสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างด้วย Solid-phase extraction ในข้อ 4 นำสารละลายที่ผ่านคอลัมน์มาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยการผ่านก๊าซไนโตรเจน แล้วละลายสารที่เหลือจากการระเหยด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

1.31 ตัวอย่างยาพ่นจมูก (Ventolin)

ปิเปตตัวอย่างยาพ่นจมูก 0.50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.32 การเตรียมตัวอย่างเนื้อแดง (Lawrence & Menard, 1997)

นำตัวอย่าง 500 กรัม โดยตัดส่วนไขมันออก แล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ ชั่งตัวอย่าง 12 กรัม นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่ในขวดที่ใส่สารปั่นแยกตะกอนขนาด 200 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 20 วินาที แล้วนำไปใส่ในเครื่องอัลตร้าโซนิค 15 นาที เขย่าอีกครั้ง นำไปใส่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยนำไปแช่ตู้เย็นในชั้นน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสใส่ในหลอดที่ใช้ปั่นแยกตะกอนที่สะอาด ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 6 ด้วย 1.0 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ตรวจค่าพีเอชด้วยกระดาษวัดพีเอช กรณีเกิดตะกอน ให้นำไปปั่นแยกตะกอนอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วย Solid-phase extraction คอลัมน์ชนิด t-C18 ตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4

1.33 การเตรียมสารละลายเข้าสู่ขวดบรรจุสาร

สารละลายที่เตรียมก่อนจะใส่ในขวดบรรจุสาร ต้องกรองโดยผ่านตัวกรองขนาดของรู 0.45 ไมโครเมตร

2. สภาวะของเครื่องแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีส

การตั้งสภาวะของเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง มีดังนี้ นำสารเข้าสู่แคปิลารีโดยใช้ความดัน กำหนดความดัน 50 มิลลิบาร์ เวลาในการนำสารเข้าสู่แคปิลารี 5 วินาที ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ 10 กิโลโวลต์ อุณหภูมิของแคปิลารีสำหรับสารกลุ่มไรโบฟลาวินและอนุพันธ์คือ 20 องศาเซลเซียส สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดสารกลุ่มไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ คือ 267 นาโนเมตร สำหรับสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์คือ 205 นาโนเมตร และ การปรับสภาพผิวภายในแคปิลารี เริ่มต้นการทดลองในแต่ละวัน ทำการชะล้างแคปิลารีด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที น้ำกลั่น เป็นเวลา 10 นาที และสารละลายบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 10 นาที และระหว่างการทดลองซ้ำแต่ละครั้ง ชะล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 2 นาที น้ำกลั่น 2 นาที และสารละลายบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 2 นาที เมื่อมีการเปลี่ยนสภาวะการทดลองจะชะล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 5 นาที น้ำกลั่น 5 นาทีและสารละลายบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที และเมื่อสิ้นสุดการทดลองในแต่ละวัน ชะล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1โมลาร์ เป็นเวลา 10 นาทีและน้ำกลั่น เป็นเวลา 10 นาที

3. การศึกษาผลของตัวแปรที่มีผลต่อการทดลอง

3.1 สารกลุ่มไรโบฟลาวินและอนุพันธ์

3.1.1 ศึกษาผลของชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ ที่มีผลต่อการแยก (Resolution) สภาพไว (Sensitivity) และไมเกรชันไทม์ (Migration time) ของสารละลายมาตรฐาน ในการศึกษาหัวข้อนี้ใช้สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอช 8.5 และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอช 8.5

3.1.2 ศึกษาผลของค่าพีเอชของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ที่มีผลต่อการแยก สภาพไวและไมเกรชันไทม์ของสารละลายมาตรฐาน ในการศึกษาหัวข้อนี้ใช้สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ทำการศึกษาคือ 6.5, 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5

3.1.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ที่มีผลต่อการแยก สภาพไวและไมเกรชันไทม์ของสารละลายมาตรฐาน ในการศึกษาหัวข้อนี้ใช้สารละลายบอเรต

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บัฟเฟอร์ กำหนดค่าพีเอชคงที่ (ผลจากข้อ 3.1.2) ความเข้มข้นของสารละลาย บัฟเฟอร์ที่ทำการศึกษา คือ 10, 20, 25, 30 และ 40 มิลลิโมลาร์

3.1.4 ศึกษาผลของตัวทำละลายเมทานอลและอะซิโตไนไตรล์ที่เติมลงในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ โดยเลือกใช้พีเอช ความเข้มข้นของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแยก ที่ได้จากผลการทดลอง 3.1.2 และ 3.1.3 เปอร์เซ็นต์ที่ทำการศึกษาได้แก่ 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ นำไปวิเคราะห์สารผสมไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ ความเข้มข้น 20 ppm

3.1.5 ศึกษาผลของอุณหภูมิของแคปิลารีที่มีผลต่อการแยก สภาพไวและไมเกรชันไทม์สารละลายมาตรฐานผสม โดยกำหนดสภาวะของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.1.1-3.1.4 กำหนดเวลาที่ใช้ในการนำสารเข้าสู่แคปิลารี 5 วินาที โดยอุณหภูมิของแคปิลารีที่ทำการศึกษา คือ 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส

3.1.6 ศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการนำสารเข้าสู่แคปิลารีที่มีผลต่อการแยกของสารละลายมาตรฐานผสม ทำการทดลองโดยกำหนดสภาวะของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.1.1-3.1.4 กำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการแยกที่เหมาะสม จากผลการทดลองข้อ 3.1.5 และศักย์ไฟฟ้า 10 กิโลโวลต์ ใช้ความดันในการนำสารเข้าสู่แคปิลารีคงที่ 50 มิลลิบาร์ โดยทำการเปลี่ยนแปลงเวลาในการนำสารเข้าแคปิลารี คือ 3, 5, 7 และ 10 วินาที

3.1.7 ศึกษาผลของการปรับสภาพผิวภายในของแคปิลารี ที่มีผลต่อค่า Reproducibility ของไมเกรชันไทม์และพื้นที่พีกสารมาตรฐานแต่ละชนิด ซึ่งในระหว่างทำการทดลองซ้ำมีขั้นตอนการชะล้างแคปิลารี 5 สภาวะ ซึ่งชะล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ น้ำกลั่น และสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองดังตารางที่ 1 แสดงสภาวะในการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารีทั้ง 5 สภาวะ โดยทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง ในแต่ละสภาวะการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 1 สภาวะการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารีสารกลุ่มไรโบฟลาวินและอนุพันธ์

สภาวะที่	เวลาที่ใช้ในการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารี (นาที)		
	0.1 M NaOH	น้ำกลั่น	บัฟเฟอร์
1	2	2	2
2	2	0	2
3	1	1	1
4	1	0	1
5	0	0	2

3.2 สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์

3.2.1 ศึกษาผลของค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีผลต่อการแยก สภาพไวและไมเกรชันไทม์ ของสารละลายมาตรฐาน ในการศึกษาหัวข้อนี้จะใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ทำการศึกษาคือ 6.5, 7.5, 8.5 และ 9.5

3.2.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีผลต่อการแยก สภาพไว และไมเกรชันไทม์ของสารละลายมาตรฐาน ในการศึกษาหัวข้อนี้จะใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ กำหนดค่าพีเอชคงที่ (ผลจากข้อ 3.2.1) ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ทำการศึกษาคือ 5, 10, 20 และ 30 มิลลิโมลาร์

3.2.3 ศึกษาผลของตัวทำละลายเมทานอลและอะซิโตไนไตรล์ที่เติมลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยเลือกใช้พีเอช ความเข้มข้นของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแยกที่ได้จากผลการทดลอง 3.2.1 และ 3.2.2 เปอร์เซ็นต์ที่ทำการศึกษาได้แก่ 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ นำไปวิเคราะห์สารผสมเบต้าอะโกนิสต์ ความเข้มข้น 10 ppm

3.2.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิของแคปิลารีที่มีผลต่อการแยก สภาพไว และไมเกรชันไทม์ของสารละลายมาตรฐานผสม โดยกำหนดสภาวะของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.1-3.2.3 กำหนดเวลาที่ใช้ในการนำสารเข้าสู่แคปิลารี 5 วินาที โดยอุณหภูมิของแคปิลารีที่ทำการศึกษา คือ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส

3.2.5 ศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการนำสารเข้าสู่แคปิลารีที่มีผลต่อการแยกของสารละลายมาตรฐานผสม ทำการทดลองโดยกำหนดสภาวะของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.1-3.2.3 กำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการแยกที่เหมาะสมจากผลการทดลอง ข้อ 3.2.4 และ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ศักย์ไฟฟ้า 10 กิโลโวลต์ ใช้ความดันในการนำสารเข้าสู่แคปิลารีคงที่ 50 มิลลิบาร์ โดยทำการเปลี่ยนแปลงเวลาในการนำสารเข้าแคปิลารี คือ 3, 5, 7 และ10 วินาที

3.2.6 ศึกษาผลของการปรับสภาพผิวภายในของแคปิลารี ที่มีผลต่อค่า Reproducibility ของไมเกรชันไทม์และพื้นที่พีกของสารมาตรฐานแต่ละชนิด ในระหว่างทำการทดลองซ้ำจะมีขั้นตอนการชะล้างแคปิลารี 4 สภาวะ ซึ่งชะล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ น้ำกลั่น และสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองดังตารางที่ 2 แสดงสภาวะในการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารีทั้ง 4 สภาวะ โดยทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง ในแต่ละสภาวะการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารี

ตารางที่ 2 สภาวะการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารีสารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์

สภาวะที่	เวลาที่ใช้ในการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารี (นาที)		
	0.1 M NaOH	น้ำกลั่น	บัฟเฟอร์
1	2	2	2
2	2	0	2
3	1	1	1
4	1	0	1

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยวิธี Solid-phase extraction

4.1 ผลของเปอร์เซ็นต์เมทานอลที่เหมาะสมในการชะ

ปรับสภาวะคอลัมน์ด้วยเมทานอล 3 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผ่านสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 1.0 ppm ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ หลังจากสารละลายมาตรฐานผสมผ่านคอลัมน์หมดแล้ว ทำการชะสารในคอลัมน์ด้วย 5% เมทานอล 3 มิลลิลิตร ตามด้วย 50% เมทานอล 5 มิลลิลิตร ทำการเก็บสารละลายทุกขั้นตอน ไประเหยตัวทำละลายด้วยแก๊สไนโตรเจน และละลายส่วนที่เหลือจากการระเหยด้วยน้ำกลั่น 1.0 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 3 แล้วเปลี่ยนเปอร์เซ็นต์เมทานอลจาก 50% เป็น 100% และทำการทดลองเหมือนการทดลองในส่วนของ 50% เมทานอล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.2 ผลของปริมาตรเมทานอลที่เหมาะสมในการชะ

เลือกเปอร์เซ็นต์ของเมทานอลจากผลการทดลอง ข้อ 5.1 และ ทำการทดลองเหมือนข้อ 5.1 โดยเปรียบเทียบผลของปริมาตรตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการชะคอลัมน์ 5 มิลลิลิตร และ 7 มิลลิลิตร

5. การศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (Method Validation)

5.1 ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity)

ทดสอบโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด 5 ความเข้มข้น โดยเตรียมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานครอบคลุมในช่วง 80-120% ของความเข้มข้นสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแคปิลารี อิเลคโทร โฟรีซีสตามสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง (จากข้อ 3) ทำการตรวจวัดซ้ำที่ระดับความเข้มข้นละ 5 ครั้ง แล้วนำผลการทดลองที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกของสารกับค่าความเข้มข้น หาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r^2)

5.2 ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารน้อยสุดที่สามารถตรวจวัดได้ แต่ไม่สามารถรายงานว่าตรวจวัดเป็นปริมาณเท่าใด ทำการทดลองโดยการนำสารละลายมาตรฐานผสมมาทำการเจือจางและทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแคปิลารีอิเลคโทร โฟรีซีสตามสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง (จากข้อ 3) ทำการทดลองจนกระทั่งได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal to noise ratio) มีค่าเท่ากับ 3 แสดงว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานนั้นเป็นค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Huber, 1998)

5.3 ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ตรวจวัดได้ โดยสามารถรายงานเป็นปริมาณที่แน่นอนได้ ทำการทดลองโดยการนำสารละลายมาตรฐานผสมมาทำการเจือจางและทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ด้วยเครื่องแคปิลารีอิเลคโทร โฟรีซีสตามสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง (จากข้อ 3) ทำการทดลองจนกระทั่งได้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนมีค่าเท่ากับ 10 แสดงว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานนั้นเป็นค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ (Huber, 1998)

5.4 ความแม่นของการวิเคราะห์ (Accuracy)

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ควรมีค่าเท่ากับค่าจริง (True value) หรือมีค่าใกล้เคียงค่าจริงที่สุด ทำการทดลองโดยเติมสารละลายมาตรฐานลงในสารตัวอย่าง 3 ระดับความเข้มข้น ซึ่งอยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ ดังนี้ ตัวอย่างเบียร์เติมสารละลายมาตรฐาน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ความเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 150, 250 และ 500ไมโครลิตรลงในสารตัวอย่างเบียร์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปผ่านคอลัมน์ t-C18 ตามสภาวะที่เหมาะสมตามหัวข้อที่ 4 ทำการระเหยด้วยไนโตรเจนจนแห้ง แล้วเติมน้ำกลั่น 1.0 มิลลิลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3.0, 5.0 และ 10.0 ppm ตัวอย่างเนื้อแดงสุกรเติมสารละลายมาตรฐานผสมเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล ความเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 150, 250 และ 500 ไมโครลิตร ลงในสารตัวอย่าง 6 กรัม นำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจากหัวข้อ 1.32 นำไปผ่านคอลัมน์ t-C18 ตามสภาวะที่เหมาะสมตามหัวข้อที่ 4 ทำการระเหยด้วยไนโตรเจนจนแห้ง แล้วเติมน้ำกลั่น 1.0 มิลลิลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3.0, 5.0 และ 10.0 ppm ในตัวอย่างเนื้อแดงสุกร ทำการวิเคราะห์ซ้ำระดับความเข้มข้นละ 5 ครั้ง ด้วยเครื่องแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีสตามสภาวะที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3) แล้วทำการคำนวณหาร้อยละการกลับคืนของแต่ละระดับความเข้มข้น โดยค่าที่คำนวณได้ควรอยู่ในช่วง 90-107% สำหรับสารที่มีช่วงความเข้มข้น 100 ppm 80-110% สำหรับสารที่มีความเข้มข้นในช่วง 0.1-10 ppm (Huber, 1998)

5.5 ความเที่ยงของการวิเคราะห์ (Precision)

เป็นค่าที่แสดงถึงความแม่นยำของการวิเคราะห์เมื่อทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานผสม 3 ระดับความเข้มข้น โดยทำการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 ppm สารที่นำมาวิเคราะห์ต้องมีลักษณะที่เป็นเนื้อเดียวกันโดยแสดงความเที่ยงโดยการทำการวิเคราะห์ซ้ำ โดยวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำในคราวเดียวกัน 6 ครั้ง ด้วยเครื่องแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีสตามสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง (จากข้อ 3) ทำการทดลองซ้ำด้วยสภาวะเดียวกัน ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน แล้วทำการคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของไมเกรชันไทม์และ พื้นที่ใต้พีกสาร ซึ่งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ควรมีค่า น้อยกว่า 5.3% สำหรับสารที่มีความเข้มข้นในช่วง 100 ppm และไม่เกิน 7.3% สำหรับสารที่มีความเข้มข้น 10 ppm ไม่เกิน 11% สำหรับสารที่มีความเข้มข้น 1 ppm และค่าไม่เกิน 15% สำหรับสารที่มีความเข้มข้น 0.1 ppm (Huber, 1998)

6. การวิเคราะห์สารละลายตัวอย่าง

6.1 ในการวิเคราะห์สารไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ ตัวอย่างเบียร์ 5 ชนิด ที่นำมาวิเคราะห์ คือ เบียร์ช้าง เบียร์สิงห์ เบียร์ไฮเนเก้นท์ เบียร์ลีโอ และเบียร์ไท ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีส โดยกำหนดสภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลองหัวข้อที่ 3.1 แล้วทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างซ้ำ ตัวอย่างละ 5 ครั้ง

6.2 การวิเคราะห์สารกลุ่มเบต้าอะโกนิสต์ ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์คือ เนื้อแดงสุกรและยาพ่นจมูก ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีส โดยกำหนดสภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลอง หัวข้อที่ 3.2 แล้วทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างซ้ำ ตัวอย่างละ 5 ครั้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7. การคำนวณ

7.1 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD)

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

เมื่อ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

X_i คือ ค่าที่วัดได้ในแต่ละครั้งที่ทดลอง

$\overline{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของค่าที่ได้จากการทดลอง n ครั้ง

n คือ จำนวนครั้งของการทดลอง

7.2 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, RSD)

$$RSD = \frac{SD}{\overline{X}} x\,100$$

เมื่อ RSD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\overline{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของค่าที่ได้จากการทดลอง

7.3 ร้อยละการกลับคืน (%Recovery)

$$\%\,\text{Recovery} = \frac{\left|C_{(std+sample)} - C_{sample}\right|}{C_{std}} x100$$

เมื่อ %Recovery คือ ค่าร้อยละการกลับคืน

C_{std} คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไปในตัวอย่าง

C_{sample} คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

$C_{std\ +sample}$ คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7.4 ความสามารถในการแยก (Resolution, R_s)

$$R_s = 2\left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_2 + W_1}\right)$$

เมื่อ R_s คือ ความสามารถในการแยกของพีกสาร

t_{R1} คือ ค่า Retention time ของพีกที่ 1

t_{R2} คือ ค่า Retention time ของพีกที่ 2

W_1 คือ ค่าความกว้างของฐานพีกที่ 1

W_2 คือ ค่าความกว้างของฐานพีกที่ 2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University