บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สารกลุ่มไรโบฟลาวินและอนุพันธ์

จากการวิเคราะห์สารผสมไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ โดยเทคนิคแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีส เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ โดยกำหนดสภาวะที่ใช้ในการทดลองคือ ความยาวทั้งหมดของแคปิลารี 45.0 เซนติเมตร ความยาวของแคปิลารีที่ใช้ในการแยก 36.5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ความแรงของสนามไฟฟ้า 10 กิโลโวลต์ นำสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารีด้วยความดัน 50 มิลลิบาร์ ตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น 267 นาโนเมตร ความกว้างของช่องแสง 20 นาโนเมตร

1. การศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่มีต่อการวิเคราะห์สารผสมไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 7 พบว่าลำดับของพีกสาร FMN และ FAD ในบัฟเฟอร์ทั้งสองจะสลับตำแหน่งกัน เนื่องมาจากผลของอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตี ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์นั้น FAD สามารถแตกตัวให้ประจุที่เป็นลบมากกว่า FMN ดังนั้น FAD จึงมีลำดับพีกก่อน FMN และพบว่าฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ค่ารีเทนชันไทม์ของสารผสมไรโบฟลาวินและอนุพันธ์เร็วกว่าบอเรตบัฟเฟอร์ เนื่องจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ค่าอิเลคโทรออสโมติคโฟลสูงกว่าบอเรตบัฟเฟอร์ (Cataldi & et.al., 2002) ซึ่งถือว่าเป็นข้อดีของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แต่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีข้อเสียในส่วนของการแยกระหว่างพีกของน้ำและพีกสารไรโบฟลาวินที่ซ้อนทับกัน รวมถึงสภาพไว (S/N) ของ RF และ FMN จะต่ำกว่ากรณีที่ใช้บอเรตบัฟเฟอร์ในการทดลองดังแสดงในภาพที่ 8 เมื่อพิจารณาการแยกของพีกน้ำกับพีกสาร RF และสภาพไวของสารจึงเลือกใช้บอเรตบัฟเฟอร์สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มไรโบฟลาวินและอนุพันธ์

2. การศึกษาพีเอชของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ที่มีต่อการวิเคราะห์สารผสมไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 9 พบว่าค่าไมเกรชันไทม์ของสารเพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปการเพิ่มค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์จะมีผลทำให้ค่าไมเกรชันไทม์ของสารลดลง (ค่า EOF เพิ่มขึ้น) แต่เนื่องจากโมเลกุลของสารไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ที่ทำการศึกษาเป็นกรดอ่อน เมื่อละลายน้ำสามารถแตกตัวได้ดังสมการที่ 10

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

$$HA \leftrightarrow H^+ + A^- \qquad (10)$$

$$K_a = [H^+][A^-]/[HA]$$

เมื่อ K_a คือ ค่าคงที่การแตกตัวของกรดอ่อน

การเคลื่อนที่ของโมเลกุลจะเป็นการเคลื่อนที่ของไอออนลบ (A^-) ซึ่งจะเคลื่อนที่ด้วยแรงอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตี ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดและจำนวนประจุของโมเลกุล พบว่าเมื่อค่าพีเอชสูงขึ้นสารจะแตกตัวกลายเป็นไอออนลบมากขึ้น ทำให้สารเคลื่อนที่ด้วยอิทธิพลของอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตีมากขึ้น โดยการเคลื่อนที่จะสวนทางกับแรงอิเลคโทรออสโมติคโฟล แต่เนื่องจากอิเลคโทรออสโมติคโฟลมีค่ามากกว่าอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตี ดังนั้นการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโมเลกุลจึงเกิดจากผลต่างของแรงอิเลคโทรออสโมติคโฟลกับอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตี เมื่อแรงอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตีมีค่ามาก ทำให้ความเร็วสัมพัทธ์ที่ได้มีค่าน้อยลง ค่าไมเกรชันไทม์ของสารจึงมีค่ามากขึ้นเมื่อพีเอชสูงขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับผลการทดลองที่ได้ การแยกของโมเลกุลของสารไรโบฟลาวินและอนุพันธ์จะเกิดขึ้นเนื่องจากการเลือกพีเอชของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ที่ช่วยในการแตกตัวเป็นไอออนของสารได้ดีจากภาพที่ 9 แสดงอิเลคโทรฟีโรแกรมของสารผสมไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ที่พีเอชต่าง ๆ ที่พีเอช 6.5 พีกสาร FMN และ FAD ซ้อนทับกัน ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ เนื่องมาจากที่พีเอช 6.5 นี้ FAD แตกตัวเป็นไอออนได้น้อยทำให้อิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตีมีค่าน้อย เพราะฉะนั้นการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโมเลกุลจึงมีค่ามากทำให้สารเคลื่อนที่เร็ว ซึ่งความเร็วในการเคลื่อนที่ของสาร FAD ใกล้เคียงกับ FMN จึงไม่สามารถแยกออกจากกัน พบว่าเมื่อให้ค่าพีเอชของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์สูงขึ้น แนวโน้มของการแยกระหว่างสาร 2 ตัวนี้มีค่าสูงขึ้น เนื่องจากที่พีเอชสูงขึ้น FAD จะถูกดึงโปรตอนกลายเป็นไอออนลบได้มากขึ้นทำให้อิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตีมีค่ามากขึ้น เพราะฉะนั้นการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโมเลกุลจึงมีค่าน้อยทำให้ FAD เคลื่อนที่ช้าลง ซึ่งความเร็วในการเคลื่อนที่ต่างกับโมเลกุลของ FMN จึงสามารถแยกจากโมเลกุลของ FMN ได้ แต่พบว่าการเคลื่อนที่ช้าลงนี้มีผลกระทบกับการแยกของสาร Unknow ที่เป็นพีกสารเล็ก ๆ กับพีกสาร FMN พบว่าที่พีเอช 7.5 พีกสาร Unknow กับ FMN ซ้อนทับกัน ส่วนที่พีเอช 8.5 จนถึง 10.5 พีกสาร Unknow กับ FMN ไม่ซ้อนทับกัน แต่เนื่องจากค่าไมเกรชันไทม์ของสารที่พีเอช 9.5 และ 10.5 จะช้ากว่า พีเอช 8.5

เมื่อพิจารณาการแยกและค่าไมเกรชันไทม์ของสาร รวมถึงพิจารณาการซ้อนทับของพีกสารกับพีก Unknow จึงเลือกพีเอช 8.5 เป็นค่าพีเอชที่เหมาะสม

3. การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ที่มีต่อการวิเคราะห์สารผสมไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 10 และ 11 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ ไมเกรชันไทม์มีค่ามากขึ้น เนื่องจากอิเลคโทรออสโมติคโมบิลิตีมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์มาก ๆ จะมีความหนืดมาก ทำให้สารเคลื่อนที่ช้าลง จึงมีเวลาในการแยกมากขึ้นดังสมการที่ 3 ในบทที่ 2 จะพบว่าอิเลคโทรออสโมติคโมบิลิตีลดลงเป็นสัดส่วนกับรากที่สองของความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ ที่ความเข้มข้นของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ สารกลุ่มไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ใช้เวลาในการวิเคราะห์เร็วที่สุด ตามด้วย 20, 25, 30 และ 40 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าถ้าความเข้มข้นของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์มีค่ามากขึ้นการแยกจะมีค่ามากขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์มีผลต่อสภาพไวของการวิเคราะห์ เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์สูงจะช่วยป้องกันสารไม่ให้ดูดซับที่ผนังของแคปิลารี (Weinberger, 1993, p. 61) จากภาพ 11 เป็นการพลอตระหว่างอัตราส่วนของความสูงของสัญญาณที่ตรวจวัดได้ต่อสัญญาณรบกวนกับความเข้มข้นของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 10 ถึง 40 มิลลิโมลาร์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์มากขึ้นค่าอัตราส่วนระหว่างสัญญาณที่ได้ต่อสัญญาณรบกวนจะเพิ่มขึ้น จนกระทั่งถึง 25 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าอัตราส่วนระหว่างสัญญาณที่ได้ต่อสัญญาณรบกวนสูงสุดและค่าจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 30 และ 40 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีผลมาจากความเข้มข้นของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ที่มากเกินพอทำให้การกระจายความร้อนระหว่างผนังด้านในท่อแคปิลารีและภายในศูนย์กลางไม่ดี เกิดปรากฏการณ์ Joule heating ภายในแคปิลารี (Weinberger, 1993, p.31) ซึ่งทำให้เกิด bandbroadening (Weinberger, 1993, p.60) มีผลกับความสูงและรูปร่างของพีกสาร จากการทดลองผลของความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์จะพิจารณาการแยกและสภาพไวของสารที่ทำการวิเคราะห์ ซึ่งสารกลุ่มนี้มีปริมาณในตัวอย่างน้อยมาก จึงเน้นให้ความสำคัญกับสภาพไวของการวิเคราะห์ จึงเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารผสมไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ คือ 25 มิลลิโมลาร์

4. การศึกษาอิทธิพลของตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลและอะซีโตไนไตรล์ที่เติมในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์สารผสมไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 12 ซึ่งแสดงอิเลคโทรฟีโรแกรมของสารผสมไรโบฟลาวินและอนุพันธ์

ที่เปอร์เซ็นต์ของเมทานอลต่าง ๆ และภาพที่ 13 ซึ่งแสดงอิเลคโทรฟีโรแกรมของสารผสมไรโบฟลาวิน และอนุพันธ์ที่เปอร์เซ็นต์ของอะซีโตไนไตรล์ต่าง ๆ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณทั้งเมทานอลและอะซิโตไนไตรล์ ค่าไมเกรชันไทม์สูงขึ้น โดยเฉพาะเมทานอลพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเมทานอลในสารละลายบัฟเฟอร์เป็น 20 เปอร์เซ็นต์ ค่าไมเกรชันไทม์ของสารเพิ่มขึ้นมาก สาเหตุที่ค่าไมเกรชันไทม์ของสารมีค่าเพิ่มขึ้นมาก เนื่องมาจากตัวทำละลายอินทรีย์มีผลเพิ่มค่าคงที่ไดอิเลคทริคของสารละลายบัฟเฟอร์ ดังสมการที่ 4 ในบทที่ 2 ส่งผลให้ค่าศักย์ซีต้ามีค่าลดลงและลดอิเลคโทรออสโมติคโฟลดังสมการที่ 3 ในบทที่ 2 เมื่ออิเลคโทรออสโมติคโฟลลดลงทำให้สารเคลื่อนที่ช้าลง จึงทำให้ค่าไมเกรชันไทม์ของสารมากขึ้น (Schwer, & Kenndler, 1991 cited in Weinberger, 1993, p. 25) เมื่อพิจารณาจากค่าไมเกรชันไทม์และการแยกของพีกสาร ดังนั้นในการวิเคราะห์จึงไม่มีการเติมเมทานอลและอะซิโตไนไตรล์ลงในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์

5. การศึกษาอุณหภูมิที่มีต่อการวิเคราะห์สารผสมไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 14 พบว่าเมื่ออุณหภูมิของแคปิลารีสูงขึ้น ค่าไมเกรชันไทม์ของสารกลุ่มไรโบฟลาวินและอนุพันธ์มีค่าน้อยลง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะมีผลต่อความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ คือที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ความหนืดของสารละลายลดลงทำให้สารเคลื่อนที่เร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ในการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือที่ 35 องศาเซลเซียส เพราะใช้เวลาในการวิเคราะห์เร็วและสภาพไวของสารค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 15 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส สภาพไวของสาร FAD และ FMN ลดลงในขณะที่ RF ค่อนข้างคงที่ (จากผลของสภาพไวที่มีต่ออุณหภูมิแคปิลารี สามารถคาดการณ์ได้ว่าสาร RF มีความสามารถในการทนต่อความร้อนได้ดีกว่า FAD และ FMN ดังนั้นจากการทดลองจึงเลือกอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส)

6. การศึกษาเวลาในการนำสารตัวอย่างเข้าแคปิลารีที่มีต่อการวิเคราะห์สารผสมไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 17 พบว่าสภาพไวเพิ่มขึ้นถ้าเพิ่มเวลาในการนำสารตัวอย่างเข้าแคปิลารี ถ้าใช้เวลามากสารตัวอย่างจะเข้าสู่แคปิลารีมากทำให้สภาพไวเพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ พบว่าเวลาที่ใช้ในการนำสารตัวอย่างเข้าแคปิลารีที่เวลา 10 วินาที ให้สัญญาณสูงสุดมากกว่า 7, 5 และ 3 วินาที ตามลำดับ แต่ถูกจำกัดในเทอมการแยก ซึ่งพีกของ FAD และ FMN มีบางส่วนที่ซ้อนทับกัน จากภาพที่ 16 เมื่อพิจารณาในสภาพไว การแยกของสาร ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์จึงเลือกที่เวลา 7 วินาที ให้สัญญาณมากกว่า 5 และ 3 วินาที พีกของสารสามารถแยกจากกันได้โดยที่ไม่มีส่วนใดซ้อนทับกันเมื่อเทียบกับ 10 วินาที และสภาพไวที่ 10 วินาที เริ่มคงที่

7. การศึกษาสภาวะการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารี ที่มีต่อการวิเคราะห์สารผสมไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ ซึ่งแสดงผลดังภาพที่ 18 เป็นความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่าไมเกรชันไทม์กับสภาวะการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารี ภาพที่ 19 เป็นความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่าพื้นที่พีกสารกับสภาวะการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารี จากผลการทดลองสภาวะที่ให้ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของไมเกรชันไทม์และพื้นที่พีกต่ำสุดคือ สภาวะที่ปรับสภาพผิวภายในแคปิลารีด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 2 นาที

ตารางที่ 21 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารกลุ่มไรโบฟลาวินและอนุพันธ์โดยเทคนิคแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีส

สภาวะที่ศึกษา	สภาวะที่เหมาะสม
ชนิดของบัฟเฟอร์	บอเรตบัฟเฟอร์
พีเอชของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์	8.5
ความเข้มข้นของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์	25 มิลลิโมลาร์
ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ในสารละลายบัฟเฟอร์	0 เปอร์เซ็นต์
อุณหภูมิของแคปิลารี	35 องศาเซลเซียส
ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก	10 กิโลโวลต์
เวลาในการนำสารตัวอย่างเข้าแคปิลารี	7 วินาที
สภาวะการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารี	บัฟเฟอร์ 2 นาที

8. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยวิธี Solid-phase extraction โดยได้ทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์เมทานอลและปริมาตรเมทานอล สำหรับชะคอลัมน์ โดยพิจารณาจากค่าร้อยละการกลับคืน ได้ผลการทดลองของเปอร์เซ็นต์เมทานอลและปริมาตรเมทานอลแสดงดังตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ พบว่าที่ 50% เมทานอลให้ค่าร้อยละการกลับคืน RF, FMN และ FAD อยู่ในช่วง 61.1-107.6% เมื่อชะคอลัมน์ด้วย 100% เมทานอล ให้ค่าร้อยละการกลับคืน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อยู่ในช่วง 80.0-110.6% สาเหตุที่ 50% เมทานอล ให้ค่าร้อยละการกลับคืนต่ำกว่า 100% เมทานอล เพราะคอลัมน์ชนิด t-C18 อนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ไม่มีขั้ว จากสูตรโครงสร้างสาร RF มีขั้วน้อยกว่า FMN และ FAD จึงดูดซับอยู่ในคอลัมน์ได้ดี เมื่อใช้ 50% เมทานอล ซึ่งมีขั้วค่อนข้างมาก สารจึงถูกชะออกจากคอลัมน์น้อยกว่า FMN และ FAD แต่เมื่อใช้ 100% เมทานอล ซึ่งมีขั้วน้อยกว่าเป็นตัวชะ ทำให้สาร RF, FMN และ FAD ที่เกาะอยู่ในคอลัมน์สามารถถูกชะออกมาได้มากขึ้น ทำให้มีค่าร้อยละการกลับคืนสูงกว่าที่ 50% เมทานอล สำหรับปริมาตรของเมทานอล 5 มิลลิลิตร ให้ร้อยละการกลับคืน 80.0-110.6% และปริมาตร 7 มิลลิลิตรมีค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 81.3-109.5% การชะด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตรให้ค่าร้อยละการกลับคืนน้อยกว่า 7 มิลลิลิตร เนื่องมาจากที่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ยังมีสาร RF, FMN และ FAD ตกค้างอยู่ในคอลัมน์ แต่เมื่อเพิ่มปริมาตรเป็น 7 มิลลิลิตร ทำให้สารที่ตกค้างอยู่ในคอลัมน์สามารถถูกชะออกมาได้มากขึ้นและจากผลการทดลองพบว่าสาร FMN ให้ค่าร้อยละการกลับคืนต่ำกว่า RF ซึ่งไม่เป็นไปตามลำดับความมีขั้วตามทฤษฎี เนื่องมาจาก FMN มีการสลายตัวในระหว่างขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง จึงส่งผลให้ได้ค่าร้อยละการกลับคืนน้อยกว่าที่ควรจะเป็น จากผลการทดลองจึงเลือกสภาวะที่ 100% เมทานอล ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการชะคอลัมน์

9. การศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์สารกลุ่มไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ พบว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.20-0.50 ppm ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.50-0.80 ppm ช่วงความเข้มข้นของสารที่ให้กราฟเป็นเส้นตรงแสดงผลดังตารางที่ 7 สาร RF อยู่ในช่วง 0.50-50.0 ppm, FMN และ FAD 0.80-20.0 ppm การสร้างกราฟมาตรฐานผลแสดงดังตารางที่ 8 สัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ของสารทุกตัวมากกว่า 0.99 จากการศึกษาความเที่ยงโดยใช้ร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่าค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์พื้นที่พีกอยู่ในช่วง 0.35-4.89 ไมเกรชันไทม์อยู่ในช่วง 0.14-4.47 ความแม่นของการวิเคราะห์ ศึกษาโดยใช้ค่าร้อยละการกลับคืน พบว่าค่าร้อยละการกลับคืน
อยู่ในช่วง 94.5-105.7%

10. การหาปริมาณสารกลุ่มไรโบฟลาวินและอนุพันธ์ในตัวอย่างเบียร์ทั้ง 5 ยี่ห้อ พบปริมาณ RF อยู่ในช่วง 0.7-1.1 μg/ml และ FMN 0.4 -1.0 μg/ml แสดงอิเลคโทรฟีโรแกรมดังภาพที่ 26, 28, 30, 32 และ 34

กลุ่มสารเบต้าอะโกนิสต์

จากการวิเคราะห์สารผสมเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล โดยเทคนิคแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีส เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ โดยกำหนดสภาวะที่ใช้ในการทดลอง คือ ความยาวทั้งหมดของแคปิลารี 34.0 เซนติเมตร ความยาวของแคปิลารีที่ใช้ในการแยก 25.5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ความแรงของสนามไฟฟ้า 10 กิโลโวลต์ นำสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารีด้วยความดัน 50 มิลลิบาร์ ตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร ความกว้างของช่องแสง 20 นาโนเมตร

1. การศึกษาค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์สารผสม CB และ SB ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 36 พบว่าไมเกรชันไทม์ของสาร CB ลดลง เมื่อค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์จะมีผลทำให้ค่าไมเกรชันไทม์ของสาร SB มากขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของสาร CB และ SB ที่ทำการศึกษาเป็นกรดอ่อน สามารถแตกตัวได้เมื่อละลายในน้ำ จากสมการที่ 10

การเคลื่อนที่ของโมเลกุลเป็นการเคลื่อนที่ของไอออนลบ ซึ่งจะเคลื่อนที่ด้วยแรงอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตี ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดและจำนวนประจุของโมเลกุล จากสมการที่ 10 พบว่าเมื่อค่าพีเอชสูงขึ้นสารจะแตกตัวกลายเป็นไอออนได้มากขึ้น ทำให้สารเคลื่อนที่ด้วยอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตีมากขึ้น โดยการเคลื่อนที่จะสวนทางกับแรงอิเลคโทรออสโมติคโฟล แต่เนื่องจากแรงอิเลคโทรออสโมติคโฟลมีค่ามาก ค่าไมเกรชันไทม์ของสาร SB จึงมีค่ามากเมื่อพีเอชสูงขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับผลการทดลองที่ได้ การแยกของโมเลกุลของสาร CB และ SB จะเกิดขึ้นเนื่องจากการเลือกพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ซึ่งสามารถทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนของสารได้ดีจากภาพที่ 36 แสดงอิเลคโทรฟีโรแกรมของสารผสม CB และ SB ที่พีเอชต่าง ๆ ที่พีเอช 6.5 และ 7.5 พีกสารทั้งสองไม่แยก พีเอช 8.5 พีกสารแยกไม่สมบูรณ์ยังมีส่วนที่ซ้อนทับกันอยู่ เนื่องมาจากที่พีเอช 6.5-8.5 นี้ CB แตกตัวเป็นไอออนได้น้อย ทำให้แรงอิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตีมีค่าน้อย ความเร็วในการเคลื่อนที่ของสาร SB ใกล้เคียงกับ CB จึงไม่สามารถแยกออกจากกัน พบว่าเมื่อให้ค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สูงขึ้น แนวโน้มของการแยกระหว่างสาร 2 ตัวนี้มีค่าสูงขึ้น เนื่องจากที่พีเอชสูงขึ้น SB กลายเป็นไอออนลบได้มาก ทำให้อิเลคโทรโฟริติคโมบิลิตีมีค่ามากขึ้น ทำให้ SB เคลื่อนที่ช้าลง ซึ่งความเร็วในการเคลื่อนที่ต่างกับโมเลกุลของ CB จึงสามารถแยกจากโมเลกุลของ CB ค่าพีเอช 9.5 พีกสารทั้งสองมีการแยกจากกันได้ดี ไม่ซ้อนทับกัน เมื่อพิจารณาการแยกของสารจึงเลือกพีเอช 9.5 เป็นค่าพีเอชที่เหมาะสม

2. การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีต่อการวิเคราะห์สารผสม CB และ SB ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 37 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น ไมเกรชันไทม์มีค่ามากขึ้น เนื่องจากอิเลคโทรออสโมติคโฟลมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์มาก ๆ จะมีความหนืดมาก ทำให้สารเคลื่อนที่ช้าลง จึงมีเวลาในการแยกมากขึ้นดังสมการที่ 3 ในบทที่ 2 จะเห็นว่าอิเลคโทรออสโมติคโฟลลดลงเป็นสัดส่วนกับรากที่สองของความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ ที่ความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ สาร CB และSB ใช้เวลาในการวิเคราะห์เร็วที่สุดและตามด้วย 10, 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีค่ามากขึ้นการแยกจะมีค่ามากขึ้นด้วย ที่ความเข้มข้นบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ การแยกของพีกสารทั้งสองมีการแยกน้อย เมื่อเทียบกับ 10 มิลลิโมลาร์และเมื่อเปรียบเทียบในส่วนของค่าไมเกรชันไทม์พบว่า 10 มิลลิโมลาร์ มีค่าน้อยกว่า 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นเมื่อพิจารณาในเทอมของการแยกและค่าไมเกรชันไทม์จึงเลือกความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

3. การศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เติมลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยการศึกษาผลของเมทานอลและอะซิโตไนไตรล์ที่เติมลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 38 ซึ่งแสดงอิเลคโทรฟีโรแกรมของสารผสม CB และ SB ที่เปอร์เซ็นต์ของเมทานอลต่าง ๆ และภาพที่ 39 ซึ่งแสดงอิเลคโทรฟีโรแกรมของสารผสม CB และ SB ที่เปอร์เซ็นต์อะซิโตไนไตรล์ต่าง ๆ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณทั้งเมทานอลและอะซิโตไนไตรล์ ค่าไมเกรชันไทม์เพิ่มขึ้น สาเหตุที่ค่าไมเกรชันไทม์ของสารมีค่าเพิ่มขึ้นมาก เนื่องมาจากตัวทำละลายอินทรีย์มีผลลดค่าคงที่ไดอิเลคทริคของสารละลายบัฟเฟอร์ ดังสมการที่ 4 ในบทที่ 2 ซึ่งมีผลให้ค่าศักย์ซีต้ามีค่าลดลง และลดค่าอิเลคโทรออสโมติคโฟลดังสมการที่ 3 ในบทที่ 2 เนื่องจากว่าตัวทำละลายอินทรีย์ไปลดอิเลคโทรออสโมติคโฟล ทำให้สารเคลื่อนที่ช้าลง จึงทำให้ค่าไมเกรชันไทม์ของสารมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มปริมาณเมทานอลและอะซิโตไนไตรล์มีผลต่อการแยกของสารเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอล ทำให้การแยกของสารทั้งสองลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ในบัฟเฟอร์ ดังนั้นในการวิเคราะห์จึงไม่มีการเติมเมทานอลและอะซิโตไนไตรล์ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

4. การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการวิเคราะห์สารผสม CB และ SB ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 40 พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิของแคปิลารีสูงขึ้น ไมเกรชันไทม์ของสารผสม CB และ

SB มีค่าน้อยลง เนื่องมาจากว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมีผลต่อความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ คือที่อุณหภูมิสูงความหนืดของสารละลายจะลดลง มีผลทำให้ค่าอิเลคโทรออสโมติคโฟลมีค่ามากขึ้น ทำให้สารเคลื่อนที่เร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ แต่การเพิ่มอุณหภูมิของแคปิลารีนอกจากจะมีผลในการลดค่าไมเกรชันไทม์แล้ว ยังมีผลที่ทำให้การแยกของสารลดลง เมื่อพิจารณาในเทอมของไมเกรชันไทม์ และการแยก จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25 องศาเซลเซียส เพราะใช้เวลาในการวิเคราะห์เร็วและพีกของสารทั้งสองสามารถแยกกันได้ดี โดยที่ไม่ซ้อนทับกัน

5. การศึกษาเวลาในการนำสารตัวอย่างเข้าแคปิลารีที่มีต่อการวิเคราะห์สารผสม CB และ SB ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 41 และ 42 พบว่าสภาพไวเพิ่มขึ้นถ้าเพิ่มเวลาในการนำสารเข้าสู่แคปิลารี ถ้าใช้เวลามากปริมาณสารตัวอย่างจะเข้าสู่แคปิลารีมาก ทำให้สภาพไวเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ พบว่าเวลาที่ใช้ในการนำสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารี ที่เวลา 10 วินาที ให้สัญญาณสูงมากกว่า 7, 5 และ 3 วินาที ตามลำดับ แต่ถูกจำกัดในเทอมการแยก ที่เวลา 7 และ 10 วินาที พีกสาร CB และ SB ซ้อนทับกัน เพราะฉะนั้นเวลาที่เหมาะสมที่สุด ในการวิเคราะห์จึงเลือกที่เวลา 5 วินาที ให้สัญญาณมากกว่าที่เวลา 3 วินาที พีกของสาร CB และ SB แยกจากกันได้โดยไม่ซ้อนทับกัน

6. การศึกษาสภาวะในการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารี ที่มีต่อการวิเคราะห์สารผสม CB และ SB ซึ่งแสดงผลดังภาพที่ 43 เป็นความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่าไมเกรชันไทม์กับสภาวะการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารี ภาพที่ 44 เป็นความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่าพื้นที่พีกสารกับสภาวะการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารี จากผลการทดลองสภาวะที่ให้ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของไมเกรชันไทม์และพื้นที่พีกต่ำสุดคือ สภาวะที่ปรับสภาพผิวภายในแคปิลารีด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 1 นาที และ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 22 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารเคลนบูเทอรอลและซาลบูทามอลโดยเทคนิคแคปิลารีอิเลคโทรโฟรีซีส

สภาวะที่ศึกษา	สภาวะที่เหมาะสม
พีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	9.5
ความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์	10 มิลลิโมลาร์
ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ในสารละลายบัฟเฟอร์	0 เปอร์เซ็นต์
อุณหภูมิของแคปิลารี	25 องศาเซลเซียส
ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก	10 กิโลโวลต์
เวลาในการนำสารตัวอย่างเข้าแคปิลารี	5 วินาที
สภาวะการปรับสภาพผิวภายในแคปิลารี	0.1 โมลาร์ NaOH
	1 นาที, บัฟเฟอร์
	1 นาที

7. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยวิธี Solid-phase extraction โดยได้ทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์เมทานอล และปริมาตรเมทานอล สำหรับชะคอลัมน์ โดยพิจารณาจากค่าร้อยละการกลับคืน ได้ผลการทดลองของเปอร์เซ็นต์เมทานอล และปริมาตรเมทานอล แสดงดังตารางที่ 12 และ 13 ตามลำดับ พบว่าที่ 50% เมทานอลให้ค่าร้อยละการกลับคืนของ CB เท่ากับ 70.0% SB เท่ากับ 67.5% และ 100% เมทานอล ให้ค่าร้อยละการกลับคืน CB เท่ากับ 83.4% SB เท่ากับ 76.0% สาเหตุที่ 50% เมทานอล ให้ค่าร้อยละการกลับคืนต่ำกว่า 100% เมทานอล เพราะคอลัมน์ชนิด t-C18 อนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ไม่มีขั้ว สารCB และ SB มีขั้วน้อยจึงดูดซับอยู่ในคอลัมน์ เมื่อใช้ 50% เมทานอล ซึ่งมีขั้วค่อนข้างมาก สารจึงยังค้างอยู่ในคอลัมน์ แต่เมื่อใช้ 100% เมทานอล ซึ่งมีขั้วน้อยกว่าเป็นตัวชะ ทำให้สาร CB และ SB ที่เกาะอยู่ในคอลัมน์สามารถถูกชะออกมาได้มากขึ้น ทำให้มีค่าร้อยละการกลับคืนสูงกว่า 50% เมทานอล สำหรับปริมาตรของเมทานอล 5 มิลลิลิตรให้ร้อยละการกลับคืนของ CB เท่ากับ 83.4% และ SB เท่ากับ 76.0% และปริมาตร 7 มิลลิลิตรมีค่าร้อยละการกลับคืนของ CB เท่ากับ 86.9% และ SB เท่ากับ 80.2% การชะคอลัมน์ด้วยเมทานอลปริมาตร 5 มิลลิลิตรให้ค่าร้อยละการกลับคืนน้อยกว่า

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7 มิลลิลิตร เนื่องมาจากที่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ยังมีสาร CB และ SB ตกค้างอยู่ในคอลัมน์ แต่เมื่อเพิ่มปริมาตรเป็น 7 มิลลิลิตร ทำให้สารที่ตกค้างอยู่ในคอลัมน์สามารถถูกชะออกมาได้มากขึ้น จึงเลือกสภาวะที่ 100% เมทานอล ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการชะคอลัมน์ และสาเหตุที่ทำการศึกษาปริมาตรของเมทานอลถึง 7 มิลลิลิตร เนื่องจากที่ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ให้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (Huber, 1998)

8. การศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์สารกลุ่ม CB และ SB พบว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ เท่ากับ 0.05 ppm ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณอยู่ในช่วงความเข้มข้นของ CB เท่ากับ 0.10 ppm SB เท่ากับ 0.20 ppm ความเข้มข้นของสารที่ให้กราฟเป็นเส้นตรง ดังตารางที่ 16 อยู่ในช่วง 0.5-10.0 ppm การสร้างกราฟมาตรฐานผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 17 สัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ของสาร CB เท่ากับ 0.9956 และ SB เท่ากับ 0.9811 จากการศึกษาความเที่ยงโดยใช้ร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่าค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์พื้นที่พีก อยู่ในช่วง 2.22-6.71 ไมเกรชันไทม์อยู่ในช่วง 0.33-1.19 ความแม่นของการวิเคราะห์ศึกษาโดยใช้ค่าร้อยละการกลับคืนพบว่าค่าร้อยละการกลับคืน CB เท่ากับ 78.8-98.8% SB เท่ากับ 99.5–109.3% แสดงผลดังตารางที่ 19 จากผลของความแม่น พบว่าที่ความเข้มข้น 10 ppm จะได้ค่าร้อยละการกลับคืนลดลง แต่ค่ายังอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ การลดลงของร้อยละการกลับคืนมีผลมาจากความเข้มข้นที่มาก มีปริมาณเนื้อสารมาก จึงมีผลต่อความสามารถในการดูดซับไว้ที่คอลัมน์ t-C18 จากผลการทดลองสามารถอธิบายความเข้มข้นที่ทำการศึกษาด้วยคอลัมน์ t-C18 ขนาด 500 มิลลิกรัม คือ ความเข้มข้นไม่ควรเกิน 10 ppm ซึ่งยังอยู่ในช่วงร้อยละการกลับคืนที่ยอมรับได้

9. การหาปริมาณสาร CB และ SB ในตัวอย่างยาพ่นจมูกและตัวอย่างเนื้อแดงสุกร แสดงผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 20 พบสาร SBในตัวอย่างยาพ่นจมูก (เวนโทลีน) 1000 ppm สามารถตรวจวัดได้ 991.5 ppm แสดงผลดังภาพที่ 49 เนื้อแดงสุกรตัวอย่างที่ 1ไม่พบสาร CB และ SBในตัวอย่างที่ 2 พบสาร CB เท่ากับ 0.2 µg/gและ SB เท่ากับ 0.3 µg/g แสดงอิเลคโทรฟีโรแกรมดังภาพที่ 51 และ 53 ลักษณะภายนอกของเนื้อแดงสุกรตัวอย่างที่ 1 มีลักษณะสีแดงคล้ำกว่าปกติ เนื้อที่หั่นทิ้งไว้จะมีลักษณะเนื้อค่อนข้างแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกันตัวอย่างที่ 2 เนื้อจะมีสีแดงอ่อน และเนื้อจะแห้งช้ากว่าตัวอย่างที่ 1 ซึ่งจากผลการทดลอง สอดคล้องกับลักษณะภายนอกตามที่องค์การอาหารและยาได้ระบุไว้

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาความจุของคอลัมน์ tC-18 ที่ใช้ในการทดลอง