

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์ปริมาณแคลนบูเทรอลและซัลบูตามอล

1.1 ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารแคลนบูเทรอลและซัลบูตามอล โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

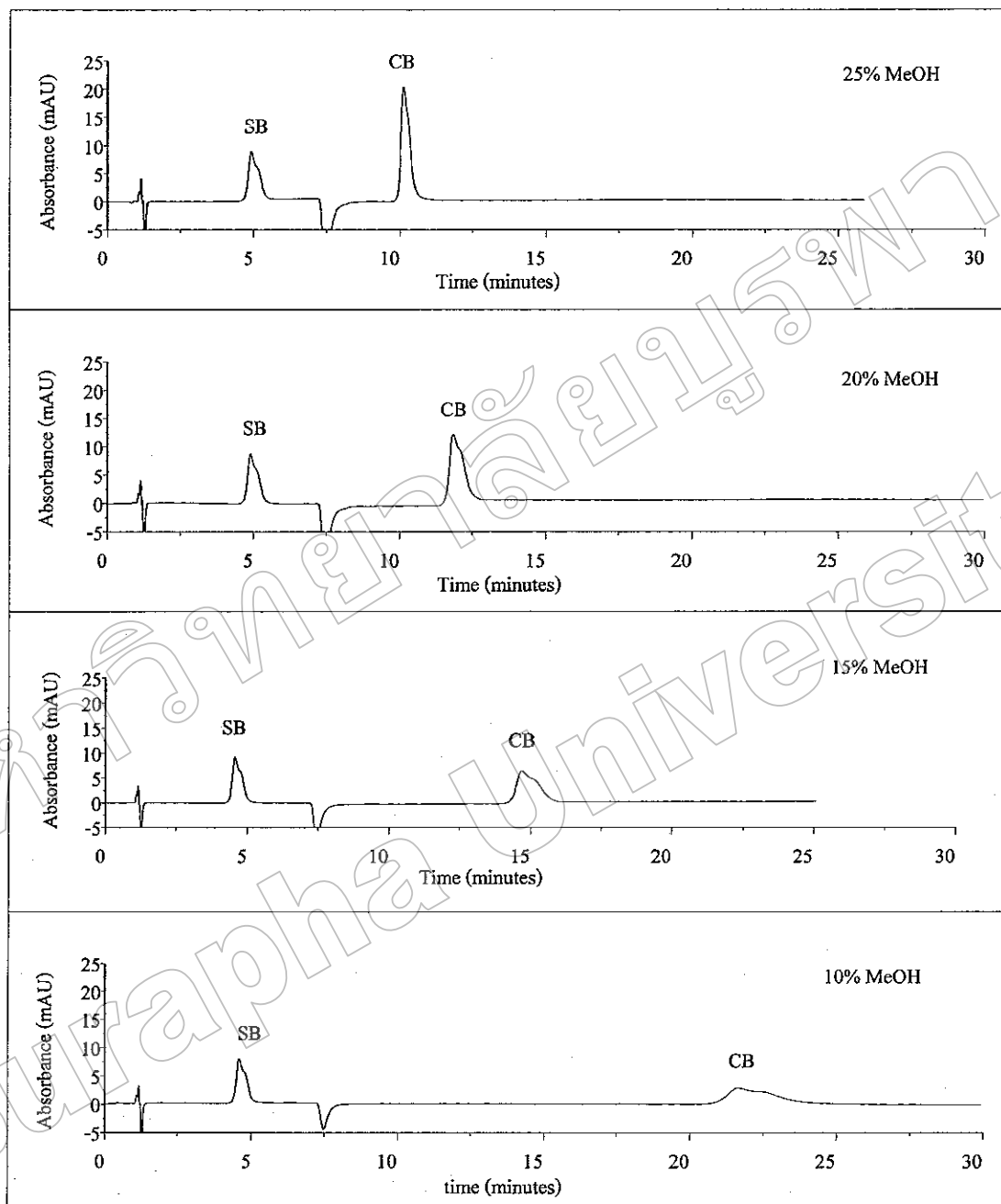
การศึกษานี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสม ได้แก่ ซัลบูตามอล และแคลนบูเทรอล โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี สถานะของการทดลอง คอลัมน์ชนิด C_{18} ความยาว 125 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคที่ใช้บรรจุ 5 ไมโครเมตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส ตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น เวลา 0-7.00 นาที 206 นาโนเมตร เวลา 7.01-9.00 นาที 400 นาโนเมตร หลังจากเวลา 9.00 นาที 206 นาโนเมตร

1.1.1 ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์ของเมทานอลในเฟสเคลื่อนที่ ในการศึกษาการชะแบบเกรเดียน ตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 15.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 2.0 โดยเวลาตั้งแต่ 0-5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก 9% และหลังจากเวลา 5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก ในช่วง 10% ถึง 25% ต่อการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมของสารซัลบูตามอลและแคลนบูเทรอล ภายใต้สภาวะที่กำหนด ที่มีผลต่อการรบกวนของสัญญาณและการวิเคราะห์ ผลการศึกษาดังภาพที่ 4-1 และ 4-2 พบว่าการชะที่เหมาะสมที่สุด คือ เวลาตั้งแต่ 0-5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก 9% และหลังจากเวลา 5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 25%

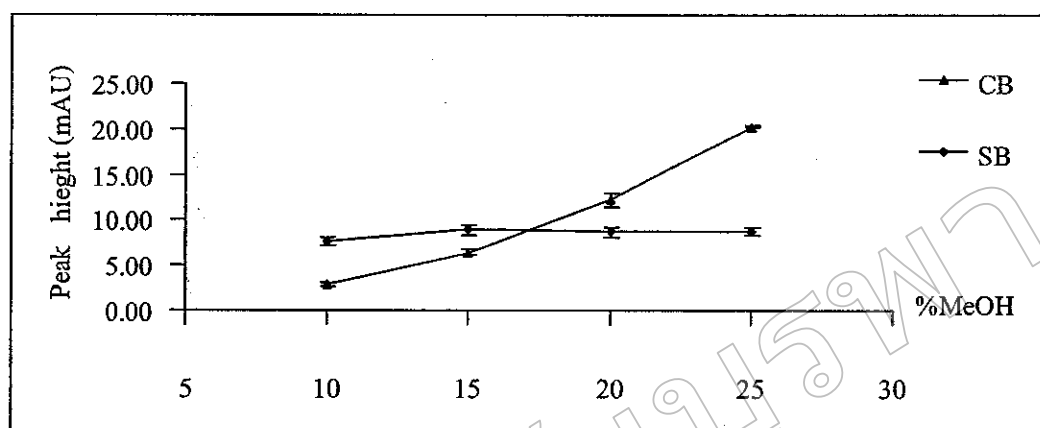
1.1.2 ผลการศึกษาค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟต จากการศึกษาค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟต ในการชะแบบเกรเดียน ตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 15.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟต โดยเวลาตั้งแต่ 0-5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก 9% และหลังจากเวลา 5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 25% ต่อการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมของสารซัลบูตามอลและแคลนบูเทรอล ภายใต้สภาวะที่กำหนด ที่มีผลต่อสภาพไวของการวิเคราะห์ ได้ผลดังภาพที่ 4-3 และ 4-5 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ สารละลายฟอสเฟตที่พีเอช 3.0

1.1.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟต จากการศึกษาค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟต ในการชะแบบเกรเดียน ตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และ

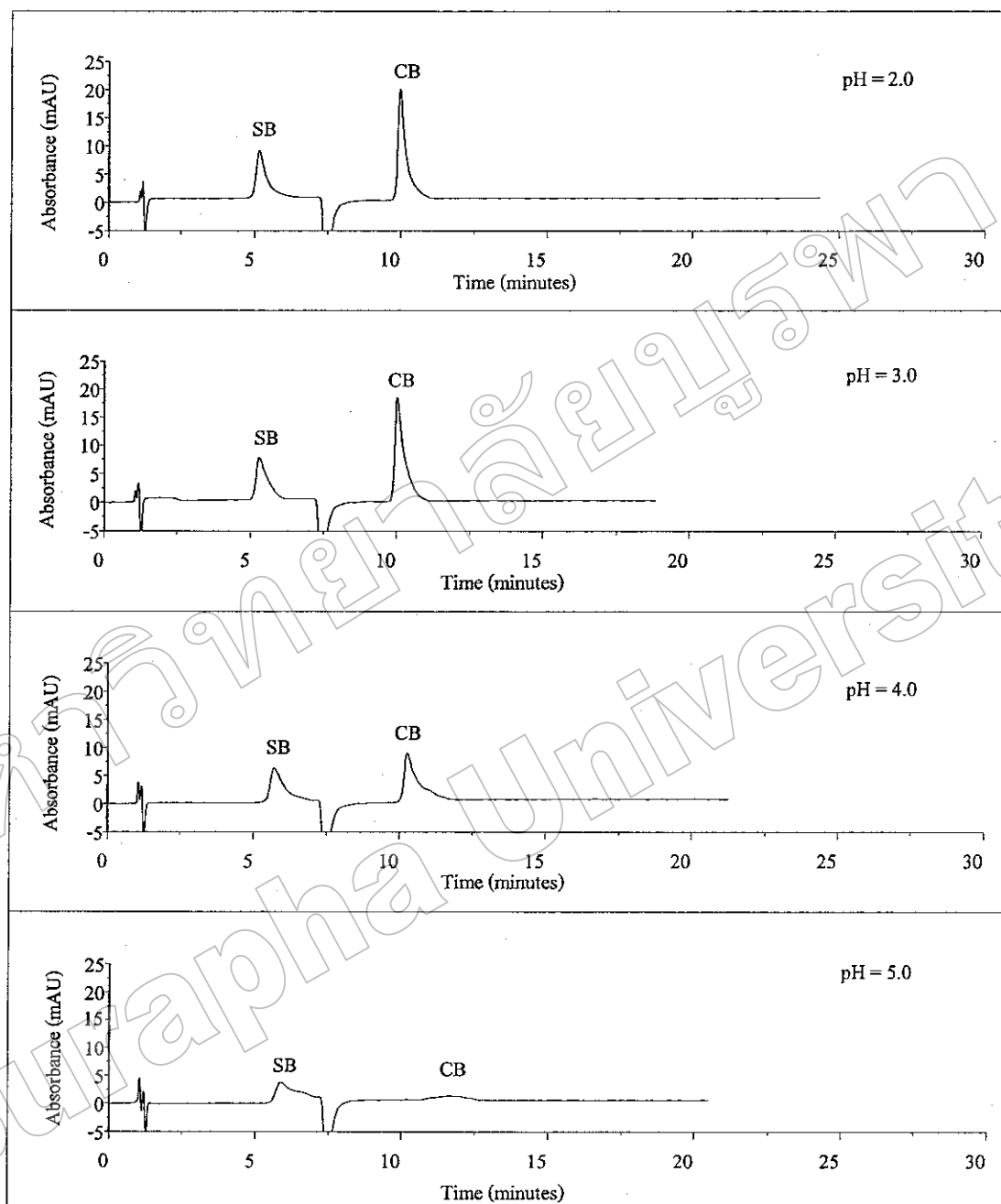
ตัวทำละลาย ข คือ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 3.0 โดยเวลาดั้งแต่ 0-5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก 9% และหลังจากเวลา 5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 25% ต่อการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมของสารซัลบูทามอลและคลอโนพเรอล ภายใต้สภาวะที่กำหนดที่มีผลต่อสภาพไวของการวิเคราะห์ ได้ผลดังภาพที่ 4-4 และ 4-6 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟต 5.0 มิลลิโมลาร์



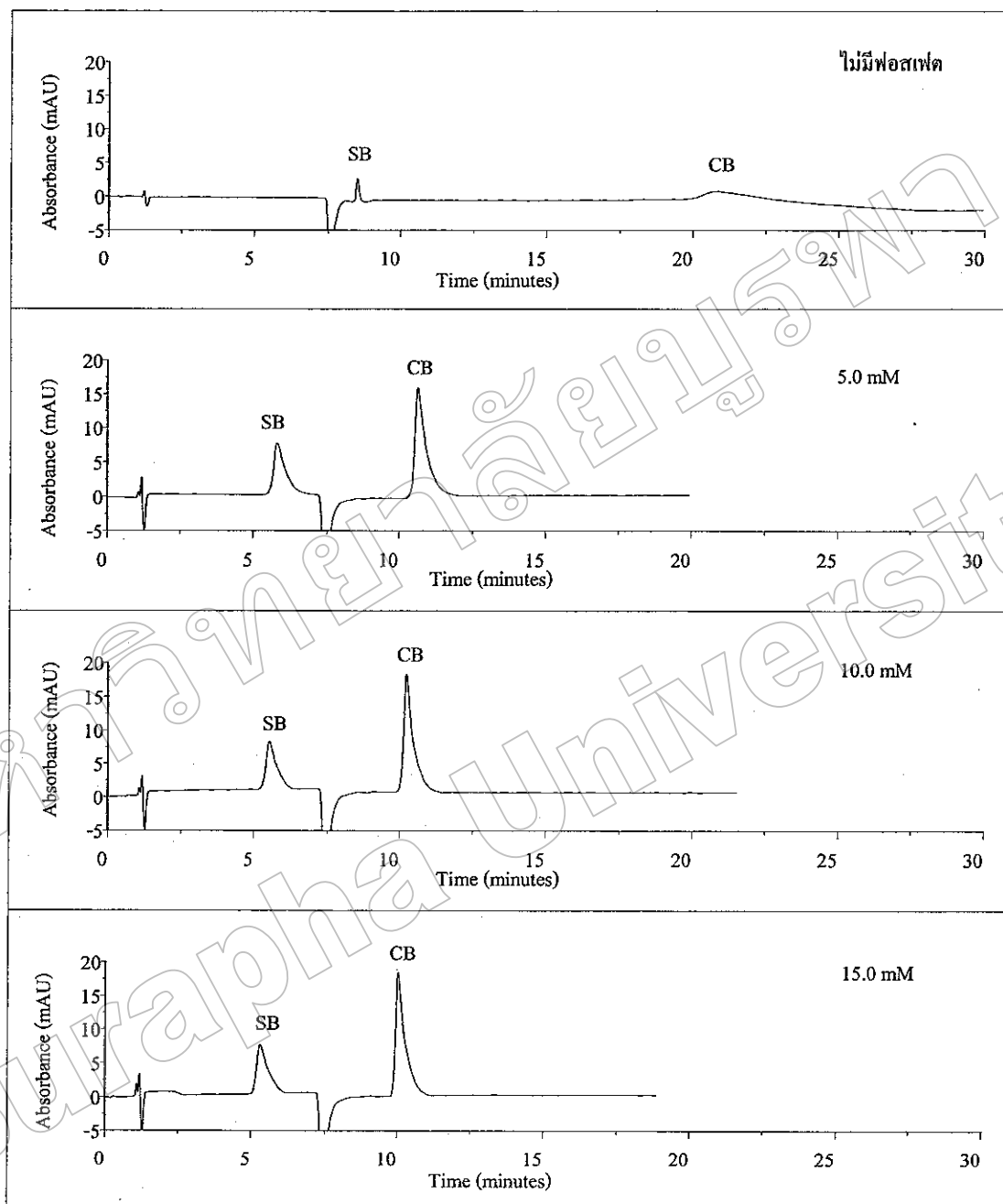
ภาพที่ 4-1 ผลของเปอร์เซ็นต์ของเมทานอลในสารละลายเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของสาร เกลนบูเทรอลและซัลบูตามอล สถานะการทดลองดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย ตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 15.0 มิลลิโมลาร์ สารละลาย ฟอสเฟตพืเอช 2 ระบบการชะแบบเกรเดียน โดยเวลาตั้งแต่ 0-5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ ของตัวทำละลาย ก 9% ความเข้มข้น SB และ CB = 2 มิลลิกรัมต่อลิตร



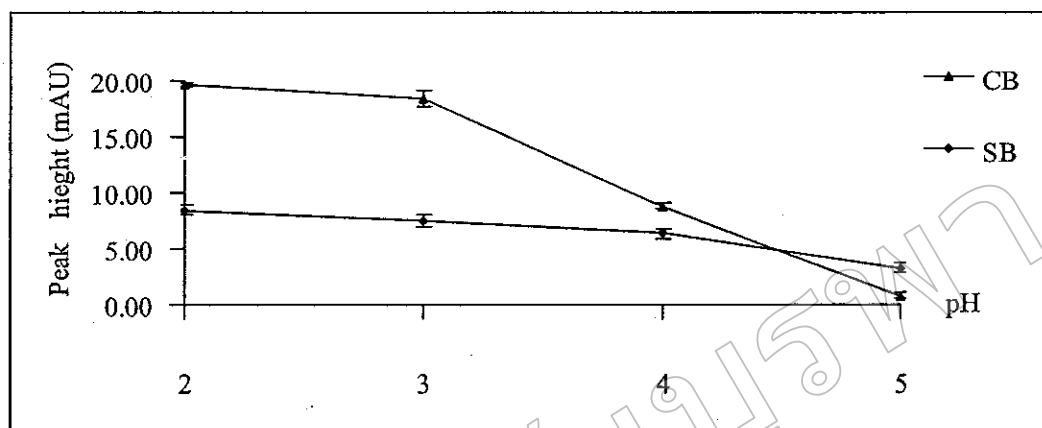
ภาพที่ 4-2 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ของเมทานอลในสารละลายเฟสเคลื่อนที่กับสภาพไวของสารซัลบูตามอลและเกลนบูเทรอล



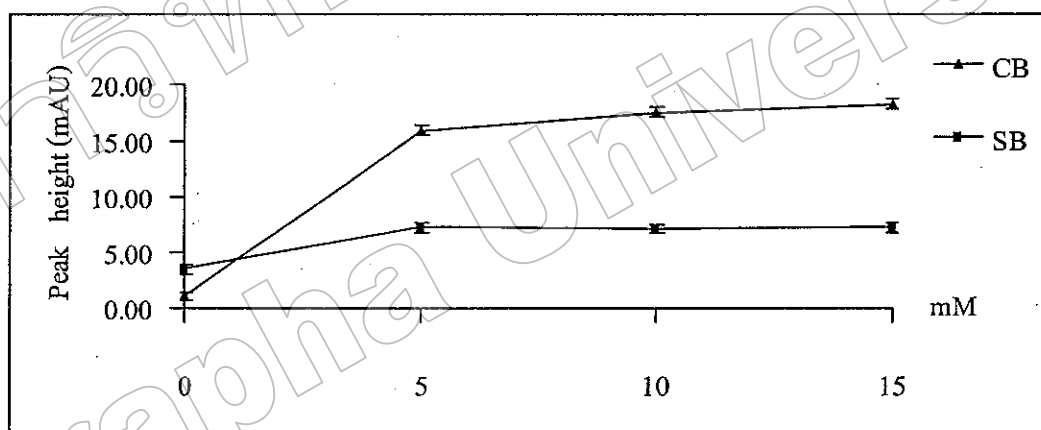
ภาพที่ 4-3 ผลของค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตต่อโครมาโทแกรมของสารเคสโนบูเทรอลและซัลบูตามอล สถานะการทดลองดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย ตัวทำละลาย ก คือ เมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 15.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟต ระบบการระเหยแบบเกรเดียน โดยเวลาตั้งแต่ 0-5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก 9% และ หลังจากเวลา 5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 25% ความเข้มข้น SB และ CB = 2 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-4 ผลความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตต่อโครมาโทแกรมของสารเคโนบูเทรอลและซัลบูตามอล สภาวะการทดลองดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย ตัวทำละลาย ก คือ เมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ สารละลายฟอสเฟต พีเอช 3.0 ระบบการชะแบบเกรเดียน โดยเวลาตั้งแต่ 0-5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก 9% และหลังจากเวลา 5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 25% ความเข้มข้น SB และ CB = 2 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-5 ความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชของสารละลายฟอสเฟตในสารละลายเฟสเคลื่อนที่กับสภาพไวของสารซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอล



ภาพที่ 4-6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตในสารละลายเฟสเคลื่อนที่กับสภาพไวของสารซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอล

1.2 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์

สภาวะที่ใช้ในการทดลองคือ คอลัมน์ชนิด C_{18} ความยาว 125 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคที่ใช้บรรจุ 5 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 5.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 3.0 ระบบการชะแบบเกรเดียน โดยเวลาดั้งเดิม 0-5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก 9% และหลังจากเวลา 5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 25% อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส ตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่นเวลา 0-7.00 นาที 206 นาโนเมตร เวลา 7.01-9.00 นาที 400 นาโนเมตร หลังจากเวลา 9.00 นาที 206 นาโนเมตร

1.2.1 ผลการหาขีดจำกัดของการตรวจวัด

จากการหาขีดจำกัดของการตรวจวัด พบว่าความเข้มข้นของสารที่ทำการวิเคราะห์ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise Ratio) อยู่ในช่วง 2-3 แสดงผลดังตารางที่ 4-1 ภาพที่ ผ-1 และ ผ-2

ตารางที่ 4-1 ขีดจำกัดของการตรวจวัดของสารซัลบูตามอลและเคลนบูเทรอล ($n=5$)

สาร	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อลิตร)
SB	20.0
CB	20.0

1.2.2 ผลการหาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ

จากการหาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ พบว่าความเข้มข้นของสารที่ทำการวิเคราะห์ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise Ratio) อยู่ในช่วง 10-12 แสดงผลดังตารางที่ 4-2 ภาพที่ ผ-3 และ ผ-4

ตารางที่ 4-2 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณสารซัลบูตามอลและเคลนบูเทรอล ($n=5$)

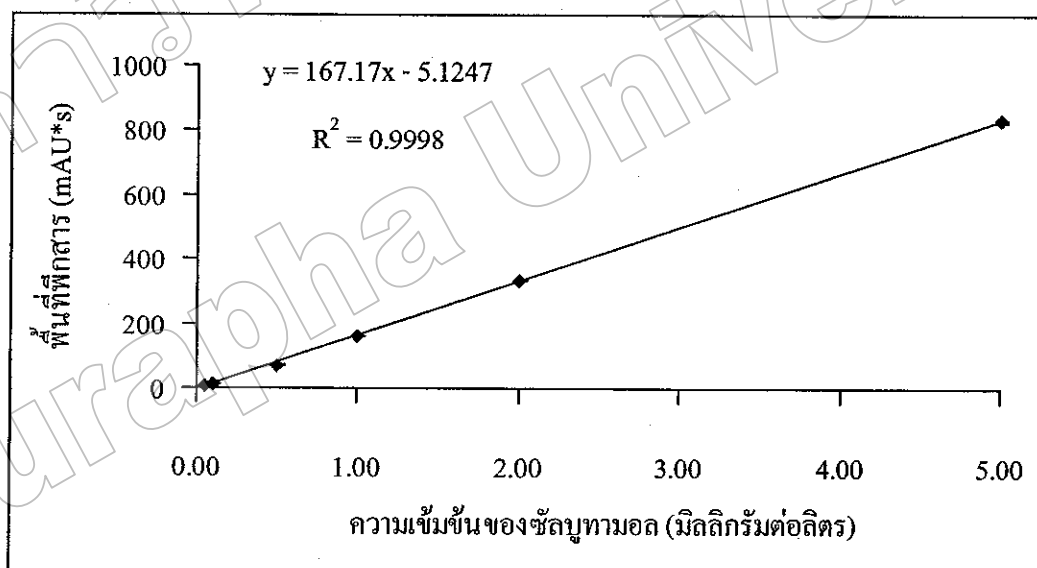
สาร	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อลิตร)
SB	40.0
CB	40.0

1.2.3 การหาความเป็นเส้นตรง

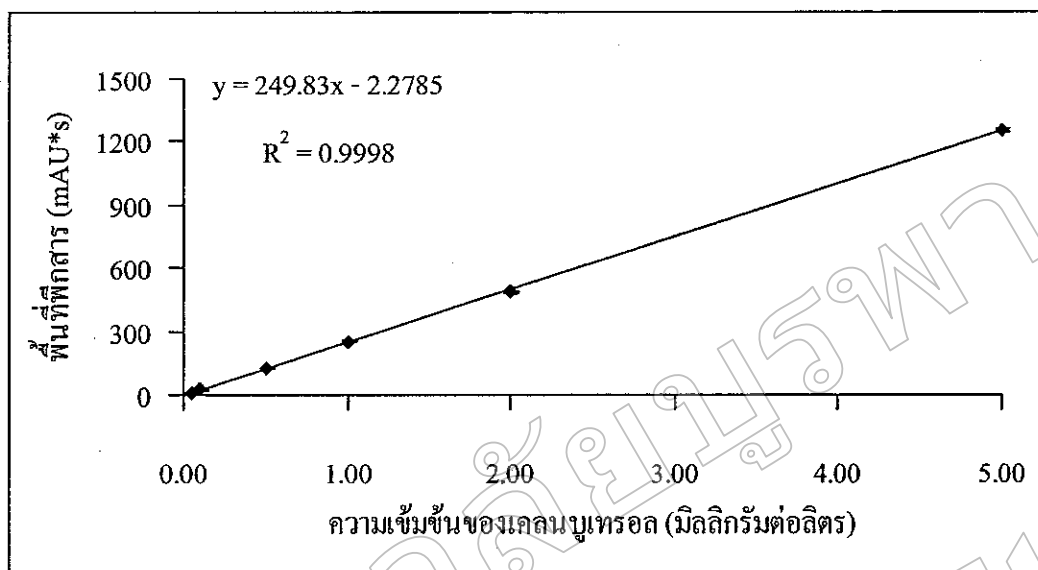
การหาความเข้มข้นของสารที่ให้กราฟเป็นเส้นตรงได้ผลแสดงดังตารางที่ 4-3 ภาพที่ 4-7 และภาพที่ 4-8

ตารางที่ 4-3 ผลการสร้างช่วงความเป็นเส้นตรงของสารซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอล (n=5)

สาร	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สัมประสิทธิ์ ของความ สัมพันธ์	สมการ
SB	0.05-5.00	0.9998	$y = 167.17x - 5.1247$
CB	0.05-5.00	0.9998	$y = 249.83x - 2.2785$



ภาพที่ 4-7 กราฟความเป็นเส้นตรงของสารละลายซัลบูทามอล



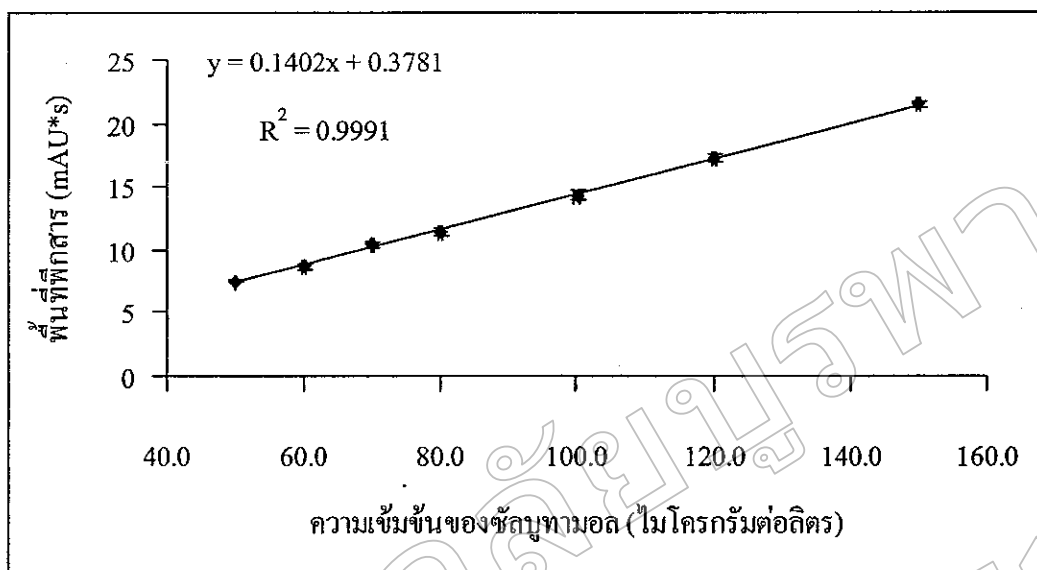
ภาพที่ 4-8 กราฟความเป็นเส้นตรงของสารละลายกลูโคส

1.2.4 ผลการสร้างกราฟมาตรฐาน

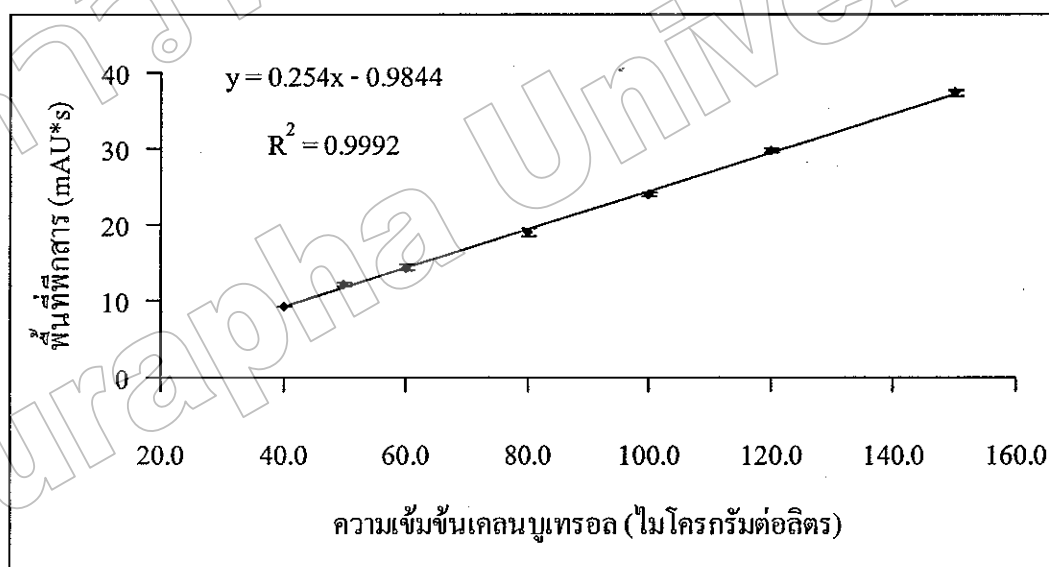
จากการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ฟลักซ์กับความเข้มข้นของสารได้ผลดังตารางที่ 4-4, ภาพที่ 4-9 และภาพที่ 4-10

ตารางที่ 4-4 ผลการสร้างกราฟมาตรฐานของสารซัลบูตามอลและกลูโคส (n=5)

สาร	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อลิตร)	สัมประสิทธิ์ ของความ สัมพันธ์	สมการ
SB	50.0-150.0	0.9991	$y = 0.1402x + 0.3781$
CB	40.0-150.0	0.9992	$y = 0.2540x - 0.9844$



ภาพที่ 4-9 กราฟมาตรฐานของสารละลายคลอโรฟิลล์ a



ภาพที่ 4-10 กราฟมาตรฐานของสารละลายคลอโรฟิลล์ b

1.2.5 ความเที่ยงของการวิเคราะห์

ทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานผสม โดยวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟลูออเรสเซนซ์คลอโรมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสม ผลแสดงดังตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 ความเที่ยงของการวิเคราะห์สารซัลบูตามอลและคลนบูเทรอลพิจารณาในเทอมของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่พีค และค่ารีเทนชันไทม์ (n=5)

สาร	%RSD พื้นที่พีคสาร			%RSD รีเทนชันไทม์		
	80.0 µg/L	100.0 µg/L	120.0 µg/L	80.0 µg/L	100.0 µg/L	120.0 µg/L
SB	2.94	1.46	1.82	3.08	2.62	0.30
CB	2.80	0.96	0.98	1.60	0.97	0.11

1.2.6 ความแม่นยำของการวิเคราะห์

ทำการวิเคราะห์ผลโดยใช้สภาวะการเตรียมตัวอย่างจากผลข้อ 1.5.1 และสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่จากข้อ 1.5.3 เติมสารละลายมาตรฐานซัลบูตามอลและคลนบูเทรอลความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50.0, 80.0 และ 120.0 ไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 50.0, 80.0 และ 120.0 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อปริมาตรสุดท้ายจากการระเหยด้วยไนโตรเจนเท่ากับ 1.0 มิลลิตร และทำการวิเคราะห์ซ้ำระดับความเข้มข้นละ 5 ครั้ง ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 1.5.3 แสดงผลดังตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-6 ความแม่นยำของการวิเคราะห์สารซัลบูตามอลและคลนบูเทรอลพิจารณาในเทอมค่าร้อยละการกลับคืน (n=5)

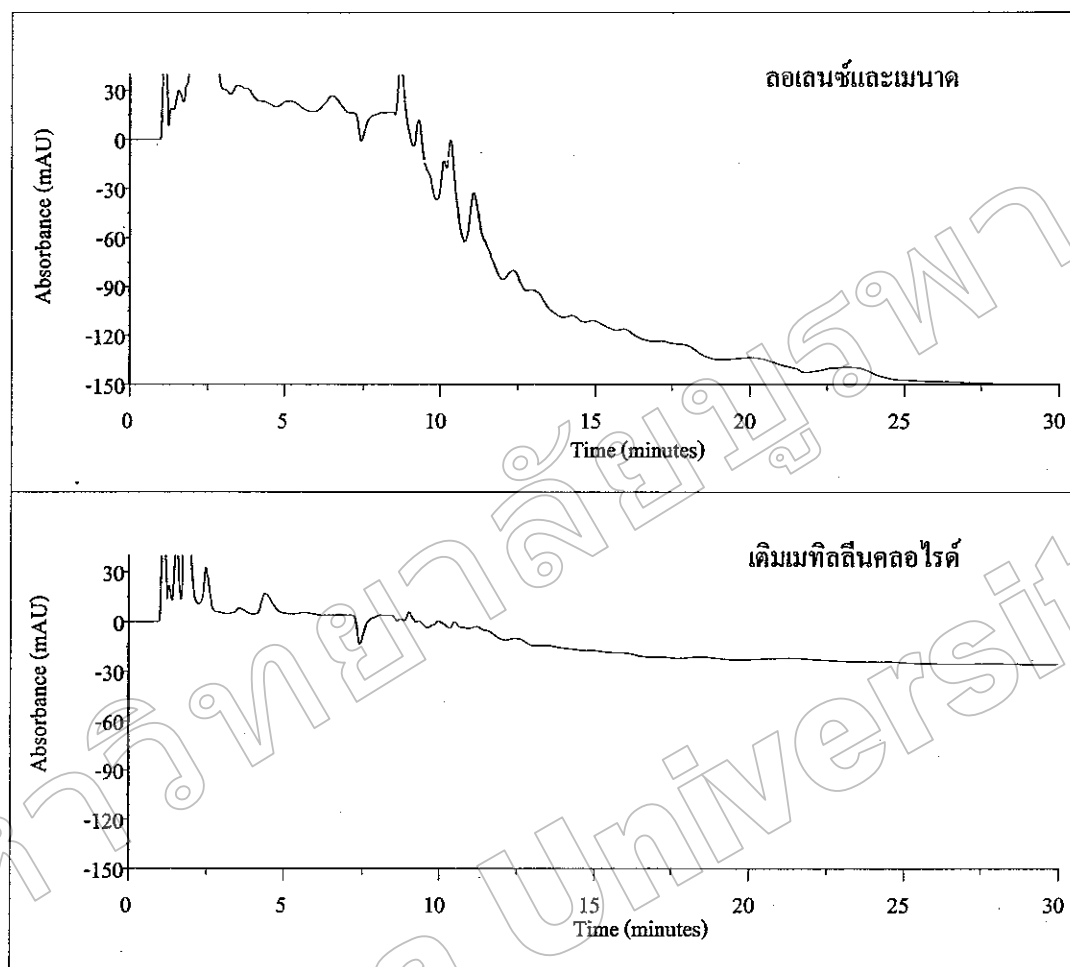
สาร	ร้อยละการกลับคืน $\pm$ SD		
	50.0 µg/L	80.0 µg/L	120.0 µg/L
SB	96.6 $\pm$ 0.5	98.5 $\pm$ 0.3	88.2 $\pm$ 1.4
CB	97.1 $\pm$ 0.9	86.0 $\pm$ 0.4	92.3 $\pm$ 0.2

1.3 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมจากการเตรียมตัวอย่างเนื้อสุกร

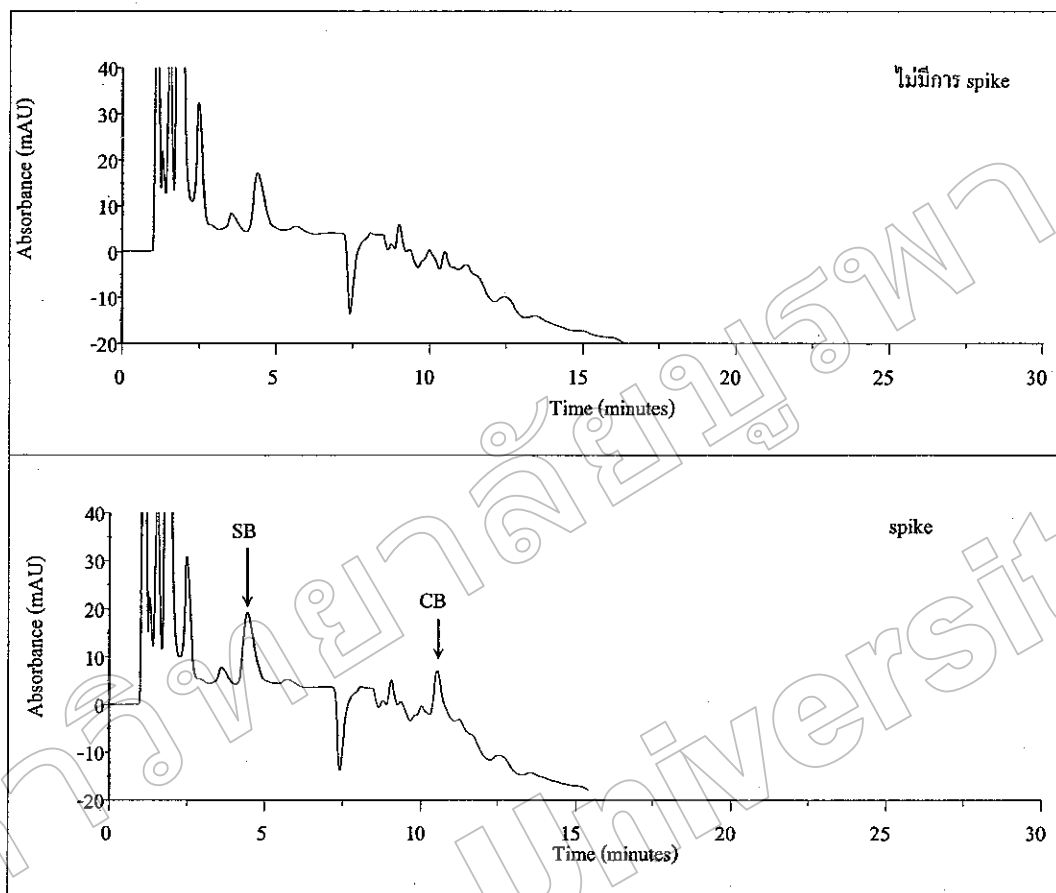
โดยทำการเตรียมตัวอย่างเนื้อสุกรจากชิ้นตอนของคอและเมนาด (Lawrence & Menard, 1997) เปรียบเทียบกับผลของการเติมเมทิลลีนคลอไรด์ 10.0 มิลลิตร ได้ผลดังภาพที่ 4-11 พบว่า เมื่อทำการเติมเมทิลลีนคลอไรด์ลงในชิ้นตอนที่ 1 ในการเตรียมตัวอย่างแล้วเมทริกซ์ลดลง

1.4 ผลการตรวจเอกลักษณ์ (Peak Identification) ของสารเคลือบเทอร์พอลและซัลบูตามอล ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อสุก

โดยเติมสารละลายมาตรฐานซัลบูตามอลและเคลือบเทอร์พอล ความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ได้ผลดังภาพที่ 4-12 พบว่า พีคของสารมาตรฐานซัลบูตามอลและเคลือบเทอร์พอลซ้อนทับกับพีคของแมทริกซ์ทั้งสองพีค ซึ่งไม่สามารถทำการวิเคราะห์ปริมาณได้ ดังนั้นจึงทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งได้ผลดังข้อ 1.5.3



ภาพที่ 4-11 ผลการหาสถานะที่เหมาะสมจากการเตรียมตัวอย่างเนื้อสุกร สถานะการทดลองดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย ตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 3.0 ระบบการชะแบบเกรเดียน โดยเวลาตั้งแต่ 0-5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก 9% และหลังจากเวลา 5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ ตัวทำละลาย ก 25%



ภาพที่ 4-12 ผลการตรวจเอกลักษณ์พืชสารชาตูปทุมมอลและเคลนบูเทรอล โดยการเติมสารละลายมาตรฐานชาตูปทุมมอลและเคลนบูเทรอล 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 5.0 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในการทดลองคือ เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 5.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 3.0 ระบบการชะแบบเกรเดียน โดยเวลาตั้งแต่ 0-5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก 9% และหลังจากเวลา 5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 25%

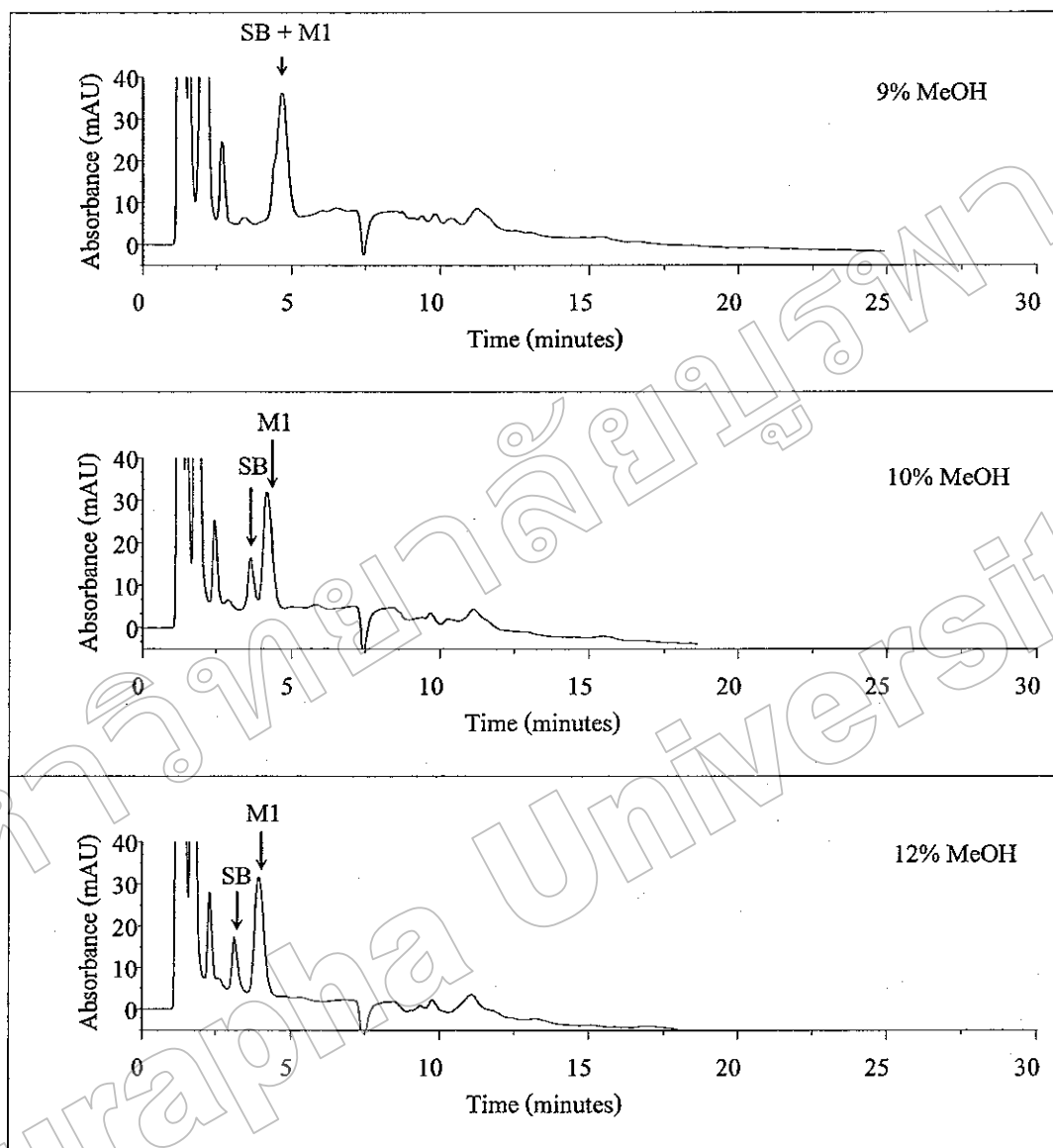
1.5 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ตัวอย่างสารซัลบูตามอลและเกลนบูเทรอล

1.5.1 สารซัลบูตามอล

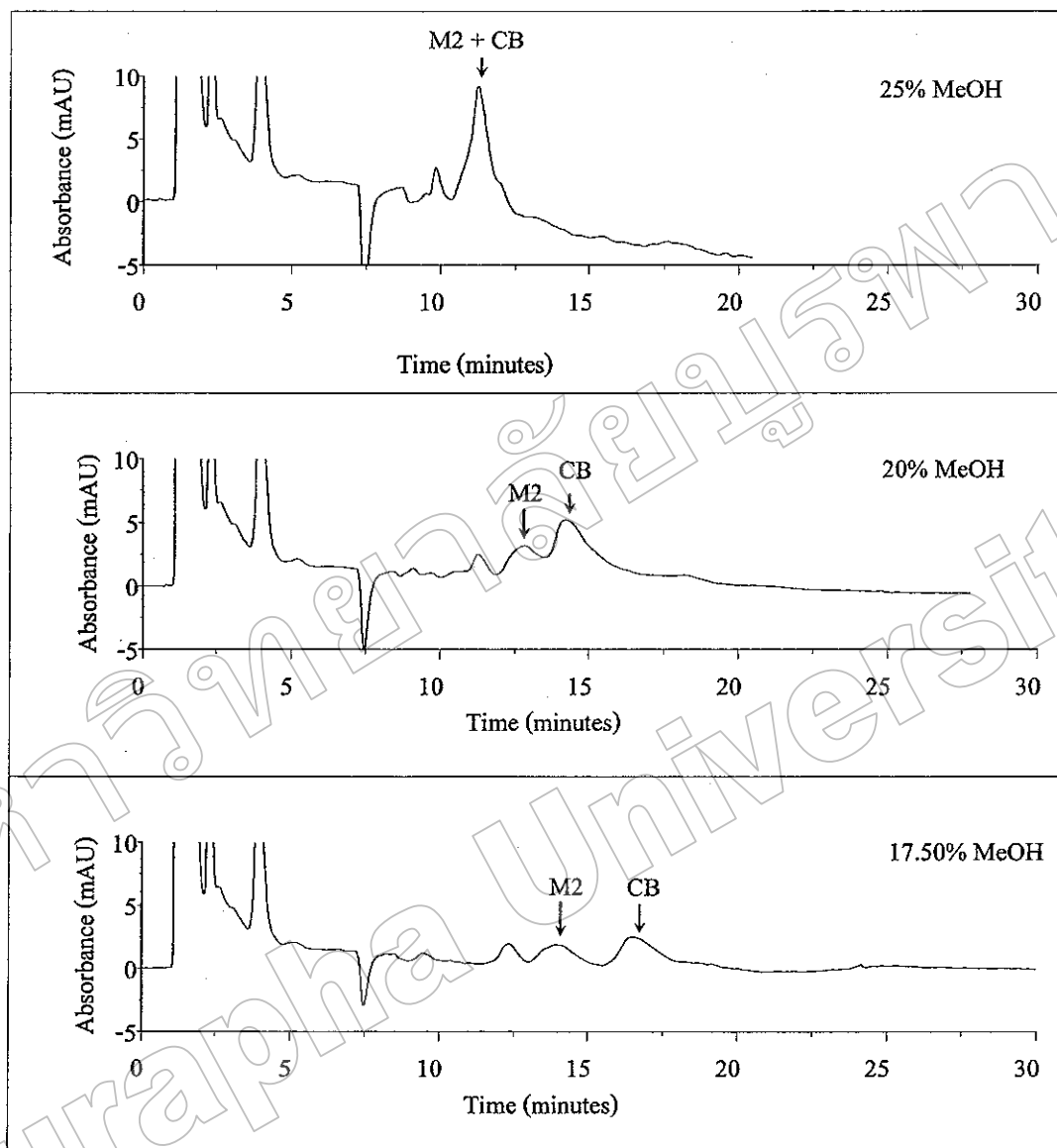
ทำการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อสุกร โดยการเติมสารมาตรฐานซัลบูตามอลความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10.0 ไมโครลิตร สภาวะการทดลอง เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 5.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 3.0 ระบบการชะแบบเกรเดียน โดยทำการศึกษาผลของเปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก ได้ผลการศึกษาดังภาพที่ 4-13 พบว่าเปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก ที่เหมาะสม เวลา 0–5.30 นาที คือ 12% และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก กับค่าการแยกแหว่งฟีกแมทริกซ์กับฟีกสารซัลบูตามอล ดังภาพที่ 4-15

1.5.2 สารเกลนบูเทรอล

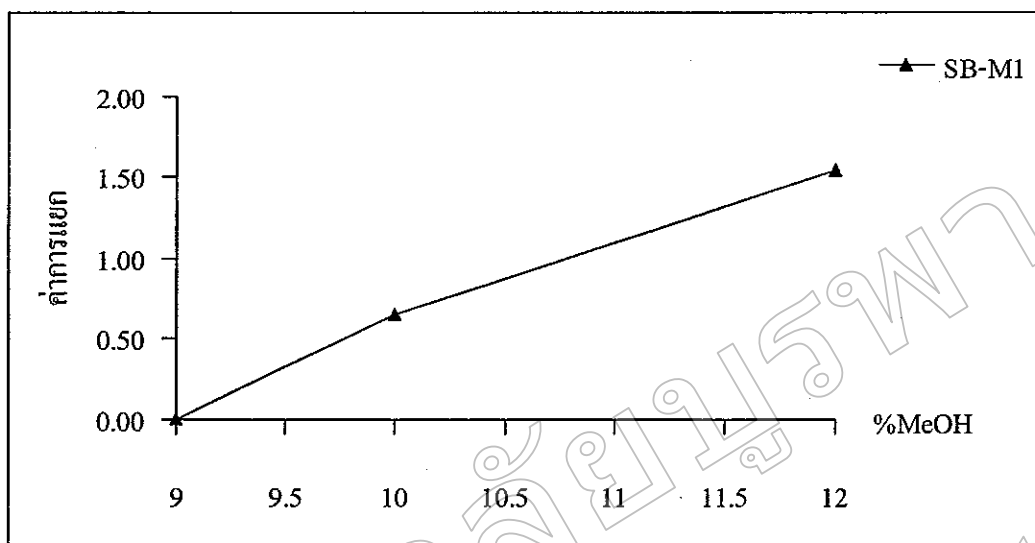
ทำการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อสุกร โดยการเติมสารมาตรฐานเกลนบูเทรอลความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10.0 ไมโครลิตร โดยทำการศึกษาผลของอัตราส่วนเมทานอลต่อสารละลายฟอสเฟตที่เวลา 5.30 นาที ได้ผลดังภาพที่ 4-14 สภาวะที่การทดลอง คือ เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย ตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 5.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 3.0 ระบบการชะแบบเกรเดียน โดยเวลาตั้งแต่ 0–5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก 12% พบว่า หลังจากเวลา 5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก ที่เหมาะสม คือ 17.5% และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวทำละลาย ก กับค่าการแยกแหว่งฟีกแมทริกซ์กับฟีกสารเกลนบูเทรอล ดังภาพที่ 4-16



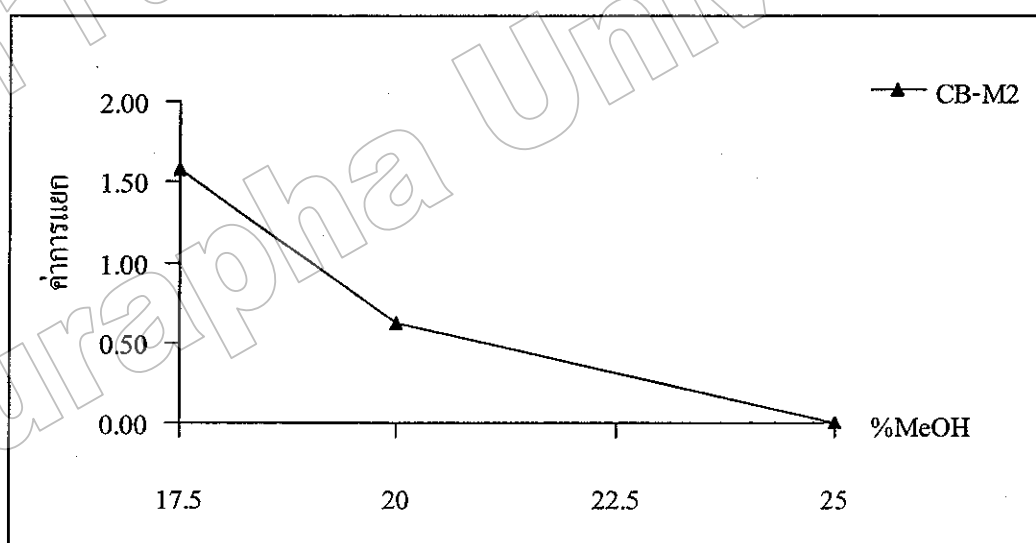
ภาพที่ 4-13 ผลของความเข้มข้นของเมทานอลใน 5.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 3.0 ต่อโครมาโทแกรมของสารซัลบูตามอล สถานะการทดลองดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ ประกอบด้วยตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 15.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 3.0 ระบบการชะแบบเกรเดียน หลังจากเวลา 5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 25% M1 = แมทริกซ์ตำแหน่งที่ 1



ภาพที่ 4-14 ผลความเข้มข้นของเมทานอลในสารละลายฟอสเฟตความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์
 พีเอช 3.0 ต่อโครมาโทแกรมสารเคลือบเทรอล เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย
 ก คือ เมทานอล และ ตัวทำละลาย ข คือ 15.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟต
 พีเอช 3.0 สภาวะการทดลองดังนี้ ระบบการชะแบบเกรเดียน โดยเวลาดังตั้ง 0-5.30
 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก 12% M2 = แมทริกซ์ตำแหน่งที่ 2



ภาพที่ 4-15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเมทานอลกับค่าการแยกระหว่างฟิกส์สารชุดบูตามอล กับฟิกส์เมทริกซ์ตำแหน่งที่ 1



ภาพที่ 4-16 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเมทานอลกับค่าการแยกระหว่างฟิกส์สารเคโนบูเทรอล กับฟิกส์เมทริกซ์ตำแหน่งที่ 2

1.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารซัลบูตามอลและคลนบูเทรอลในตัวอย่างโดยใช้

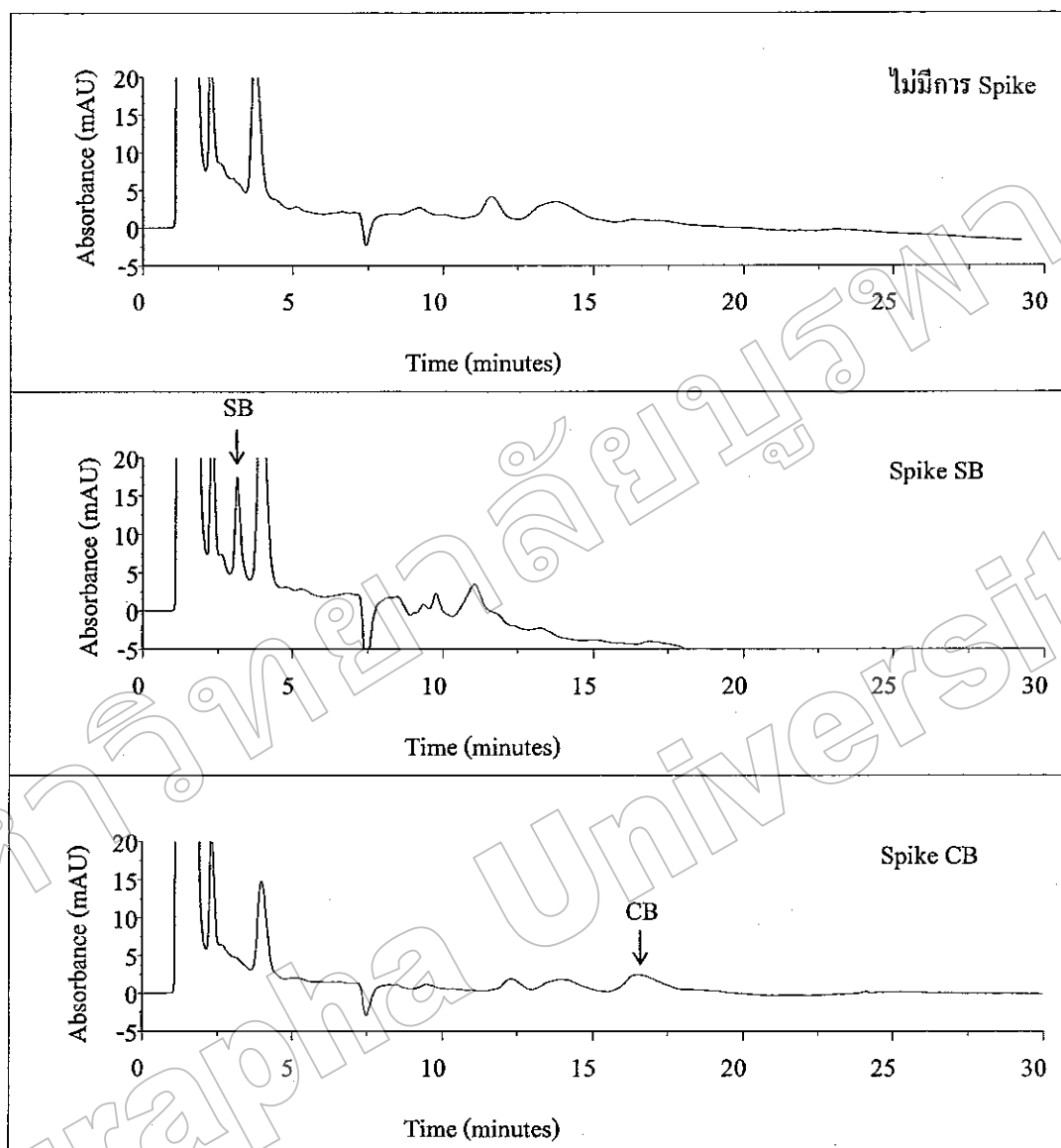
กราฟมาตรฐาน

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองคือ คอลัมน์ชนิด C_{18} ความยาว 125 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคที่ใช้บรรจุ 5 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 5.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 3.0 ระบบการชะแบบเกรเดียน โดยเวลาตั้งแต่ 0-5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก 12% และหลังจากเวลา 5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 17.5% อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส ตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น เวลา 0-7.00 นาที 206 นาโนเมตร เวลา 7.01-9.00 นาที 400 นาโนเมตร หลังจากเวลา 9.00 นาที 206 นาโนเมตร ได้ผลดังตารางที่ 4-7 และภาพที่ 4-17 และ 4-18

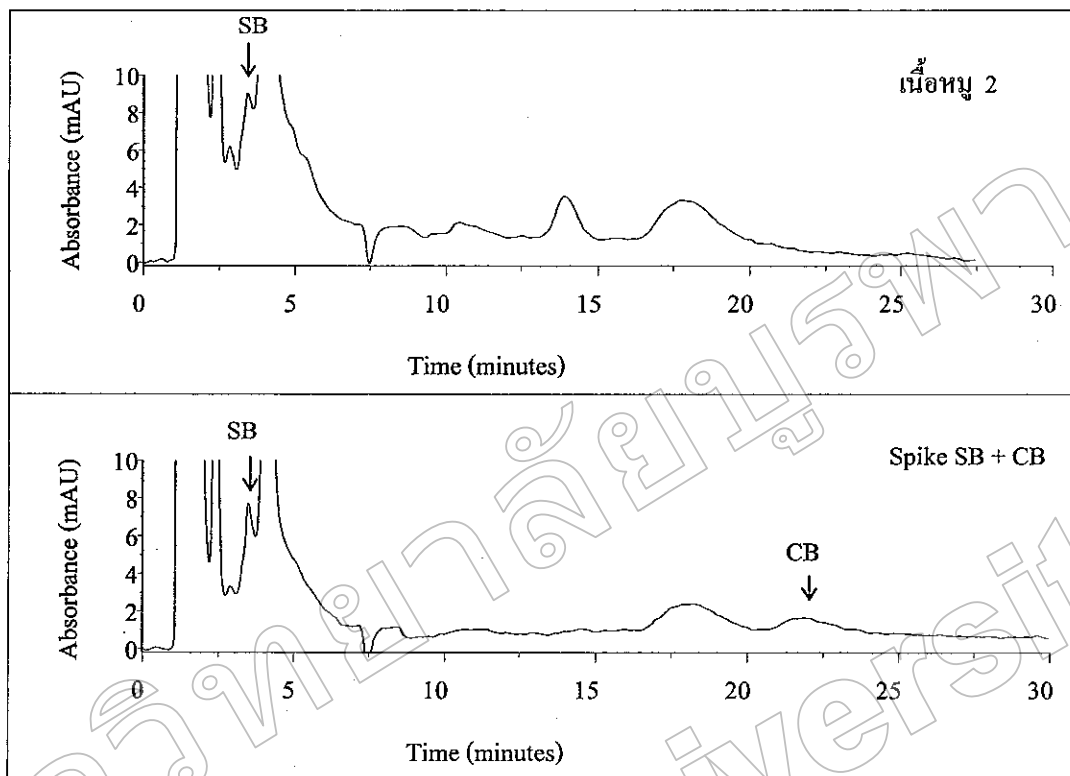
ตารางที่ 4-7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารซัลบูตามอลและคลนบูเทรอลในตัวอย่าง ($n=5$)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
	SB	CB
เนื้อหมู 1	n.d.	n.d.
เนื้อหมู 2	17.7 ± 1.4	n.d.

n.d. = not detect



ภาพที่ 4-17 โครมาโทแกรมตัวอย่างเนื้อสุกร 1 สภาวะเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมคือ ตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 5.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 3.0 ระบบการชะแบบเกรเดียน โดยเวลาตั้งแต่ 0-5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของ ตัวทำละลาย ก 12% และหลังจากเวลา 5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 17.5% เติมสารละลายมาตรฐานแคลนบูเทรอลและซัลบูตามอลความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 10.0 ไมโครลิตร



ภาพที่ 4-18 โครมาโทแกรมตัวอย่างเนื้อสุกร 2 สถานะเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม คือ ตัวทำละลาย ก คือ เมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 5.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟดพีเอช 3.0 ระบบการชะแบบเกรเดียน โดยเวลาดังแต่ 0-5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก 12% และหลังจากเวลา 5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 17.5% เติมสารละลายมาตรฐานซัลบูตามอลความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร 20.0 ไมโครลิตร และแคลนบูเทรอล 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร 50.0 ไมโครลิตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณไรโบฟลาวิน ฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ และ ฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์

2.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไรโบฟลาวิน ฟลาวินอะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ และฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์

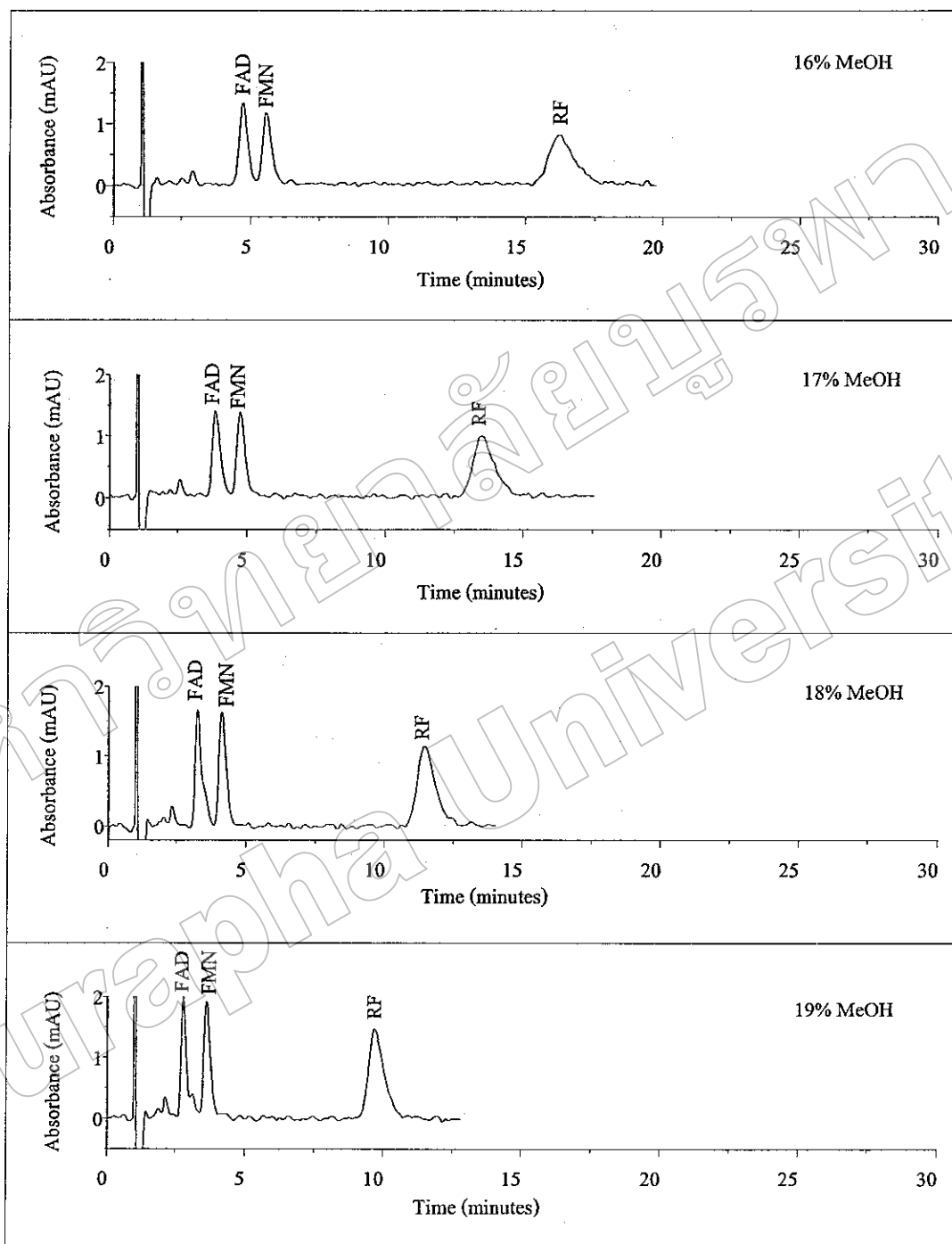
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมได้แก่ ไรโบฟลาวิน ฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ และฟลาวินอะดีนีนนิวคลีโอไทด์ โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟลูออเรสเซนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี สภาวะของการทดลอง คอลัมน์ชนิด C_{18} ความยาว 125 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคที่ใช้บรรจุ 5 ไมโครเมตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส ตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น 267 นาโนเมตร

2.1.1 ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์ของเมทานอลในสารละลายเฟสเคลื่อนที่ จากการศึกษาผลของเปอร์เซ็นต์เมทานอลในสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 ซึ่งพิจารณาในเทอมของค่าการแยกและค่ารีเทนชันไทม์ของสารละลายมาตรฐานผสม แสดงผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์ของเมทานอลในสารละลายเฟสเคลื่อนที่ ดังภาพที่ 4-19 และ 4-20 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ เมทานอล 17%

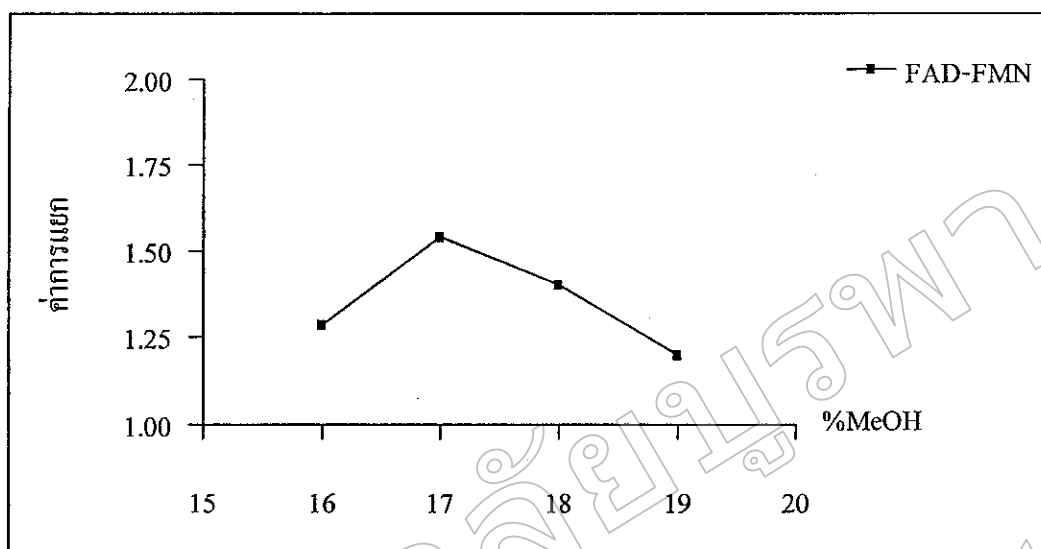
2.1.2 ผลการศึกษาค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟต จากการศึกษาค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟต เฟสเคลื่อนที่ 17%เมทานอลในสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะที่กำหนด ซึ่งพิจารณาในเทอมของค่ารีเทนชันไทม์ แสดงผลการศึกษา ดังภาพที่ 4-21 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือสารละลายฟอสเฟตที่พีเอช 6.0

2.1.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟต จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟต เฟสเคลื่อนที่ 17%เมทานอลในสารละลายฟอสเฟตพีเอช 6.0 ภายใต้สภาวะที่กำหนด ซึ่งพิจารณารูปร่างของพีกสารละลายมาตรฐานผสม แสดงผลการศึกษา ดังภาพที่ 4-22 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟต 15.0 มิลลิโมลาร์

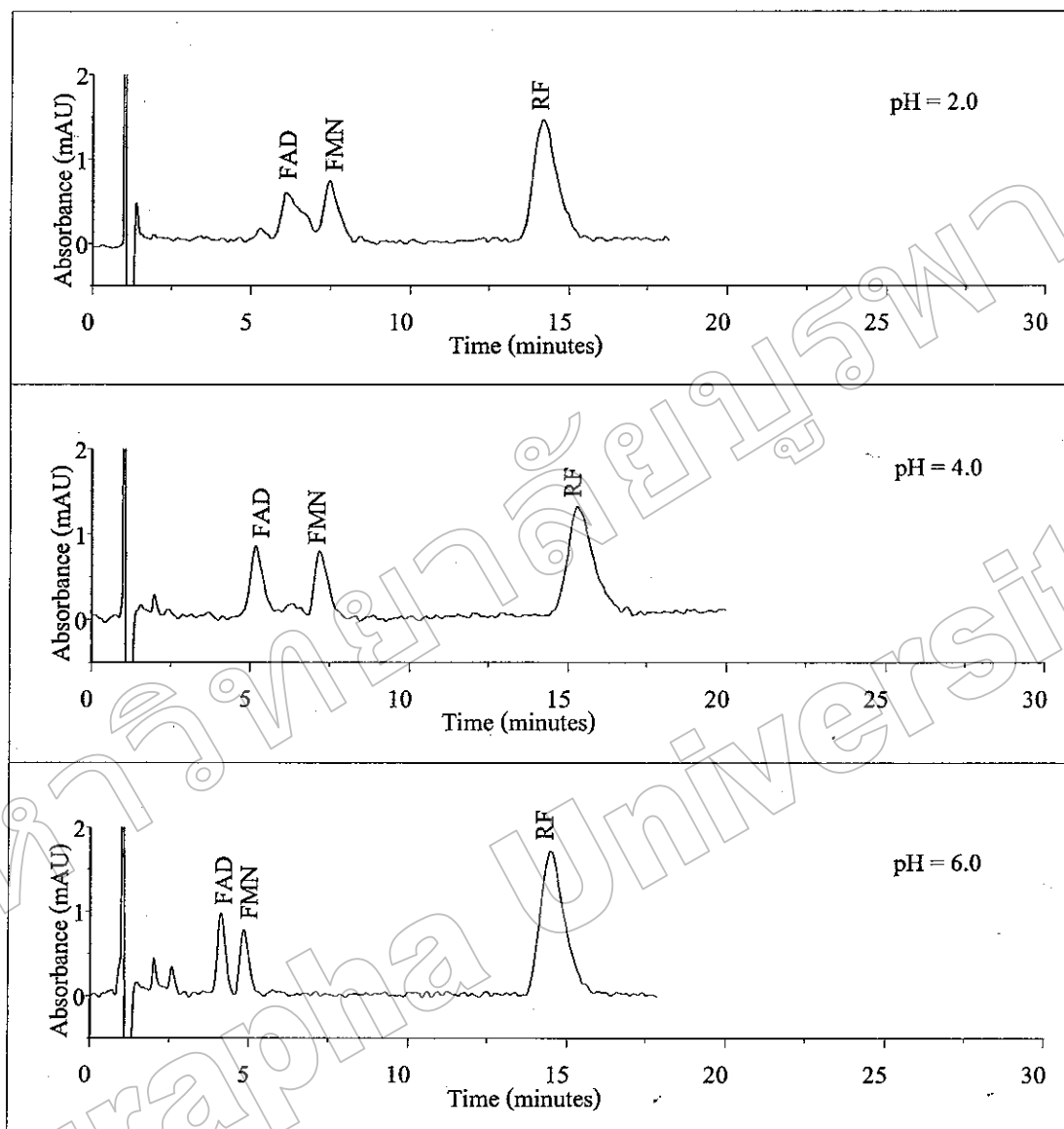
2.1.4 ผลการศึกษาการชะแบบเกรเดียน จากการศึกษาผลของการชะแบบเกรเดียน ตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 15.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 6.0 เวลาตั้งแต่ 0-5.00 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 17% และหลังจากเวลา 5.00 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ ตัวทำละลาย ก 25% ภายใต้สภาวะที่กำหนด พิจารณาในเทอมของค่ารีเทนชันไทม์ แสดงผลการศึกษา ดังภาพที่ 4-23



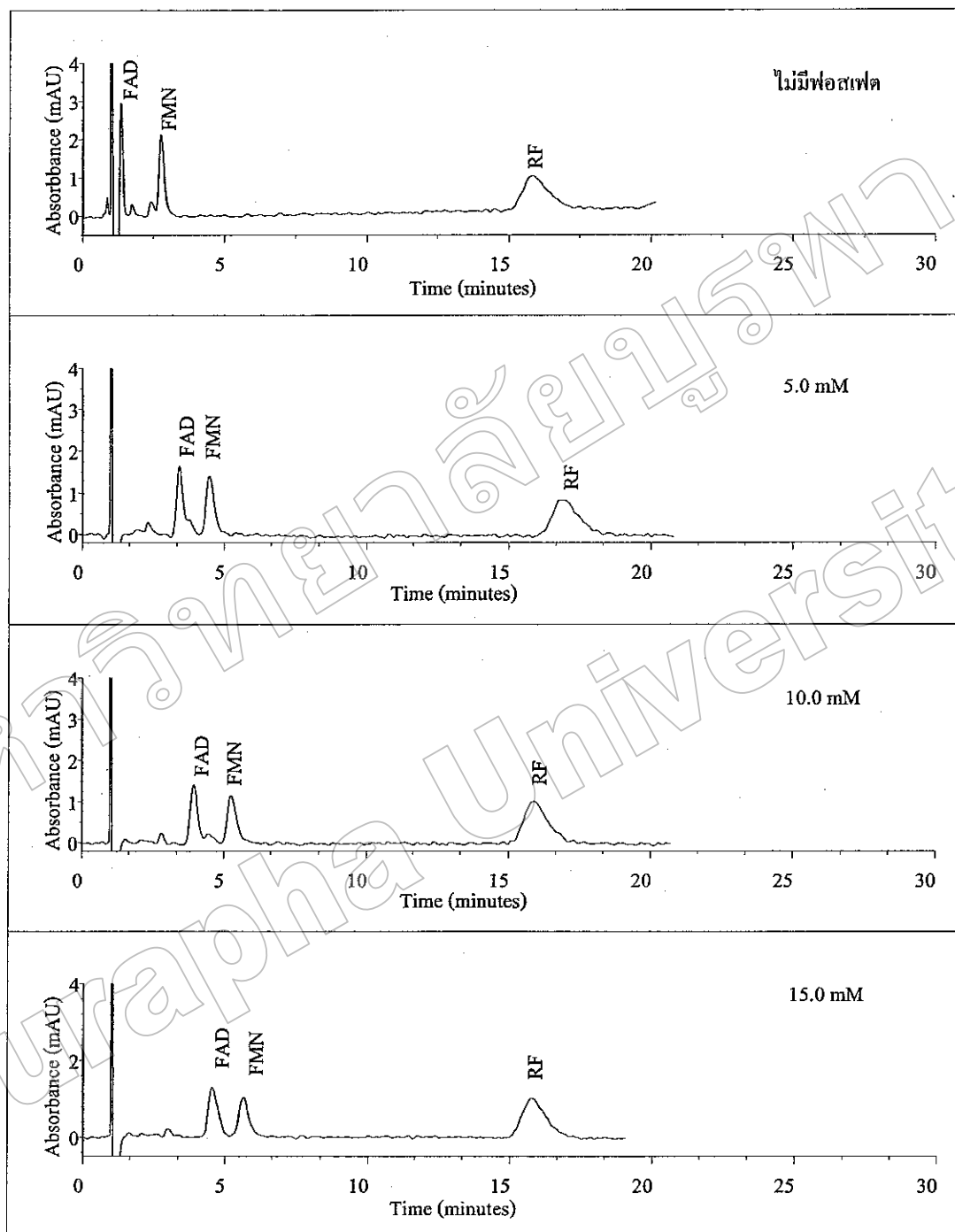
ภาพที่ 4-19 ผลของเปอร์เซ็นต์ของเมทานอลในสารละลายเฟสเคลื่อนที่ต่อโครมาโทแกรมของสาร ฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ ฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ และไรโบฟลาวิน สภาวะการทดลอง ดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ใช้เมทานอลใน 15.0 มิลลิโมลาร์ สารละลาย ฟอสเฟตพีเอช 6 อัตราส่วน 17: 83 (v/v) ความเข้มข้น FAD = 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร FMN และ RF = 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร



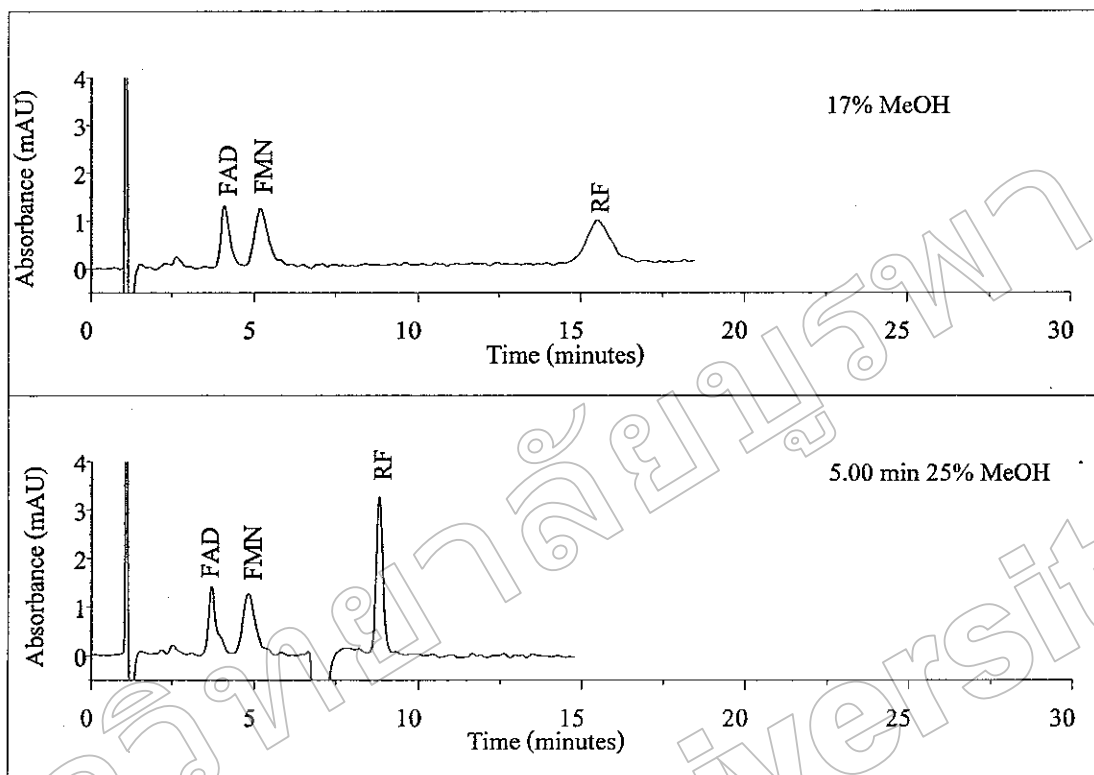
ภาพที่ 4-20 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ของเมทานอลในสารละลายเฟสเคลื่อนที่กับค่าการแยกของฟิกสาร์ฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์และฟิกสาร์ฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4-21 ผลของพีเอชของสารละลายฟอสเฟตต่อโครมาโทแกรมของสารฟลาวินอะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ ฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ และไรโบฟลาวิน สภาวะการทดลองดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ใช้อัตราส่วนของเมทานอลต่อสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์ อัตราส่วน 17: 83 (v/v) ความเข้มข้น FAD = 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร FMN และ RF = 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-22 ผลของความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตต่อโครมาโทแกรมของสารฟลาวิโนอะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ ฟลาวิโนโมโนนิวคลีโอไทด์ และไรโบฟลาวิน สภาวะการทดลอง ดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ใช้อัตราส่วนของเมทานอลต่อสารละลายฟอสเฟตพีเอช 6 อัตราส่วน 17: 83 (v/v) ความเข้มข้น FAD = 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร FMN และ RF = 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4-23 ผลของการชะแบบเกรเดียนต์โครมาโทแกรมของสารฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ ฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ และไรโบฟลาวิน สภาวะการทดลองดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ ประกอบด้วยตัวทำละลาย ก คือ เมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 15.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 6.0 ระบบการชะแบบเกรเดียนต์ เวลาตั้งแต่ 0-5.00 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 17% และหลังจากเวลา 5.00 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 25% ตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น เวลา 0-6.00 นาที 267 นาโนเมตร เวลา 6.01-8.00 นาที 400 นาโนเมตร หลังจากเวลา 8.00 นาที 267 นาโนเมตร ความเข้มข้น FAD = 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร FMN และ RF = 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์

สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง คือ คอลัมน์ชนิด C_{18} ความยาว 125 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคที่ใช้บรรจุ 5 ไมโครเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 15.0 มิลลิโมลาร์ สารละลาย ฟอสเฟตพีเอช 6.0 ระบบการชะแบบเกรเดียน เวลาตั้งแต่ 0-5.00 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 17% และ หลังจากเวลา 5.00 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 25% อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส ตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น เวลา 0-6.00 นาที 267 นาโนเมตร เวลา 6.01-8.00 นาที 400 นาโนเมตร หลังจากเวลา 8.00 นาที 267 นาโนเมตร

2.2.1 ผลการหาขีดจำกัดของการตรวจวัด

จากการหาขีดจำกัดของการตรวจวัด พบว่าความเข้มข้นของสารที่ทำการวิเคราะห์ ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise Ratio) อยู่ในช่วง 2-3 แสดงผลดังตารางที่ 4-8 ภาพที่ ผ-10 ผ-11 และ ผ-12

ตารางที่ 4-8 ขีดจำกัดของการตรวจวัดของสารฟลาโวนอะคินินไดนิวคลีโอไซด์ ฟลาโวนโมโนนิวคลีโอไซด์ และไรโบฟลาวิน (n=5)

สาร	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อลิตร)
FAD	25.0
FMN	50.0
RF	25.0

2.2.2 ผลการหาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ

จากการหาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ พบว่าความเข้มข้นของสารที่ทำการวิเคราะห์ ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise Ratio) อยู่ในช่วง 10-12 แสดงผลดังตารางที่ 4-9 ภาพที่ ผ-13 ผ-14 และ ผ-15

ตารางที่ 4-9 ซีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณของสารฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ ฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ และไรโบฟลาวิน (n=5)

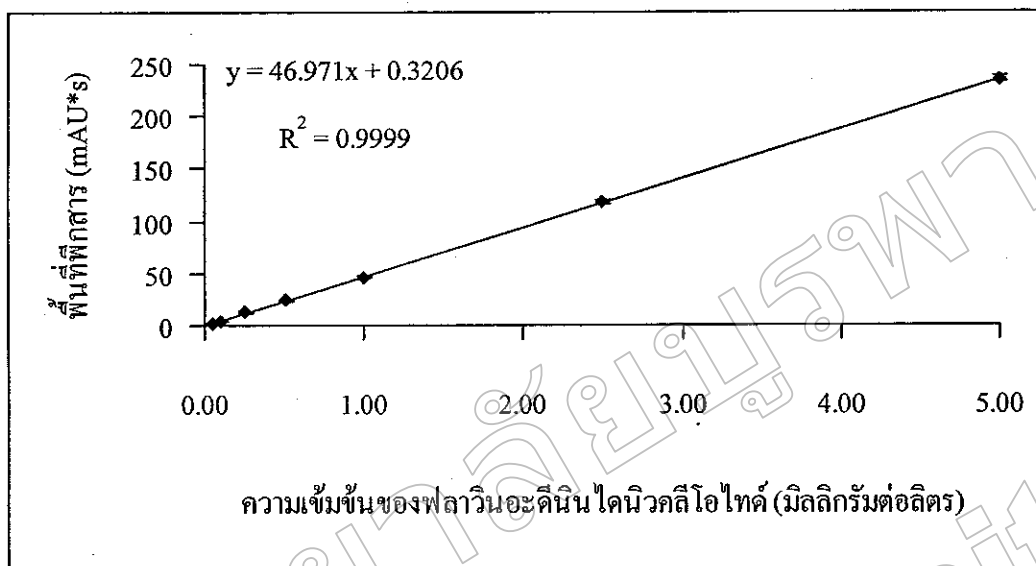
สาร	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อลิตร)
FAD	50.0
FMN	100.0
RF	50.0

2.2.3 การหาความเป็นเส้นตรง

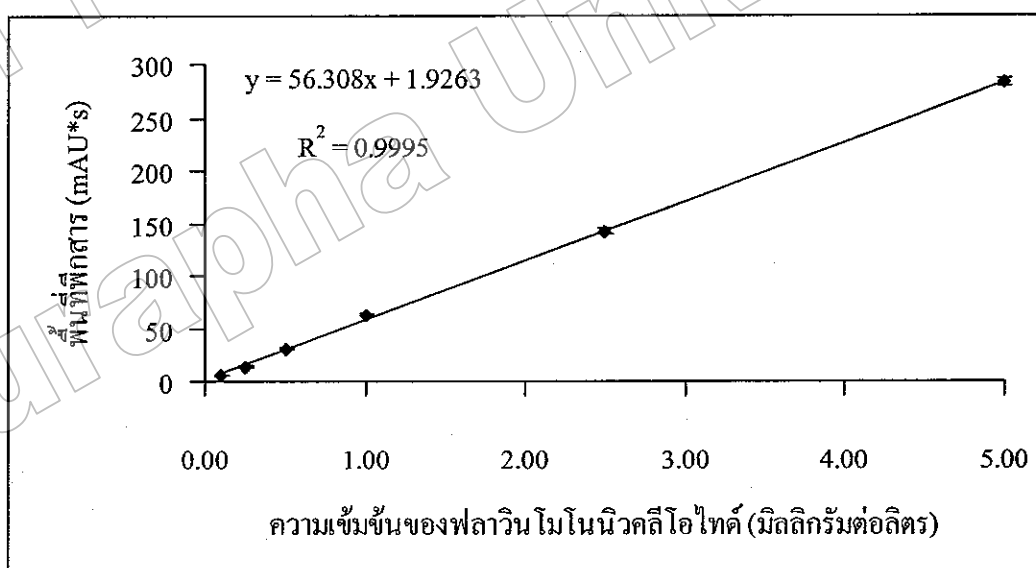
จากการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ที่พิกกับความเข้มข้นของสารได้ผล ดังตารางที่ 4-10 ภาพที่ 4-24 4-25 และ 4-26

ตารางที่ 4-10 ผลการสร้างช่วงความเป็นเส้นตรงของสารฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ ฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ และไรโบฟลาวิน (n=5)

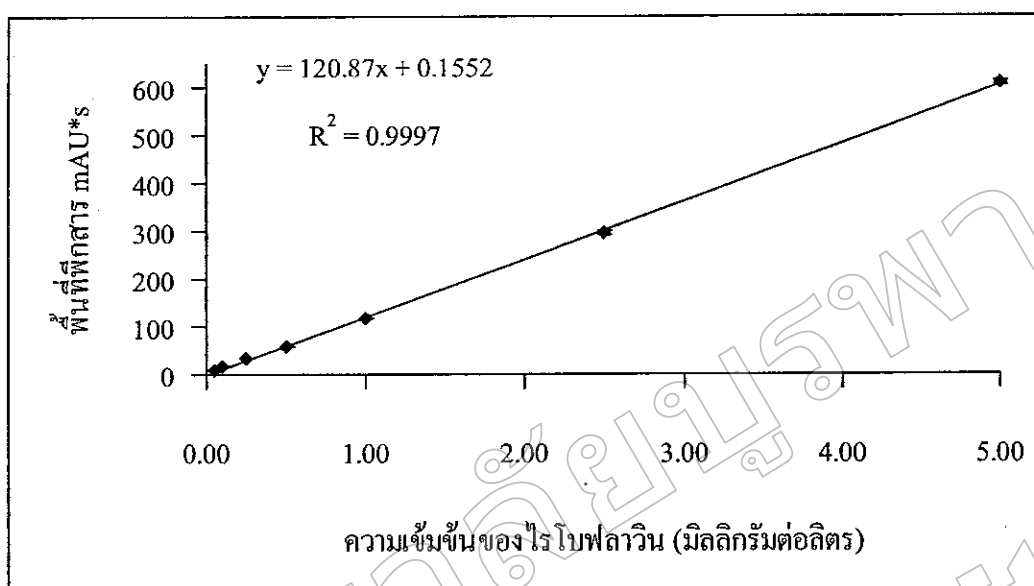
สาร	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สัมประสิทธิ์ ของความสัมพันธ์	สมการ
FAD	0.05 - 5.00	0.9999	$y = 46.971x + 0.3206$
FMN	0.10 - 5.00	0.9995	$y = 56.308x + 1.9263$
RF	0.05 - 5.00	0.9997	$y = 120.87x + 0.1552$



ภาพที่ 4-24 กราฟความเป็นเส้นตรงของสารฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4-25 กราฟความเป็นเส้นตรงของสารฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์



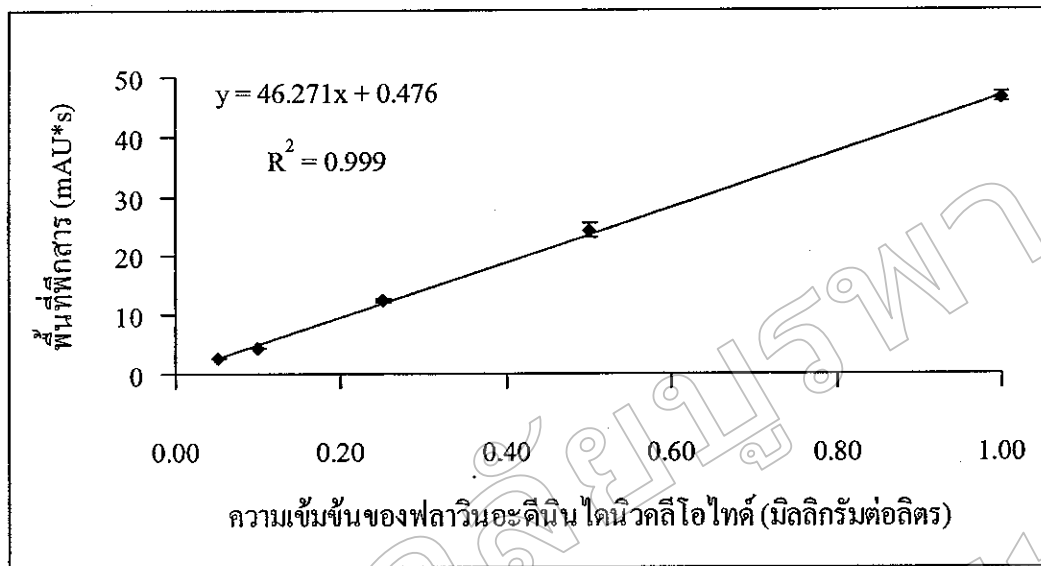
ภาพที่ 4-26 กราฟความเป็นเส้นตรงของสารไรโบฟลาวิน

2.2.4 ผลการสร้างกราฟมาตรฐาน

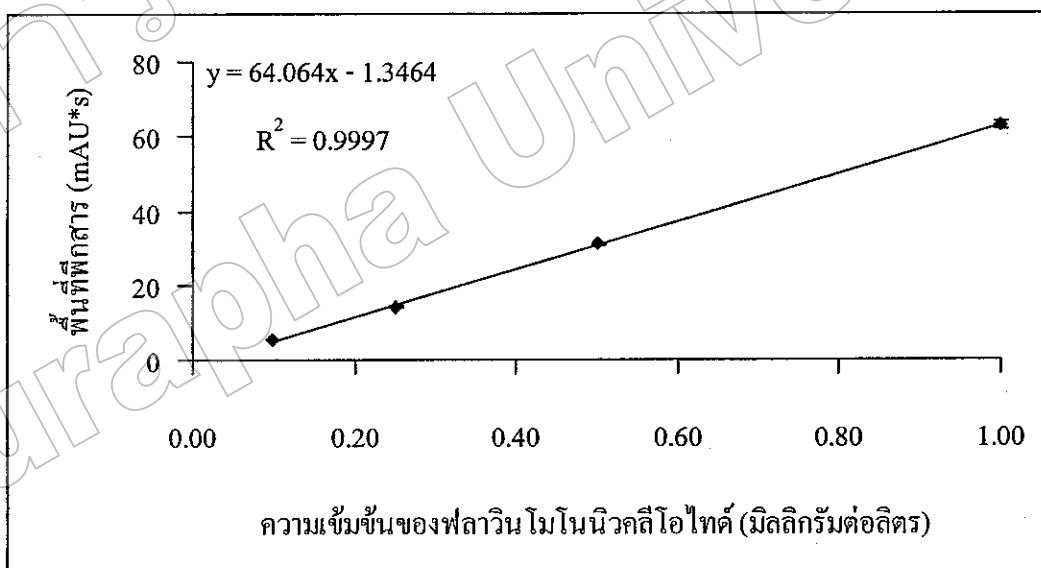
จากการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ที่พิกกับความเข้มข้นของสารได้ผลดังตารางที่ 4-11 ภาพที่ 4-27 4-28 และ 4-29

ตารางที่ 4-11 ผลการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ที่พิกกับความเข้มข้นของสารฟลาวินอะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ ฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ และไรโบฟลาวิน (n=5)

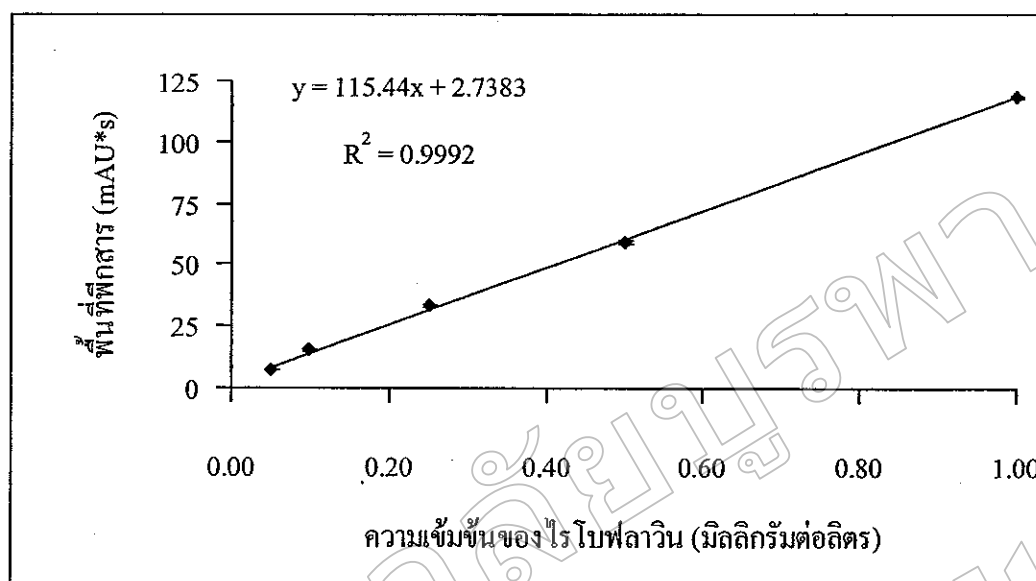
สาร	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สัมประสิทธิ์ ของความสัมพันธ์	สมการ
FAD	0.05 - 1.00	0.9990	$y = 46.271x + 0.476$
FMN	0.10 - 1.00	0.9997	$y = 64.064x - 1.3464$
RF	0.05 - 1.00	0.9992	$y = 115.44x + 2.7383$



ภาพที่ 4-27 กราฟมาตรฐานของสารฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4-28 กราฟมาตรฐานของสารฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4-29 กราฟมาตรฐานของสารไรโบฟลาวิน

2.2.5 ความเที่ยงของการวิเคราะห์

ทำการวิเคราะห์มาตรฐานผสม โดยวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสม แสดงผลดังตารางที่ 4-12

ตารางที่ 4-12 ความเที่ยงของการวิเคราะห์สารฟลาวินอะคตินินไดนิวคลีโอไทด์ ฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ และไรโบฟลาวิน พิจารณาในเทอมของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่ารีเทนชันไทม์และพื้นที่ฟลักสาร (n=5)

สาร	%RSD รีเทนชันไทม์			%RSD พื้นที่ฟลักสาร		
	50.0 µg/L	100.0 µg/L	500.0 µg/L	50.0 µg/L	100.0 µg/L	500.0 µg/L
FAD	0.09	0.06	0.02	3.23	1.85	1.37
FMN	0.26	0.03	0.01	4.74	4.78	1.00
RF	0.42	0.06	0.02	4.73	1.97	0.75

2.2.6 ความแม่นยำของการวิเคราะห์

ทำการวิเคราะห์ผลโดยการเติมสารมาตรฐานผสม 3 ความเข้มข้น โดยวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสม แสดงผลดังตารางที่ 4-13 และ 4-14

ตารางที่ 4-13 ความแม่นยำของการวิเคราะห์สารฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์และไรโบฟลาวิน พิจารณาในเทอมของค่าร้อยละการกลับคืน (n=5)

สาร	ร้อยละการกลับคืน $\pm$ SD		
	250.0 $\mu\text{g/L}$	500.0 $\mu\text{g/L}$	750.0 $\mu\text{g/L}$
FAD	97.6 ± 1.0	99.4 ± 4.4	104.8 ± 4.5
RF	93.6 ± 2.1	96.7 ± 3.7	99.5 ± 4.2

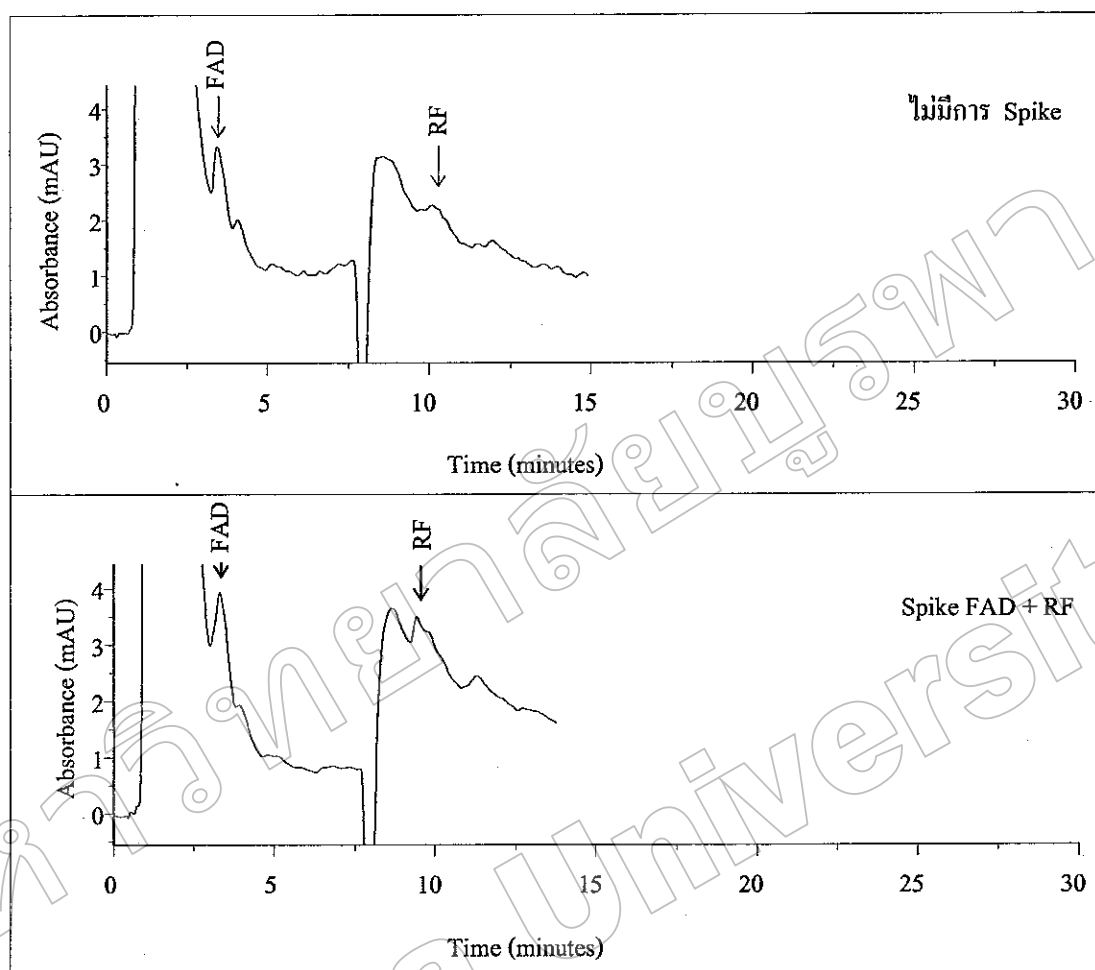
ตารางที่ 4-14 ความแม่นยำของการวิเคราะห์สารฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ พิจารณาในเทอมของค่าร้อยละการกลับคืน (n=5)

สาร	ร้อยละการกลับคืน $\pm$ SD		
	50.0 $\mu\text{g/L}$	100.0 $\mu\text{g/L}$	200.0 $\mu\text{g/L}$
FMN	87.8 ± 1.8	90.1 ± 4.5	96.6 ± 4.2

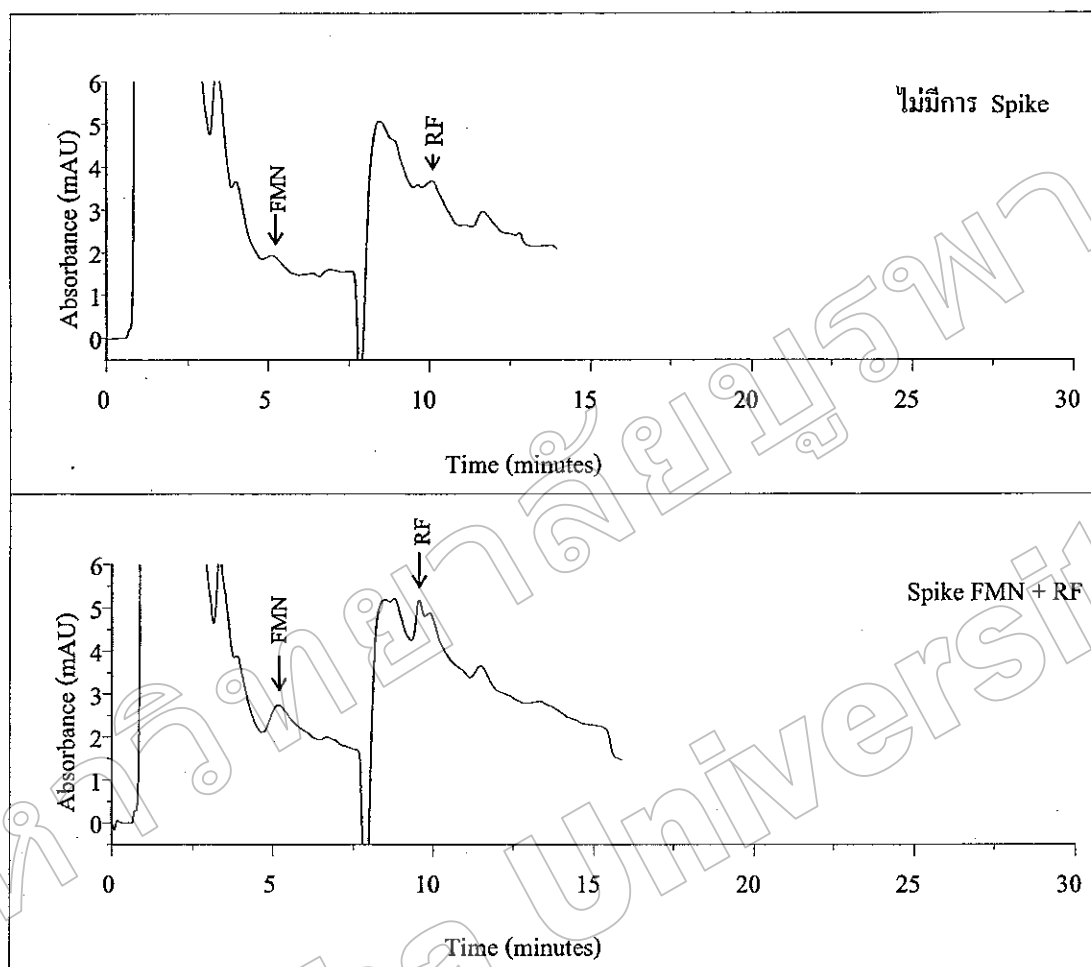
2.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารไรโบฟลาวิน ฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ และฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ในตัวอย่าง โดยใช้กราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 4-15 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาวินอะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ ฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ และไรโบฟลาวิน ในตัวอย่าง (n=5)

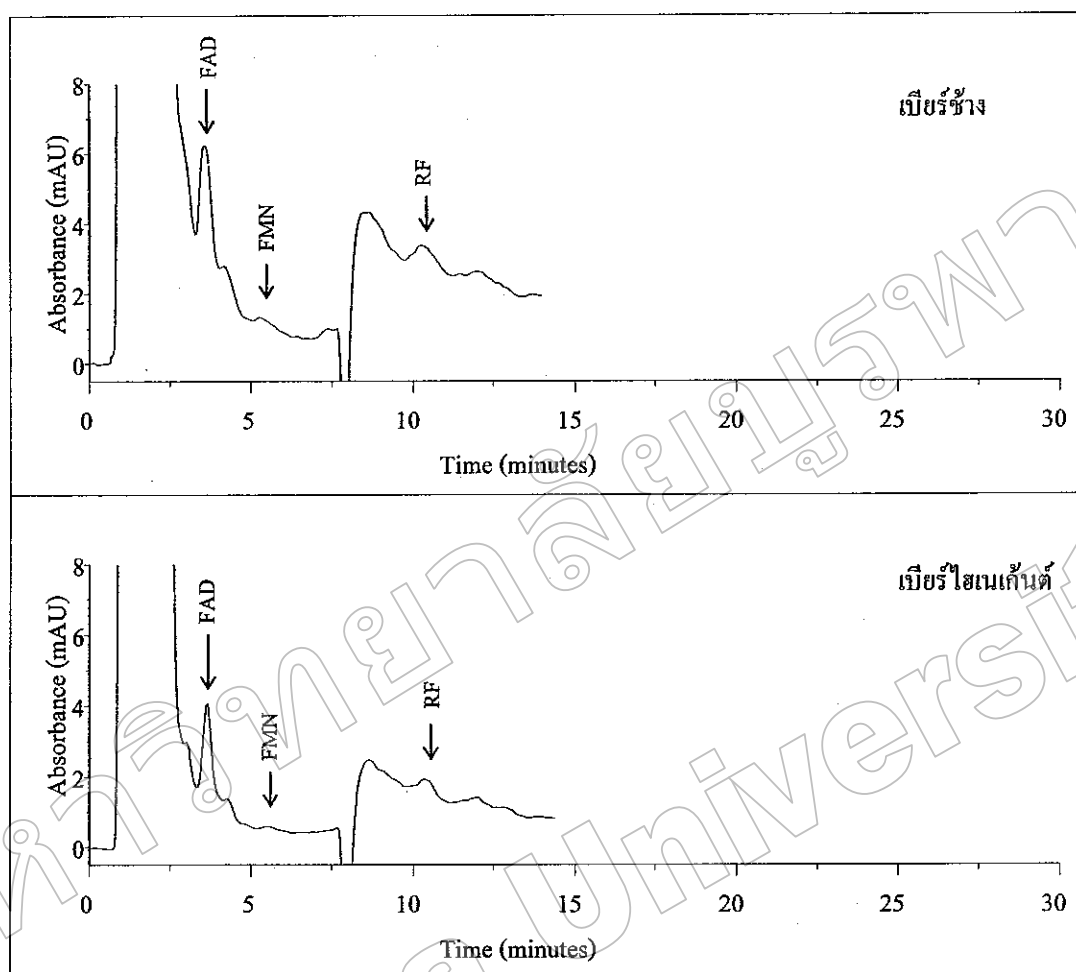
ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	FAD	FMN	RF
เบียร์สิงห์	1.99 ± 0.10	0.34 ± 0.07	0.41 ± 0.09
เบียร์ช้าง	4.84 ± 0.28	0.37 ± 0.08	0.56 ± 0.11
เบียร์ไฮเนเก้นด์	2.89 ± 0.17	0.37 ± 0.07	0.42 ± 0.10



ภาพที่ 4-30 โครมาโทแกรมตัวอย่างเบียร์สิ่งเติมสารละลายมาตรฐาน FAD และ RF ความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 10.0 ไมโครลิตร สภาพการทดลองดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ ประกอบด้วยตัวทำละลาย ก คือ เมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 15.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 6.0 ระบบการชะแบบเกรเดียน เวลาตั้งแต่ 0-5.00 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ ตัวทำละลาย ก 17% และหลังจากเวลา 5.00 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ ตัวทำละลาย ก 25%



ภาพที่ 4-31 โครมาโทแกรมตัวอย่างเบียร์สิ่งเติมสารละลายมาตรฐาน FMN และ RF ความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 20.0 ไมโครลิตร สภาพการทดลองดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ ประกอบด้วย ตัวทำละลาย ก คือ เมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 15.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 6.0 ระบบการชะแบบเกรเดียน เวลาตั้งแต่ 0-5.00 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 17% และหลังจากเวลา 5.00 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 25%



ภาพที่ 4-32 โครมาโทแกรมเบียร์ช้างและเบียร์ไฮเนเก้นต์ สภาวะการทดลองดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ ประกอบด้วยตัวทำละลาย ก คือ เมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 15.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 6.0 ระบบการชะแบบเกรเดียน เวลาตั้งแต่ 0-5.00 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 17% และหลังจากเวลา 5.00 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ตัวทำละลาย ก 25%