บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (G1600A, Hewlett-Packard ^{3D}CE, Germany)

3.1.2 ฟิวส์ซิลิกาแคปปิลารี ยาว 36 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร (Polymicro Technologies, U.S.A.)

3.1.3 เครื่องวัดพีเอช (Beckman, U.S.A.)

3.1.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด 4 ตำแหน่ง (AG204, Mettler Toledo, U.S.A.)

3.1.5 เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน Easy pure LF (Barnstead, U.S.A.)

3.1.6 เครื่องอุลตร้าโซนิค (690D, CREST, U.S.A.)

3.1.7 ขวดวัดปริมาตร

3.1.8 บีกเกอร์

3.1.9 ปิเปต

3.1.10 กระบอกตวง

3.2 สารเคมี

3.2.1 เดาโนรูบิซิน เกรดวิเคราะห์ (Daunorubicin, $C_{27}H_{29}NO_{10}$.HCl, 563.99 กรัมต่อโมล, Sigma, Germany)

3.2.2 ไอดารูบิซิน เกรดวิเคราะห์ (Idarubicin, $C_{26}H_{27}NO_9$.HCl, 533.96 กรัมต่อโมล, Fluka, China)

3.2.3 ดือกโซรูบิซิน เกรดวิเคราะห์ (Doxorubicin, $C_{27}H_{29}NO_{11}$.HCl, 580.00 กรัมต่อโมล, Fluka, India)

3.2.4 เมทโทเทรกเซท เกรดวิเคราะห์ (Methotrexate, $C_{20}H_{22}N_8O_5$, 454.45 กรัมต่อโมล, Trexall™, U.S.A.)

3.2.5 ไดโซเดียมเตตระบอเรตเดคะไฮเดรต เกรดวิเคราะห์ (Disodium tetraborate decahydrate, $Na_2B_4O_7.10H_2O$, 381.37 กรัมต่อโมล, Merck, Germany)

3.2.6 ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต แอนไฮดรัส เกรดวิเคราะห์ (Disodium hydrogen orthophosphate anhydrous, Na_2HPO_4, 141.96 กรัมต่อโมล, Ajax, Australia)

3.2.7 โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต เกรดวิเคราะห์ (Sodium hydrogen carbonate, $NaHCO_3$, 84.01 กรัมต่อโมล, Merck, Germany)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2.8 อะซิโตไนไตรล์ เกรดวิเคราะห์ (Acetonitrile 98%, C_2H_3N, BHD, England)

3.2.9 โซเดียมไฮดรอกไซด์ เกรดวิเคราะห์ (Sodium hydroxide, NaOH, 40.00 กรัมต่อโมล, Ajax, Australia)

3.2.10 กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เกรดวิเคราะห์ (Hydrochloric acid 37%, HCl, Merck, Germany)

3.3 การเตรียมสารละลาย

3.3.1 การเตรียมสารละลายสต๊อก (Stock solution)

3.3.1.1 สารละลายสต๊อกเดาโนรูบิซิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ละลายเดาโนรูบิซิน 0.0010 กรัม ด้วยอะซิโตไนไตรล์ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 5 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

3.3.1.2 สารละลายสต๊อกไอดารูบิซิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ละลายไอดารูบิซิน 0.0010 กรัม ด้วยอะซิโตไนไตรล์ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 5 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

3.3.1.3 สารละลายสต๊อกด็อกโซรูบิซิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ละลายด็อกโซรูบิซิน 0.0010 กรัม ด้วยอะซิโตไนไตรล์ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 5 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

3.3.1.4 สารละลายมาตรฐานเมทโทเทรกเซท 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ละลายเมทโทเทรกเซท 0.0010 กรัม ด้วย 0.01 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 5 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

3.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard solution)

3.3.2.1 สารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน 20.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน จากสารละลายสต๊อกเดาโนรูบิซิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.2.2 สารละลายมาตรฐานไอดารูบิซิน 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไอดารูบิซิน จากสารละลายสต๊อกไอดารูบิซิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3.2.3 สารละลายมาตรฐานด็อกโซรูบิซิน 20.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานด็อกโซรูบิซิน จากสารละลายสต๊อกด็อกโซรูบิซิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.2.4 สารละลายมาตรฐานเมทโทเทรกเซท 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเมทโทเทรกเซท จากสารละลายสต๊อกเมทโทเทรกเซท 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.2.5 สารละลายมาตรฐานผสม เดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซทชนิดละ 20.0, 5.0, 20.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายสต๊อกชนิดละ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100, 25, 100 และ 25 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.3 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

3.3.3.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์

ชั่ง Na_2HPO_4 1.4196 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นปรับเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

3.3.3.2 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์

ชั่ง $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 3.8137 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นปรับเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

3.3.3.3 สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์

ชั่ง $NaHCO_3$ 0.8401 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นปรับเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

3.3.4 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 20 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6.5, 7.5, และ 8.0

ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์ (ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.3.1) ปริมาตร 7.50 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์แต่ละใบขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ ตามลำดับ จากนั้นปิเปตอะซิโตไนไตรล์ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์แต่ละใบ ตามลำดับ ตวงน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร แล้วเทลงในบีกเกอร์แต่ละใบ จากนั้นปรับพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

คลอริก หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้มีพีเอชเป็น 6.5, 7.5, และ 8.0 จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรของแต่ละขวดขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร ตามลำดับ

3.3.5 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 20 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 8.5, 9.0, 9.5, และ 10.0

ปิเปตสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์ (ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.3.2) ปริมาตร 7.50 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์แต่ละใบขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 4 ใบ ตามลำดับ จากนั้นปิเปตอะซิโตไนไตรล์ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์แต่ละใบ ตามลำดับ ตวงน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร แล้วเทลงในบีกเกอร์แต่ละใบ จากนั้นปรับพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้พีเอชเป็น 8.5, 9.0, 9.5, และ 10.0 จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรของแต่ละขวดขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร ตามลำดับ

3.3.6 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 20.0, 25.0, 30.0, 35.0 และ 40.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 20 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 9.5

ปิเปตสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์ (ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.3.2) ปริมาตร 5.00, 6.25, 7.50, 8.75 และ 10.00 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์แต่ละใบขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ ตามลำดับ จากนั้นปิเปตอะซิโตไนไตรล์ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์แต่ละใบ ตามลำดับ ตวงน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร แล้วเทลงในบีกเกอร์แต่ละใบ จากนั้นปรับพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้พีเอชเป็น 9.5 จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรของแต่ละขวดขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร ตามลำดับ

3.3.7 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 20 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 9.5

ปิเปตสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์ (ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.3.2) ปริมาตร 7.50 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 1 ใบ ปิเปตอะซิโตไนไตรล์ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ ตวงน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร แล้วเทลงในบีกเกอร์ จากนั้นปรับพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้พีเอชเป็น 9.5 จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร

3.3.8 สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีอะซิโตไนไตรล์ 0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 และ 30.0 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 9.5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปิเปตสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์ (ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.3.2) ปริมาตร 7.50 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์แต่ละใบขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 7 ใบ ตามลำดับ จากนั้นปิเปตอะซิโตไนไตรล์ปริมาตร 0.00, 1.25, 2.50, 3.75, 5.00, 6.25 และ 7.50 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์แต่ละใบ ตามลำดับ ตวงน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร แล้วเทลงในบีกเกอร์แต่ละใบ จากนั้นปรับพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้พีเอชเป็น 9.5 จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรของแต่ละขวดขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรตามลำดับ

3.3.9 สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์เข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตรที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 20 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 9.5

ปิเปตสารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.3.3) ปริมาตร 7.50 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 1 ใบ ปิเปตอะซิโตไนไตรล์ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ ตวงน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร แล้วเทลงในบีกเกอร์ จากนั้นปรับพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้พีเอชเป็น 9.5 จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร

3.3.10 เตรียมสารละลายเพื่อวิเคราะห์ขีดจำกัดของการตรวจวัด

3.3.10.1 สารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายสต๊อกเดาโนรูบิซิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.1.1) ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.10.2 สารละลายมาตรฐานไอดารูบิซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายสต๊อกไอดารูบิซิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.1.2) ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.10.3 สารละลายมาตรฐานด็อกโซรูบิซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายสต๊อกด็อกโซรูบิซิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.1.3) ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3.10.4 สารละลายมาตรฐานเมทโทเทรกเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายสต๊อกเมทโทเทรกเซท 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.1.4) ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.3.10.5 สารละลายมาตรฐานเตาโนรูบิซิน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเตาโนรูบิซิน จากสารละลายมาตรฐานเตาโนรูบิซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10.0 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.10.6 สารละลายมาตรฐานไอดารูบิซิน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไอดารูบิซิน จากสารละลายมาตรฐานไอดารูบิซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.10.7 สารละลายมาตรฐานด็อกโซรูบิซิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานด็อกโซรูบิซิน จากสารละลายมาตรฐานด็อกโซรูบิซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.10.8 สารละลายมาตรฐานเมทโทเทรกเซท 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานเมทโทเทรกเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.11 เตรียมสารละลายเพื่อวิเคราะห์ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ

3.3.11.1 สารละลายมาตรฐานเตาโนรูบิซิน 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเตาโนรูบิซิน จากสารละลายมาตรฐานเตาโนรูบิซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 30.0 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3.11.2 สารละลายมาตรฐานไอคารูบิซิน 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไอคารูบิซิน จากสารละลายมาตรฐานไอคารูบิซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10.0 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.11.3 สารละลายมาตรฐานด็อกโซรูบิซิน 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานด็อกโซรูบิซิน จากสารละลายมาตรฐานด็อกโซรูบิซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.11.4 สารละลายมาตรฐานเมทโทเทรกเซท 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานเมทโทเทรกเซท 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.12 เตรียมสารละลายเพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรง

3.3.12.1 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 1.0, 0.3, 0.5 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10.0, 3.0, 5.0 และ 5.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.12.2 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 3.0, 1.0, 3.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 30.0, 10.0, 30.0 และ 30.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.12.3 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 5.0, 3.0, 5.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50.0, 30.0, 50.0 และ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

50.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.12.4 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 7.0, 5.0, 7.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 70.0, 50.0, 70.0 และ 70.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.12.5 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 10.0, 10.0, 10.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100.0, 100.0, 100.0 และ 100.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.12.6 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 15.0, 15.0, 15.0 และ 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 150.0, 150.0, 150.0 และ 150.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.12.7 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 20.0, 20.0, 20.0 และ 20.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 200.0, 200.0, 200.0 และ 200.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3.12.8 สารละลายมาตรฐานผสมของเตาโนรูบิซิน และด็อกโซรูบิซินความเข้มข้น 30.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซินและด็อกโซรูบิซิน จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 300.0 และ 300.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.12.9 สารละลายมาตรฐานผสมของไอดารูบิซิน และเมทโทเทรกเซทความเข้มข้น 30.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไอดารูบิซินและเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 300.0 และ 300.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.12.10 สารละลายมาตรฐานไอดารูบิซิน 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไอดารูบิซิน จากสารละลายมาตรฐาน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 500.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.13 เตรียมสารละลายเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

3.3.13.1 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 3.0, 1.0, 3.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 30.0, 10.0, 30.0 และ 30.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.13.2 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 5.0, 3.0, 5.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50.0, 30.0, 50.0 และ 50.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3.13.3 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 7.0, 5.0, 7.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 70.0, 50.0, 70.0 และ 70.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.13.4 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 10.0, 10.0, 10.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100.0, 100.0, 100.0 และ 100.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.13.5 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 15.0, 15.0, 15.0 และ 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 150.0, 150.0, 150.0 และ 150.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.14 เตรียมสารละลายเพื่อวิเคราะห์ความเที่ยง

3.3.14.1 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 4.0, 4.0, 4.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 40.0, 40.0, 40.0 และ 40.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างปัสสาวะ 50 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.14.2 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 8.0, 8.0, 8.0 และ 8.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 80.0, 80.0, 80.0 และ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

80.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างปัสสาวะ 50 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.14.3 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 14.0, 14.0, 14.0 และ 14.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 140.0, 140.0, 140.0 และ 140.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างปัสสาวะ 50 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.15 เตรียมสารละลายเพื่อวิเคราะห์ความแม่น

3.3.15.1 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ

กรองตัวอย่างปัสสาวะที่ไม่มีสารสนใจผ่านตัวกรองขนาด 5 มิลลิลิตร และขนาดรู 0.45 ไมครอน ลงในบีกเกอร์และปิดฝาไว้

3.3.15.2 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 3.0, 3.0, 3.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 30.0, 30.0, 30.0 และ 30.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างปัสสาวะ 50 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.15.3 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 5.0, 5.0, 5.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50.0, 50.0, 50.0 และ 50.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างปัสสาวะ 50 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.15.4 สารละลายมาตรฐานผสมของเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 15.0, 15.0, 15.0 และ 15.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 150.0, 150.0, 150.0

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

และ 150.0 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างปัสสาวะ 50 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.15.5 สารละลายตัวอย่างปัสสาวะเจือจาง 20 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร Spike สารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 10.0, 2.0, 10.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปิเปตตัวอย่างปัสสาวะที่กรองแล้วในหัวข้อ 3.3.16.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100, 20, 100 และ 50 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.15.6 การเตรียมตัวอย่างยาเม็ด

ชั่งยาเมทโทเทรกเซท 10 เม็ด บันทึกน้ำหนัก แล้วหาค่าเฉลี่ยต่อเม็ดและจดบันทึก จากนั้นบดตัวอย่างยาให้ละเอียดและเก็บไว้ในขวดสีชา ชั่งตัวอย่างยาที่ผ่านการบดละเอียดให้มีน้ำหนักประมาณหนึ่งเม็ด ถ่ายลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 นอร์มัล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปโซนิเคท 10 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ 10 เปอร์เซ็นต์ เตรียม 3 ตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้ 1.25 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนที่มีอะซิโตไนไตรล์ 10 เปอร์เซ็นต์ กรองสารละลายที่ได้แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.4 การทดลอง

3.4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสครั้งแรก ก่อนฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่แคปปิลารีจะปรับสภาพผิวภายในแคปปิลารีด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 5 นาที น้ำปราศจากไอออน เป็นเวลา 3 นาที และบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 นาที

3.4.2 กำหนดสภาวะเริ่มต้นสำหรับการวิเคราะห์ดังนี้

3.4.2.1 สารละลายมาตรฐานเดาโนรูบิซิน 20.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4.2.2 สารละลายมาตรฐานไอดารูบิซิน 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4.2.3 สารละลายมาตรฐานด็อกโซรูบิซิน 20.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4.2.4 สารละลายมาตรฐานเมทโทเทรกเซท 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4.2.5 สารละลายมาตรฐานผสมประกอบด้วย เดาโนรูบิซิน ไอดารูบิซิน ด็อกโซรูบิซิน และ เมทโทเทรกเซท ความเข้มข้น 20.0, 5.0, 20.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3.4.2.6 แคปปิลารีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ยาว 36 เซนติเมตร

3.4.2.7 ศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์

3.4.2.8 อุณหภูมิของแคปปิลารี 25 องศาเซลเซียส

3.4.2.9 นำสารเข้าสู่ระบบด้วยความดัน 50 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 3 วินาที

3.4.2.10 ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

3.4.3 ศึกษาผลของพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์

การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 6.5-8.0 และบอเรตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 8.5-10 เข้มข้น 30.0 มิลลิโมลาร์ โดยศึกษาผลของพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 20 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6.5, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 และ 10.0 ตามลำดับ

3.4.4 ศึกษาผลของชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์

การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมใช้สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์และสารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอชที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 3.4.3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.4.5 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์

การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชและชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 3.4.3 และ 3.4.4 ที่มีอะซิโตไนไตรล์ผสมอยู่ 20 เปอร์เซ็นต์ และศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 20.0, 25.0, 30.0, 35.0 และ 40.0 มิลลิโมลาร์

3.4.6 ศึกษาผลของความเข้มข้นของอะซิโตไนไตรล์ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์

การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช ชนิดของบัฟเฟอร์ และความเข้มข้นที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 3.4.3, 3.4.4 และ 3.4.5 และศึกษาผลของความเข้มข้นอะซิโตไนไตรล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 และ 30.0 เปอร์เซ็นต์

3.4.7 ศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้า

การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช ชนิดของบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น และความเข้มข้นอะซิโตไนไตรล์ที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 3.4.3, 3.4.4 3.4.5 และ 3.4.6 และศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้าที่ 14.0, 15.0 และ 16.0 กิโลโวลต์

3.4.8 ศึกษาผลของอุณหภูมิของแคปปิลารี

การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช ชนิดของบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น ความเข้มข้นอะซิโตไนไตรล์ และศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 3.4.3, 3.4.4, 3.4.5, 3.4.6 และ 3.4.7 และศึกษาผลของอุณหภูมิของแคปปิลารีที่ 25.0, 30.0, 35.0 และ 40.0 องศาเซลเซียส

3.5 ศึกษาความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ (ICH Harmonised Tripartite Guideline,1996, pp. 1-9)

3.5.1 การหาขีดจำกัดของการตรวจวัด

ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม โดยพิจารณาอัตราส่วนระหว่างสัญญาณของสารละลายมาตรฐานที่วิเคราะห์มีค่าเป็น 3 เท่า ของสัญญาณรบกวน (S/N=3)

3.5.2 การหาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ

ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม โดยพิจารณาอัตราส่วนระหว่างสัญญาณของสารละลายมาตรฐานที่วิเคราะห์มีค่าเป็น 10 เท่า ของสัญญาณรบกวน (S/N=10)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.5.3 ทดสอบความเป็นเส้นตรง

3.5.3.1 ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมทั้ง 4 ชนิด โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม วิเคราะห์สารอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น ๆ ละ 3 ซ้ำ ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์เริ่มตั้งแต่ค่า LOD เป็นต้นไป

3.5.3.2 นำผลที่ได้จากอิเล็กโทรฟีโรแกรมไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีก แล้วพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (correlation coefficient; R^2)

3.5.4 การสร้างกราฟมาตรฐาน

3.5.4.1 ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมทั้ง 4 ชนิด โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม วิเคราะห์สารความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดยค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์เริ่มตั้งแต่ค่า LOQ เป็นต้นไป

3.5.4.2 นำผลที่ได้จากอิเล็กโทรฟีโรแกรมไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีก แล้วพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (correlation coefficient; R^2)

3.5.5 การทดสอบความเที่ยง

3.5.5.1 ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมทั้ง 4 ชนิด โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม วิเคราะห์สาร 3 ความเข้มข้นได้แก่ ความเข้มข้นที่ต่ำ กึ่งกลาง และความเข้มข้นที่สูงในช่วงของกราฟมาตรฐานความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานภายในวันเดียวกัน และวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานระหว่างวัน วิเคราะห์สารวันละครั้ง เป็นเวลา 3 วันต่อเนื่อง

3.5.5.2 นำผลที่ได้จากอิเล็กโทรฟีโรแกรมมาวิเคราะห์ค่าไมเกรชั่นไทม์และพื้นที่ใต้พีก โดยรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative Standard Deviation)

3.5.6 การทดสอบความแม่น

3.5.6.1 ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมทั้ง 4 ชนิด โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม เติมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนลงในตัวอย่างปัสสาวะ วิเคราะห์สารอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น ๆ ละ 3 ซ้ำ ที่ความเข้มข้นต่ำ กึ่งกลาง และความเข้มข้นสูง โดยแต่ละความเข้มข้นต้องอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน

3.5.6.2 นำพื้นที่ใต้พีกมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไปในตัวอย่าง แล้วพิจารณาค่าร้อยละการกลับคืนของสาร (%Recovery)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.5.7 การวิเคราะห์ตัวอย่างยาเม็ด

วิเคราะห์สารเมทโทเทรกเซท ในตัวอย่างยาเม็ด ที่สภาวะเหมาะสม จากนั้นนำพื้นที่ใต้พีกที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน และคำนวนปริมาณสาร

3.5.8 การทดสอบความเฉพาะของสาร (Sirichai & Khanatharana, 2008, pp. 1197 cite in Agilent technologies, Understanding Your Spectra Modulc, Walbronn, 2007)

การพิสูจน์ความเฉพาะของสารทำได้โดยใช้ Agilent^{3D} CE Chemstation software โดยนำพีกตัวอย่างมาเปรียบเทียบที่ความยาวคลื่น 200 ถึง 400 นาโนเมตร และพิจารณาถึงค่า peak purity ratio ซึ่งจะต้องมีค่าน้อยกว่า 1

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University