บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. High Performance Liquid Chromatography System (Hewlett-Packard 1050, Germany). Pump: Hewlett-Packard 1050, Germany. Detector: Photodiode Array Hewlett-Packard 1050, Germany.

2. คอลัมน์ C_{18} (Hewlett-Packard, Germany) รุ่น HP 1010 Hypersil BDS ความยาว 125 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาคที่ใช้บรรจุ 5 ไมโครเมตร

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

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

5. เครื่องพีเอชมิเตอร์ (Φ34 pH Meter, Beckman, USA)

6. ชุดเครื่องกรอง และกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Dassel, Germany)

7. เครื่องเซนตริฟิวซ์ (Centrifuge, SorvalTC, Du Pont, USA)

8. คอลัมน์ SPE t-C_{18} ขนาด 500 มิลลิกรัม (Water, USA)

9. ไมโครปิเปต (Micropipet, Gilson, France)

10. เครื่องปั่น

สารเคมี

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

2. ฟลาวินอะดีนินไดนิวคลีโอไทด์ไดโซเดียมซอลไดไฮเดรต (Flavin Adenine Dinucleotide Disodium Salt Dihydrate, $C_{27}H_{31}N_9Na_2O_{15}P_9$. $2H_2O$) เกรดไบโอเคม จาก Fluka (Switzerland)

3. ไรโบฟลาวิน โมโนฟอสเฟตโซเดียมซอลไดไฮเดรต (Riboflavin 5′ – monophosphate Sodium Salt Dihydrate, $C_{17}H_{20}N_4NaO_9P$. $2H_2O$) เกรดไบโอเคม จาก Fluka (Switzerland)

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

5. ซัลบูทามอล (Salbutamol, $C_{12}H_{19}NO_3.HCl$) สำหรับ HPLC จาก Sigma-Aldrich (USA)

6. เมทานอล (Methanol, CH_3OH) เกรดวิเคราะห์ จาก Fisher Chemical (UK)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium Hydrogen Phosphate, Na_2HPO_4) เกรดวิเคราะห์ จาก Ajax Chemicals (Australia)

8. กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85% (Phosphoric Acids 85%, H_3PO_4) เกรดวิเคราะห์จาก Merck (Germany)

9. กรดไฮโดรคลอริก 36% (Hydrochloric Acid, HCl) เกรดวิเคราะห์ จาก Merck (Germany)

10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide, NaOH) เกรดวิเคราะห์ จาก Ajax Chemicals (Australia)

11. เมทิลลีนคลอไรด์ (Methylene Chloride, CH_2Cl_2) เกรดวิเคราะห์ จาก Ajax Chemicals (Australia)

12. น้ำกลั่น 2 ครั้งและผ่านระบบ Compact Ultrapure Water System (Barnstead, USA)

วิธีดำเนินการ

1. การวิเคราะห์สารเคลนบูเทรอลและซัลบูทามอล

1.1 การเตรียมสารเคมี

1.1.1 สารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 50.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต หนัก 1.9345 กรัม ใส่บีกเกอร์และละลายในน้ำกลั่น นำไปใส่ในเครื่องอุลตร้าโซนิคเพื่อช่วยในการละลาย ถ่ายสารละลายที่ได้ไปยังขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.2 สารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นประมาณ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ตวงสารละลายกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85% (v/v) ปริมาตร 1.70 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร

1.1.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ น้ำหนัก 2.00 กรัม ใส่ในบีกเกอร์และละลายด้วยน้ำกลั่น นำไปใส่เครื่องอัลตร้าโซนิคเพื่อช่วยในการละลาย ถ่ายสารละลายที่ได้ไปยังขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.1.4 สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นประมาณ 10.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 36% (v/v) ปริมาตร 4.8 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

1.1.5 สารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 5.0, 10.0 และ 15.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 3.0 อย่างละ 500 มิลลิลิตร

ตวงสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น 50.0 มิลลิโมลาร์ 50.0 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายที่ได้ไปยังขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ทำเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนปริมาตรการตวงสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 50.0 มิลลิโมลาร์ เป็น 100.0 และ 150.0 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 10.0 และ 15.0 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ปรับค่าพีเอชให้ได้ 3.0 ด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85%

1.1.6 สารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ พีเอช 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 อย่างละ 500 มิลลิลิตร

ตวงสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น 50.0 มิลลิโมลาร์ 150.0 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายที่ได้ไปยังขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ถ่ายสารละลายที่ได้ลงในบีกเกอร์ขนาด 1.0 ลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 2.0, 3.0 และ 4.0 ด้วยกรดฟอสฟอริก 85% และปรับค่าพีเอชให้ได้ 5.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์

1.1.7 สารละลายมาตรฐานซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอล ความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐานซัลบูทามอล 0.0010 กรัม และเคลนบูเทรอล 0.0010 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร 2 ขวด ละลายสารแต่ละชนิดในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.8 สารละลายมาตรฐานซัลบูทามอล ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ปิเปตสารมาตรฐานซัลบูทามอล ความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 250.0 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายสารในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.9 สารละลายมาตรฐานเคลนบูเทรอล ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปีเปตสารมาตรฐานเคลนบูเทรอล ความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 250.0 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายสารในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.10 สารละลายมาตรฐานผสมเคลนบูเทรอลและซัลบูทามอล ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปีเปตสารละลายมาตรฐานเคลนบูเทรอลและซัลบูทามอล 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 100.0 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.11 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่

ก่อนการวิเคราะห์จะต้องกรองเฟสเคลื่อนที่โดยผ่านกระดาษกรองขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร และนำไปกำจัดฟองอากาศด้วยเครื่องอัลตร้าโซนิคบาทเป็นเวลา 30 นาที

1.2 การตั้งสภาวะเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

ตั้งสภาวะของเครื่องที่ใช้ในการทดลอง อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อทำการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ทำการผ่านเฟสเคลื่อนที่เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการฉีดสารฉีดสารตัวอย่างทุกครั้งด้วยปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร และเมื่อสิ้นสุดการทดลองของแต่ละวันชะด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 120 นาที และเมทานอลเป็นเวลา 60 นาที

1.3 ศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทดลอง

1.3.1 ศึกษาผลของเปอร์เซ็นต์เมทานอลในเฟสเคลื่อนที่ ในการชะแบบเกรเดียน ตัวทำละลาย ก คือเมทานอล และตัวทำละลาย ข คือ 15.0 มิลลิโมลาร์ สารละลายฟอสเฟตพีเอช 2.0 โดยเวลาตั้งแต่ 0-5.30 นาที ใช้เปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย ก 9% และหลังจากเวลา 5.30 นาที เปลี่ยนตัวทำละลาย ก ในช่วง 9% ถึง 25% ที่มีผลต่อค่ารีเทนชันไทม์และสภาพไวของการวิเคราะห์

1.3.2 ศึกษาผลของค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตความเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์ ระบบการชะแบบเกรเดียนที่เปอร์เซ็นต์ของเมทานอลที่เหมาะสมจากผลของข้อ 1.3.1 ที่มีผลต่อสภาพไวของการวิเคราะห์ ซึ่งศึกษาค่าพีเอชที่ 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0

1.3.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟต ระบบการชะแบบเกรเดียนที่เปอร์เซ็นต์ของเมทานอลในสารละลายฟอสเฟตที่เหมาะสมจากข้อ 1.3.1 และที่พีเอชจากผลของข้อ 1.3.2 ที่มีผลต่อค่ารีเทนชั่นไทม์และสภาพไวของการวิเคราะห์ ซึ่งศึกษาความเข้มข้นที่ 0, 5.0, 10.0 และ 15.0 มิลลิโมลาร์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.4 ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ทำการวิเคราะห์ (Method Validation)

(Huber, Agilent Technologies, 1998)

1.4.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD)

วิเคราะห์หาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจพบปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ แต่ไม่สามารถรายงานว่าตรวจวัดเป็นปริมาณเท่าใด ทดลองโดยการนำสารละลายมาตรฐานผสมมาเจือจางและวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละตัวที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise Ratio) มีค่าอยู่ในช่วง 2 – 3

1.4.2 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

วิเคราะห์หาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจพบปริมาณต่ำสุดของสารที่ทำการวิเคราะห์ที่ตรวจวัดได้ โดยสามารถรายงานเป็นปริมาณที่แน่นอน ทดลองโดยการนำสารละลายมาตรฐานผสมมาเจือจางและวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละตัวที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise Ratio) มีค่าอยู่ในช่วง 10 – 12

1.4.3 ความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ (Linearity)

ทดสอบโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด 5 ความเข้มข้น โดยเตรียมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานครอบคลุมในช่วง 80-120% ของความเข้มข้นสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 1.3) ทำการตรวจวัดซ้ำที่ระดับความเข้มข้นละ 5 ครั้ง นำผลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกของสารกับความเข้มข้น หาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (Correlation Coefficient, r^2)

1.4.4 ความเที่ยงของการวิเคราะห์ (Precision)

เป็นค่าที่แสดงถึงความเที่ยงของการวิเคราะห์เมื่อทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานผสม 3 ระดับความเข้มข้น ทำการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 80.0, 100.0 และ 120.0 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำในคราวเดียวกัน 5 ครั้ง ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 1.3) ทำการทดลองซ้ำด้วยสภาวะเดียวกัน ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่ารีเทนชันไทม์และพื้นที่พีกของสาร ซึ่งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ควรมีค่าน้อยกว่า 15 %

1.4.5 ความแม่นของการวิเคราะห์ (Accuracy)

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ควรมีค่าเท่ากับค่าจริง (True Value) หรือมีค่าใกล้เคียงค่าจริงที่สุด โดยเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่าง 3 ระดับความเข้มข้น ซึ่งความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมอยู่ในช่วง 50-150 % ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ และต้องอยู่ในช่วงตรงของการวิเคราะห์ วิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำที่เติมสารละลายมาตรฐานระดับความเข้มข้นละ 5 ครั้ง ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 1.5.3) คำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของแต่ละความเข้มข้น โดยค่าที่คำนวณควรอยู่ในช่วง 80-110%

1.5 การวิเคราะห์ปริมาณเคลนบูเทรอลและซัลบูทามอลในตัวอย่างเนื้อสุกร

1.5.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างสารเคลนบูเทรอลและซัลบูทามอล ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์คือ เนื้อสุกร

1.5.1.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อสุกร (Lawrence & Menard, 1997)

ขั้นตอนที่ 1 นำตัวอย่างเนื้อสุกร 500 กรัม โดยตัดส่วนไขมันออก แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ชั่งตัวอย่างหนัก 6 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 10.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปกวนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอนที่ 2 นำสารละลายที่ได้ไปใส่เครื่องอัลตร้าโซนิคบาทเป็นเวลา 10 นาที ปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บชั้นน้ำให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ด้วย 1.0 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ ตรวจวัดด้วยกระดาษวัดพีเอช กรณีเกิดตะกอนให้นำไปปั่นแยกตะกอนอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างด้วย Solid-phase Extraction

ขั้นตอนที่ 3 การเตรียมตัวอย่างโดยวิธี Solid-phase Extraction คอลัมน์ที่ใช้เป็นชนิด t-C_{18} โดยปรับสภาวะคอลัมน์ด้วยเมทานอล 3.0 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยน้ำกลั่น 3.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผ่านสารละลายตัวอย่างจากขั้นตอนที่ 2 ทำการชะในคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น 3.0 มิลลิลิตร และเมทานอล 3.0 มิลลิลิตร เก็บเมทานอลนำไประเหยด้วยแก๊สไนโตรเจน และละลายส่วนที่เหลือจากการระเหยด้วยน้ำกลั่น 1.0 มิลลิลิตร และกรองผ่านตัวกรองเข็มขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 1.5.3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.5.1.2 ผลของเมทิลลีนคลอไรด์

นำสารละลายที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 เติมเมทิลลีนคลอไรด์ 10.0 มิลลิลิตร นำไปกวนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายที่ได้ไปทำในขั้นตอนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

1.5.2. การตรวจเอกลักษณ์ของสารเคลนบูเทรอลและซัลบูทามอลในเนื้อสุกร

โดยเติมสารละลายมาตรฐานซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอลความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 5.0 ไมโครลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 1.3

1.5.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์เคลนบูเทรอลและซัลบูทามอลในเนื้อสุกร

ศึกษาผลของเปอร์เซ็นต์เมทานอลในสารละลายฟอสเฟต ที่มีผลต่อค่าการแยก โดยเติมสารละลายมาตรฐานซัลบูทามอลและเคลนบูเทรอล ความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 10.0 ไมโครลิตร ลงในสารละลายตัวอย่างทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่กำหนด

1.5.4 การวิเคราะห์เคลนบูเทรอลและซัลบูทามอลในเนื้อสุกร

วิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อสุกร 2 ตัวอย่าง โดยทำการเตรียมตัวอย่างตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 1.5.1 และทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่จากข้อ 1.5.3 ทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างซ้ำ ตัวอย่างละ 5 ครั้ง นำค่าพื้นที่พีกที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน

2. การวิเคราะห์สารไรโบฟลาวิน, ฟลาวินอะดีนินไดนิวคลีโอไทด์ และฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์

2.1 การเตรียมสารเคมี

2.1.1 สารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 50.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต หนัก 1.9345 กรัม ใส่บีกเกอร์และละลายในน้ำกลั่น นำไปใส่ในเครื่องอุลตร้าโซนิคเพื่อช่วยในการละลาย ถ่ายสารละลายที่ได้ไปยังขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2.1.2 สารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นประมาณ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ตวงสารละลายกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85% (v/v) ปริมาตร 1.70 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ น้ำหนัก 2.00 กรัม ใส่ในบีกเกอร์และละลายด้วยน้ำกลั่น นำไปใส่เครื่องอัลตร้าโซนิคเพื่อช่วยในการละลาย ถ่ายสารละลายที่ได้ไปยังขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่น

2.1.4 สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นประมาณ 10.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 36% (v/v) ปริมาตร 4.8 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

2.1.5 สารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 5.0, 10.0 และ 15.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 3.0 อย่างละ 500 มิลลิลิตร

ตวงสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น 50.0 มิลลิโมลาร์ 50.0 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายที่ได้ไปยังขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ทำเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนปริมาตรการตวงสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 50.0 มิลลิโมลาร์ เป็น 100.0 และ 150.0 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 10.0 และ 15.0 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ปรับค่าพีเอชให้ได้ 3.0 ด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85%

2.1.6 สารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ พีเอช 2.0, 4.0, และ 6.0 อย่างละ 500 มิลลิลิตร

ตวงสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น 50.0 มิลลิโมลาร์ 150.0 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายที่ได้ไปยังขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ถ่ายสารละลายที่ได้ลงในบีกเกอร์ขนาด 1.0 ลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 2.0 และ 4.0 ด้วยกรดฟอสฟอริก 85% และปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์

2.1.7 สารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวิน ฟลาวินอะดีนินไดนิวคลีโอไทด์ และฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐานไรโบฟลาวิน 0.0025 กรัม ฟลาวินอะดีนินไดนิวคลีโอไทด์ 0.0025 กรัม และฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ 0.0025 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร 3 ขวด ละลายสารแต่ละชนิดในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1.8 สารละลายมาตรฐานผสมไรโบฟลาวิน ฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และฟลาวินอะดีนินไดนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานไรโบฟลาวิน ฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 25.0 ไมโครลิตร สำหรับสารฟลาวินอะดีนินไดนิวคลีโอไทด์ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร 15.0 ไมโครลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2.1.9 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่

ก่อนการวิเคราะห์จะต้องกรองเฟสเคลื่อนที่โดยผ่านกระดาษกรองขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร และนำไปกำจัดฟองอากาศด้วยเครื่องอัลตร้าโซนิคบาทเป็นเวลา 30 นาที

2.2 การตั้งสภาวะเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

ตั้งสภาวะของเครื่องที่ใช้ในการทดลอง อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อทำการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ทำการผ่านเฟสเคลื่อนที่เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการฉีดสาร ฉีดสารตัวอย่างทุกครั้งด้วยปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร และเมื่อสิ้นสุดการทดลองของแต่ละวันชะด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 120 นาที และเมทานอลเป็นเวลา 60 นาที

2.3 ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการทดลอง

2.3.1 ศึกษาผลของเปอร์เซ็นต์เมทานอลในสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 ที่มีผลต่อค่าการแยกและค่ารีเทนชันไทม์ของสารละลายมาตรฐานผสม ซึ่งศึกษาเปอร์เซ็นต์เมทานอล 16% – 19% โดยการชะแบบไอโซเครติค (Isocratic Elution)

2.3.2 ศึกษาผลของค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟต ที่เปอร์เซ็นต์ของเมทานอลในสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์ จากผลของข้อ 2.3.1 ที่มีผลต่อค่ารีเทนชันไทม์ ซึ่งศึกษาค่าพีเอชที่ 2.0, 4.0 และ 6.0

2.3.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟต ที่เปอร์เซ็นต์ของเมทานอลในสารละลายฟอสเฟต ที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.1 และที่พีเอชของสารละลายฟอสเฟตจากผลของข้อ 2.3.2 ที่มีผลต่อรูปร่างของพีกสารละลายมาตรฐานผสม ซึ่งศึกษาความเข้มข้นที่ 0, 5.0, 10.0, และ 15.0 มิลลิโมลาร์

2.3.4 ศึกษาผลของการชะแบบเกรเดียน ที่เปอร์เซ็นต์ของเมทานอลในสารละลายฟอสเฟตที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.1 พีเอชของฟอสเฟตที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.2 และความเข้มข้นของฟอสตเฟสที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.3 ที่มีผลต่อค่ารีเทนชันไทม์ของสารละลายมาตรฐานผสม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.4 ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่ทำการวิเคราะห์ (Method Validation)

(Huber, Agilent Technologies, 1998)

2.4.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD)

วิเคราะห์หาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจพบปริมาณต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ แต่ไม่สามารถรายงานว่าตรวจวัดเป็นปริมาณเท่าใด ทดลองโดยการนำสารละลายมาตรฐานผสมมาเจือจางและวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละตัวที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise Ratio) มีค่าอยู่ในช่วง 2 – 3

2.4.2 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

วิเคราะห์หาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจพบปริมาณต่ำสุดของสารที่ทำการวิเคราะห์ที่ตรวจวัดได้ โดยสามารถรายงานเป็นปริมาณที่แน่นอน ทดลองโดยการนำสารละลายมาตรฐานผสมมาเจือจางและวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละตัวที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise Ratio) มีค่าอยู่ในช่วง 10 – 12

2.4.3 ความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ (Linearity)

ทดสอบโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิด 5 ความเข้มข้น โดยเตรียมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานครอบคลุมในช่วง 80-120% ของความเข้มข้นสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 3) ทำการตรวจวัดซ้ำที่ระดับความเข้มข้นละ 5 ครั้ง นำผลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีกของสารกับความเข้มข้น หาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (Correlation Coefficient, r^2)

2.4.4 ความเที่ยงของการวิเคราะห์ (Precision)

เป็นค่าที่แสดงถึงความเที่ยงของการวิเคราะห์เมื่อทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานผสม 3 ระดับความเข้มข้น โดยทำการวิเคราะห์สารที่ความเข้มข้น 50.0, 100.0 และ 500.0 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำในคราวเดียวกัน 5 ครั้ง ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 2.1) ทำการทดลองซ้ำด้วยสภาวะเดียวกัน ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของค่ารีเทนชันไทม์และพื้นที่พีกของสาร ซึ่งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ควรมีค่าน้อยกว่า 11 % สำหรับสารที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร และน้อยกว่า 15 % สำหรับสารที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.4.5 ความแม่นของการวิเคราะห์ (Accuracy)

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ควรมีค่าเท่ากับค่าจริง (True Value) หรือมีค่าใกล้เคียงค่าจริงที่สุด โดยเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่าง 3 ระดับความเข้มข้น ซึ่งความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมอยู่ในช่วง 50-150 % ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ และต้องอยู่ในช่วงตรงของการวิเคราะห์ วิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำที่เติมสารละลายมาตรฐานระดับความเข้มข้นละ 5 ครั้ง ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสม คำนวณหาค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของแต่ละความเข้มข้น โดยค่าที่คำนวณควรอยู่ในช่วง 80-110%

2.5 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเบียร์ เบียร์ที่นำมาศึกษา 3 ชนิดได้แก่ เบียร์สิงห์ เบียร์ช้าง และเบียร์ไฮเนเก้นท์ เตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สารฟลาวินอะดีนินไดนิวคลีโอไทด์และไรโบฟลาวิน ปิเปตสารตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์สารฟลาวินโมโนนิวคลีโอไทด์ ปิเปตสารตัวอย่างปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร หลังจากนั้นนำไปใส่เครื่องอัลตร้าโซนิคบาท เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านตัวกรองเข็ม (Syringe Filter) ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 ทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างซ้ำ ตัวอย่างละ 5 ครั้ง นำค่าพื้นที่พีกที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน

การคำนวณ

1. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

เมื่อ Xi แทน ค่าที่วัดได้ในแต่ละครั้ง

$\bar{X}$ แทน ค่าเฉลี่ยของการวัด n ครั้ง

n แทน จำนวนครั้งของการวัด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, RSD)

$$RSD = \frac{SD}{\overline{X}} \times 100$$

เมื่อ SD แทน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\overline{X}$ แทน ค่าเฉลี่ย

3. ร้อยละการกลับคืน (%Recovery)

$$\%Recovery = \frac{\left| C_{(std+samp)} - C_{samp} \right|}{C_{std}} \times 100$$

เมื่อ C_{std} แทน ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป

C_{samp} แทน ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน

$C_{(std+samp)}$ แทน ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน

4. Resolution Factor

$$R_s = 2\left(\frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{W_2 + W_1}\right)$$

เมื่อ t_{R_1} แทน ค่า Retention Time ของพีกที่ 1

t_{R_2} แทน ค่า Retention Time ของพีกที่ 2

W_1 แทน ความกว้างของฐานพีกที่ 1

W_2 แทน ความกว้างของฐานพีกที่ 2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University