

บทที่ 2

วัสดุ และ วิธีทำการวิจัย

1. วัสดุ

- 1.1 ตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณของไรโบฟลาวิน
 - 1.1.1 ไวตามินบี 2 ทั้งยาเม็ด และ ยาน้ำดื่ม
 - 1.1.2 ไวตามินบีคอมเพล็กซ์ ทั้งยาเม็ด ยาแคปซูล ยาน้ำเชื่อม และยาน้ำดื่ม ที่มีส่วนในท้องตลาด
 - 1.1.3 มัลติไวตามิน ทั้งยาเม็ด และ ยาน้ำเชื่อม
 - 1.1.4 ยาเม็ดมัลติไวตามินผสมเกลือแร่
- 1.2 ไวตามินบี 2 มาตรฐาน (Riboflavin for Biochemistry, Lab., type analysis)
- 1.3 Potassium Hydrogen Phosphate (Laboratory reagent)
- 1.4 NaOH (analytical reagent)
- 1.5 ปร์อท (ANALAR)
- 1.6 HCl (Lab. reagent)
- 1.7 Acetic Acid (Lab. reagent)
- 1.8 Sodium Hydrosulfite (Lab. reagent)
- 1.9 KMnO_4 (Lab. reagent)
- 1.10 H_2O_2 solution (Lab. reagent)
- 1.11 Toluene (Lab. reagent)
- 1.12 Sodium Acetate Trihydrate (ANALAR)
- 1.13 Sodium Salicylate (cryst. extra pure)
- 1.14 Chloroform (Lab. reagent)

2. เครื่องมือ

2.1 Polarograph, Model XVI, Sargent Welch, Illinois, U.S.A.

2.2 pH Meter, Seibold Wien, Australia

2.3 Spectrophotometer, Carl Zeiss, PMQ II

2.4 Spectrofluorometer, Perkin Elmer, MPF-3

3. น้ำยา3.1 1 N NaOH (NaOH T.S.) : NaOH 45 กรัม เติมน้ำ 1000 มิลลิลิตร3.2 0.1 N HCl : HCl 85 มล. ในน้ำ 915 มล.3.3 1 N Acetic Acid : glacial acetic acid 60 มล.
ในน้ำ 940 มล.3.4 0.1 M Sodium Acetate : ชั่ง $\text{CH}_3\text{COO Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 13.61 กรัม
เติมน้ำจนครบ 1000 มล.3.5 H_2O_2 Solution : ใน 100 มล. มี H_2O_2 2.5 - 3.5 กรัม3.6 KH_2PO_4 Solution : 3.4 % KH_2PO_4 ในน้ำ3.7 1/25 KMnO_4 : KMnO_4 1 กรัม เติมน้ำจนครบ 25 มล.4. วิธีเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์โดยใช้โพลารोगราฟี4.1 ถ้าเป็นยาเม็ด หรือ ยาแคปซูลชั่งยาเม็ด (แคปซูล) 20 เม็ด คำนวณน้ำหนักโดยเฉลี่ยของผงยา 1 เม็ด
(ถ้าเป็นแคปซูล ก็ต้องหักน้ำหนักแคปซูลออก)บดให้ละเอียดและผสมเข้ากันดี ชั่งผงยาให้มีไวตามินบี 2 ประมาณ 2 - 5 มิลลิกรัม (มก.) อย่างแม่นยำ ใส่ลงใน Volumetric Flask ขนาด 50 มล.
ใส่ 0.2 N NaOH ลงไป 13 มล. เขย่า 2 - 3 นาทีเพื่อให้ 2 ละลายหมด
(จากการทดลองกับไวตามินบี 2 มาตรฐาน พบว่าจะได้สารละลายใสใน 2 - 3 นาที)
เติม KH_2PO_4 sol. 10 มล. เติมน้ำจนครบ 50 มล. สารละลายนี้จะมี pH = 12

นำไปผ่านไนโตรเจน 10 นาที และบันทึกโพลารแกรม โดยกำหนดให้ :

ความเร็วของกระดาษ	2 นิ้ว / นาที
ความเร็วของ Voltage	50 % / นาที
Voltage Range	0 ถึง - 1 โวลต์
ความสูงของระดับปรอท	80.5 มม.
ความคืบของไนโตรเจน	20 ปอนด์ / นิ้ว ²
Damping	1, 2
Compensation Current	0.1, 0.2 μ A.
ความเข้มข้นของโรบิฟลาวิน	4 - 10 มก. %

4.2 ถ้าเป็นยาน้ำ หรือ ยาฉีด

ตวงน้ำยาให้มีวิตามินบี 2 จำนวน 2 - 5 มก. อย่างแม่นยำ ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มล. ใส่ 4 N NaOH เขย่า 2 - 3 นาที ให้ บี 2 ละลาย เติม KH_2PO_4 solution 10 มล. แล้วทำเช่นเดียวกับข้อ 4.1 (เติม NaOH ให้ pH ของสารละลายสุดท้าย = 12)

5. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งวิตามินบี 2 มาตรฐาน 50 มก. ใส่ลงใน Volumetric Flask ขนาด 100 มล. (กันแสง) เติมน้ำยาผสมของน้ำ 70 มล. และ glacial acetic acid 7 มล. ทำให้อุ่นบน Water Bath ที่กำลังเดือดประมาณ 15 นาที หรือจนบี 2 ละลายหมด ทำให้เย็น แล้วเติมน้ำให้ครบ 100 มล. ผสมให้เข้ากัน ความเข้มข้นของบี 2 = 0.5 มก. / มล.

ตวงสารละลายนี้ 4 - 10 มล. อย่างแม่นยำ ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มล. ใส่ 4 N NaOH ลงไป 1.8 - 3.8 มล. และ KH_2PO_4 solution 10 มล. นำไปเติมน้ำจนครบ 50 มล. ผสมให้เข้ากัน จะได้ pH = 12 นำสารละลายนี้ไปผ่านไนโตรเจน 10 นาที แล้วนำไปบันทึกโพลารแกรม ความเข้มข้นของ

$$\text{บี 2} = 4 - 10 \text{ มก. \%}$$

6. การคำนวณหาปริมาณของวิตามินบี 2 ในตัวอย่าง

6.1 ในยาเม็ด

น้ำหนักของยาตัวอย่าง	=	W	กรัม
น้ำหนักหนึ่งเม็ดโดยเฉลี่ย	=	A	กรัม
ปริมาณวิตามินบี 2 ที่ระบุไว้บนฉลาก	=	L	มก./เม็ด
ค่าของ diffusion current ของตัวอย่าง	=	U	ไมโครแอมแปร์
diffusion current ของสารละลายมาตรฐาน	=	S	ไมโครแอมแปร์
ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสุดท้าย	=	C	มก. %
ปริมาณของบี 2 ในผงยาตัวอย่างที่ชั่งมา	=	$\frac{C \times U}{2 S}$	มก.
ปริมาณของบี 2 ในยา 1 เม็ด	=	$\frac{C \times U \times A}{2 S \times W}$	มก.
% ของจำนวนที่ระบุไว้บนฉลาก	=	$\frac{C \times U \times A \times 100}{2 S \times W \times L}$	

6.2 ในยาน้ำ หรือ ยาฉีด

ปริมาตรของยาตัวอย่างที่ใช้	=	V	มล.
ปริมาณวิตามินบี 2 ที่ระบุไว้บนฉลาก	=	L	มก./มล.
diffusion current ของสารตัวอย่าง	=	U	ไมโครแอมแปร์
" " ของสารมาตรฐาน	=	S	ไมโครแอมแปร์
ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานสุดท้าย	=	C	มก. %
% ของจำนวนที่ระบุไว้บนฉลาก	=	$\frac{C \times U \times 100}{2 S \times V \times L}$	

7. การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 2 โดยใช้ Spectrophotometry ²³

ซึ่งไรโบฟลาวิน 0.15 กรัม ละลายในน้ำยาผสมของ glacial acetic acid 2 มล. และน้ำ 150 มล. ใช้ความร้อนช่วยในการละลาย เติมน้ำจนครบ 1,000 มล. ผสมให้เข้ากัน ตวงน้ำยานี้มา 10 มล. นำมาเติม 0.1 M sodium acetate 3.5 มล. เติมน้ำจนครบ 100 มล. นำไปวัดการดูดซึมของแสง (E) ใน cell 1 ซม. ที่ความยาวช่วงคลื่น

(wave length) 444 nm. โดยใช้ buffer เป็น blank

ค่า $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ที่ 444 nm. = 323

8. การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 2 โดยใช้ Spectrofluorometry ¹⁹

8.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างให้มีวิตามินบี 2 จำนวน 20 มก. ใส่ลงใน Volumetric Flask ขนาด 250 มล. เติม 0.1 N HCl 150 มล. เขย่าแรง ๆ แล้วล้างข้าง ๆ flask ด้วย 0.1 N HCl ต้องให้ pH ต่ำกว่า 1.5 ในระหว่างการทำให้ร้อนใน steam bath เขย่า บ่อย ๆ จนบี 2 ละลาย (หรือใส่ไว้ใน autoclave 121 °C. นาน 30 นาที) ทำให้เย็น ปรับ pH ด้วย NaOH T.S. ให้อยู่ระหว่าง 5 - 6 พร้อมทั้งเขย่าแรง ๆ เติมน้ำจนครบ 1,000 มล. กรอง (ถ้าจำเป็น) ด้วยกระดาษกรองที่ไม่ดูดซับบี 2 น้ำยาที่กรองได้นำไป ทำให้เจือจางด้วยน้ำ จนมีความเข้มข้นของบี 2 = 0.1 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร (มคก./มล.) ใช้เป็นสารละลายตัวอย่างที่จะวิเคราะห์

8.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งวิตามินบี 2 มาตรฐาน (U.S.P. reference standard) ที่อบ 105 °C. นาน 2 ชม. และเก็บใน Desiccator เหนือ P_2O_5 และป้องกันแสง)

เติม 0.02 N Acetic acid 300 มล. ทำให้ร้อนบน steam bath เขย่าตลอด เวลาจนบี 2 ละลายหมด ทำให้เย็น และเติม 0.02 N acetic acid จนครบ 500 มล. เก็บไว้ภายใต้ Toluene (ห้ามเขย่า) และใส่ไว้ในตู้เย็น

ทำให้น้ำยานี้เจือจางลงด้วย 0.02 N acetic acid ให้มีความเข้มข้น 10 มคก./มล. เก็บภายใต้ Toluene ไว้ในตู้เย็น

เมื่อจะทำการวิเคราะห์ นำสารละลายนี้มา 10 มล. แล้วเติมน้ำจนครบ 100 มล. (ความเข้มข้นของวิตามินบี 2 = 1.0 มคก./มล.)

8.3 วิธีวิเคราะห์

ใช้ตัวอย่างน้อย 4 หลอด เติมสารละลายตัวอย่างหลอดละ 10 มล. ทุกหลอด หลอดที่ 1 และ 2 ใส่สารละลายมาตรฐานหลอดละ 1.0 มล. ส่วนอีกสองหลอดใส่น้ำแทนในปริมาณที่เท่ากัน ใส่ glacial acetic acid หลอดละ 1.0 มล. 1/25 KMnO_4 sol. หลอดละ 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที เติม H_2O_2 sol. หลอดละ 0.5 มล. ผสมกัน สีของ KMnO_4 จะหายไปภายใน 10 วินาที เขย่าแรง ๆ เพื่อไล่ออกไปจนหมด นำสารละลายไปอ่านค่า Fluorescence (F) โดยให้ input = 440 nm.

output = 565 nm.

ค่าเฉลี่ยของ F ของหลอดที่ 1, 2 = I_s

ค่าเฉลี่ยของ F ของหลอดที่ 3, 4 = I_u

นำทั้ง 4 หลอดไปเติม sodium hydrosulfite หลอดละ 20 มก. แล้ววัด F ใน 5 วินาที

ค่าเฉลี่ย = I_B

8.4 การคำนวณ

ปริมาณของโรโบฟลาวินของสารที่แห้งในสารละลายตัวอย่าง

$$= \frac{0.0001 (I_u - I_B)}{(I_s - I_u)} \text{ มก./มล.}$$

(* ค่าของ $(I_u - I_B) / (I_s - I_u) = 0.66 - 1.5$ จึงจะนำมาใช้คำนวณได้)⁴²
แล้วคำนวณเป็น มก. บี 2 ในแต่ละแคปซูล หรือแต่ละเม็ดได้