

บทที่ 3

การทดลอง



3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1) เครื่องคะพิลลารีอิลีกโทรฟอริซิส ของบริษัท Beckman รุ่น MDQ
- 2) เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) ของบริษัท Metrohm รุ่น 744
- 3) เครื่องโซนิคเทท (sonicator) ของบริษัท Ultrasonic steri-cleaner
- 4) เครื่อง evaporator ของบริษัท Eyela
- 5) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifugator) ของบริษัท Sanyo
- 6) เครื่องผลิตน้ำ Milli Q
- 7) เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี ของบริษัท Water

3.2 สารเคมี

- 1) พีวาร์ริน (P) ของบริษัท Sigma Aldrich
- 2) คาอิดเซอิน (D) ของบริษัท Sigma Aldrich
- 3) จีนิสเตอิน (G) ของบริษัท Sigma Aldrich
- 4) คาอิดซิน (DZ) ของบริษัท Sigma Aldrich
- 5) กวาวคูริน (K) จาก รศ. ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ
- 6) โพรพิลพาราเบน (propyl paraben, PP) ของบริษัท Sigma Aldrich
- 7) โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) ของบริษัท Fluka
- 8) ไดโซเดียมบอเรตเต็ทไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Fluka
- 9) เมทานอล ของบริษัท Merck
- 10) อะซิโตนไนไตรล์ ของบริษัท Merck
- 11) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Fluka
- 12) น้ำ milli Q
- 13) หัวขวดเครื่องขาวแบ่งตามแหล่งเพาะปลูกและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 8 ตัวอย่างดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวแบ่งตามแหล่งเพาะปลูกและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 8 ตัวอย่าง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์		แหล่งเพาะปลูก	ตัวอย่าง
ใบย่อยส่วนปลาย	ลักษณะปลายใบ		
ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	อ. ด่านเจดีย์สามองค์ จ. กาญจนบุรี	P1
ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี	P2
ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี	P3
รูปมนรี (elliptic)	เรียวแหลม (acuminate)	อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี	P4
รูปมนรี (elliptic)	ตั้งแหลม (cuspidate)	อ. พระพุทธบาท จ. สระบุรี	P5
รูปไข่ (ovate)	เรียวแหลม (acuminate)	อ. พระพุทธบาท จ. สระบุรี	P6
รูปไข่ (ovate) ขนาด 17 × 23 cm.	เรียวแหลม (acuminate)	อ. เมือง จ. ลำปาง	P7
รูปไข่ (ovate) ขนาด 19.8 × 22 cm.	เรียวแหลม (acuminate)	อ. เมือง จ. ลำปาง	P8

3.3 การเตรียมสารละลายสำหรับบัพเฟอร์

3.3.1 เตรียมสารละลาย 500 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) โดยชั่ง SDS น้ำหนักที่แน่นอน ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q

3.3.2 เตรียมสารละลาย 100 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (บอเรตบัพเฟอร์) ที่ pH 9.2 โดยชั่ง $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ น้ำหนักที่แน่นอน ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q จะได้บอเรตบัพเฟอร์ที่ pH 9.2 โดยไม่ต้องปรับ pH

3.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

3.4.1 สารละลายมาตรฐานผสมระหว่างคาอิดซิน พิวราลิน กวาวคูริน คาอิดเซอิน และ จินิสเตอิน 1000 ppm โดยชั่งสารมาตรฐานแต่ละตัว 0.0020 กรัม ละลายในขวดแก้วสีชาด้วย เมทานอล 2 มิลลิลิตร

3.4.2 สารละลายมาตรฐานกวาวคูรินและจินิสเตอินความเข้มข้น 500 ppm โดยชั่งสารมาตรฐานแต่ละตัว 0.0010 กรัม ละลายในขวดแก้วสีชาด้วยเมทานอล 2 มิลลิลิตร

3.4.3 สารละลายมาตรฐานโพรพิลพาราเบนเป็น internal standard (ISTD) ความเข้มข้น 1000 ppm โดยชั่ง PP 0.0100 กรัม ในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ละลายด้วยเมทานอล

3.5 การเตรียมสารละลายของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาว

ซึ่งตัวอย่างผงกวาวเครือขาวแห้งที่บดละเอียด น้ำหนัก 5 กรัม ลงในขวดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาสกัดครั้งแรกด้วยเมทานอลปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยเขย่าผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องวอร์เทกซ์ เป็นเวลา 2 นาที และ sonicate อีกเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาตะกอนออก ที่ 2500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที คูดส่วนใสมาเก็บไว้ แล้วสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยเมทานอล 25 มิลลิลิตร แล้วคูดส่วนใสรวมกับที่ได้จากการสกัดครั้งที่หนึ่ง นำมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นเติมเมทานอล 4 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วย PTFE membrane filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บไว้ในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °C

3.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างสำหรับ CZE

3.6.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างคาอิดซิน พิวราริน กวาวคูริน คาอิดเซอิน และจีนิสเตอินที่ความเข้มข้น 50 ppm โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน (ข้อ 3.4.1) นำมาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายประกอบด้วย 2 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ สำหรับหาภาวะในข้อ 4.2.1 และความเข้มข้นสุดท้ายประกอบด้วย 6 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ และ 15% v/v เมทานอล สำหรับหาภาวะในข้อ 4.2.2 ถึง 4.2.5

3.6.2 เตรียมสารละลายของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารกวาวคูริน (K) และจีนิสเตอิน (G) โดยปิเปตสารละลายของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาว P1 (ข้อ 3.5) 20 ไมโครลิตร แล้วเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยสารละลายมาตรฐาน K และ G (ข้อ 3.4.2) อย่างละ 50 ppm โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายประกอบด้วย 2 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ สำหรับหาภาวะในข้อ 4.2.1 และความเข้มข้นสุดท้ายประกอบด้วย 6 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ และ 15% v/v เมทานอล สำหรับหาภาวะในข้อ 4.2.2 ถึง 4.2.5 ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร

3.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างสำหรับ MEKC

3.7.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างคาอิดซิน พิวราริน กวาวคูริน คาอิดเซอิน และจีนิสเตอินที่ความเข้มข้น 50 ppm โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน (ข้อ 3.4.1) เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายประกอบด้วย 60 mM SDS สำหรับหาภาวะในข้อ 4.3.1 และ 4.3.2 และความเข้มข้นสุดท้ายประกอบด้วย 60 mM SDS และ 15% v/v เมทานอล สำหรับหาภาวะในข้อ 4.3.3

3.7.2 เตรียมสารละลายของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารกวาวคูรินและจีนิสเตอิน โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายประกอบด้วย 2 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ สำหรับหาภาวะในข้อ 4.3.1 และ 4.3.2 และความเข้มข้นสุดท้ายประกอบด้วย 6 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ และ 15% v/v เมทานอล สำหรับหาภาวะในข้อ 4.3.3

3.8 ภาวะของ CE สำหรับการทดลอง

ภาวะของ CE เริ่มต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารคาอิดซิน พิวราลิน กวาวคูริน คาอิดเซอิน และจีนิสเตอิน ในการทดลองนี้ คือ

เครื่อง CE	: Beckman รุ่น MDQ
คะพิลลารี	: uncoated fused silica capillary ขนาด 75 μm I.D. \times 60.2 cm (50 cm to detector)
BGE	: บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับ CZE และใช้บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และ SDS เป็นสารลดแรงตึงผิว สำหรับ MEKC
อุณหภูมิของคะพิลลารี	: 25 $^{\circ}\text{C}$
ศักย์ไฟฟ้า	: 20 kV
การบรรจุสาร	: อัดความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 5 วินาที
การตรวจวัด	: photodiode array ที่ 254 นาโนเมตร
การชะล้างคะพิลลารี	: ก่อนทำการทดลองในแต่ละวันชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M NaOH นาน 15 นาที ตามด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง 15 นาที ระหว่างการวิเคราะห์แต่ละครั้งชะคอลัมน์ด้วย MeOH 2 นาที 0.1 M NaOH 3 นาที ตามด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ 5 นาที หลังทำการทดลองในแต่ละวันชะคอลัมน์ด้วยเมทานอล 5 นาที 0.1 M NaOH นาน 15 นาที ตามด้วยน้ำ milli Q 15 นาที

หากภาวะของ BGE ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณของสารที่สนใจทั้ง 5 ชนิดด้วย CE โดยได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นบอเรตบัฟเฟอร์ ชนิดและปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ ความเข้มข้น SDS และศักย์ไฟฟ้าที่มีผลต่อการแยกของสารด้วย CZE และ MEKC

3.9 การหาภาวะของ CZE

3.9.1 ผลของความเข้มข้นบอเรตบัฟเฟอร์

เตรียมบัฟเฟอร์ของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 10 ถึง 100 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ แล้วใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานและส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสาร K และ G ด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.8 ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.2.1

3.9.2 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็น

เมทานอล หรืออะซิโตไนโตรล์ ปริมาณ 10 ถึง 20% v/v ของตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์ด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.8 ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.2.2

3.9.3 ผลของความเข้มข้นทั้งบอเรตและตัวทำละลายอินทรีย์

เตรียมบอเรตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 30 ถึง 70 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วย ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเมทานอล หรืออะซิโตไนโตรล์ ปริมาณ 15 และ 20% v/v ของตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์ด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.8 ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.2.3

3.9.4 ผลของศักย์ไฟฟ้า

เตรียม 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ และ 60 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วย 15% v/v ของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเมทานอล หรืออะซิโตไนโตรล์ ใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์ด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.8 และใช้ศักย์ไฟฟ้าตั้งแต่ 20 ถึง 30 kV ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.2.4

3.10 การหาภาวะของ MEKC

3.10.1 ผลของความเข้มข้น SDS

เตรียมบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2 และความเข้มข้น SDS ในช่วง 30 ถึง 80 mM แล้วใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.8 ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.3.1

3.10.2 ผลของความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$

เตรียมบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นในช่วง 10 ถึง 50 mM ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS แล้วใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.8 ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.3.2

3.10.3 ผลของชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์

เตรียมบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2, 60 mM SDS และตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเมทานอลหรืออะซิโตไนโตรล์ปริมาณ 10 ถึง 20% v/v แล้วใช้เป็น BGE สำหรับแยกและวิเคราะห์สารด้วย CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.8 ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.3.3

3.11 การวิเคราะห์ด้วย HPLC

ในการทดลองใช้เครื่อง HPLC ของบริษัท water และเครื่องตรวจวัดชนิด photodiode array detector รุ่น 996 โดยทำการตรวจวัดในช่วงความยาวคลื่น 200 ถึง 400 นาโนเมตร และทำปริมาณวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร คอลัมน์ HPLC ที่ใช้ขนาด 250×4.6 mm i.d. ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร เฟสคงที่เป็น BDS hypersil C_{18} ของบริษัท Thermo Scientific ใช้ระบบเฟสเคลื่อนที่เป็น ACN กับ 2% กรดอะซิติกในน้ำ แบบ gradient ได้ทำการปรับสัดส่วนเฟสเคลื่อนที่

พบว่าอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่สามารถแยกสารที่สนใจทั้ง 5 ชนิดออกจากพีคของสารอื่นๆ คือ อัตราส่วน ACN : 2% กรดอะซิติกในน้ำ เริ่มต้นที่ 10 : 90 เปอร์เซ็นต์ โปรแกรมให้เป็น 30 : 70 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา 20 นาที ปรับอัตราส่วนเป็น 60 : 40 เปอร์เซ็นต์ที่ 25 นาที ปรับอัตราส่วนเป็น 100 : 0 เปอร์เซ็นต์ที่ 30 นาที แล้วคงที่ไว้นาน 15 นาที จากนั้นปรับเป็นอัตราส่วนเริ่มต้นและคงที่ไว้อีก 15 นาที รวมเวลาทั้งหมด 60 นาที ใช้อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่องเป็น 15 ไมโครลิตร แต่ละตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์ ซ้ำ 2 ครั้ง

ก่อนการวิเคราะห์ในแต่ละวันจะทำการล้างคอลัมน์ ด้วยเฟสเคลื่อนที่ตามอัตราส่วนเริ่มต้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหลังจากการวิเคราะห์แต่ละวัน จะล้างด้วยอะซิโตนในโทล์: น้ำ โดยค่อยๆ ลดเปอร์เซ็นต์ของน้ำลงจนอัตราส่วน ACN : น้ำ เป็น 100 : 0 จากนั้นล้างด้วยอะซิโตนในโทล์ 100% นาน 60 นาที

3.12 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

ค่า LOD และ LOQ หาได้โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมทั้ง 5 ชนิด ที่เจือจางตามความเหมาะสม (C_{diluted}) นำไปวิเคราะห์ด้วย CE และ HPLC แล้ววัดอัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (S/N) จนกระทั่งได้ค่า S/N ใกล้เคียงกับ 3 และ 10 จากนั้นคำนวณค่า LOD และ LOQ ตามลำดับ โดย

$$\text{LOD} = \frac{3}{S/N} \times C_{\text{diluted}} \quad \text{และ} \quad \text{LOQ} = \frac{10}{S/N} \times C_{\text{diluted}}$$

ค่า LOD และ LOQ สำหรับ CZE และ HPLC แสดงดังหัวข้อ 4.4.1 และ 4.5.1 ตามลำดับ

3.13 กราฟมาตรฐาน

3.13.1 กราฟมาตรฐานสำหรับ CZE

สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานในข้อ 3.4.1 และ 3.4.3 ซึ่งประกอบด้วยสารมาตรฐานคาอิดซิน พิวราลิน กวาวคูริน คาอิดเซอิน และจีนิสเตอินที่ความเข้มข้นต่างๆ (ช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 500 ppm) และแต่ละความเข้มข้นของสารมาตรฐานประกอบด้วย 100 ppm ของโพรพิลพาราเบนเป็น ISTD เจือจางสารละลายผสมดังกล่าวด้วยบัฟเฟอร์โดยมีองค์ประกอบสุดท้ายเป็น 6 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ และ 15% v/v ของเมทานอล กราฟมาตรฐานที่ได้แสดงในหัวข้อ 4.4.2

3.13.2 กราฟมาตรฐานสำหรับ HPLC

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ (ช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 500 ppm) โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานคาอิดซิน พิวราลิน กวาวคูริน คาอิดเซอิน และจีนิสเตอินในข้อ 3.4.1 ด้วยเมทานอล กราฟมาตรฐานที่ได้แสดงในหัวข้อ 4.5.2

3.14 ความแม่นยำและความเที่ยง

ทำการเติม (spike) สารละลายมาตรฐานผสมทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 20 และ 75 ppm ในเมทริกซ์ที่เป็นบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย 6 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ และ 15% v/v ของเมทานอล โดยแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานประกอบด้วย 100 ppm ของโพรพิลพาราเบนเป็น ISTD นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ มาวิเคราะห์ด้วย CE ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นคำนวณหาปริมาณสารโดยใช้กราฟมาตรฐานในข้อ 3.12.1 แล้วนำข้อมูลของรีเทนชันไทม์และพื้นที่ ($A_{\text{corr. สารมาตรฐาน}} / A_{\text{corr. PP}}$) ที่ได้ไปคำนวณความเที่ยงของรีเทนชันไทม์และพื้นที่ ($A_{\text{corr. สารมาตรฐาน}} / A_{\text{corr. PP}}$) ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.4.3 แล้วคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์และเปอร์เซ็นต์ของสารที่วิเคราะห์ได้ ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อ 4.4.3

3.15 การหาปริมาณคาอิดซิน พิวราลิน กวาวคูริน คาอิดเซอิน และจีนิสเตอินในตัวอย่างกวาวเครือขาวด้วย CZE และ HPLC

เตรียมตัวอย่างดังหัวข้อที่ 3.5 สำหรับการวิเคราะห์ด้วย CZE ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตร นำไประเหยแห้งแล้วเจือจางส่วนสกัดกวาวเครือขาวตามความเหมาะสมด้วยบัฟเฟอร์โดยให้ม็องค์ประกอบสุดท้ายเป็น 6 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ และ 15% v/v ของเมทานอล และแต่ละสารละลายตัวอย่างประกอบด้วย 100 ppm โพรพิลพาราเบนเป็น ISTD สำหรับ HPLC เจือจางสารละลายตัวอย่างตามความเหมาะสมด้วยเมทานอล จากนั้นกรองด้วย PTFE membrane filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนการวิเคราะห์ด้วย CZE และ HPLC โดยใช้ภาวะเหมาะสมที่หาได้จากการทดลอง แล้วคำนวณหาปริมาณสารที่สนใจทั้ง 5 ชนิด โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานในหัวข้อ 3.13.1 และ 3.13.2 สำหรับ CZE และ HPLC ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังหัวข้อ 4.6