

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบวิตามิน ในยาบรรจุเสร็จสำหรับสัตว์ชนิดยาฉีด

นางสุนันท์ กิตติจารุวัฒนา นายชูศักดิ์ อาจสูงเนิน นายองอาจ บุญบรรลุ นายธิติ รุจิเชาว์

บทคัดย่อ

ทำการพัฒนาวิธีและทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบวิตามินในยาบรรจุเสร็จสำหรับสัตว์ชนิดยาฉีด ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography - diode array detector (HPLC-DAD) แบ่งวิธีการทดสอบออกเป็น 2 วิธี คือ วิธีแรกเป็นการทดสอบวิตามินที่ละลายในน้ำ (B_1 , B_2 , B_3 , B_6 , B_9 และ B_{12}) โดยวิธีการทดสอบวิตามินที่ละลายในน้ำจะใช้เวลาในการทดสอบ 14 นาที ในคอลัมน์ HPLC ชนิด C_{18} ขนาด 4.6×250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ใช้ mobile phase คือ pH 4.0, 0.005 M potassium dihydrogen phosphate : methanol แบบ gradient elution ทดสอบความใช้ได้ของวิธีโดยมี linearity and range ของการทดสอบวิตามิน B_1 , B_2 , B_3 , B_6 และ B_{12} ที่ความเข้มข้น 0.005 – 0.035 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิตามิน B_9 ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.004 – 0.080 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.998 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ประเมินจากค่า % recovery และความเที่ยงประเมินจากการทำซ้ำระหว่างวัน (intermediate precision) วิตามินที่ละลายในน้ำอยู่ในช่วง 97.15 - 99.15 % และ 1.24 - 2.31 % ตามลำดับ ทดสอบ limit of quantification (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.01, 0.005, 0.01, 0.01, 0.004 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับวิธีที่สองเป็นการทดสอบวิตามินที่ละลายในไขมัน ใช้เวลาในการทดสอบ 14 นาที ด้วยคอลัมน์ HPLC ชนิด C_{18} ขนาด 4.6×250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ใช้ methanol : DI water แบบ gradient elution ทดสอบความใช้ได้ของวิธีโดยมี linearity and range ของการทดสอบวิตามิน A, D_3 , E และ K ที่ความเข้มข้น 0.008 - 0.032 และ 0.002 - 0.030 และ 0.005 - 0.030 และ 0.003 - 0.009 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.998 การทดสอบความแม่นยำประเมินจากค่า % recovery และความเที่ยงประเมินจากการทำซ้ำระหว่างวัน วิตามินที่ละลายในไขมันอยู่ในช่วง 97.47 - 99.46 % และ 1.25 - 2.07 ตามลำดับ ทดสอบ LOQ ของวิตามิน A, D_3 , E และ K มีค่าเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าวิธีการทดสอบความใช้ได้ของวิธีมีความไวและถูกต้องสามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินในยาบรรจุเสร็จสำหรับสัตว์ชนิดยาฉีดได้

คำสำคัญ : วิตามิน, วิตามินละลายในน้ำ, วิตามินละลายในไขมัน, HPLC

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้า ปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method development and validation of multivitamins injection for veterinary use

Sunan Kittijaruwattana, Chusak Ardsongnearn, Ongart Boonbanlu and Titi Rujichao

Abstract

Method development and validation for the assay of multivitamin in injectable dosage form for animals using high performance liquid chromatography (HPLC - DAD) were conducted. Two analytical methods were developed for the groups of water - soluble vitamins (B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ and B₁₂) and fat-soluble vitamins (A, D₃, E and K). For water-soluble vitamins, chromatographic separations were achieved in 14 minutes run time using 5 µm particle size, 4.6 x 250 mm, C₁₈ HPLC column, with the mobile phase consists of pH 4.0, 0.005 M potassium dihydrogen phosphate: methanol, gradient elution. The linearity and range were evaluated over the concentration range of 0.005 - 0.035 mg/mL for vitamins B₁, B₂, B₃, B₆ และ B₁₂, and 0.004 - 0.080 mg/mL for vitamins B₉. The correlation coefficient (r) is greater than 0.995. The accuracy in term of percent recovery and intermediate precision were in the range of 97.15 - 99.15 % and 1.24 - 2.31 %, respectively. The limits of quantification (LOQ) were 0.01, 0.005, 0.01, 0.01, 0.004 and 0.005 mg/mL, respectively. For fat - soluble vitamins, the compounds were separated within 14 minutes using 5 µm particle size, 4.6 x 250 mm, C₁₈ HPLC column. The mobile phase composition was methanol: water, gradient elution. The concentration ranges of A, D₃, E and K were 0.008 - 0.032 mg/mL, 0.002 - 0.030 mg/mL, 0.005 - 0.030 mg/mL and 0.003 - 0.009 mg/mL, respectively. The correlation coefficient (r) is greater than 0.995. The accuracy and intermediate precision were between 97.47 - 99.46 %, 1.25 - 2.07 % respectively. The LOQ were 0.01 mg/mL. The results showed that the validated method is sensitive and accurate for quantitative determination of

Keywords: Vitamins, water - soluble vitamins, fat - soluble vitamins, HPLC

Veterinary Drugs and Hazardous Substances Assay Division, Bureau of Quality
Control of Livestock Products, Department of Livestock Development

multivitamin injection for veterinary use.

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบวิตามินในยาบรรจุเสร็จสำหรับสัตว์

บทนำ

วิตามิน (Vitamin) เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในปริมาณที่น้อยมากในอาหาร แต่มีความสำคัญต่อกระบวนการต่าง ๆ ของสัตว์ ตั้งแต่กระบวนการสร้างเนื้อเยื่อ การหายใจ การเจริญเติบโตของร่างกาย การสืบพันธุ์ สุขภาพของสัตว์ วิตามินบางชนิดสามารถสังเคราะห์ได้โดยจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่และกระเพาะ ซึ่งวิตามินที่สามารถสังเคราะห์ได้ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของวิตามินที่ละลายน้ำได้ (water soluble vitamin) ดังนั้นบางครั้งสัตว์จะได้รับวิตามินอื่น ๆ ที่จำเป็นในปริมาณไม่มากพอ ทำให้สมดุลในร่างกายเสีย ทำให้เกิดอาการเจ็บป่วย รวมถึงอาการไม่พึงประสงค์ต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้น ทำให้จำเป็นต้องให้วิตามินแก่สัตว์เลี้ยงและปศุสัตว์เพื่อทดแทนวิตามินที่สัตว์อาจได้รับในปริมาณไม่เพียงพอ

ผลิตภัณฑ์วิตามินสำหรับสัตว์ จำเป็นต้องมีการควบคุมปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการให้ลงไป ในอาหารสัตว์ เนื่องจากตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง “กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้า หรือขายอาหารสัตว์” ปี พ.ศ. 2559 ได้มีการกำหนดให้วิตามินเป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ โดยต้องมีปริมาณวิตามินที่ผสมลงในอาหารในปริมาณประกาศที่กำหนด ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีวิธีที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มวิตามินได้อย่างแม่นยำและมีการควบคุมคุณภาพเพื่อที่เกษตรกรจะได้ใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีและทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์วิตามินในยาบรรจุสำเร็จสำหรับสัตว์ชนิดยาฉีดน้ำใส

2. ขอบข่าย

พัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์วิตามินเชิงปริมาณในยาบรรจุสำเร็จสำหรับสัตว์ชนิดยาฉีดน้ำใสด้วยเทคนิค HPLC - DAD โดยแบ่งชนิดของวิตามินที่ทำการวิเคราะห์ ดังนี้

2.1 วิตามินที่ละลายในน้ำ (water soluble vitamins) ได้แก่

- Thiamine หรือวิตามิน B₁ (C₁₂H₁₇N₄O₅)
- Riboflavin หรือวิตามิน B₂ (C₁₇H₂₀N₄O₆)
- Nicotinamide หรือวิตามิน B₃ (C₆H₅NO₂)
- Pyridoxine หรือวิตามิน B₆ (C₈H₁₁NO₃)
- Folic acid หรือวิตามิน B₉ (C₁₉H₁₉N₇O₆)
- Cyanocobalamin หรือวิตามิน B₁₂ (C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P)

2.2 วิตามินที่ละลายในไขมัน (fat soluble vitamin) ได้แก่

- Retinol หรือวิตามิน A (C₂₀H₃₀O)
- Cholecalciferol หรือวิตามิน D₃ (C₂₇H₄₄O)
- α - Tocopherol หรือวิตามิน E (C₂₉H₅₀O₂)
- Phylloquinone หรือวิตามิน K (C₃₁H₄₆O₂)

3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีทดสอบที่สามารถตรวจวิเคราะห์วิตามินจำนวน 10 ชนิด ในยาบรรจุสำเร็จสำหรับสัตว์ชนิดยาฉีดน้ำใส สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

4 เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1.1 Beaker ขนาด 10, 50, 500 มิลลิลิตร
- 4.1.2 Volumetric flask ขนาด 10, 25, 50 และ 1000 มิลลิลิตร
- 4.1.3 Volumetric pipette ขนาด 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตร
- 4.1.4 Micropipette ขนาด 20 – 200 ไมโครลิตร และขนาด 200 – 1000 ไมโครลิตร
- 4.1.5 Amber glass vial ขนาด 16 มิลลิลิตร
- 4.1.6 HPLC vial ใส พร้อมฝา ขนาด 2 มิลลิลิตร
- 4.1.7 Syringe filter ชนิด PTFE 0.22 ไมโครลิตร
- 4.1.8 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง
- 4.1.9 เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์พร้อมอุปกรณ์ ยี่ห้อ Thermo
- 4.1.10 ชุดแยกชนิดและปริมาณสารด้วยหลักการ High - Performance Liquid Chromatography (HPLC) พร้อมเครื่องตรวจวัดชนิด diode array (DAD) ยี่ห้อ Shimadzu
- 4.1.11 คอลัมน์ HPLC ชนิด C_{18} ขนาด 4.6×250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Vertisep

4.2 วัสดุวิทยาศาสตร์

- 4.2.1 Methanol (CH_3OH) AR grade และ HPLC grade
- 4.2.2 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
- 4.2.3 Petroleum ether (C_6H_{14}) AR grade
- 4.2.4 Retinol หรือวิตามิน A ($C_{20}H_{30}O$) ยี่ห้อ Sigma
- 4.2.5 Thiamine หรือวิตามิน B₁ ($C_{12}H_{17}N_4OS$) ยี่ห้อ Acros
- 4.2.6 Riboflavin หรือวิตามิน B₂ ($C_{17}H_{20}N_4O_6$) ยี่ห้อ Applichem
- 4.2.7 Nicotinamide หรือวิตามิน B₃ ($C_6H_6N_2O$) ยี่ห้อ Sigma
- 4.2.8 Pyridoxine หรือวิตามิน B₆ ($C_8H_{11}NO_3$) ยี่ห้อ Acros
- 4.2.9 Folic acid หรือวิตามิน B₉ ($C_{19}H_{19}N_7O_6$) ยี่ห้อ Applichem
- 4.2.10 Cyanocobalamin หรือวิตามิน B₁₂ ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$) ยี่ห้อ Sigma
- 4.2.11 α - Tocopherol หรือวิตามิน E ($C_{29}H_{50}O_2$) ยี่ห้อ Aldrich
- 4.2.12 Cholecalciferol หรือวิตามิน D₃ ($C_{27}H_{44}O$) ยี่ห้อ Sigma
- 4.2.13 Phylloquinone หรือวิตามิน K ($C_{31}H_{46}O_2$) ยี่ห้อ Acros

5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Perveen และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาวิตามิน riboflavin (B₂), pyridoxine (B₆), cyanocobalamin (B₁₂) และ folic acid (B₉) ใน nutraceutical products ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ C₁₈, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Supelco, Sigma - Aldrich ใช้ mobile phase เป็น methanol และ buffer 50 mM potassium dihydrogen phosphate, pH 4.2 อัตราส่วน 30 ต่อ 70 วิธีนี้สามารถหาสารสำคัญได้ทั้ง 4 ชนิด ใช้เวลา 15 นาที เมื่อทำการ validation แล้วผลการทดสอบทั้ง linearity, precision, accuracy และ robustness ให้ผลที่ดีผ่านตามเกณฑ์กำหนดค่า RSD ระหว่างผลการทดลองน้อยกว่า 1 % RSD ค่า recovery อยู่ในช่วง 98.6 – 100.5 %

Sami และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาวิตามินที่ละลายในน้ำ (B₂, B₃, B₆, B₁₂ และ C) กับวิตามินที่ละลายในไขมัน (A, D, E, K และ α - Carotene) ในกระเจี๊ยบเขียว (Okra) ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ Eclipse C₁₈, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Agilent โดยแบ่งวิธีการทดสอบตามชนิดของวิตามินที่ทำการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งในงานวิจัยชิ้นนี้ใช้ทั้งหมด 3 วิธี แบ่งเป็นวิตามินที่ละลายในน้ำ 2 วิธี และวิตามินที่ละลายในไขมัน 1 วิธี วิตามินที่ละลายในน้ำวิธีที่ 1 ใช้สำหรับตรวจกลุ่มวิตามิน B ใช้ mobile phase เป็น methanol และ 0.023 M potassium dihydrogen phosphate, pH 3.54 อัตราส่วน 33 ต่อ 67 วิตามินที่ละลายในน้ำวิธีที่ 2 ใช้สำหรับตรวจหาวิตามิน C ใช้ mobile phase เป็น acetonitrile และน้ำ ในอัตราส่วน 50 ต่อ 50 และสำหรับวิตามินที่ละลายในไขมันวิธีที่ 1 จะใช้สำหรับตรวจหาวิตามิน A, D, E, K และ α - Carotene ใช้ mobile phase เป็น acetonitrile, methanol และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 88 ต่อ 10 ต่อ 2 ตามลำดับ ผลการวิจัยเน้นไปที่ การหาปริมาณของวิตามินสำหรับกระเจี๊ยบเขียวที่ปลูกต่างพื้นที่

Aslam และคณะ (2012) ทำการทดสอบวิตามินที่ละลายในไขมัน (A, D, E และ K) ในเมล็ดถั่วเขียวด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ Symmetry C₁₈, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Waters ใช้ mobile phase คือ methanol, acetonitrile และน้ำ ในอัตราส่วน 84 ต่อ 14 ต่อ 2 ตามลำดับ ผลการวิจัยเน้นไปที่การหาปริมาณของวิตามินที่ละลายในไขมันในเมล็ดถั่วเขียว ซึ่งได้ทดสอบพารามิเตอร์ต่าง ๆ เช่น recovery precision เป็นต้น ได้ค่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานทั้งหมด

Klejdus และคณะ (2004) ทำการทดสอบวิตามินที่ละลายในน้ำ (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉, B₁₂ และ C) และวิตามินที่ละลายในไขมัน (A, D₂, D₃, E, K₁ และ K₂) ในตัวอย่างยาด้วยเทคนิค HPLC - DAD โดยใช้คอลัมน์ C₁₈, ขนาดอนุภาค 3 ไมโครเมตร ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตร ใช้ mobile phase เป็น 0.010 % trifluoroacetic acid pH 3.9 และ methanol ในอัตราส่วน 95 : 5 ผลการวิจัยสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งวิตามินที่ละลายในน้ำและวิตามินที่ละลายในไขมันได้พร้อมกัน โดยจะปรับอัตราส่วนให้วิตามินที่ละลายในน้ำออกมาก่อนใช้เวลาตั้งแต่ 1 – 15 นาที และจากนั้นจะปรับอัตราส่วนให้วิตามินที่ละลายในไขมันออกตามมาใช้เวลาตั้งแต่ 15 – 35 นาที ในการทดสอบ ซึ่งพิกส่วนใหญ่สามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจน มีค่า RSD ตั้งแต่ 1.8 - 8.2 %

6 วิธีดำเนินการ

6.1 การเตรียมละลายสารมาตรฐาน

- 6.1.1 สารละลายมาตรฐานวิตามิน B₁, B₂, B₃, และ B₁₂ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งสารมาตรฐานวิตามินให้มีเนื้อสาร 25 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์
- 6.1.2 สารละลายมาตรฐานวิตามิน B₉ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งสารมาตรฐานวิตามินให้มีเนื้อสาร 20 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักจริง) ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 1 N sodium hydroxide
- 6.1.3 สารละลายมาตรฐานวิตามิน A, D₃, และ E ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งสารมาตรฐานวิตามินให้มีเนื้อสาร 50 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol
- 6.1.4 สารละลายมาตรฐานวิตามิน K ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ชั่งสารมาตรฐานวิตามินให้มีเนื้อสาร 50 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย petroleum ether

- 6.2 การเตรียม 0.05 M potassium dihydrogen phosphate pH 4.0: ชั่ง potassium dihydrogen phosphate 6.8 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ ปรับ pH เท่ากับ 4.0 ด้วย formic acid

6.3 ทดสอบ condition วิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂

- 6.3.1 ทดสอบตามวิธีของ Perveen และคณะ(2009) ซึ่งได้ทำการศึกษาวิตามิน B รวมได้แก่ B₂, B₆, B₉ และ B₁₂ ใน nutraceutical products ด้วยวิธี HPLC - DAD โดยมี condition ตามตารางที่ 1 ใช้ HPLC column VertiSep GES C₁₈, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร 4.0 x 250 มิลลิเมตร ในการทดสอบ

ตารางที่ 1 Condition ทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ตามวิธีของ Perveen และคณะ (2009)

Parameters	Value
Mobile phase:	A: Methanol B: 0.05 M potassium dihydrogen phosphate pH 4.2 (A : B, 30 : 70, v/v)
Column oven:	Room temperature
Flow rate:	1.0 mL/min
Injection volume:	20 µL
Detector:	DAD 200 และ 254 nm
Run time:	20 min

6.3.2 ดัดแปลง condition สำหรับทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ จากวิธีของ Perveen และคณะ (2009) โดยปรับอัตราส่วนของ mobile phase จาก methanol : 0.05 M potassium dihydrogen phosphate pH 4.2 (30 : 70, v/v) เป็น methanol : 0.05 M potassium dihydrogen phosphate pH 4.0 (10 : 90, v/v) ตามตารางที่ 2 และจากการพัฒนาวิธีได้ปรับอัตราส่วนของ mobile phase เป็นแบบ gradient ตามตารางที่ 3 ใช้ HPLC column VertiSep GES C₁₈, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร 4.0 x 250 มิลลิเมตร ในการทดสอบ

ตารางที่ 2 Condition ทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ดัดแปลงวิธีของ Perveen และคณะ (2009)

Parameters	Value
Mobile phase:	A: Methanol B: 0.05 M Potassium dihydrogen phosphate pH 4.0 (A : B, 10 : 90, v/v)
Column oven:	Room temperature
Flow rate:	1.0 mL/min
Injection volume:	20 µL
Detector:	B ₁ 245 nm, B ₂ 450 nm, B ₃ 260 nm, B ₆ 290 nm, B ₉ 280 nm และ B ₁₂ 360 nm
Run time:	15 min

ตารางที่ 3 Condition ทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ดัดแปลงวิธีของ Perveen และคณะ (2009) ปรับ gradient

Parameters	Value
Mobile phase:	A: Methanol B: 0.05 M Potassium dihydrogen phosphate pH 4.0
Gradient:	Time %A %B 0 98 2 5 85 30 9 85 50 9.5 98 2 15 98 2
Column oven:	Room temperature

Flow rate:	1.0 mL/min
Injection volume:	20 μ L
Detector:	B ₁ 245 nm, B ₂ 450 nm, B ₃ 260 nm, B ₆ 290 nm, B ₉ 280 nm และ B ₁₂ 360 nm
Run time:	15 min

6.3.3 ปรับระดับ pH Buffer สำหรับทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ เป็นระดับได้แก่ pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 ทดสอบตามตารางที่ 3 โดยใช้ HPLC column VertiSep GES C₁₈, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร 4.0 x 250 มิลลิเมตร ในการทดสอบ

6.3.4 ทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของการทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂

6.3.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆ และ B₁₂ โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์

6.3.4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับทดสอบวิตามิน B₉ โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.004, 0.008, 0.016, 0.024, 0.032, 0.040, 0.080, 0.160, 0.320 และ 0.400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์

6.4 ทดสอบ condition วิตามิน A, D₃, E และ K

6.4.1 ตามวิธีของ Sami และคณะ (2014) ซึ่งได้ทำการศึกษาวิตามิน A, D, E, K และ β -carotene ในกระเจี๊ยบเขียวด้วยวิธี HPLC โดยมี condition ตามตารางที่ 4 ใช้ HPLC column VertiSep GES C₁₈, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร 4.0 x 250 มิลลิเมตร ในการทดสอบ

ตารางที่ 4 Condition ทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K ตามวิธีของ Sami และคณะ (2014)

Parameters	Value
Mobile phase:	Methanol 100%
Column oven:	Room temperature
Flow rate:	1.0 mL/min
Injection volume:	20 μ L
Detector:	245 nm
Run time:	10 min

6.4.2 ดัดแปลง condition สำหรับทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K จากวิธีของ Sami และคณะ (2014) ซึ่งปรับจาก methanol 100% เป็น methanol : DI water (95 : 5, v/v) ตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 Condition ทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K ดัดแปลงวิธีของ Sami และคณะ (2014)

Parameters	Value
Mobile phase:	Methanol : DI water (95 : 5, v/v)
Column oven:	Room temperature
Flow rate:	1.0 mL/min
Injection volume:	20 µL
Detector:	245 nm
Run time:	10 min

6.4.3 ปรับ gradient สำหรับทดสอบตามตารางที่ 6 ใช้ HPLC column VertiSep GES C₁₈, 5 ไมโครเมตร 4.0 x 250 มิลลิเมตร ในการทดสอบ

ตารางที่ 6 Condition ทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K ปรับ gradient

Parameters	Value
Mobile phase:	A : Methanol B : DI water
Gradient:	Time %A %B 0 95 5 5 100 0 8 100 0 8.5 95 5 15 95 5
Column oven:	Room temperature
Flow rate:	1.0 mL/min
Injection volume:	20 µL
Detector:	A 317 nm, D ₃ 260 nm, E 286 nm และ K 245 nm
Run time:	15 min

6.5 ทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของวิตามิน A, D₃, E และ K

6.5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามิน A, D₃ และ K โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.010, 0.020, 0.030, 0.040, 0.050, 0.100, 0.200, 0.300 และ 0.400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol

6.5.2 วิตามิน E โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.010, 0.020, 0.030, 0.040, 0.050, 0.060, 0.070, 0.080, 0.090 และ 0.100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol

6.6 ขั้นตอนการทดสอบความใช้ได้ของวิธี

6.6.1 สำหรับวิตามินละลายในน้ำ : จากการพัฒนาวิธีได้ chromatographic conditions สำหรับการทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 Condition ทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂

Parameters	Value
Mobile phase:	A : Methanol B : 0.05 M Potassium dihydrogen phosphate pH 4.0
Gradient:	Time %A %B 0 98 2 5 85 30 9 85 50 9.5 98 2 15 98 2
Column oven:	30°C
Flow rate:	1.0 mL/min
Injection volume:	20 µL
Detector:	B ₁ 245 nm, B ₂ 450 nm, B ₃ 260 nm, B ₆ 290 nm, B ₉ 280 nm และ B ₁₂ 360 nm
Run time:	15 min

6.6.2 การเตรียม standard calibration curve สำหรับทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ เตรียมความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.005 -0.035 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025, 0.030 และ 0.035 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ วิตามิน B₉ เตรียมความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.004 -0.080 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (0.004, 0.008, 0.016, 0.024, 0.032, 0.040 และ 0.080 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) การเตรียมตามตารางที่ 8 เตรียมความเข้มข้นละ 1 ซ้ำๆ ละ 2 injection เหน็จการยอมรับ $r \geq 0.995$

ตารางที่ 8 การเตรียม standard calibration curve ทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ เตรียมใน volumetric flask ขนาด 10 mL

Stock std. วิตามิน B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₆ และ B ₁₂ 0.5 mg/mL (mL)	Stock std. วิตามิน B ₉ 0.4 mg/mL (mL)	ความเข้มข้นวิตามิน B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₆ และ B ₁₂ (mg/mL)	ความเข้มข้น วิตามิน B ₉ (mg/mL)
0.1 mL	0.1 mL	0.005	0.004
0.2 mL	0.2 mL	0.010	0.008
0.3 mL	0.4 mL	0.015	0.016
0.4 mL	0.6 mL	0.020	0.024

0.5 mL	0.8 mL	0.025	0.032
0.6 mL	1.0 mL	0.030	0.040
0.7 mL	2.0 mL	0.035	0.080

- 6.6.3 การทดสอบ accuracy ทำการทดสอบ standard addition ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตามตารางที่ 9 ความความเข้มข้นละ 7 ซ้ำๆ ละ 2 injection ทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ % recovery อยู่ในช่วง 95 –105 (AOAC, 2016)

ตารางที่ 9 การเตรียม standard addition สำหรับทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂

Compounds	Pipette (mL)	Final Volume (mL)	Final Conc. (mg/mL)
Stock std. วิตามิน B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₆ และ B ₁₂ 0.5 mg/mL	0.3	10	0.015
	0.4	10	0.020
	0.5	10	0.025
Stock std. วิตามิน B ₉ 0.4 mg/mL	0.4	10	0.016
	0.6	10	0.024
	0.8	10	0.032

- 6.6.4 การทดสอบ precision โดยเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบตามข้อ 6.10.3 ทดสอบ 7 ซ้ำๆ ละ 2 injection เป็นเวลา 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ %RSD $\leq$ 3 (AOAC, 2016)
- 6.6.5 ทดสอบ limit of quantitation (LOQ) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน วิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ทดสอบ signal to noise ratio (S/N) ให้มีค่าเท่ากับ 10 เตรียมจำนวน 7 ซ้ำๆ ละ 2 injection เกณฑ์การยอมรับ %RSD $\leq$ 3 (AOAC, 2016)
- 6.6.6 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (selectivity) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามิน A, D₃, E และ K ไปฉีดใน condition วิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂
- 6.6.7 การทดสอบ robustness โดยเตรียม standard solution ที่ความเข้มข้น level ที่ 4 ของ standard calibration curve เตรียมจำนวน 2 ซ้ำๆ ละ 2 injection สำหรับทดสอบ โดยมีปัจจัยต่างๆ ตามตารางที่ 10 สำหรับทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ วางแผนการทดสอบตามวิธีของ Youden's ตามตารางที่ 11

ตารางที่ 10 Parameters ทดสอบ robustness ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂

Factor	Units	Limits	Level (-1)	Level (+1)	Normal value
สีของ vial (A/a)	-	-	สีชา = A	สีใส = a	-
Column temperature (B/b)	°C	±5	25 = B	35 = b	30
Sample temperature (C/c)	°C	±5	20 = C	30 = c	25
ยี่ห้อของ methanol (D/d)	-	-	Labscan = D	Scharlau = d	-
Flow rate (E/e)	mL/min	±0.1	0.9 = E	1.1 = e	1.0
สีของ volumetric flask (F/f)	-	-	สีชา = F	สีใส = f	-
Equilibrate time (G/g)	min	±20	40 = G	80 = g	60

ตารางที่ 11 แผนการทดสอบ robustness ด้วยวิธี Youden's

Parameter	จำนวนการทดสอบ							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
ผล	S	T	U	V	W	X	Y	Z

6.6.8 สำหรับวิตามินละลายในไขมัน : จากการพัฒนาวิธี chromatographic condition ทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K ตารางที่ 12

ตารางที่ 12 Condition สำหรับการทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K

Parameters	Value
Mobile phase:	A : Methanol B : DI water
Gradient:	Time %A %B 0 95 5 5 100 0 8 100 0 8.5 95 5 15 95 5
Column oven:	Room temperature
Flow rate:	1.0 mL/min
Injection volume:	20 µL
Detector:	A 317 nm, D ₃ 260 nm, E 286 nm และ K 245 nm
Run time:	15 min

6.6.9 การเตรียม standard calibration curve สำหรับทดสอบวิตามิน A เตรียมความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.008 -0.032 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (0.008, 0.012, 0.016, 0.020, 0.024, 0.028 และ 0.032 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) การเตรียมตามตารางที่ 10 วิตามิน D₃ เตรียมความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.002 -0.030 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.010, 0.020 และ 0.030 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) การเตรียมตามตารางที่ 10 และวิตามิน K เตรียมความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.003 - 0.009 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (0.003, 0.004, 0.005, 0.006, 0.007, 0.008 และ 0.009 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) การเตรียมตามตารางที่ 13 เตรียมความเข้มข้นละ 1 ซ้ำๆ ละ 2 injection เกล็ดของการยอมรับ $r \geq 0.995$

ตารางที่ 13 การเตรียม standard calibration curve ทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K เตรียมใน volumetric flask ขนาด 10 mL

Stock std. วิตามิน A 1.0 mg/mL (mL)	Stock std. วิตามิน D ₃ 1.0 mg/mL (mL)	Stock std. วิตามิน E 1.0 mg/mL (mL)	Stock std. วิตามิน K 1.0 mg/mL (mL)	ความ เข้มข้น วิตามิน A (mg/mL)	ความ เข้มข้น วิตามิน D ₃ (mg/mL)	ความ เข้มข้น วิตามิน E (mg/mL)	ความ เข้มข้น วิตามิน K (mg/mL)
0.08	0.02	0.05	0.03	0.008	0.002	0.005	0.003
0.12	0.04	0.10	0.04	0.012	0.004	0.010	0.004
0.16	0.06	0.15	0.05	0.016	0.006	0.015	0.005

0.20	0.08	0.20	0.06	0.020	0.008	0.020	0.006
0.24	0.10	0.25	0.07	0.024	0.010	0.025	0.007
0.28	0.20	0.30	0.08	0.028	0.020	0.030	0.008
0.32	0.30	0.35	0.09	0.032	0.030	0.035	0.009

- 6.6.10 การทดสอบ accuracy ทำการทดสอบ standard addition ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตามตารางที่ 14 ความความเข้มข้นละ 7 ซ้ำๆ ละ 2 injection ทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ % recovery อยู่ในช่วง 95 – 105 (AOAC, 2016)

ตารางที่ 14 การเตรียม standard addition สำหรับทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K

Compounds	Pipette (mL)	Final Volume (mL)	Final Conc. (mg/mL)
Stock std. วิตามิน E 0.5 mg/mL	0.3	10	0.015
	0.4	10	0.020
	0.5	10	0.025
Stock std. วิตามิน A 1.0 mg/mL	0.16	10	0.016
	0.20	10	0.020
	0.24	10	0.024
Stock std. วิตามิน D ₃ 1.0 mg/mL	0.06	10	0.006
	0.08	10	0.008
	0.10	10	0.010
Stock std. วิตามิน K 1.0 mg/mL	0.05	10	0.005
	0.06	10	0.006
	0.07	10	0.007

- 6.6.11 การทดสอบ precision โดยเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบตามข้อ 6.10.3 ทดสอบ 7 ซ้ำๆ ละ 2 injection เป็นเวลา 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ %RSD ≤ 3 (AOAC, 2016)
- 6.6.12 ทดสอบ limit of quantitation (LOQ) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน วิตามิน A, D₃, E และ K ทดสอบ signal to noise ratio (S/N) ให้มีค่าเท่ากับ 10 เตรียมจำนวน 7 ซ้ำๆ ละ 2 injection เกณฑ์การยอมรับ %RSD ≤ 3 (AOAC, 2016)

- 6.6.13 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (selectivity) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ไปฉีดใน condition ของวิตามิน A, D₃, E และ K
- 6.6.14 การทดสอบ robustness โดยเตรียม standard solution ที่ความเข้มข้น level ที่ 4 ของ standard calibration curve เตรียมจำนวน 2 ซ้ำๆ ละ 2 injection สำหรับทดสอบ โดยมีปัจจัยต่างๆ ตามตารางที่ 14 สำหรับทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K วางแผนการทดสอบตามวิธีของ Youden's ตามตารางที่ 16

ตารางที่ 15 Parameters ทดสอบ robustness ของวิตามิน A, D₃, E และ K

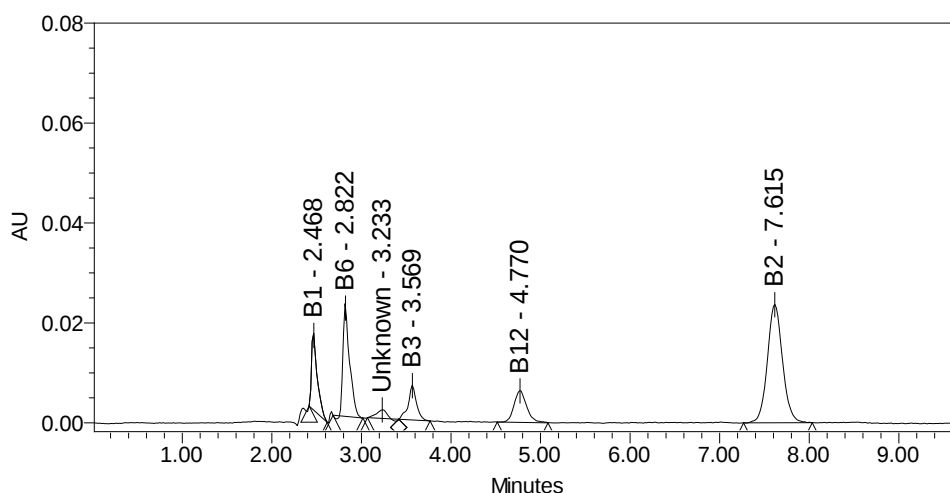
Factor	Units	Limits	Level (-1)	Level (+1)	Normal value
สีของ vial (A/a)	-	-	สีชา = A	สีใส = a	-
Flow rate (B/b)	mL/min	±0.1	0.9 = B	1.1 = b	1.0
Injection volume (C/c)	μL	±0.5	19.5 = C	20.5 = c	20
ยี่ห้อของ methanol (D/d)	-	-	Labscan = D	Scharlau = d	-
ปริมาณการล้าง needle (E/e)	μL	±200	300 = E	700 = e	500
สีของ volumetric flask ที่ใช้ (F/f)	-	-	สีชา = F	สีใส = f	-
Equilibrate time (G/g)	min	±20	40 = G	80 = g	60

ตารางที่ 16 แผนการทดสอบ robustness ด้วยวิธี Youden's

Parameter	จำนวนการทดสอบ							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
ผล	S	T	U	V	W	X	Y	Z

7 ผลการทดลอง

- 7.1 ผลการทดสอบ condition ตามวิธีของ Perveen และคณะ (2009) ใช้ condition ตามตารางที่ 1 โดยทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ พบว่าวิตามิน B₁, B₃ และ B₆ ถูก elute ออกมาเร็วและไม่สามารถที่จะ identify วิตามิน B₉ ได้ตามรูปที่ 1 และได้ค่า parameter ตามตารางที่ 17

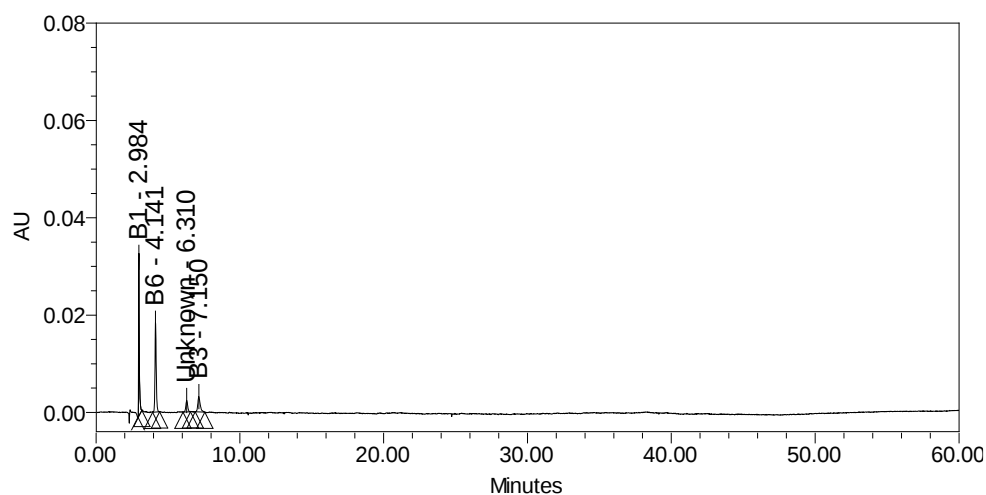


รูปที่ 1 Chromatogram ของสารมาตรฐานวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ตามวิธีของ Perveen และคณะ (2009)

ตารางที่ 17 ค่า parameters ของการทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ตามวิธีของ Perveen และคณะ (2009)

Compounds	Rt (min)	Area	K Prime	R	Tailing	N
B ₁	2.47	67838	0.12	-	1.82	8210
B ₂	7.61	278611	2.46	9.85	1.08	10294
B ₃	3.57	45139	0.62	1.74	0.99	8458
B ₆	2.82	117682	0.28	2.42	1.68	6134
B ₉	-	-	-	-	-	-
B ₁₂	4.77	62248	1.17	5.59	1.23	5557

7.2 ผลการทดสอบ condition โดยดัดแปลงตามวิธีของ Perveen และคณะ (2009) ใช้ condition ตามตารางที่ 2 ทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ พบว่าที่อัตราส่วนของ mobile phase methanol : 0.05 M potassium dihydrogen phosphate pH 4.0 (10 : 90, v/v) พบว่าวิตามิน B₁, B₃ และ B₆ มี retention time ที่ 2.98, 7.15 และ 4.14 นาที ตามลำดับ จากเดิมที่ 2.47, 3.57 และ 2.82 นาที ตามลำดับ ส่วนวิตามิน B₂ และ B₁₂ ไม่พบว่ามีผลจากคอลัมน์เมื่อครบ 60 นาที ตามรูปที่ 2 ได้ค่า parameters ตามตารางที่ 18



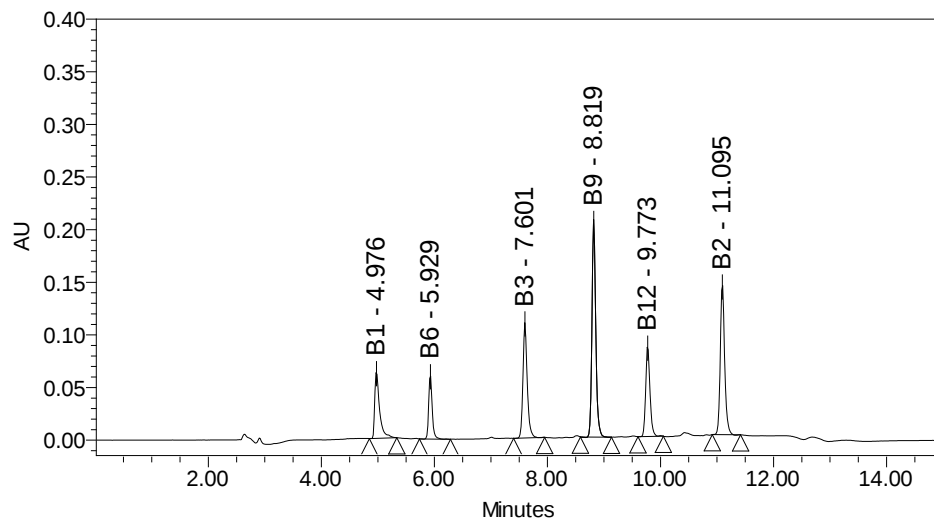
รูปที่ 2 Chromatogram ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ดัดแปลงจากวิธีของ Perveen และคณะ (2009)

ตารางที่ 18 ค่า parameters ของการทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ดัดแปลงจากวิธีของ Perveen และคณะ (2009)

Compounds	Rt	Area	K Prime	R	Tailing	N
B ₁	2.98	118808	0.36	-	1.61	19218
B ₂	-	-	-	-	-	-
B ₃	7.15	36763	2.25	3.06	1.44	9858
B ₆	4.14	112495	0.88	9.20	1.21	11824
B ₉	-	-	-	-	-	-
B ₁₂	-	-	-	-	-	-

*หมายเหตุ – คือไม่พบว่าสารถูกชะออกจากคอลัมน์

7.3 ผลการทดสอบ condition โดยดัดแปลงตามวิธีของ Perveen และคณะ (2009) ใช้ condition ตามตารางที่ 3 ทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ได้ทำการทดสอบ ปรับ gradient ของ mobile phase ทดสอบได้ผลตามรูปที่ 3 ได้ค่า parameters ตามตารางที่ 19 ซึ่งเป็น condition ที่จะนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

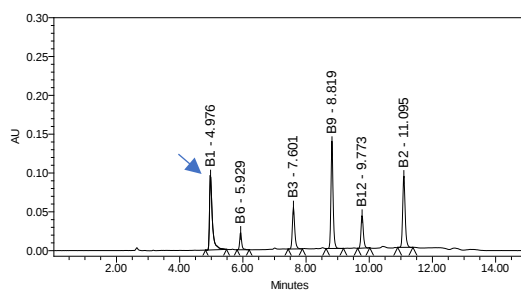


รูปที่ 3 Chromatogram ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ที่ปรับอัตราส่วน mobile phase เป็นแบบ gradient

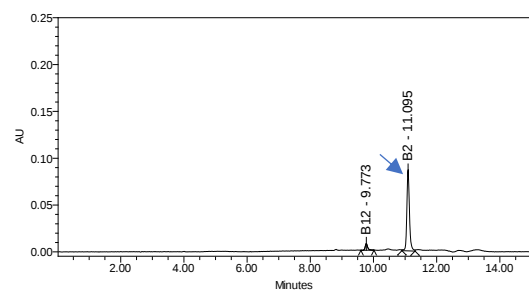
ตารางที่ 19 ค่า parameters ของการทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ที่ปรับอัตราส่วน mobile phase เป็นแบบ gradient

Compounds	Rt (min)	Area	K Prime	R	Tailing	N
B ₁	4.97	757702	0.99	-	1.48	18042
B ₂	11.02	2234920	3.41	9.04	1.52	99368
B ₃	7.53	250725	2.01	4.72	1.60	47428
B ₆	5.90	716184	1.36	6.67	1.50	43701
B ₉	8.70	110771	2.48	8.47	1.41	75156
B ₁₂	9.70	418043	2.88	7.19	1.46	81991

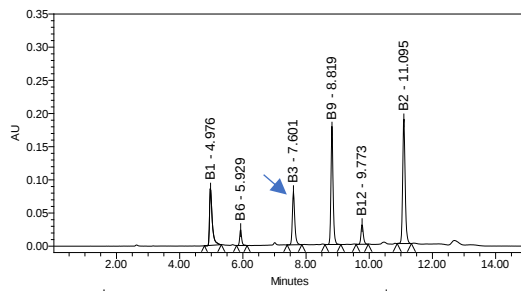
7.4 ผลการทดสอบ spectrum ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ โดยการทดสอบจะใช้ spectrum ของวิตามินแต่ละชนิดในการทดสอบตามรูปที่ 4 - 15



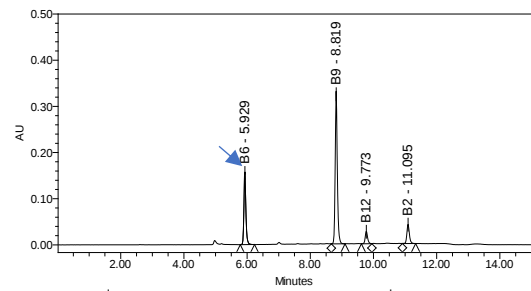
รูปที่ 4 Chromatogram วิตามิน B₁ ที่ 245 nm



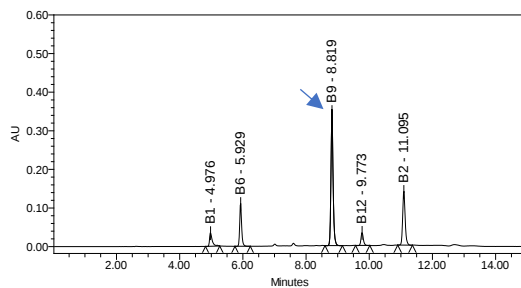
รูปที่ 5 Chromatogram วิตามิน B₂ ที่ 450 nm



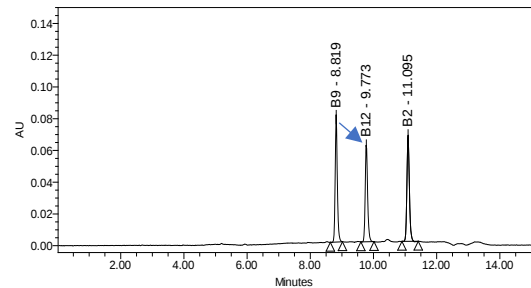
รูปที่ 6 Chromatogram วิตามิน B₃ ที่ 260 nm



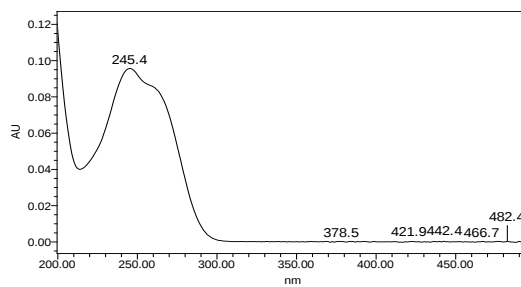
รูปที่ 7 Chromatogram วิตามิน B₆ ที่ 290 nm



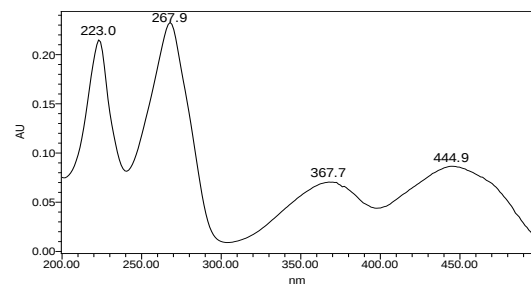
รูปที่ 8 Chromatogram วิตามิน B₉ ที่ 280 nm



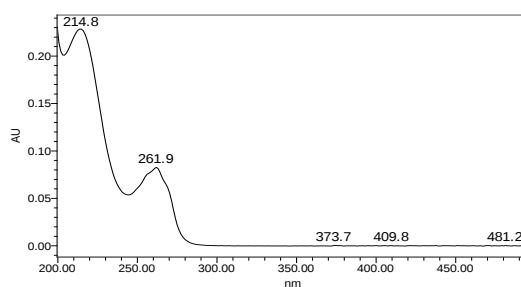
รูปที่ 9 Chromatogram วิตามิน B₁₂ ที่ 360 nm



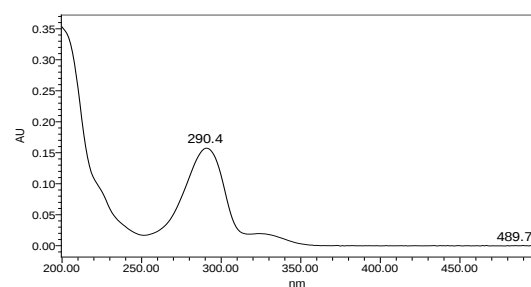
รูปที่ 10 Spectrum วิตามิน B₁



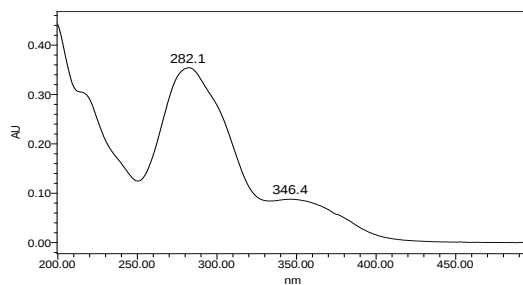
รูปที่ 11 Spectrum วิตามิน B₂



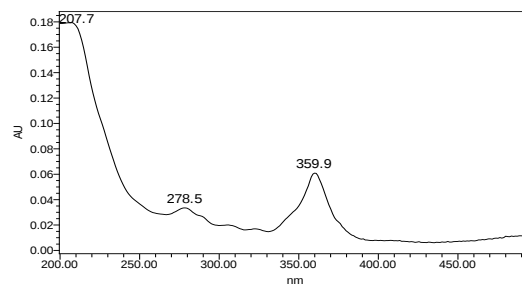
รูปที่ 12 Spectrum วิตามิน B₃



รูปที่ 13 Spectrum วิตามิน B₆

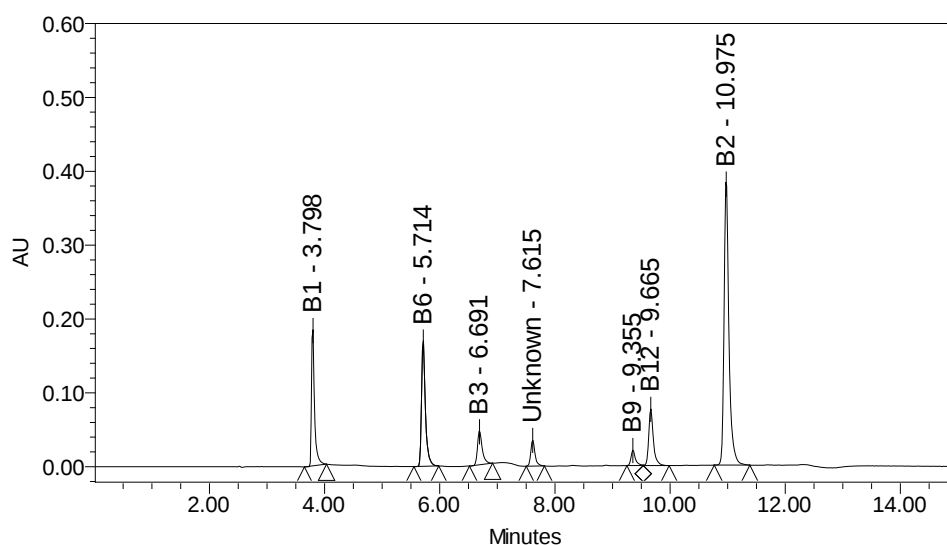


รูปที่ 14 Spectrum วิตามิน B₉

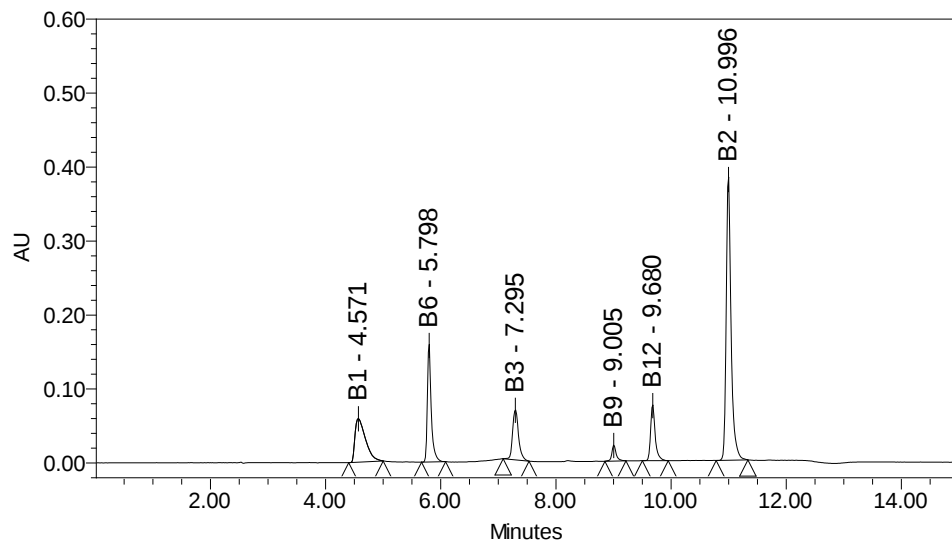


รูปที่ 15 Spectrum วิตามิน B₁₂

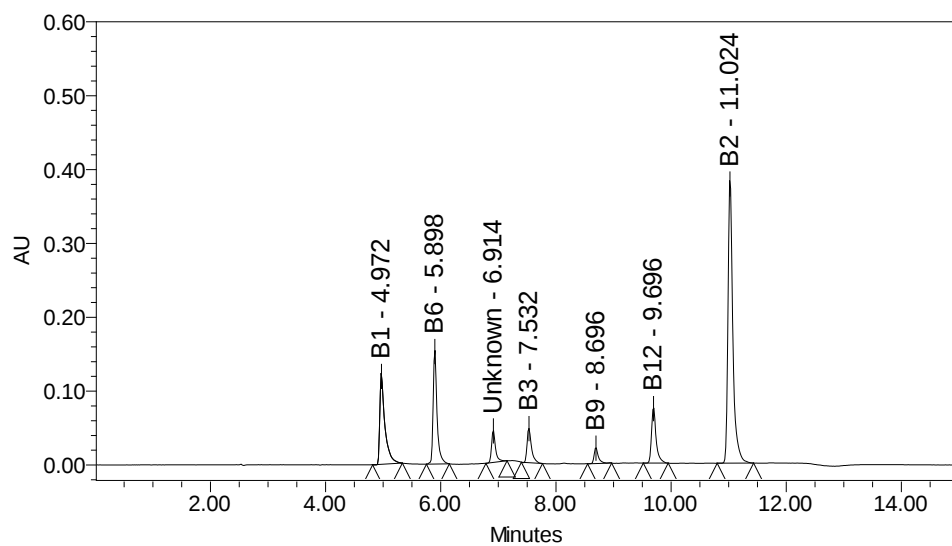
7.5 ผลการทดสอบแปรระดับ pH ของ buffer โดยทดสอบที่ pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 ใช้ condition ทดสอบตามตารางที่ 4 ที่มีการใช้ methanol และ 0.05 M Potassium dihydrogen phosphate pH 4.0 เป็น mobile phase ได้ผลตามรูปที่ 16 - 23 และ ตารางที่ 20 - 24 จากรูปที่ 21 ทดสอบค่า K prime พบว่า วิตามิน B₁ มีค่า K prime เพิ่มขึ้นตามค่า pH ที่เพิ่มขึ้นและวิตามิน B₉ มีค่า K prime ลดลงเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น จากรูปที่ 22 และ 23 พบว่า วิตามิน B₁ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH จะทำให้ค่า plate count และค่า tailing มีการเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย



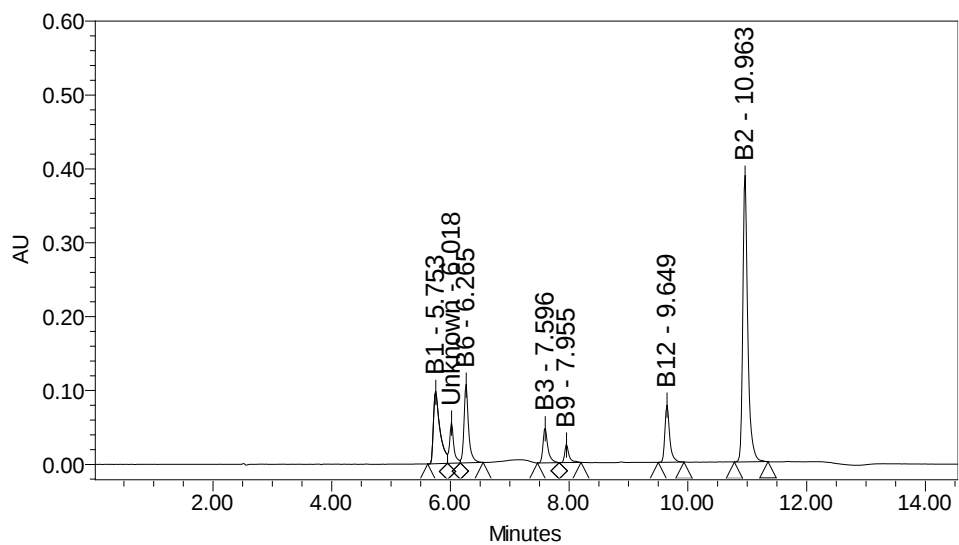
รูปที่ 16 Chromatogram ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ pH buffer เท่ากับ 3.0



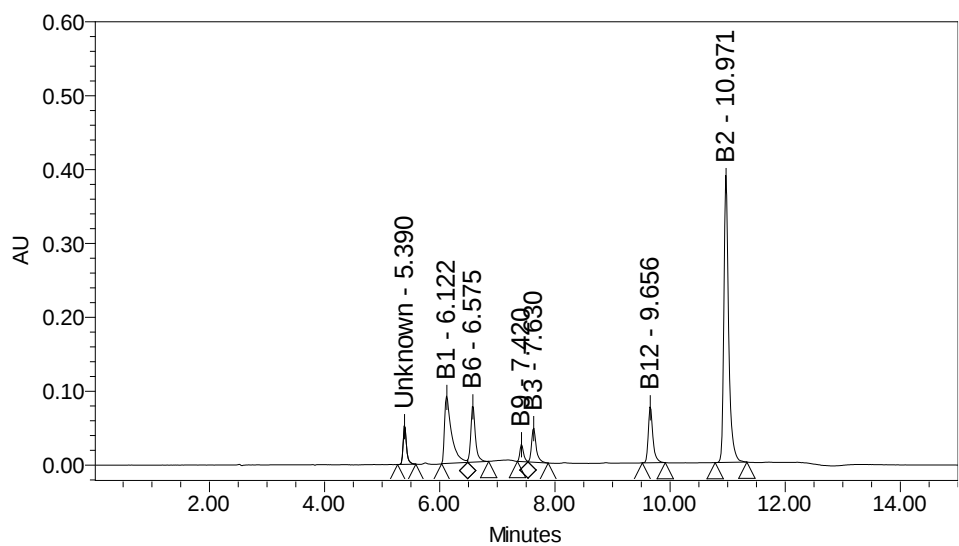
รูปที่ 17 Chromatogram ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ pH buffer เท่ากับ 3.5



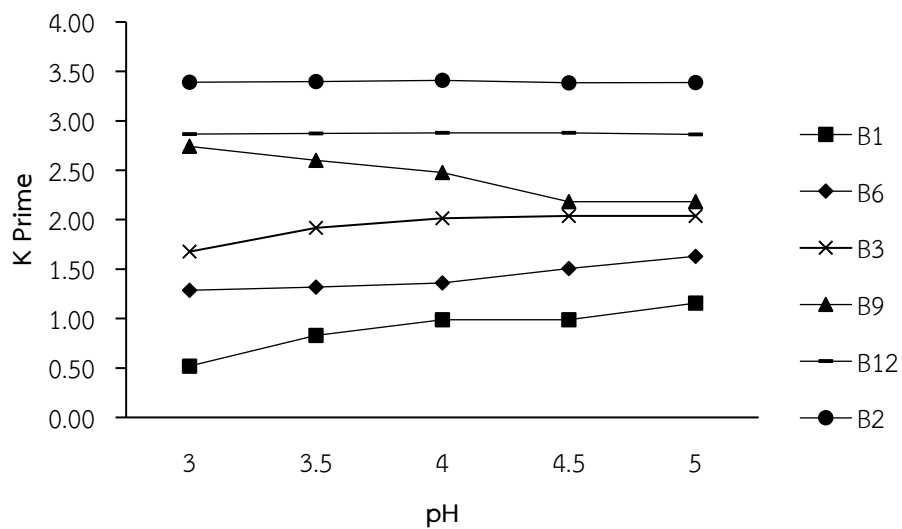
รูปที่ 18 Chromatogram ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ pH buffer เท่ากับ 4.0



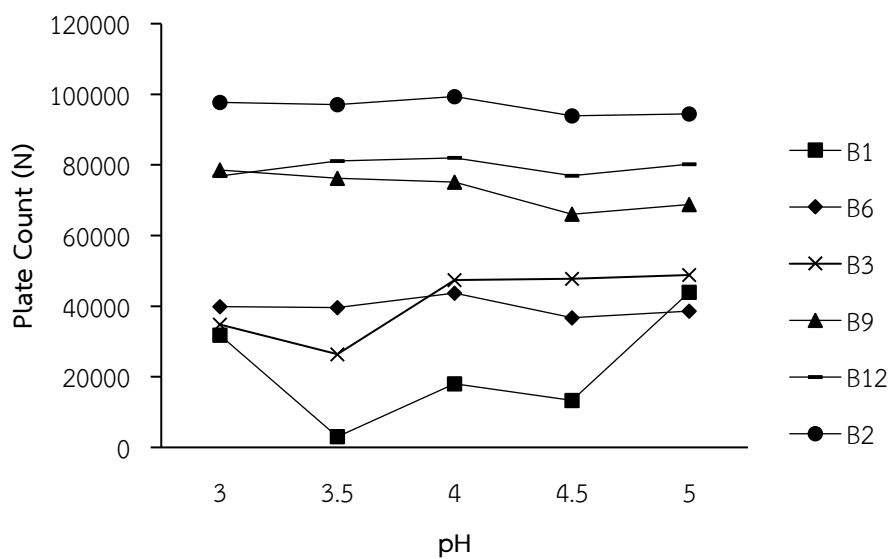
รูปที่ 19 Chromatogram ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ pH buffer เท่ากับ 4.5



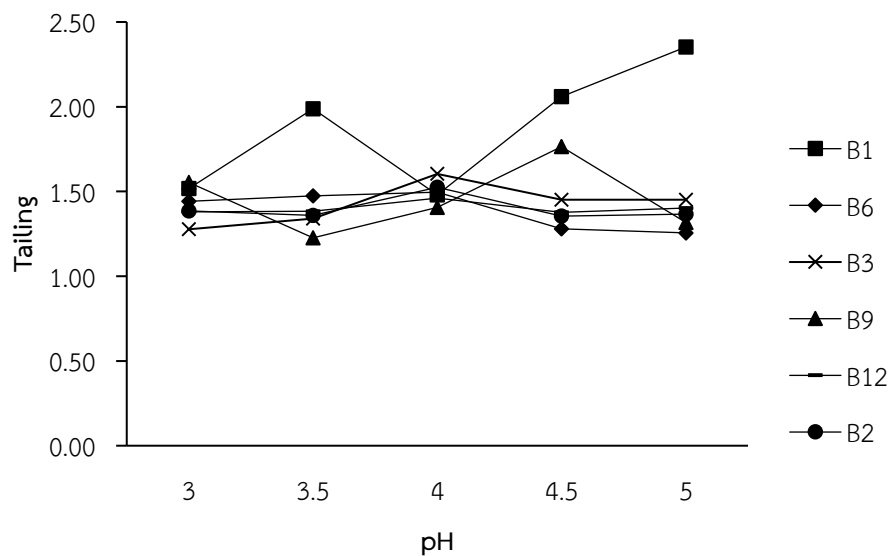
รูปที่ 20 Chromatogram ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ pH buffer เท่ากับ 5.0



รูปที่ 21 ค่า K Prime ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ที่ pH 3.0 – 5.0



รูปที่ 22 ค่า Plate Count ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ที่ pH 3.0 – 5.0



รูปที่ 23 ค่า Tailing ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ที่ pH 3.0 – 5.0

ตารางที่ 20 ค่า parameters ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ที่ pH 3.0

Compounds	Rt (min)	Area	K Prime	R	Tailing	N
B ₁	3.80	678491	0.52	-	1.52	31770
B ₂	10.97	2246401	3.39	8.90	1.38	97679
B ₃	6.69	265461	1.68	7.24	1.28	34799
B ₆	5.71	787060	1.29	18.30	1.44	39900
B ₉	9.35	112171	2.74	12.93	1.55	78554
B ₁₂	9.67	424421	2.87	2.23	1.38	76856

ตารางที่ 21 ค่า parameters ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ที่ pH 3.5

Compounds	Rt (min)	Area	K Prime	R	Tailing	N
B ₁	4.57	739155	0.83	-	1.99	3017
B ₂	11.00	2223866	3.40	8.92	1.36	97067
B ₃	7.29	484948	1.92	9.81	1.34	26391
B ₆	5.80	754682	1.32	5.32	1.47	39560
B ₉	9.00	114079	2.60	10.88	1.23	76252
B ₁₂	9.68	417970	2.87	4.89	1.38	81090

ตารางที่ 22 ค่า parameters ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ที่ pH 4.0

Compounds	Rt (min)	Area	K Prime	R	Tailing	N
B ₁	4.97	757702	0.99	-	1.48	18042
B ₂	11.02	2234920	3.41	9.04	1.52	99368
B ₃	7.53	250725	2.01	4.72	1.60	47428
B ₆	5.90	716184	1.36	6.67	1.50	43701
B ₉	8.70	110771	2.48	8.47	1.41	75156
B ₁₂	9.70	418043	2.88	7.19	1.46	81991

ตารางที่ 23 ค่า parameters ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ที่ pH 4.5

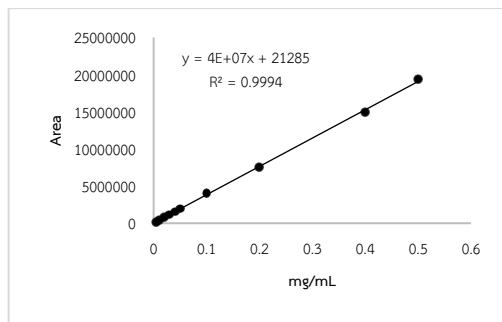
Compounds	Rt (min)	Area	K Prime	R	Tailing	N
B ₁	5.75	741619	1.30	-	2.06	13273
B ₂	10.96	2253426	3.39	8.93	1.35	93915
B ₃	7.60	271213	2.04	9.21	1.45	47761
B ₆	6.26	565762	1.51	1.83	1.28	36729
B ₉	7.95	126115	2.18	2.61	1.76	66027
B ₁₂	9.65	424512	2.86	12.55	1.38	76940

ตารางที่ 24 ค่า parameters ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ที่ pH 5.0

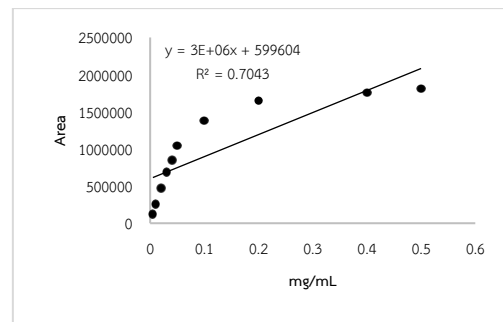
Compounds	Rt (min)	Area	K Prime	R	Tailing	N
B ₁	6.12	769475	1.45	4.36	2.35	13239
B ₂	10.97	2229009	3.39	9.16	1.37	94488
B ₃	7.63	257244	2.05	1.59	1.45	48824
B ₆	6.57	418654	1.63	2.48	1.26	38605
B ₉	7.42	100822	1.97	6.61	1.32	68819
B ₁₂	9.66	417193	2.86	14.19	1.40	80189

จากผลการศึกษาพบว่าที่ pH 4.0 มีการแยกของสารแต่ละชนิดที่ดีและมีค่าพารามิเตอร์อื่นเช่น Plate Count และ tailing factor อยู่ในระดับที่ยอมรับได้จึงเลือกใช้ค่า pH ที่ 4.0 ในการทดสอบต่อไป

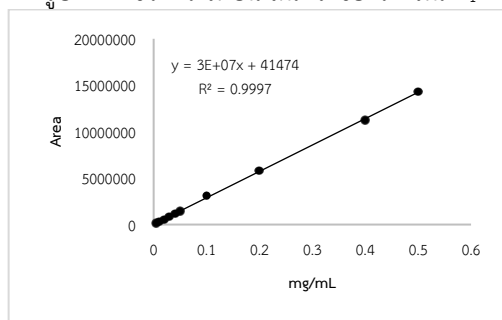
7.6 ผลการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ตามข้อที่ 6.6 พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคกับความเข้มข้นของวิตามิน B₂ ไม่เป็นเส้นตรงมีค่า $r < 0.995$ เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเส้นโค้งที่ความเข้มข้น 0.050-0.500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 25 ส่วนวิตามิน B₁, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ที่ความเข้มข้น 0.005-0.500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคกับความเข้มข้นยังคงเป็นเส้นตรงมีค่า $r > 0.995$ ตามรูปที่ 24 และ 26-29



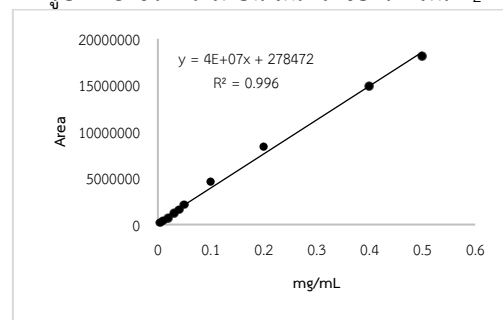
รูปที่ 24 ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิตามิน B₁



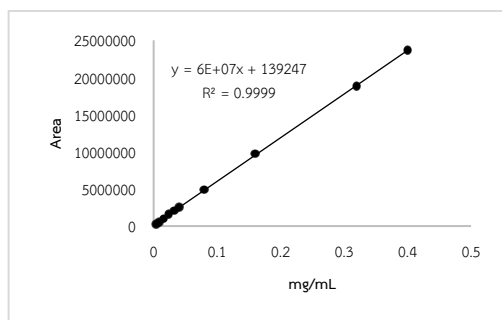
รูปที่ 25 ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิตามิน B₂



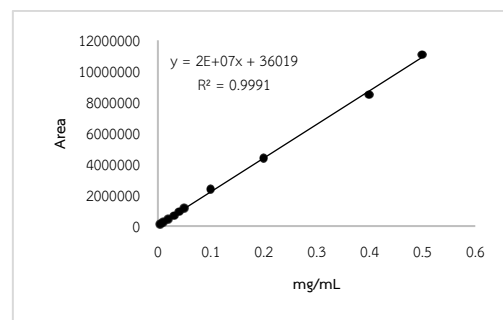
รูปที่ 26 ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิตามิน B₃



รูปที่ 27 ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิตามิน B₆

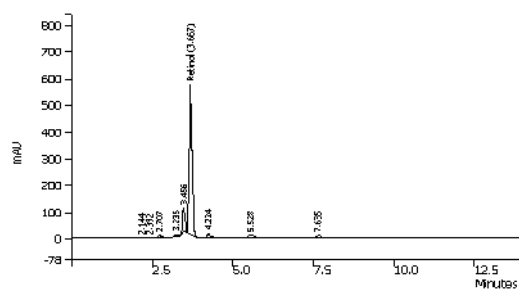


รูปที่ 28 ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิตามิน B₉

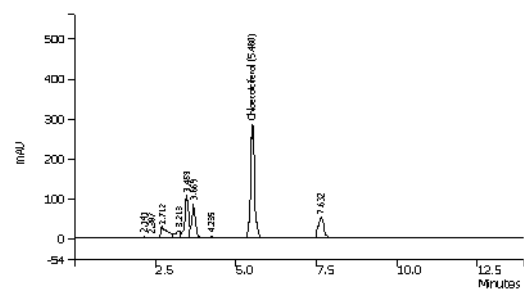


รูปที่ 29 ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิตามิน B₁₂

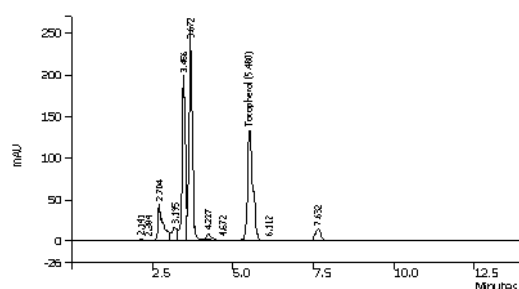
7.7 ผลการทดสอบ condition วิตามิน A, D₃, E และ K ตามวิธีของ Sami และคณะ (2014) โดยใช้ condition ตามตารางที่ 4 ได้ผลโครมาโทแกรมตามรูปที่ 30 - 33 และค่า parameters ตามตารางที่ 25 พบว่าวิตามิน A มีค่า resolution เท่ากับ 0.8 ซึ่งทำให้พีคไม่สามารถแยกออกจากสารอื่นได้ และวิตามิน D₃ และ E พีคถูก elute ออกมารวมกันไม่สามารถแยกได้ condition ดังกล่าวจึงไม่สามารถใช้ในการทดสอบได้



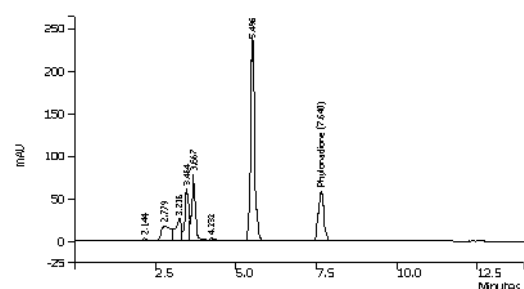
รูปที่ 30 Chromatogram วิตามิน A ที่ 317 nm



รูปที่ 31 Chromatogram วิตามิน D₃ ที่ 260 nm



รูปที่ 32 Chromatogram วิตามิน E ที่ 286 nm

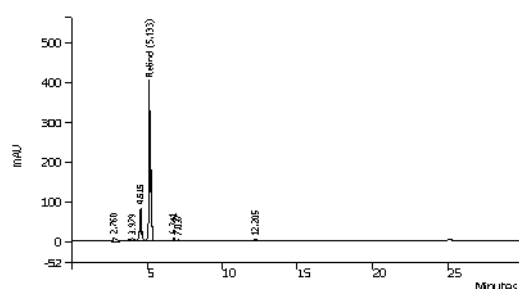


รูปที่ 33 Chromatogram วิตามิน K ที่ 245 nm

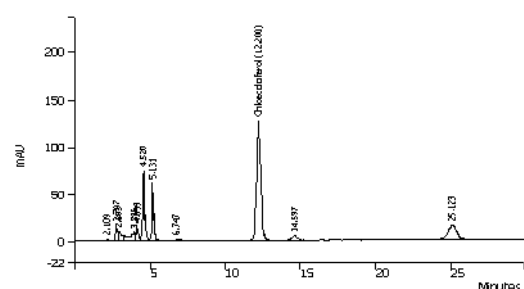
ตารางที่ 25 Parameter ทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K ตามวิธีของ Sami และคณะ (2014)

Compounds	Rt (min)	Area	K Prime	R	Tailing	N
A	3.66	16505115	2.46	0.8	1.07	7603
D ₃	5.48	12765354	4.48	4.3	1.22	10079
E	5.48	7764026	4.48	4.3	1.47	5296
K	7.64	3596810	6.64	8.1	1.05	9723

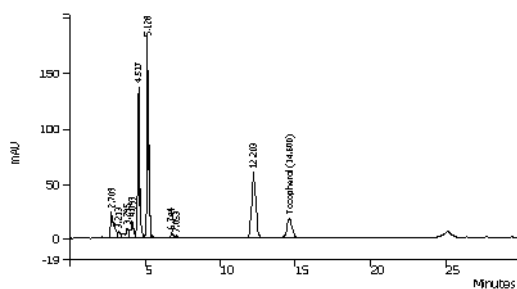
7.8 ผลการทดสอบ condition วิตามิน A, D₃, E และ K ดัดแปลงวิธีของ Sami และคณะ (2014) โดยใช้ condition ตามตารางที่ 5 ได้ผลโครมาโทแกรมตามรูปที่ 34 - 37 และตารางที่ 26 พบว่าวิตามิน A, D₃, E และ K มีค่า resolution อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (2) แต่เนื่องจากมี run time 30 นาทีจึงได้พัฒนาต่อไป เพื่อลดเวลาในการวิเคราะห์หลัง



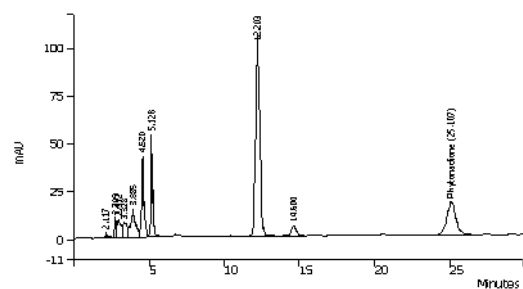
รูปที่ 34 Chromatogram วิตามิน A ที่ 317 nm



รูปที่ 35 Chromatogram วิตามิน D₃ ที่ 260 nm



รูปที่ 36 Chromatogram วิตามิน E ที่ 286 nm

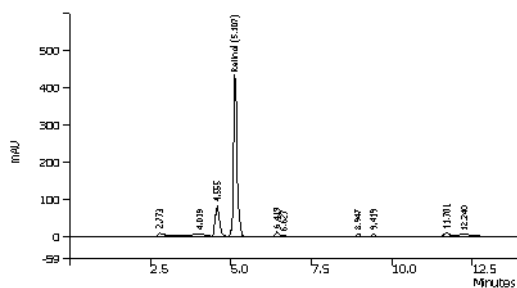


รูปที่ 37 Chromatogram วิตามิน K ที่ 245 nm

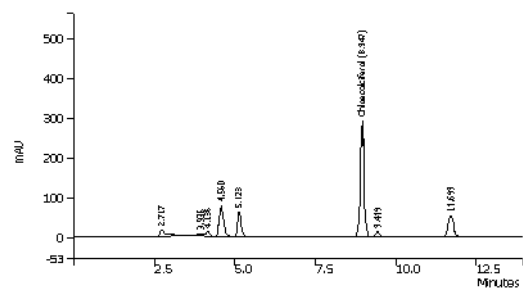
ตารางที่ 26 Parameters ทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K ดัดแปลงวิธีของ Sami และคณะ (2014)

Compounds	Rt (min)	N	K Prime	R	Tailing	Area
A	5.13	8883	4.13	2.8	1.16	17658764
D ₃	12.2	9718	11.2	13	1.05	12491834
E	14.6	9457	13.6	4.3	1.03	2140663
K	25.1	8984	24.11	12	1.05	3657514

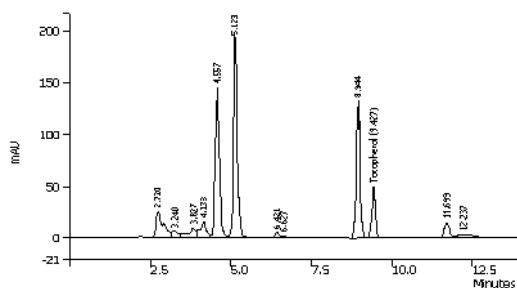
7.9 ผลการทดสอบ condition วิตามิน A, D₃, E และ K ดัดแปลงวิธีของ Sami และคณะ (2014) โดยใช้ condition ตามตารางที่ 6 ซึ่งเป็นการปรับ gradient ของ mobile phase ได้ผลโครมาโทแกรมตามรูปที่ 38 - 41 และตารางที่ 27



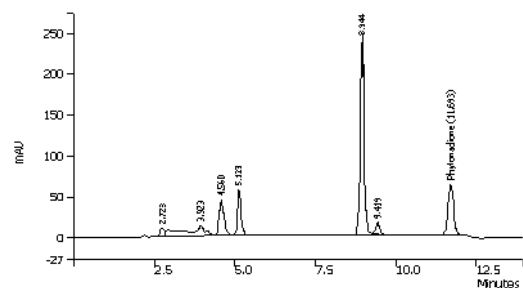
รูปที่ 38 Chromatogram วิตามิน A ที่ 317 nm



รูปที่ 39 Chromatogram วิตามิน D₃ ที่ 260 nm



รูปที่ 40 Chromatogram วิตามิน E ที่ 286 nm

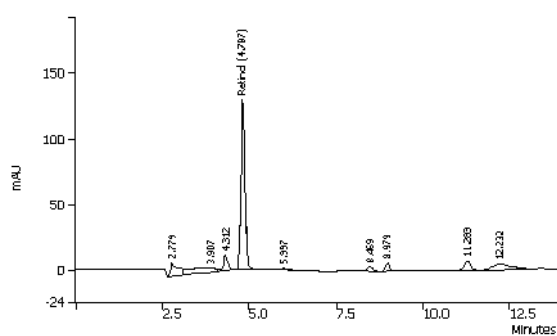


รูปที่ 41 Chromatogram วิตามิน K ที่ 245 nm

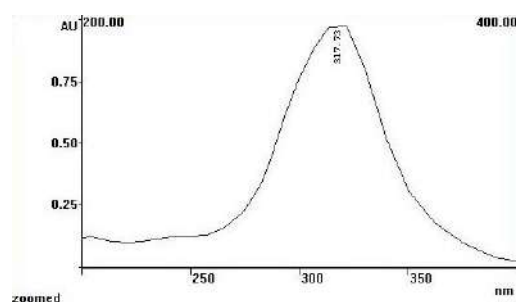
ตารางที่ 27 Parameters ทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K ดัดแปลงวิธีของ Sami และคณะ (2014)

Compounds	Rt (min)	N	K Prime	R	Tailing	Area
A	5.107	10017	4.11	2.6	1.17	17721070
D ₃	8.947	27153	7.95	18	1.06	12478372
E	9.427	32246	8.43	2.3	1.08	2064989
K	11.693	23783	10.69	8.8	1.06	3757274

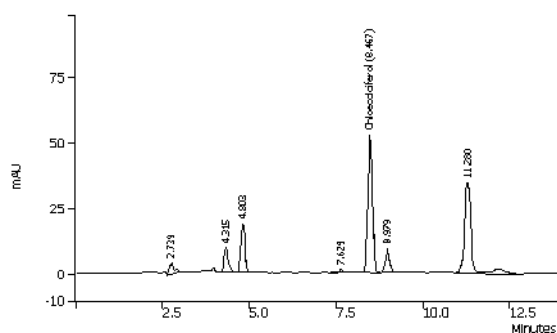
7.10 ผลการทดสอบ spectrum วิตามิน A, D₃, E และ K ได้ผลตามรูปที่ 42 - 49



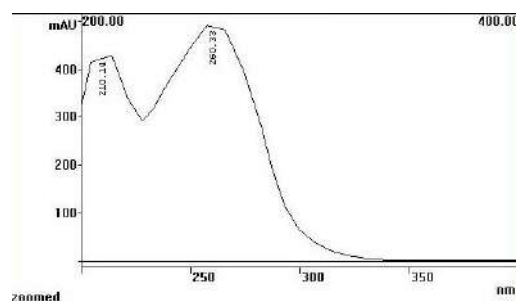
รูปที่ 42 Chromatogram วิตามิน A ที่ 317 nm



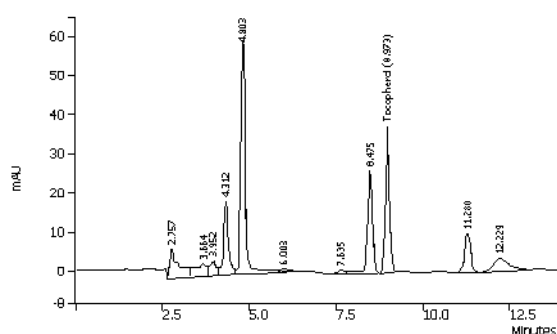
รูปที่ 43 Spectrum วิตามิน A



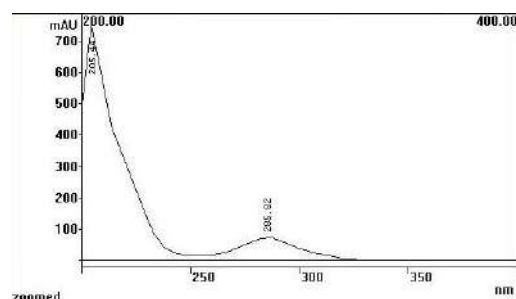
รูปที่ 44 Chromatogram วิตามิน D₃ ที่ 260 nm



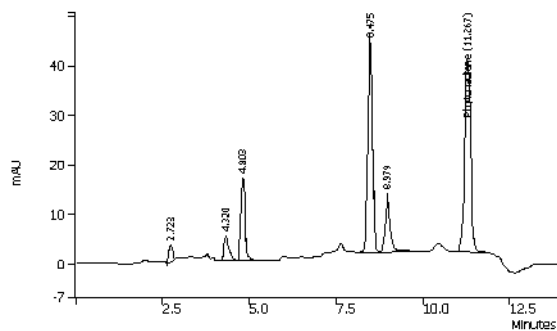
รูปที่ 45 Spectrum วิตามิน D₃



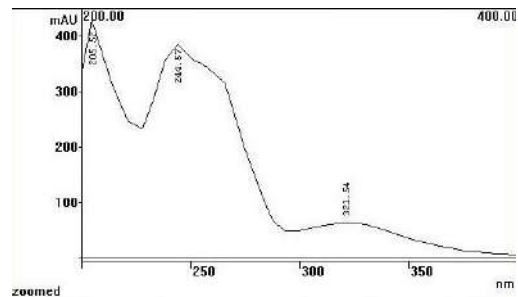
รูปที่ 46 Chromatogram วิตามิน E ที่ 286 nm



รูปที่ 47 Spectrum วิตามิน E

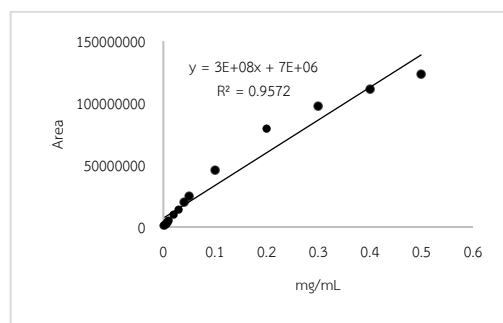


รูปที่ 48 Chromatogram วิตามิน K ที่ 245 nm

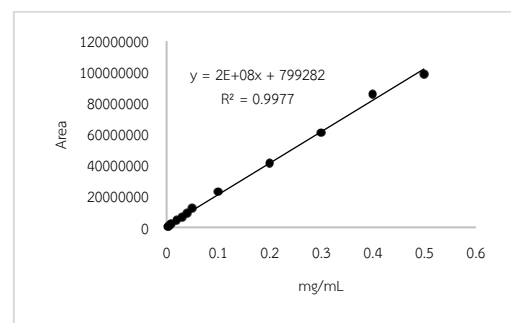


รูปที่ 49 Spectrum วิตามิน K

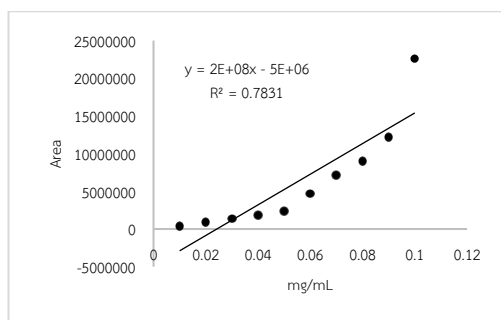
7.11 ผลการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของวิตามิน A, D₃, E และ K จากรูปที่ 50-53 พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของวิตามิน A, E และ K ไม่เป็นเส้นตรงมีค่า $r < 0.995$ จึงได้ปรับการคำนวณโดยลด ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิตามิน A ให้เท่ากับ 0.002 – 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิตามิน E เท่ากับ 0.010 – 0.040 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวิตามิน K เท่ากับ 0.002 – 0.010 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวิตามิน D₃ ที่ความเข้มข้น 0.002-0.400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง มีค่า $r > 0.995$ ตามรูปที่ 84, 86, 88 และ 90



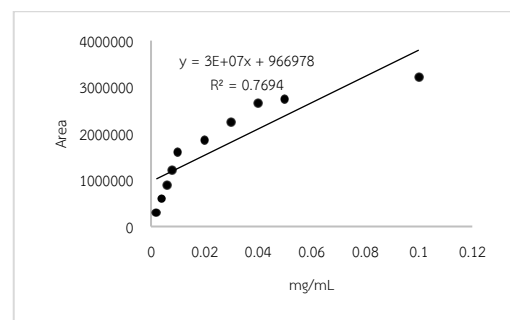
รูปที่ 50 ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิตามิน A



รูปที่ 51 ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิตามิน D₃



รูปที่ 52 ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิตามิน E

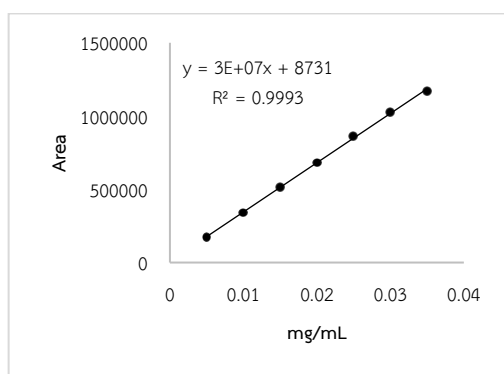


รูปที่ 53 ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิตามิน K

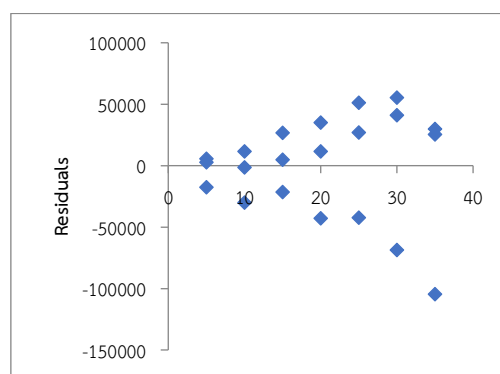
7.12 ผลการทดสอบ standard calibration curve วิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ตามตารางที่ 28 และ 29 และรูปที่ 54 – 65

ตารางที่ 28 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂

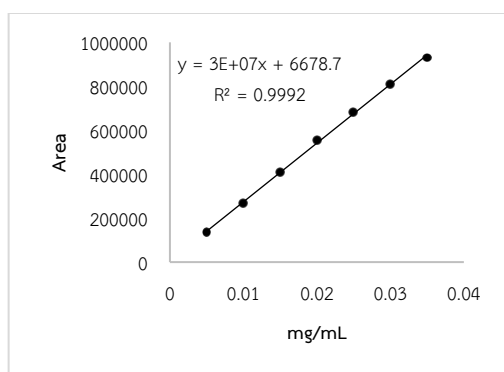
Compounds	Slope	Intercept	r^2	r
B ₁	33630.36	8731.00	0.9993	0.9996
B ₂	26740.70	6678.72	0.9992	0.9996
B ₃	23886.39	30895.59	0.9994	0.9997
B ₆	43998.29	-2597.05	0.9999	0.9999
B ₉	61906.12	46035.10	0.9995	0.9997
B ₁₂	20780.51	7282.03	0.9996	0.9998



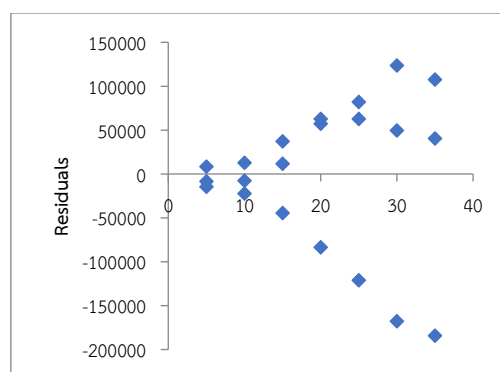
รูปที่ 54 Calibration curve ของวิตามิน B₁



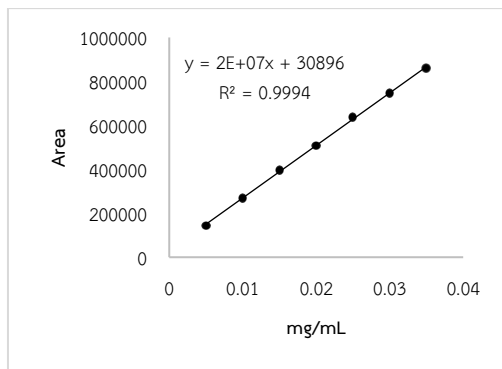
รูปที่ 55 Residual plot ของวิตามิน B₁



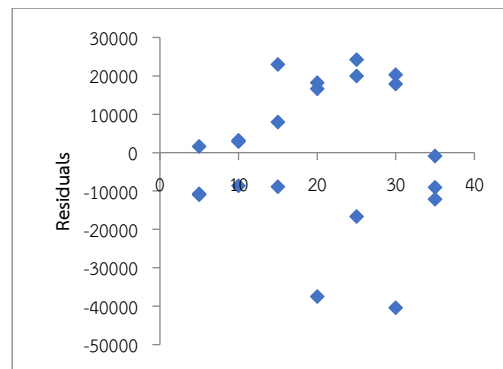
รูปที่ 56 Calibration curve ของวิตามิน B₂



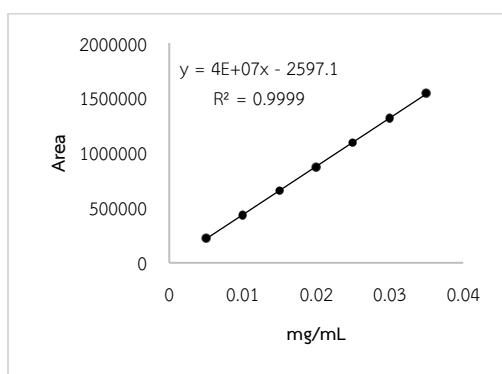
รูปที่ 57 Residual plot ของวิตามิน B₂



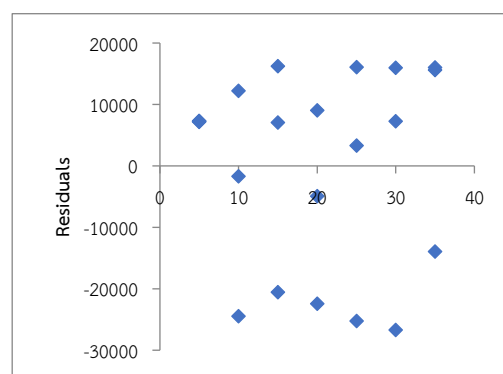
รูปที่ 58 Calibration curve ของวิตามิน B₃



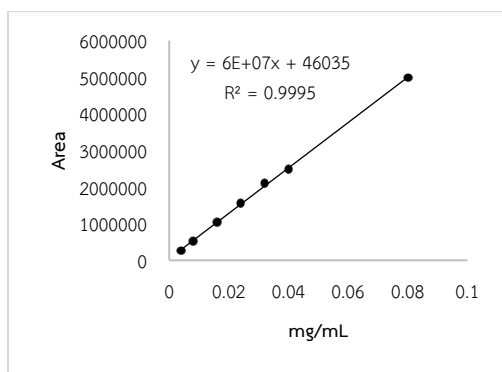
รูปที่ 59 Residual plot ของวิตามิน B₃



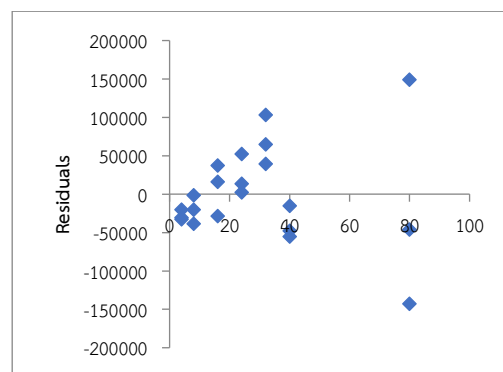
รูปที่ 60 Calibration curve ของวิตามิน B₆



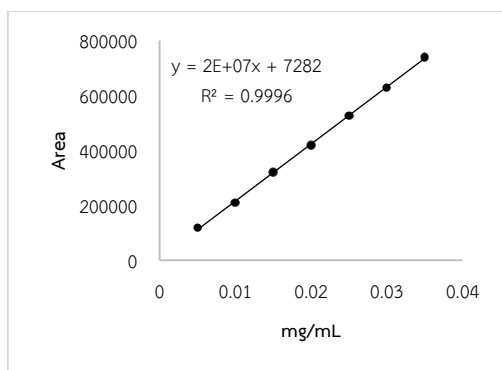
รูปที่ 61 Residual plot ของวิตามิน B₆



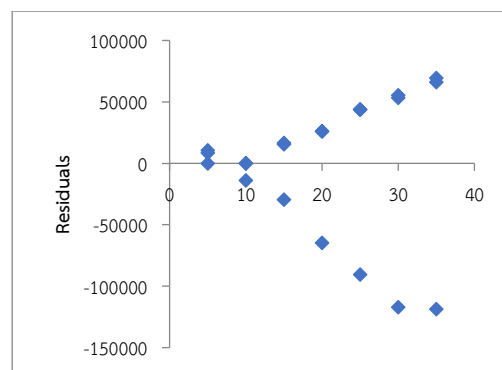
รูปที่ 62 Calibration curve ของวิตามิน B₉



รูปที่ 63 Residual plot ของวิตามิน B₉



รูปที่ 64 Calibration curve ของวิตามิน B₁₂



รูปที่ 65 Residual plot ของวิตามิน B₁₂

จากการทดสอบวิตามินกลุ่มละลายน้ำพบว่าได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับและพบว่าการกระจายตัวของ residual plot ที่เหมาะสม

7.13 ผลการทดสอบ accuracy และ precision ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ตามตารางที่ 29

ตารางที่ 29 ผลการทดสอบ intermediate precision and recovery ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂

Compounds	Concentration (mg/mL)	Intermediate precision		Mean recovery (%)
		Mean conc. (mg/mL)	%RSD (n=21)	
B ₁	0.015	0.0148	1.80	99.15
	0.020	0.0180	1.24	98.56
	0.025	0.0243	1.34	97.52
B ₂	0.015	0.0146	1.95	97.63
	0.020	0.0195	2.31	97.75
	0.025	0.0241	1.55	96.59
B ₃	0.015	0.0148	2.02	98.70
	0.020	0.0195	1.25	97.65
	0.025	0.0242	1.42	97.15
B ₆	0.015	0.0146	1.60	97.95
	0.020	0.0196	1.85	98.29
	0.025	0.0245	1.53	98.11
B ₉	0.016	0.0157	1.72	98.10
	0.024	0.0236	1.34	98.53
	0.032	0.0314	1.77	98.22
B ₁₂	0.015	0.0146	1.89	97.62
	0.020	0.0195	1.71	97.76
	0.025	0.0246	1.67	98.73

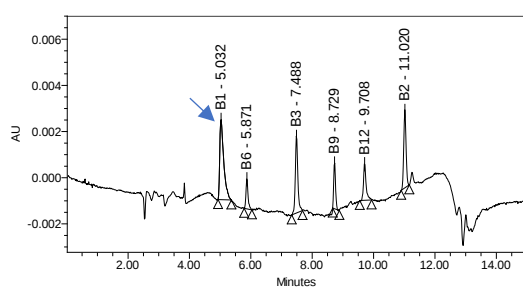
ตารางที่ 30 ผลการทดสอบ precision แต่ละความเข้มข้นทดสอบ 3 วัน ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂

Compounds	%RSD (n=7)								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	Level 1	Level 2	Level 3	Level 1	Level 2	Level 3	Level 1	Level 2	Level 3
B ₁	1.68	1.17	0.63	1.72	0.88	1.75	1.57	1.73	1.38
B ₂	2.44	1.94	1.47	1.97	2.50	1.61	1.23	1.55	1.48
B ₃	1.32	1.76	1.29	2.31	0.82	1.21	2.17	0.96	1.47
B ₆	1.67	1.91	1.04	1.55	1.16	1.76	1.60	1.82	1.53
B ₉	1.03	1.31	2.47	2.06	1.46	1.01	1.13	0.74	1.52
B ₁₂	1.38	1.07	1.88	1.04	1.04	1.94	1.99	1.47	1.36

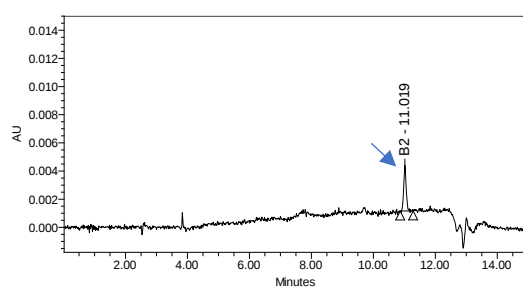
7.14 ผลการทดสอบ LOQ วิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉, B₁₂ A, D₃, E และ K

ตารางที่ 31 LOQ วิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉, B₁₂

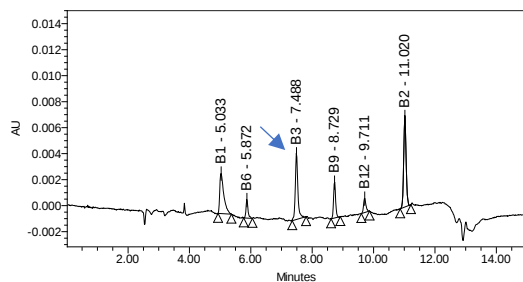
Compounds	LOQ (mg/mL)
B ₁	0.001
B ₂	0.0005
B ₃	0.001
B ₆	0.001
B ₉	0.0004
B ₁₂	0.0005



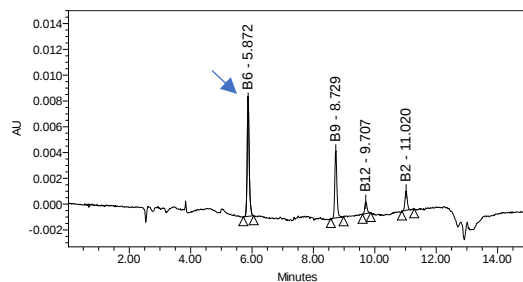
รูปที่ 66 Chromatogram LOQ วิตามิน B₁ 245 nm



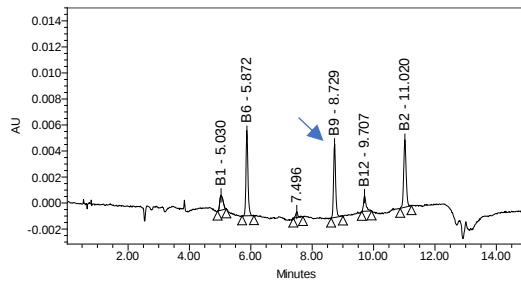
รูปที่ 67 Chromatogram LOQ วิตามิน B₂ 450 nm



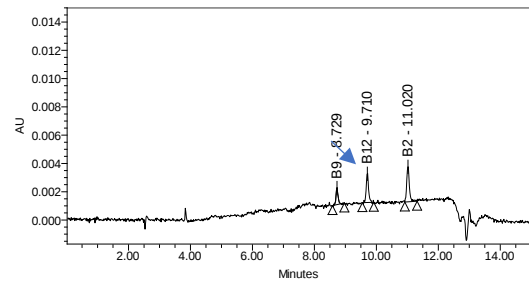
รูปที่ 68 Chromatogram LOQ วิตามิน B₃ 260 nm



รูปที่ 69 Chromatogram LOQ วิตามิน B₆ 290 nm

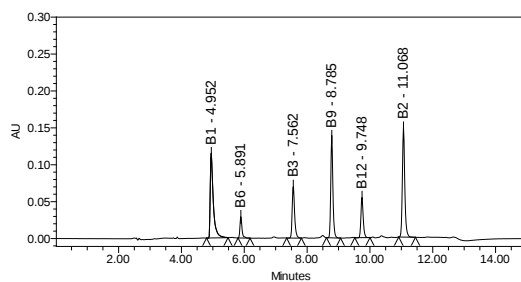


รูปที่ 70 Chromatogram LOQ วิตามิน B₉ 280 nm

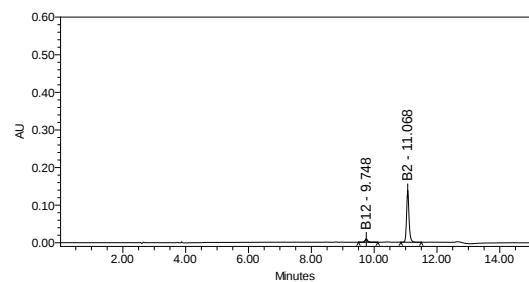


รูปที่ 71 Chromatogram LOQ วิตามิน B₁₂ 360 nm

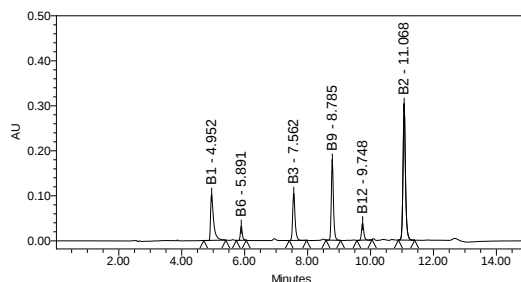
7.15 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (selectivity) เมื่อเพิ่มสารละลายมาตรฐานวิตามิน A, D₃, E และ K ลงใน condition ที่ใช้ทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ พบว่าสารละลายมาตรฐาน A, D₃, E และ K ไม่ส่งผลกระทบต่อ การทดสอบ วิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ตามรูปที่ 72 - 77



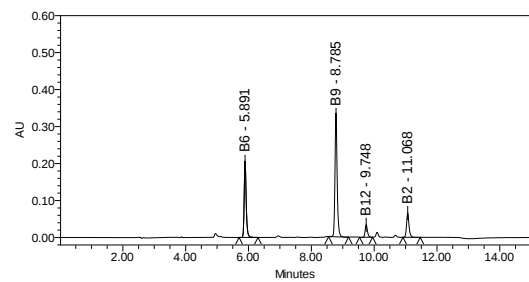
รูปที่ 72 Chromatogram วิตามิน B₁ 245 nm



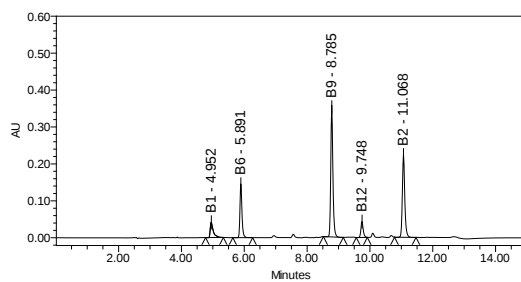
รูปที่ 73 Chromatogram วิตามิน B₂ 450 nm



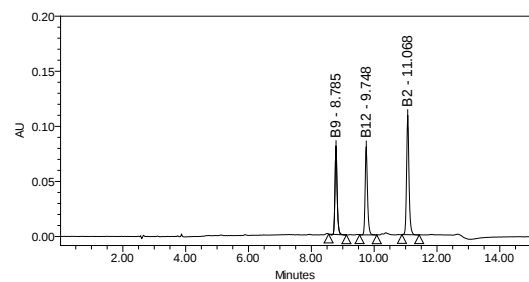
รูปที่ 74 Chromatogram วิตามิน B₃ 260 nm



รูปที่ 75 Chromatogram วิตามิน B₆ 290 nm

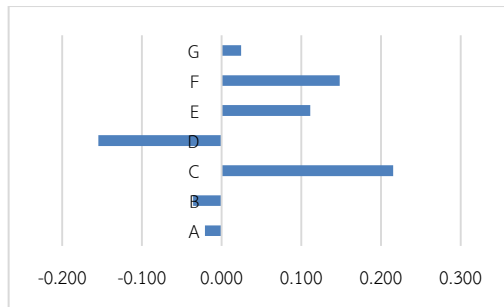


รูปที่ 76 Chromatogram วิตามิน B₉ 280 nm

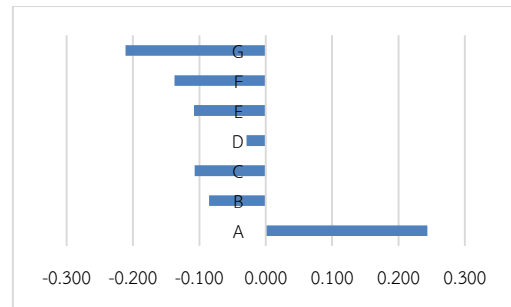


รูปที่ 77 Chromatogram วิตามิน B₁₂ 360 nm

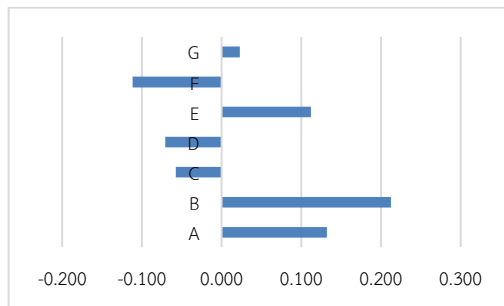
7.16 ผลการทดสอบ robustness วิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉, และ B₁₂ ได้ผลตามรูปที่ 78 - 83 และตารางที่ 32



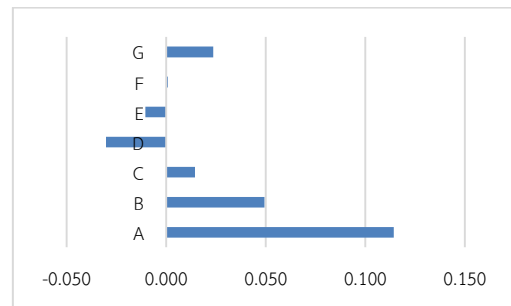
รูปที่ 78 Effect ของวิตามิน B₁



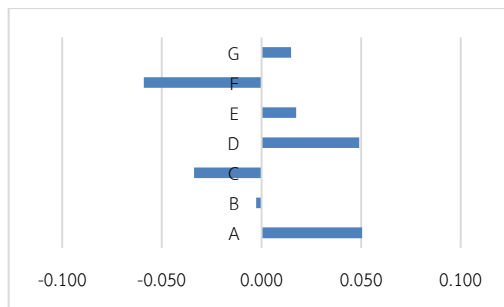
รูปที่ 79 Effect ของวิตามิน B₂



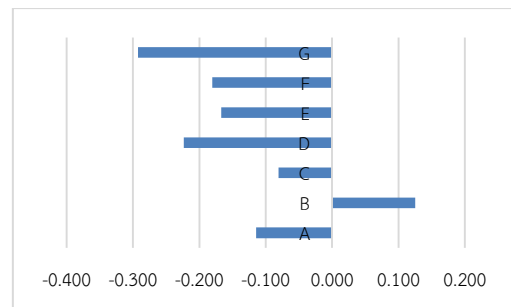
รูปที่ 80 Effect ของวิตามิน B₃



รูปที่ 81 Effect ของวิตามิน B₆



รูปที่ 82 Effect ของวิตามิน B₉



รูปที่ 83 Effect ของวิตามิน B₁₂

ตารางที่ 32 Effect ที่เกิดจากการทดสอบ robustness วิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂

Compounds	Effect						
	A	B	C	D	E	F	G
B ₁	-0.021	-0.036	0.215	-0.155	0.111	0.148	0.024
B ₂	0.244	-0.085	-0.107	-0.029	-0.108	-0.137	-0.211
B ₃	0.132	0.213	-0.057	-0.071	0.112	-0.112	0.023
B ₆	0.114	0.049	0.014	-0.030	-0.010	0.001	0.024
B ₉	0.050	-0.003	-0.034	0.049	0.017	-0.059	0.015
B ₁₂	-0.114	0.125	-0.081	-0.223	-0.167	-0.181	-0.292

A = สีของ vial

B = Column temperature

C = Sample temperature

D = ยี่ห้อของ methanol

E = Flow rate

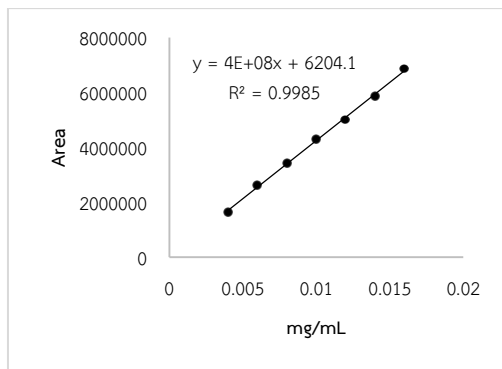
F = สีของ volumetric flask

G = Equilibrate time

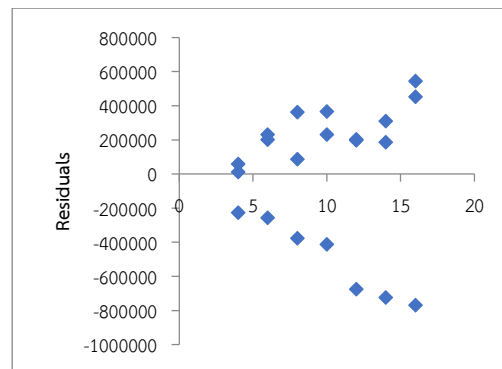
7.17 ผลการทดสอบ standard calibration curve วิตามิน A, D₃, E และ K ตามตารางที่ 33 และรูปที่ 84 - 91

ตารางที่ 33 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิตามิน A, D₃, E และ K

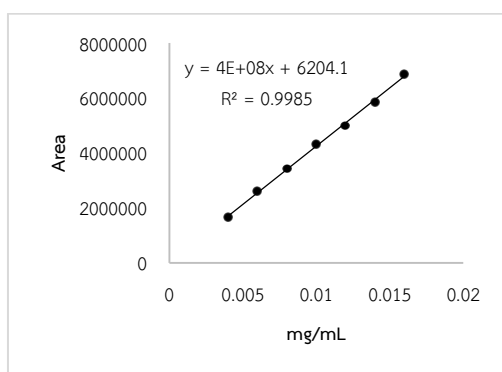
Compounds	Slope	Intercept	r^2	r
A	423782.82	6204.07	0.9985	0.9992
D ₃	232233.41	-40955.55	0.9995	0.9998
E	34268.69	-34893.57	0.9991	0.9995
K	243418.70	-20979.92	0.9988	0.9994



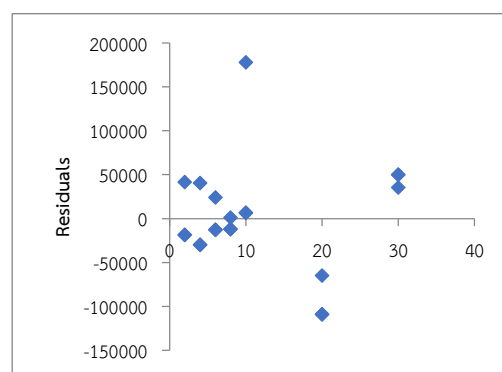
รูปที่ 84 Calibration curve ของวิตามิน A



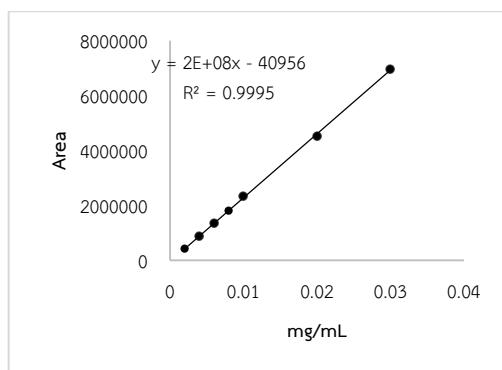
รูปที่ 85 Residual plot ของวิตามิน A



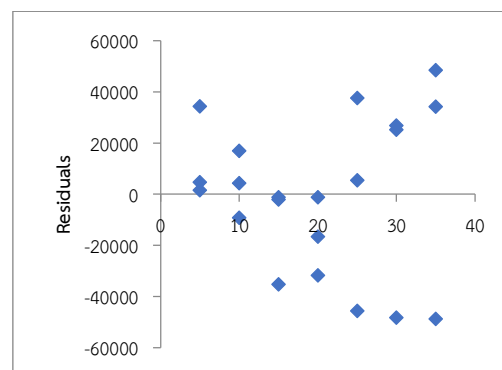
รูปที่ 86 Calibration curve ของวิตามิน D₃



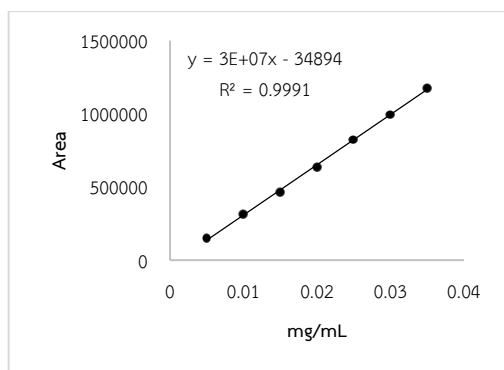
รูปที่ 87 Residual plot ของวิตามิน D₃



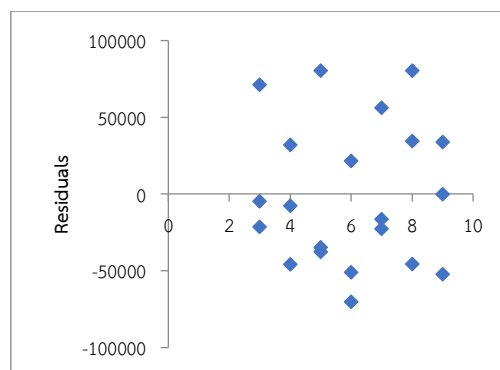
รูปที่ 88 Calibration curve ของวิตามิน E



รูปที่ 89 Residual plot ของวิตามิน E



รูปที่ 90 Calibration curve ของวิตามิน K



รูปที่ 91 Residual plot ของวิตามิน K

7.18 ผลการทดสอบ accuracy และ precision ของวิตามิน A, D₃, E และ K ตามตารางที่ 34 และ 35

ตารางที่ 34 ผลการทดสอบ intermediate precision and recovery ของวิตามิน A, D₃, E และ K

Compounds	Concentration (mg/mL)	Intermediate precision		Mean recovery (%)
		Mean conc. (mg/mL)	%RSD (n=21)	
A	0.008	0.0078	2.06	98.39
	0.010	0.0098	1.92	98.06
	0.012	0.0117	2.00	97.69
D ₃	0.006	0.0059	1.82	98.55
	0.008	0.0078	1.37	97.47
	0.010	0.0099	2.07	99.44
E	0.015	0.0148	1.70	99.00
	0.020	0.0197	2.04	98.62
	0.025	0.0248	1.66	99.46
K	0.005	0.0049	1.68	97.90
	0.006	0.0058	1.56	98.00
	0.007	0.0069	1.25	98.51

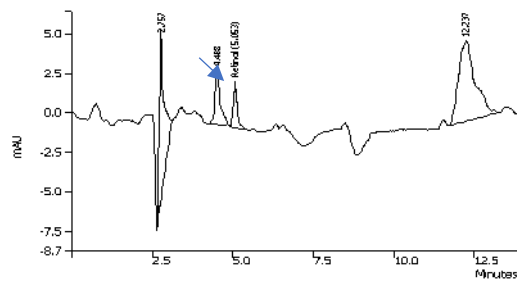
ตารางที่ 35 ผลการทดสอบ precision แต่ละความเข้มข้นทดสอบ 3 วัน ของวิตามิน A, D₃, E และ K

Compounds	%RSD (n=7)								
	Day 1			Day 2			Day 3		
	Level 1	Level 2	Level 3	Level 1	Level 2	Level 3	Level 1	Level 2	Level 3
A	1.90	1.88	1.18	1.98	1.77	2.04	2.16	2.19	2.21
D ₃	1.74	1.25	1.66	1.81	1.72	1.73	1.58	1.24	2.28
E	1.70	1.44	1.88	1.75	1.06	1.14	1.40	1.40	1.86
K	1.07	1.23	1.57	1.71	1.21	1.19	2.09	1.47	1.03

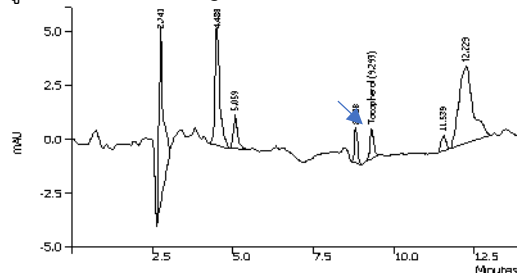
7.19 ผลการทดสอบ LOQ วิตามิน A, D₃, E และ K ตามตารางที่ 36 และรูปที่ 92 - 95

ตารางที่ 36 LOQ วิตามิน A, D₃, E และ K

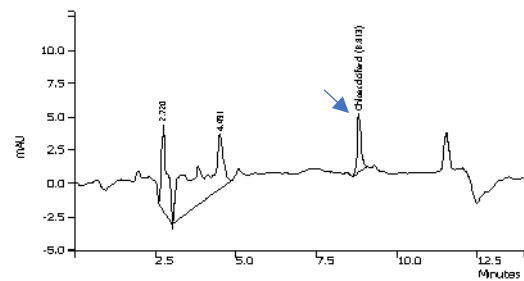
Compounds	LOQ (mg/mL)
A	0.001
D ₃	0.001
E	0.001
K	0.001



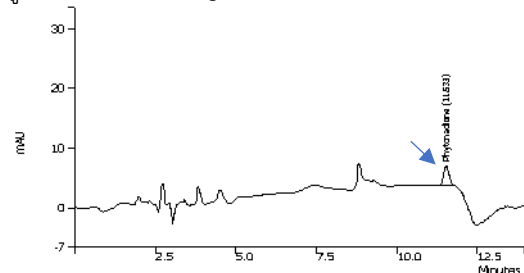
รูปที่ 92 Chromatogram LOQ วิตามิน A 317 nm



รูปที่ 94 Chromatogram LOQ วิตามิน E 286 nm

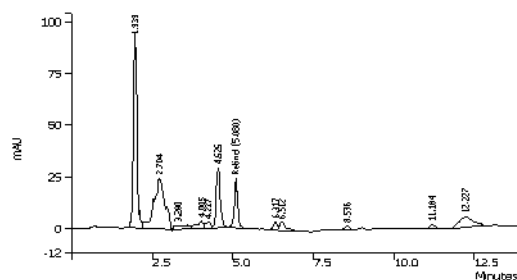


รูปที่ 93 Chromatogram LOQ วิตามิน D₃ 260 nm

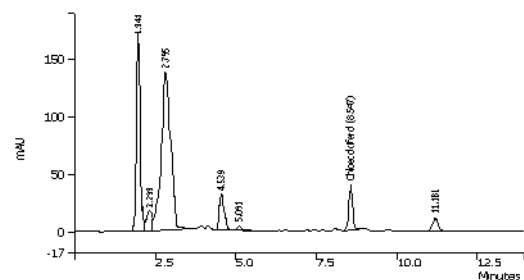


รูปที่ 95 Chromatogram LOQ วิตามิน K 245 nm

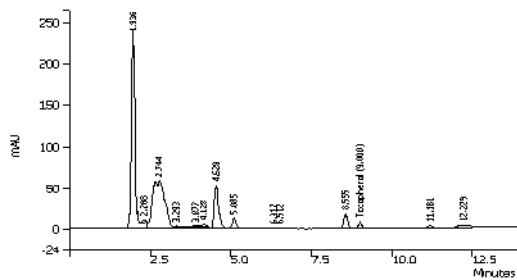
7.20 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (selectivity) เมื่อเพิ่มสารละลายมาตรฐานวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ใน condition ที่ใช้ทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K พบว่า สารละลายมาตรฐาน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ไม่ส่งผลกระทบต่อ การทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K ตามรูปที่ 96 - 99



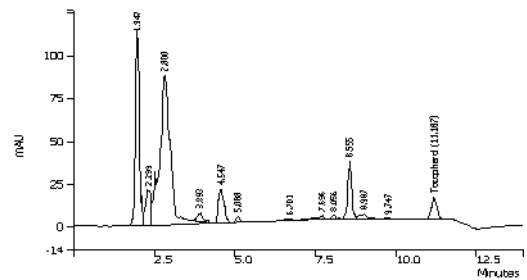
รูปที่ 96 Chromatogram วิตามิน A 317 nm



รูปที่ 97 Chromatogram วิตามิน D₃ 260 nm

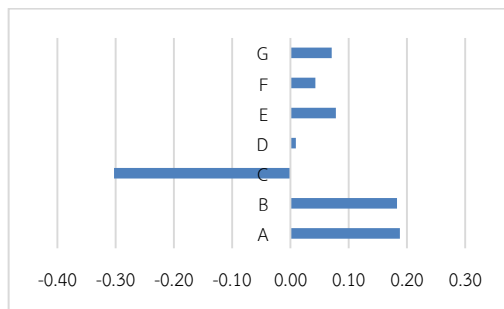


รูปที่ 98 Chromatogram วิตามิน E 286 nm

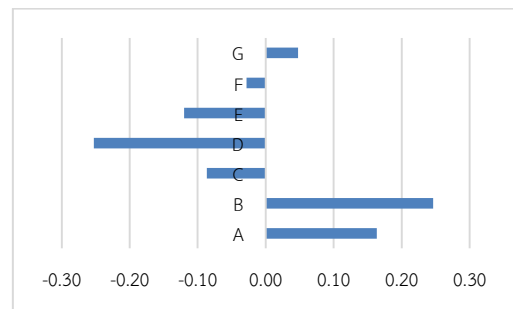


รูปที่ 99 Chromatogram วิตามิน K 245 nm

7.21 ผลการทดสอบ robustness วิตามิน A, D₃, E และ K ได้ผลตามรูปที่ 100 - 103 และตารางที่ 37



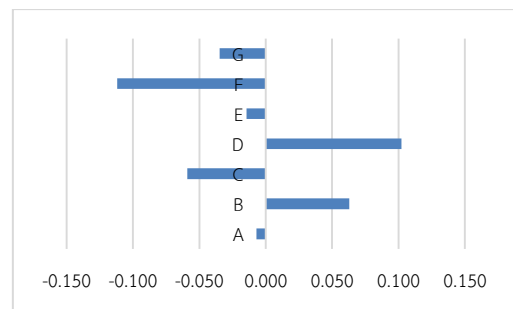
รูปที่ 100 Effect ของวิตามิน A



รูปที่ 101 Effect ของวิตามิน D₃



รูปที่ 102 Effect ของวิตามิน E



รูปที่ 103 Effect ของวิตามิน K

ตารางที่ 37 Effect ที่เกิดจากการทดสอบ robustness วิตามิน A, D₃, E และ K

Compounds	Effect						
	A	B	C	D	E	F	G
A	0.19	0.18	-0.30	0.01	0.08	0.04	0.07
D ₃	0.16	0.25	-0.09	-0.25	-0.12	-0.03	0.05
E	-0.110	0.040	-0.298	0.102	-0.017	0.179	0.350
K	-0.007	0.063	-0.059	0.102	-0.015	-0.112	-0.035

A = สีของ vial

B = Flow rate

C = Injection volume

D = ยี่ห้อของ methanol

E = ปริมาณการล้าง needle

F = สีของ volumetric flask ที่ใช้

G = Equilibrate time

8 สรุปผลการทดลอง

การทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆ และ B₁₂ มีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.005 - 0.035 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิตามิน B₉ มีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.004 - 0.080 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิตามิน A มีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.008 - 0.032 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิตามิน D₃ มีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.002 - 0.030 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิตามิน E มีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.005 - 0.035 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวิตามิน K มีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.003 - 0.009 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (*r*) มีค่ามากกว่า 0.999 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (เกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$) จากการทดสอบความแม่นยำของวิธี โดยคำนวณ % recovery วิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ มีค่าอยู่ในช่วง 97.15 - 99.15 % และวิตามิน A, D₃, E และ K มีค่าอยู่ในช่วง 97.47 - 99.46 % และความเที่ยงประเมินจากการทำซ้ำระหว่างวัน (intermediate precision) เท่ากับ 1.24 - 2.31 % และ 1.25 - 2.07 ตามลำดับ การทดสอบ LOQ ของวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ มีค่าเท่ากับ 0.001, 0.0005, 0.001, 0.001, 0.0004 และ 0.0005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และวิตามิน A, D₃, E และ K มีค่า LOQ เท่ากับ 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบ selectivity โดยเติมวิตามิน A, D₃, E และ K ใน condition ที่ทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ และเติมวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ ใน condition ที่ทดสอบวิตามิน A, D₃, E และ K พบว่าไม่ส่งกระทบต่อการทดสอบ และการทดสอบ robustness ของการทดสอบวิตามิน B₁, B₂, B₃, B₆, B₉ และ B₁₂ และ วิตามิน A, D₃, E และ K พบว่า parameters ที่มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยไม่ส่งผลกระทบต่อการทดสอบ ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความใช้ได้ของวิธีที่เหมาะสม สามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินในยาบรรจสุเสร็จสำหรับสัตว์ชนิดยาฉีดได้

9 ข้อเสนอแนะ

-

10 กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2562 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ฯ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

11 เอกสารอ้างอิง

AOAC. 2016. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Available source: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf, June 4, 2018.

Paveen, S., A. Yasmin and KM. Khan (2009). Quantitative simultaneous estimation of water-soluble vitamins, riboflavin, pyridoxine, cyanocobalamin and folic acid in nutraceutical products by HPLC. The Open Analytical Chemistry Journal 3 (1): 1 - 5.

Sami, R., Y. Li, B. Qi, S. Wang, Q. Zhang, F. Han, Y. Ma, J. Jing and L. Jiang (2014). HPLC analysis of water - soluble vitamins (B2, B3, B6, B12 and C) and fat-soluble vitamins (E, K, D, A and α - carotene) of okra (*abelmoschus esculentus*). Research article. Journal of Chemistry. <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2014/831357/>, accessed March 11, 2019.

Aslam, J., SH. Khan and SA. Khan (2012). Variation in Fat Soluble Vitamins (A, D, E, K) in in Vitro and Ex Vitro Germinated Chickpea (*Cicer Arietinum L.*) Seedlings, as Revealed by High Performance Liquid Chromatography. Journal of Saudi Chemical Society 16(2): 125 - 29.

Gliszczynska, A. and I. Rybicka (2015). Simultaneous Determination of Caffeine and Water -Soluble Vitamins in Energy Drinks by HPLC with Photodiode Array and Fluorescence Detection. Food Analytical Methods 8(1): 139 - 146.

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2559 เรื่อง กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้า หรือขายอาหารสัตว์ เล่มที่ 133 ตอนพิเศษ 306 ง (ลงวันที่ 26 ธันวาคม 2559)