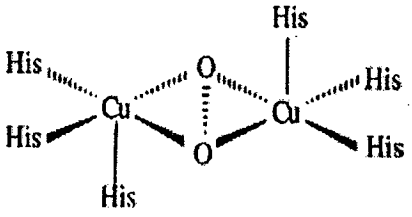
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

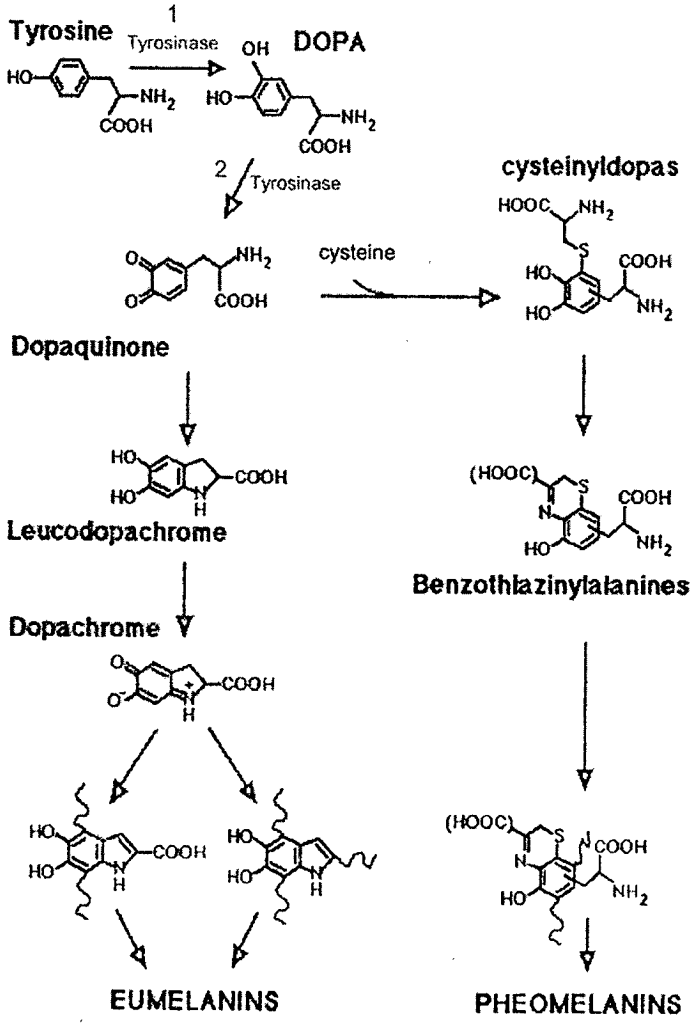
2.1 เอนไซม์ไทโรซิเนส

สารต่อต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสคือสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในร่างกาย ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจะเกี่ยวข้องกับการเกิดสีผิวเข้มขึ้นเมื่อเจอแสงแดด เอนไซม์ไทโรซิเนส (monophenol , o-diphenol : oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1) เป็นโปรตีนชนิดที่มีโลหะทองแดงเกิดสารประกอบเชิงซ้อนร่วมกับกรดอะมิโนฮิสติดีน (Histidine) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเอนไซม์ไทโรซิเนส
(Pheakun Kry. 2007 : 6)

ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน (รูปที่ 2.2) เอนไซม์ไทโรซิเนสถูกสังเคราะห์ขึ้นภายใน rER (rough endoplasmic reticulum) จากนั้นถูกส่งไปยัง golgi complex เพื่อบรรจุภายใน vesicle แล้วจึงถูกส่งต่อไปยังเมลาโนไซต์เรียกว่าเมลาโนโซม (melanosome) การทำงานของเซลล์เมลาโนไซต์ต้องทำงานร่วมกับเซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) โดยเมลาโนโซมจะถูกส่งมายังเคราติโนไซต์ที่อยู่ในชั้นเดียวกันผ่านทางกระบวนการ dendritic เมื่อเมลาโนโซมถูกไฮโดรไลท์สีผิวจะเข้มขึ้น ซึ่งกลไกในการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจะเป็นไปตามรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงกลไกการยับยั้งการเกิดเม็ดสี
(ที่มา : สุภัทรา บุญเสริม, 2547 หน้า 11)

ฤทธิ์ต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีของผิวหนัง

อาร์บูตินออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีโดยขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibitor) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญ (keyenzyme) ในกระบวนการสร้างเม็ดสีของผิวหนัง (skin pigmentation) โดยการยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีนั้นจะประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอน ที่ต้องใช้เอนไซม์ไทโรซิเนส คือ

1. การเปลี่ยนไทโรซิเนส (tyrosine) เป็น3,4 ไดไฮโดรซี ฟีนิลอะลานีน (3,4 Dihydroxy phenylalanine ; Dopa)

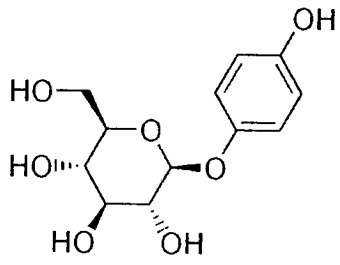
2. การเปลี่ยน 3,4 ไดไฮโดรซี ฟีนิลอะลานีน (3,4 Dihydroxy phenylalanine ; Dopa)ไปเป็น 3,4 ไดไฮโดรซี ฟีนิลอะลานีน-ควิโนน (Dopa-quinone)

2.2 สารออกฤทธิ์ต่อต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีอยู่หลายชนิด ซึ่งเป็นกลุ่มที่ผสมอยู่ในเครื่องสำอางเพื่อผิวขาว โดยจะทำหน้าที่ของการไม่ให้เกิดความหมองคล้ำภายในผิวเนื่องจากกเอนไซม์ไทโรซิเนสมีหลากหลายชนิด เช่น อาร์บูติน (Arbutin) วิตามินซี (Vitamin C) กลาบริดิน (Glabridin) กรดโคจิก (Kojic acid) และอื่นๆ

2.2.1 อาร์บูติน (Arbutin) (คณิต ลูกรักษ์: 2540 หน้า 10-16)

อาร์บูตินเป็นอนุพันธ์ของไฮโดรควิโนนชนิดหนึ่ง มีชื่อเรียกทางเคมีว่า 4-ไฮดรอกซีฟีนิล-บีตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (4-hydroxyphenyl-beta-D-glucopyranoside) เป็นสารจำพวกไกลโคไซด์ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) ยึดติดกับโมเลกุลของไฮโดรควิโนน มีสูตรเคมี $C_{12}H_{16}O_7$ มีสูตรโครงสร้างดังในรูปที่ 2.3 ลักษณะของอาร์บูตินเป็นผลึกสีขาวมีขนาดเล็กละเอียด ไม่มีกลิ่น มีรสขม ดูดความชื้นได้ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 272.25 g/mol จุดหลอมเหลวเท่ากับ 190-212 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) 6.0-7.0 (ที่ความเข้มข้นของสารละลายอาร์บูตินร้อยละ 1) สามารถละลายได้ดีในน้ำร้อนและแอลกอฮอล์



Hydroquinone-β-D-glucopyranoside

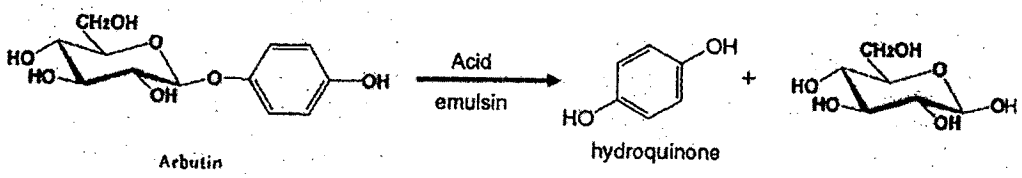
รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างอาร์บูติน

อาร์บูตินสามารถสกัดได้จากพืชและสามารถสังเคราะห์ได้จากกระบวนการทางเคมี คือ

1. สังเคราะห์จากอะซิโตบลอมกลูโคส (acetobromglucose) และไฮโดรควิโนน (hydroquinone)

2. สังเคราะห์จากบีตา-ดี-กลูโคสเพนตะอะซิเตต (β-D-glucosepenta acetate) กับไฮโดรควิโนนโมโนเบนซิลอีเทอร์ (hydroquinone monobenzyl ether) ในฟอสฟอรัสออกซีคลอไรด์ (Phosphorousoxychloride ; $POCl_3$)

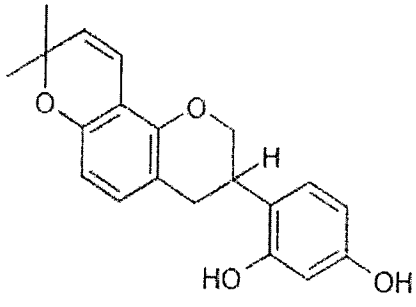
เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างและปฏิกิริยาทางเคมีแล้วก็จะทำให้เห็นว่า อาร์บูติน คือ สารประกอบประเภทไกลโคไซด์ที่ประกอบไปด้วยโมเลกุลของไฮโดรควิโนนยึดติดกับโมเลกุลของกลูโคส อาร์บูตินสามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายด้วยกรดเจือจางหรือเอนไซม์อิมัลชัน เนื่องจากกลูโคสที่เป็นส่วนของน้ำตาลในไกลโคไซด์ของอาร์บูตินนั้นมีการจัดเรียงตัวแบบบีตา-สเตอริโอไอโซเมอร์ (β- Stereoisomers) จึงทำให้อาร์บูตินสามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ด้วยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่อิมัลชันเท่านั้น ส่วนเอนไซม์มอลเทส (enzyme maltase) จะสามารถไฮโดรไลซ์ได้แต่เฉพาะแอลฟา-ไกลโคไซด์ (α-glycoside)



รูปที่ 2.4 แสดงกระบวนการไฮโดรไลซีสของสารอาร์บูติน
(ที่มา : สุภัทรา บุญเสริม,2547)

2.2.2 กลาบริดิน (Glabridin)

กลาบริดิน (Glabridin) เป็นสารประกอบชนิดไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) จากสารสกัดไลโคไรซ์ (licorice) ซึ่งเป็นที่รู้จักกันในการใช้ประโยชน์ต่อผิวเนื่องจากการป้องกันการอักเสบและมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งกระบวนการเมลาโนจินีซีสมีสูตรทางเคมีคือ $C_{20}H_{20}O_4$ เป็นผงผลึกน้ำตาลหรือสีส้ม ไวต่อความร้อน จุดหลอมเหลวเท่ากับ 154-155 องศาเซลเซียส น้ำหนักมวลโมเลกุลเท่ากับ 324.75 g/mol กลาบริดินละลายในน้ำได้น้อยมากและละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์

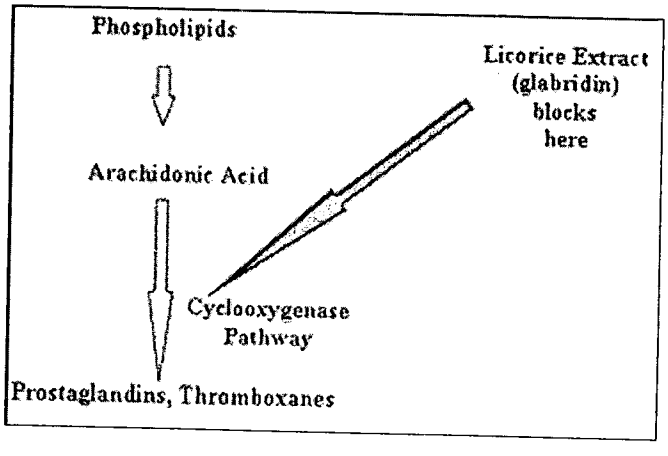


รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของกลาบริดิน

กลาบริดินอาจยับยั้งกระบวนการ เมลาโนจินีซีสโดยหนึ่งในสองกลไก

1. ยับยั้งการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ใช้ออกซิเจน (0_2)
2. ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในร่างกายซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นทำหน้าที่ควบคุม

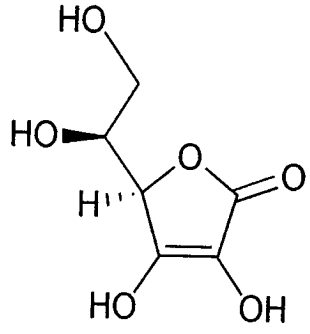
การเกิดเมลานินที่เป็นกลุ่มของเม็ดสีน้ำตาลดำในผิวหนังและตาของมนุษย์ การตรวจสอบผลการยับยั้งของกลาบริดินในกระบวนการของไซโคลออกซิจิเนส (Cyclooxygenase)โดยไซโคลออกซิจิเนสเป็นเอนไซม์ที่เมตาบอไลซ์กรดอะราชิโดนิก (metabolizes arachidonic acid) เข้าสู่พรอสตาแกลนดิน (prostaglandins) ซึ่งเป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาการอักเสบของผิวเป็นที่สังเกตว่าการเติมกลาบริดิน 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งและควบคุมกระบวนการของไซโคลออกซิจิเนส การควบคุมในการทดลองให้ผลเชิงบวกดังนี้ คือ พบว่าอินโดเมทาซินเป็นตัวยับยั้งไซโคลออกซิจิเนส กลาบริดินจึงป้องกันการอักเสบของผิว รวมทั้งกรดอะราชิโดอิก (arachidonic acid) ที่ยับยั้งขั้นตอนของ ไซโคลออกซิจิเนส ดังแผนภาพในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แสดงการยับยั้งการสังเคราะห์ไซโคลออกซีจีเนสของสารสกัดลิโคไลซ์
(ที่มา : http://glabridin.com/index.htm : 27 ก.พ.2552)

2.2.3 วิตามินซี (Vitamin C) หรือ กรดแอสคอร์บิค (L-ascorbic acid)

วิตามินซีมีชื่อเรียกทางเคมีว่ากรดแอสคอร์บิค มีสูตรเคมีอย่างง่ายคือ $C_6H_8O_6$ และมีชื่อเรียกสากล คือ 2-oxo-L-threo-hexono-1,4-lactone-2,3-enediol หรือ (*R*)-3,4-dihydroxy-5-((*S*)- 1,2-dihydroxyethyl) furan-2(5*H*)-one และมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.7 วิตามินซี มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวมีน้ำหนักโมเลกุล 176.14 กรัมต่อโมล และจุดหลอมเหลว 190-192 องศาเซลเซียส วิตามินซีละลายได้ในน้ำ และแอลกอฮอล์ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายไขมัน มีสมบัติเป็นได้ทั้งกรด และสารรีดิวซ์อย่างแรง



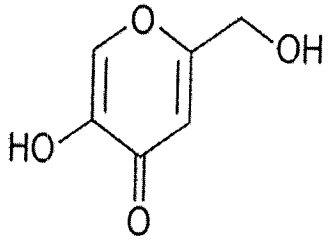
รูปที่ 2.7 แสดงโครงสร้างของวิตามินซี

วิตามินซีใช้กันอย่างแพร่หลายในเครื่องสำอางที่ทำให้ผิวขาว กลไกการออกฤทธิ์ เป็น Reducing agents ของ Melanin intermediates และกั้น Oxidative chain reaction จาก Tyrosine dihydroxyphenylalanine (DOPA) ไปสู่ Melanin ที่หลายตำแหน่ง วิตามินซีเป็น Antioxidant ที่ดี แต่จะถูก Oxidized ได้ง่ายเมื่อถูกแสง ทำให้ความสามารถในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินลดลงไปด้วย จึงมีการพัฒนาอนุพันธ์ของวิตามินซีให้มีฤทธิ์เทียบเท่ากับมันคือ มีความสามารถทำให้ผิวขาวขึ้น และแพร่ผ่านผิวหนังได้ แต่มีความคงตัว วิตามินซีมีสูตรโครงสร้างดังต่อไปนี้

ปริมาณวิตามินซีที่ใช้ในเครื่องสำอาง **มี**ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มีทั้งที่เป็นครีมโลชั่นและสารละลาย ผสมในเครื่องสำอางเพื่อทำให้ผิวขาวขึ้น ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินและอนุมูลอิสระและช่วยเสริมการสร้างคอลลาเจนทำให้ริ้วรอยย่นลดลง

2.2.4 กรดโคจิก (Kojic acid)

กรดโคจิกมีสูตรเคมีอย่างง่าย คือ $C_6H_6O_4$ และชื่อทางเคมีคือ 5-hydroxy-2-(hydroxymethyl) -4-pyrone) กรดโคจิกบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มมีน้ำหนักโมเลกุล 154.2 กรัมต่อโมลและจุดหลอมเหลว 152-160 องศาเซลเซียสกรดโคจิกละลายได้ในน้ำ และแอลกอฮอล์ (3.95 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรที่ 20 องศาเซลเซียส) และมีคุณสมบัติเป็นกรดมีค่า pH 6.0-7.0



รูปที่ 2.8 แสดงโครงสร้างของกรดโคจิก

เป็นกรดอินทรีย์ที่ได้จากจุลินทรีย์และเป็นสารประกอบไพโรน (Pyrone) ที่ขาดกลุ่มคาร์บอกซิล (Carboxygroup) กรดโคจิกถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างกว้างขวางคือใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล เพิ่มกลิ่นรส ใช้ในอุตสาหกรรม

เครื่องสำอางนำไปใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง ใช้เป็นส่วนประกอบในยาฆ่าแมลง ยาสลบ ยา และสีย้อม มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะและยับยั้งเชื้อรา ปริมาณกรดโคจิกที่ใช้ในเครื่องสำอางเพื่อออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส มีความเข้มข้นประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์

2.3 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงเป็นการแยกสารผสมออกจากกันเพื่อทำการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยมีหลักการคือสารที่ต้องการวิเคราะห์เคลื่อนที่ผ่านตัวกลางซึ่งเรียกว่าเฟสคงที่โดยมีตัวพาซึ่งเป็นของเหลว เรียกว่า เฟสเคลื่อนที่ จะทำหน้าที่พาสารเคลื่อนที่ไปบนเฟสคงที่โดยสารที่ต้องการวิเคราะห์ชนิดต่างๆจะเคลื่อนที่บนเฟสคงที่ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอันตรกิริยาระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์กับเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ การแยกสารในระบบที่มีเฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลวใช้ความดันสูงในการขับให้เฟสเคลื่อนที่ไหลไปตามคอลัมน์ วิธีโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง มีที่มาจาก ลิควิดโครมาโทกราฟีแต่ได้มีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยการลดขนาดอนุภาคที่ใช้บรรจุในคอลัมน์จาก 150-200 ไมโครเมตรหรือต่ำกว่า จึงจำเป็นที่ต้องใช้ความดันสูงเพื่อให้เฟสเคลื่อนที่ไหลได้ตามต้องการ

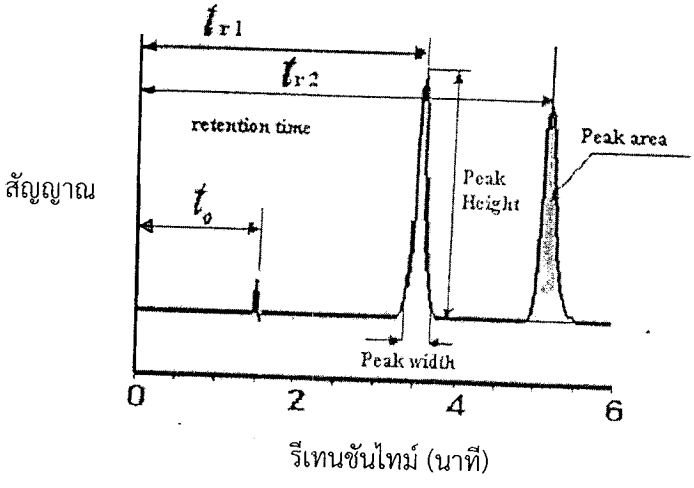
2.3.1 ทฤษฎีโครมาโทกราฟี

ลักษณะผลลัพธ์ของการแยกจากวิธีโครมาโทกราฟี เรียกว่า โครมาโทแกรม จะเป็นการพล็อตระหว่างสัญญาณไฟฟ้ากับเวลา หน่วยทางแกนy จะเป็นสัญญาณไฟฟ้าซึ่งอาจมีหน่วยเป็นมิลลิแอมป์ (mA) หรือมิลลิโวลต์ (mV) ส่วนแกน x จะเป็นเวลาซึ่งเรียกว่า รีเทนชันไทม์ (retention time ; t_r) สัญญาณที่เห็นก่อนเริ่มแรกคือ พีกของสารประกอบตัวแรกที่แยกออกมาก่อน จะมีค่ารีเทนชันไทม์ที่น้อยที่สุด จะพบค่าของรีเทนชันไทม์ที่มากขึ้นตามลำดับของสารประกอบที่แยกออกมาทีหลัง การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบแต่ละตัวมักระบุโดยใช้ค่าของรีเทนชันไทม์ ซึ่งการแยกสารผสมหลายชนิดที่สภาวะทางโครมาโทกราฟีเดียวกัน จะได้ค่ารีเทนชันไทม์ของสารประกอบที่คงที่ ดังนั้นจึงสามารถใช้วิธีทางโครมาโทกราฟีในการวิเคราะห์เชิง

คุณภาพได้ ส่วนการวิเคราะห์เชิงปริมาณสามารถทำได้โดยวัดความสูงของพีก (peak height) หรือวัดพื้นที่ใต้พีก (peak area) โดยปริมาณของสารจะแปรผันตามความสูงของพื้นที่ใต้พีก

1) รีเทนชันไทม์ (Retention time ; t_r) การแยกเกิดขึ้นเมื่อสารที่มีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ เช่น มีสารตัวที่ 1 และสารตัวที่ 2 ผสมกันอยู่ เมื่อสารตัวที่ 1 เกิดอันตรกิริยาบนพื้นผิวในคอลัมน์ที่ต่ำกว่าสารตัวที่ 2 ทำให้ปรากฏเป็นสัญญาณที่ตำแหน่งของเวลาต่ำกว่าสารตัวที่2 เรียกเวลาที่เกิดขึ้นนี้ว่ารีเทนชันไทม์ (retention time , t_r) ผลลัพธ์ที่ได้เรียก โครมาโทแกรม ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นตำแหน่งของการแยกของสารแต่ละตัวที่เวลาต่างกัน

2) แคพาซิตีแฟกเตอร์หรือเรียกรีเทนชันแฟกเตอร์ (capacity factor or retention factor ; k') จากค่ารีเทนชันไทม์ซึ่งบอกถึงตำแหน่งของสารผสมที่แตกต่างกันแล้ว ความเหมาะสมของตำแหน่งที่เกิดพีก ว่าสารนั้นมีอัตราการไหลผ่านคอลัมน์ช้าหรือเร็วนั้น สามารถบอกได้ด้วยค่าแคพาซิตีแฟกเตอร์ โดยสามารถหาค่า k' ได้จากสมการ 1



รูปที่ 2.9 แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารผสม 2 ชนิด

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad \text{.....(1)}$$

t_r คือ รีเทนชันไทม์ (retention time) ของสาร

t_o คือ รีเทนชันไทม์ของสารที่ไม่ถูกยึดเกาะในคอลัมน์และไหลผ่านมาพร้อมกับเฟสเคลื่อนที่ก็คือพีกแรกที่เห็นในโครมาโทแกรม

ค่า k' ควรอยู่ในช่วง 0.5-20 แต่จะดีที่สุดอยู่ในช่วง 1-10 โดยที่ค่า k' มีค่าต่ำแสดงว่าสารที่ถูกแยกเกิดอันตรกิริยาน้อยในคอลัมน์ จึงถูกเฟสเคลื่อนที่พาออกมาได้เร็ว ส่วนสารที่มีค่า k' สูง แสดงว่าเกิดอันตรกิริยากับคอลัมน์ได้นานกว่าจึงถูกเฟสเคลื่อนที่พาออกมาได้ช้ากว่า ค่า k' ที่มีค่าต่ำเกินไป คือ 0.5 แสดงว่าสารตัวนั้นไม่เหมาะสมที่จะใช้สภาวะการทดลองนี้ เนื่องจากเกิดพีกที่ใกล้เคียงกับพีกแรกมาก หรืออีกความหมายหนึ่ง คือ เกิดการแยกที่เร็วมากเกินไป แต่ถ้าค่า k' มีค่ามากเกินไป คือมากกว่า 20 แสดงว่าสารตัวนั้น ถูกเหนี่ยวรั้งด้วยเฟสคงที่ในคอลัมน์ที่มาก ทำให้ถูกเฟสเคลื่อนที่พาออกมาได้ช้ามากจึงต้องใช้เวลานานในการเห็นพีกนั้น นั่นก็คือสภาวะการทดลองนี้ไม่เหมาะสมกับการแยกสารชนิดนั้นเช่นเดียวกัน

3) เซพาเรชันแฟกเตอร์ (separation factor ; α) ค่าของ α จะบอกถึงระยะห่างของการแยกสาร 2 ชนิดที่มีพีกอยู่ติดกัน ดังสมการ

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = (t_{r2} - t_o) / (t_{r1} - t_o) \quad \text{.....(2)}$$

k'_1 คือ ค่า k' ของพีกของสารตัวที่ออกมาก่อน

k'_2 คือ ค่า k' ของพีกสารตัวที่อยู่ถัดไป

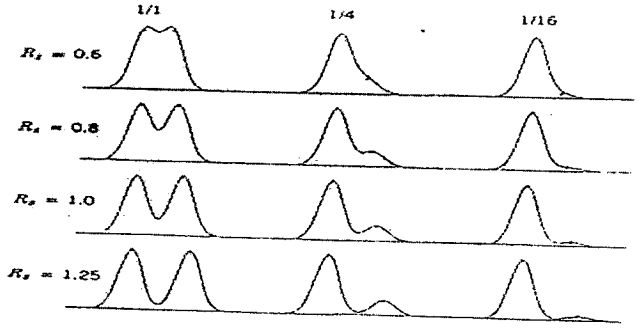
ค่าของ α ควรมีค่ามากกว่า 1 ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่ามีการแยกออกจากกันได้ดีระหว่าง 2 พีก ค่าของ α ที่มีค่ามาก แสดงให้เห็นว่าพีกของสาร 2 ชนิดที่อยู่ติดกันมีระยะห่างมากกว่าค่า α ที่มีค่าต่ำ

4) รีโซลูชัน (resolution ; R_s) ความสามารถในการแยกออกจากกันของพีก 2 พีก ที่อยู่ติดกัน สามารถทำได้โดยใช้ค่า R_s เป็นตัวกำหนด โดยมีสมการดังนี้

$$R_s = \frac{t_{r(2)} - t_{r(1)}}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)} \qquad \text{.....(3)}$$

W_1 คือ ความกว้างของพีกของสารตัวที่ออกมาก่อน

W_2 คือ ความกว้างของพีกของสารที่อยู่ถัดมา



รูปที่ 2.10 แสดงการเปรียบเทียบค่า R_s ที่แตกต่างกัน

จากรูปที่ 2.7 แสดงให้เห็นว่าค่า R_s ที่มีค่ามาก (ตั้งแต่ 1.25) จะให้การแยกที่สมบูรณ์ของพีก 2 พีกที่อยู่ติดกัน ถ้าค่าของ R_s มีค่าน้อยกว่า 1.25 จะทำให้พีกเกิดการเหลื่อมกัน ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ อย่างชัดเจน

5) ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (Column efficiency) ประสิทธิภาพของคอลัมน์พิจารณาได้จากขนาดความกว้างของพีก ซึ่งจะหมายถึง แถบของการแยกเนื่องจากการกระจายตัวของโมเลกุลของสารต่อเฟสคงที่ในคอลัมน์ ค่าที่บอกประสิทธิภาพของคอลัมน์คือค่าจำนวนเพลตทางทฤษฎี (Theoretical plate number ; N) ดังสมการ

$$N = 16\,(t_r/W)^2 \qquad \text{.....(4)}$$

$$= 5.54\,(t_r/W_{1/2})^2 \qquad \text{.....(5)}$$

$W_{1/2}$ คือ ค่าความกว้างของพีกที่ความสูงครึ่งหนึ่งของพีกนั้น

ค่าของ N ที่มีค่ามาก แสดงว่าประสิทธิภาพของการแยกของสารต่อเฟสคงที่ในคอลัมน์นั้นสูง จะสังเกตแถบของการแยก หรือความกว้างของพีกมีค่าน้อย แต่ถ้า N มีค่าน้อย นั่นคือคอลัมน์มีประสิทธิภาพน้อยลง และจะสังเกตแถบของการแยกกว้างมากขึ้นด้วยค่า

N จะเป็นการจำลองการคำนวณด้วยจำนวนเพลทย่อยๆ ในคอลัมน์แต่ละเพลทจะแสดงความสมดุลการกระจายที่เกิดขึ้นระหว่างตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่และเฟสคงที่

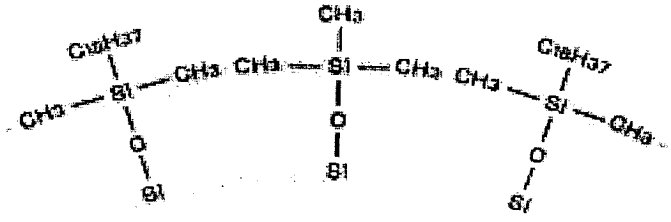
นอกจากนี้ยังสามารถบอกประสิทธิภาพของคอลัมน์ได้อีกคือ ค่าของ height equivalent to a theoretical plates (HETP) ดังสมการ 6

$$H = L / N \qquad \text{.....(6)}$$

L คือ ความยาวของคอลัมน์

ดังนั้นการบอกประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยค่า H จึงตรงกันข้ามกับค่า N คือค่า H ที่มีค่าน้อย จะแสดงถึงประสิทธิภาพที่สูงกว่าค่า H ที่มีค่ามาก ค่าของ H มีพารามิเตอร์ของความยาวของคอลัมน์ซึ่งจะบอกถึงระยะทางในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารด้วยเฟสเคลื่อนที่บนเฟสคงที่เป็นตัวกำหนด ดังนั้นที่ความยาวของคอลัมน์เท่ากันประสิทธิภาพจะขึ้นกับจำนวนเพลท (N) ในการแลกเปลี่ยนสมดุลของโมเลกุลของสารบนเฟสเคลื่อนที่และเฟสคงที่

คอลัมน์ที่ใช้ในการวิจัย คือ คอลัมน์ Inertsil® ODS - C_{18} เป็นคอลัมน์รีเวิร์สเฟส ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่ไม่มีขั้ว ใช้ตัวทำละลาย คือ เมทานอลกับน้ำ อะซิโตไนไตรล์กับน้ำ หรือเตตระไฮโดรฟู-รานกับน้ำมีโครงสร้างของ C_{18} ภายในคอลัมน์ ดังนี้



รูปที่ 2.11 แสดงโครงสร้างภายในของคอลัมน์ C_{18}

(ที่มา: http://images.google.co.th/imgres?imgurl=http://www.shiseido.co.jp/e/hplc/column/img เข้าชมล่าสุด 27 มี.ค.2555)

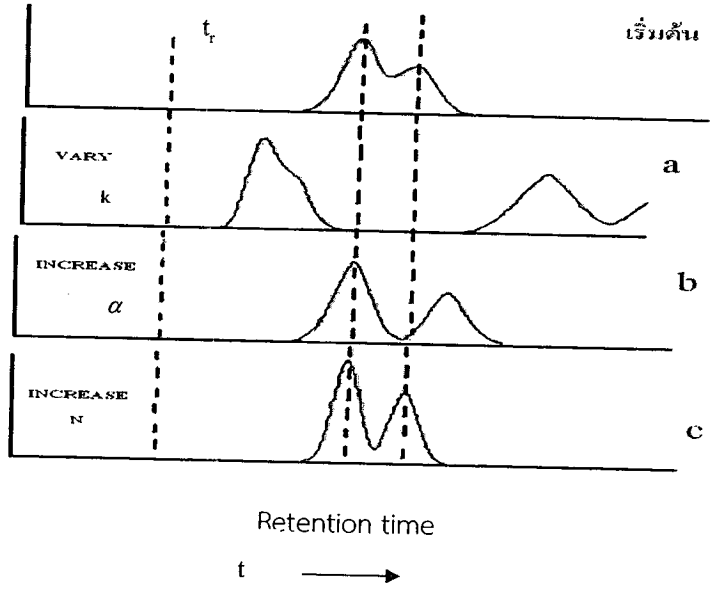
6) ความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟี การปรับปรุงประสิทธิภาพของการแยกด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีสามารถใช้พิจารณาจากพารามิเตอร์ดังที่กล่าวมาแล้ว โดยเริ่มต้นพิจารณาจากโครมาโทแกรมและพิจารณา แต่ละพารามิเตอร์เพื่อที่จะปรับปรุงประสิทธิภาพในการแยกสารให้ดีขึ้น

ความสัมพันธ์แต่ละพารามิเตอร์เป็นดังสมการ 7

$$R_s = \tfrac{1}{4}(\alpha - 1) N^{1/2} k' / (1 + k') \quad \text{.....(7)}$$

(ก) (ข) (ค)

จากสมการ 7 พิจารณาจากค่า R_s ของพีก ถ้าหากต้องการเพิ่มค่า R_s จะต้องเพิ่มค่า α และ N การเพิ่มค่า α ทำได้โดยเปลี่ยนส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่หรือแลกเปลี่ยนเฟสคงที่ ซึ่งเป็นส่วนของเทอม (ก) ในส่วนของเทอม(ข) ซึ่งต้องเพิ่มค่า N นั้นจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยปกติคอลัมน์ที่มีขนาดใหญ่กว่าทั้งด้านความยาวและเส้นผ่าศูนย์กลางจะให้ค่า N ที่มีค่ามากกว่าคอลัมน์ที่มีขนาดเล็กกว่า และในเทอมของ (ค) สามารถเพิ่มค่า R_s ได้จากการปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เช่นเดียวกับเทอม (ก) ดังรูปที่ 2.9 แสดงให้เห็นการปรับอัตราส่วนเพื่อให้มีการแยกได้ดีขึ้น เริ่มต้นจากที่มีพีกที่อยู่ติดกัน 2 พีกไม่สามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจนทำให้ต้องมีการปรับค่า k' ก่อน ดังรูป 2.9 a แต่พอปรับแล้วทำให้พีก (ที่อยู่หน้าสุด ในรูป 2.9a) เคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้น (ตำแหน่ง retention time ลดลง) แต่ผลลัพธ์ที่ได้คือพีกทั้งสองแทบจะ-ไม่แยกออกจากกัน (R_s น้อยกว่าเริ่มต้น) จึงได้มีการปรับค่า α ต่อไป ดังรูป 2.9b และพบว่าพีกทั้งสองสามารถแยกออกจากกันได้ดีขึ้น (R_s เพิ่มขึ้น) แม้ว่าจะออกมาช้ากว่าในรูป 2.9a แต่ถ้าหากมีการเพิ่มค่า N ก็จะทำให้พีกทั้งสองมีลักษณะที่แคบและคมมากขึ้น ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าการปรับค่า k' และ α สามารถทำได้โดยปรับชนิดและอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ แต่การปรับค่า N ต้องคำนึงถึงการปรับเปลี่ยนชนิดของเฟสคงที่ หรือคอลัมน์นั่นเอง



รูปที่ 2.12 แสดงความสัมพันธ์ของค่า k', α และค่า N กับการแยกในโครมาโตแกรม

องค์ประกอบของเครื่อง HPLC (HPLC-system)

1) ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase reservoir) เป็นขวดสำหรับใส่สารบรรจุตัวทำละลายมีความจุประมาณ 1 ลิตร ขวดที่ใส่เฟสไล่ฟองอากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่คือต้องกำจัดก๊าซออกซิเจนหรือไนโตรเจนที่ละลายอยู่ในตัวทำลายอยู่ในตัวทำลายซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดฟองก๊าซในคอลัมน์หรืออาจรบกวนเครื่องวัดดีเทคเตอร์ ในการวิเคราะห์สารหากใช้เฟสเคลื่อนที่เพียงชนิดเดียวหรือมีส่วนผสมคงที่เพื่อพาสารออกจากคอลัมน์ เรียกว่า isocratic elution เครื่องมือก็จะมีถังใส่ตัวทำละลายและตัวทำละลายก๊าซเพียงชุดเดียว แต่ถ้าใช้เฟสเคลื่อนที่ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปผสมกันและมีการเปลี่ยนแปลงส่วนผสมระหว่างการวิเคราะห์จะเรียกว่าgradient elution เครื่องมือสมัยใหม่จะมีภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ สำหรับเฟสเคลื่อนที่ตั้งแต่ 2-4 ชนิดและโปรแกรมควบคุมการไหลได้อย่างต่อเนื่อง

2) ปั๊ม (pump) มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลจะมีมากต้องใช้ความดันสูง

3) ระบบฉีดสารตัวอย่าง (Injection port) สำหรับใช้ใน HPLC จะสามารถมีได้ทั้งระบบฉีดด้วยเข็มสำหรับฉีดสารตัวอย่าง (syringe) หรือระบบอัตโนมัติ

4) คอลัมน์ (column) คือส่วนที่สำคัญที่สุดของเทคนิคโครมาโทกราฟี ทำหน้าที่เป็นเฟสคงที่เพื่อทำการแยกสารชนิดต่างๆที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากกัน โดยชนิดของคอลัมน์แบ่งออกได้ตามความมีขั้วและไม่มีขั้วของคอลัมน์ วัสดุที่ใช้เป็นเฟสคงที่ในคอลัมน์ทำจากซิลิกา (silica) หรือ อะลูมินา (alumina) โดยปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีของคอลัมน์ด้วยการทำปฏิกิริยาสร้างพันธะกับซิลิกาด้วยสารประกอบอินทรีย์เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดที่มีคาร์บอน 18 ตัว หรือเรียกว่า C_{18} หรือ ODS ซึ่งย่อมาจากออกตะเดซิลไซเลน (octadecylsilane) นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างที่สร้างพันธะกับซิลิกาอื่นๆอีกเช่น C_8 หรือ ไซยาโนโพรพิล (cyanopropyl) และอื่นๆ การเลือกชนิดของคอลัมน์ขึ้นอยู่กับลักษณะทางเคมีของสารที่จะวิเคราะห์ว่ามีลักษณะคล้ายกับชนิดของคอลัมน์แบบใด เช่น สารที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้ว ควรเลือกคอลัมน์ชนิดที่ไม่มีขั้ว (non-polar) คือ ODS หรือ C_{18} เป็นต้น

5) เครื่องตรวจวัด (Detector) สำหรับการตรวจวัดสารที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของคุณสมบัติของสารที่ถูกตรวจวัด เช่น ใช้หลักการทางสเปกโตรสโคปี หลักการทางไฟฟ้า และหลักการทางการหักเหของแสง เป็นต้น ตัวอย่างของชนิดเครื่องตรวจวัดสำหรับเครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงนี้ คือ

5.1) ไดโอดอาร์เรย์ ดีเทคเตอร์ (Diode Array Detector) คือเครื่องมือตรวจวัดที่พัฒนามาจากเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรสโคปี ซึ่งมีความสามารถในการตรวจวัดที่สูงกว่าเดิม สารที่ต้องการวิเคราะห์เมื่อผ่านจากคอลัมน์จะเกิดการดูดกลืนรังสียูวี-วิสิเบิล ซึ่งไดโอดอาร์เรย์ ดีเทคเตอร์จะสามารถตรวจวัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ที่หลายความยาวคลื่นพร้อมกัน

5.2) ฟลูออเรสเซนต์ ดีเทคเตอร์ (Fluorescent detector) เป็นดีเทคเตอร์ที่มีสภาพความไวสูงและมีความจำเพาะเจาะจงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ เนื่องจากมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนต์ที่ได้ออกมาจากตัวถูกละลายบางชนิดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวี โดยแสงยูวีที่ผ่านมายังสารตัวอย่างจะถูกเลือกโดยโมโนโครเมเตอร์เพื่อเลือกความยาวคลื่นที่ต้องการ หลังจากนั้นสารตัวอย่างจะให้แสง ฟลูออเรสเซนต์ออกมาซึ่งมีความยาวคลื่นเฉพาะจะผ่านไปยังฟิลเตอร์หรือโมโนโครเมเตอร์เพื่อจะตัดแสงที่ไม่ต้องการออก จากนั้นแสงจึงผ่านไปยังโฟโตเซลล์

5.3) คอนดักติวิตีดีเทคเตอร์ (conductivity detector) การตรวจวัดสารด้วยเทคนิคทางการนำไฟฟ้านี้จะเหมาะสำหรับสารที่มีตัวทำละลายเป็นน้ำ ซึ่งสามารถนำไฟฟ้าได้ และเหมาะสำหรับสารประกอบบางชนิดที่ไม่สามารถมองเห็นได้ในรังสียูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์นี้ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมาก ดังนั้นเวลาใช้งานจะต้องควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดเวลา

5.4) สเปกโทรมิเตอร์มวลหรือ แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass spectrometer) การตรวจวัดจะอาศัยหลักการเหมือนหลักการในแมสสเปกโทรเมตรีทุกประการ เครื่องดีเทคเตอร์ชนิดนี้จะให้สภาพความไวสูงที่สุด เนื่องจากใช้สารตัวอย่างเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์มักต่อกับเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี จึงเรียกรวมเป็น GC – MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry) และถ้าต่อเข้ากับเครื่องลิควิคโครมาโทรกราฟี หรือ HPLC จะเรียกรวมว่า LC – MS (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)

5.5) เครื่องดีเทคเตอร์อื่นๆ นอกจากนี้ที่ใช้กับโครมาโทกราฟี เช่น การวัดการหักเหของแสง (refractive index) การต่อเชื่อมกับ Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) เป็นต้น

2.4 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

M.L. Chang and C.M. Chang ,2003 ใช้ HPLC เพื่อทำการวิเคราะห์สารไวท์เทนนิงชนิดที่ละลายน้ำได้ (hydrophilic) ที่อยู่ในเครื่องสำอาง ซึ่งสารไวท์เทนนิงชนิดที่ละลายน้ำนี้ ได้แก่ glycolic acid, ascorbic acid, arbutin และ Mg-ascorbyl phosphate พร้อมๆ กัน ซึ่งพบพีกของสารดังกล่าวที่ รีเทนชันไทม์ประมาณ 2, 3, 4 และ 13 นาที ตามลำดับ โดยใช้คอลัมน์ Mightysil RP-18GP (250 x 4.60 mm, 5μm) โดยใช้ ion-pair เพื่อเป็น mobile phase modifier ที่ความยาวคลื่นของ UV 220 และ 240 nm

C.H. Lin *et. al.*,2005 วิเคราะห์สารอาร์บูตินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ชนิด on-line HPLC เพื่อหาปริมาณของอาร์บูตินในเครื่องสำอางโดยใช้ คอลัมน์ Hypersil Fluophase PFP (250 x 4.6 mm, 5 μm) โดยใช้ 0.020 M phosphate กับ 40 % methanol เป็นเฟสเคลื่อนที่

ผลลัพธ์ที่ได้พบพีกของ อาร์บูตินที่เวลาประมาณ 3 นาทีและเปรียบเทียบปริมาณที่ได้จากเครื่องสำอางชนิดต่าง ๆ

B.Abad. Garcia *et. al.*,2007 ได้ใช้เทคนิค HPLC สำหรับการหาสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล ซึ่งก็คือ hydroquinone, hydroxybenzoic acid, flavan-3-oles, hydroxycinnamic acids, coumarins, flavonones, flavones, dihydrochalcone and flavonols) ที่อยู่ในน้ำผลไม้ โดยใช้ Nova – Pak C18 (150 x 4.6 mm, 3 μm) โดยใช้ acetic acid , methanol และ น้ำ โดยใช้การชะแบบ gradient ซึ่งสามารถแยกสารกลุ่มโพลีฟีนอลได้ถึง 55 ชนิด ด้วยเวลาทั้งหมดในการวิเคราะห์ 140 นาที

Kittipongpatana N. *et.al.*,2007 ได้พัฒนาการแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารอาร์บูตินในเซลล์เนื้อเยื่อจากพืชตัวอย่าง 5 ชนิด ด้วยเทคนิค RP-HPLC คอลัมน์ Apollo C18 (150 x 4.6 mm, 5μm) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ methanol : น้ำ อัตราส่วน 10 : 90 v/v ดีเทคเตอร์เป็น UV วัดที่ความยาวคลื่น 280 nm พบพีกของอาร์บูตินที่เวลาประมาณ 3.9 นาที

ไชยวัฒน์ ไชยสุต.(2547 : บทคัดย่อ).การพัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินในครีม ได้พัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) สำหรับวิเคราะห์หาอาร์บูตินในตัวอย่างครีม สกัดตัวอย่างแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้คอลัมน์ชนิด ODS hypersil® วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นส่วนผสมของอะซิโตไนไตล์ : น้ำ pH 2.5 (50:50 , v/v) อัตราเร็วการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 282 นาโนเมตร ได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 20-500 มิลลิกรัมต่อลิตร (R^2 = 0.999) สามารถใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้วิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินในตัวอย่าง Arbuwhite cream, Super whitening cream และ Shiseido cream ได้ค่าเปอร์เซ็นการกลับคืนเท่ากับ 88.93 ,88.43 ,88.46 ตามลำดับ

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าในการวิเคราะห์สารกลุ่มออกฤทธิ์ต่อต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสหรือกลุ่มสารไวท์เทนนิงในเครื่องสำอางด้วยวิธีการโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง หรือ HPLC นั้นได้รับความสนใจและเป็นวิธีการที่นิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากเครื่องมือ HPLC เป็นเครื่องมือพื้นฐานในห้องปฏิบัติการเครื่องมือ และสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สามารถแปลผลและประมวลผลได้ง่าย แต่การออกแบบวิธีการทดลองที่เหมาะสมสำหรับ

การวิเคราะห์สารแต่ละชนิดมีความยุ่งยากในด้านการหาสภาวะที่เหมาะสมในแต่ละด้านคือ คอลัมน์ที่เหมาะสม และเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ตลอดจนระยะเวลาในการชะสารที่เหมาะสม