

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ สารเคมีและเครื่องมือ

3.1.1 อุปกรณ์

1. ปีกเกอร์ขนาด 50,100,250 มิลลิลิตร (Beaker : 50, 100, 250 ml)
2. ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร (Volumetric flask : 100 ml)
3. ปิเปตขนาด 1,2,5,10,25 มิลลิลิตร (Pipete : 1, 2, 5, 10, 25 ml)
4. โถดูดความชื้น (Desicater)
5. กระดาษกรองไนลอนเมมเบรนขนาด 0.13 ,0.45 ไมครอน (Nylon membrane : 0.13, 0.45 micron)
6. ชุดกรองสารละลายมาตรฐาน(Standard filtration set)
7. ชุดกรองเฟสเคลื่อนที่ สำหรับ HPLC (Mobile phase filtration set)
8. แท่งแก้วคนสาร (Glass stirrer)
9. ช้อนตักสาร (Spetula)
10. อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum foil)
11. กระจกตวงขนาด 500,1,000 มิลลิลิตร (Measuring cylinder: 500, 1,000 ml)
12. ขวดน้ำกลั่น (Distilled water bottle)
13. ขวดเก็บสารขนาดเล็ก (Vials)
14. หลอดฉีดยาสำหรับ HPLC ขนาด 50 ไมโครลิตร (Syringe : 50 μ l)

3.1.2 สารเคมี

1. สารมาตรฐานอาร์บูติน (Arbutin) จาก Sigma-Aldrich, Inc
2. สารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid) จาก Fisher Scientific
3. สารมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid) จาก Merck Schuchardt OHG
4. อะซิโตนไนไตรล์ สำหรับใช้ใน HPLC (Acetonitrile for HPLC grade) จาก Merck Schuchardt OHG
5. เมทานอล สำหรับใช้ใน HPLC (Methanol for HPLC grade) จาก Lab scan

6. สารตัวอย่างสกัดหยาบเกสรอินทผลัม

3.1.3 เครื่องมือ

1. เครื่อง HPLC ยี่ห้อ SHIMADZU
 - 1.1 ดีเทคเตอร์(Detector); Diode Array Detector, SPD-M 10AVP
 - 1.2 ซอฟต์แวร์ (Software) ; Class VP 5.0
2. คอลัมน์ (Column) ; Inertsil® ODS-3; 4.6x 250 mm ,5 µm
3. น้ำกลั่น 2 ขั้นตอน (Milipore water)
4. เครื่องกำจัดก๊าซ (Degaser)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

1. กรองน้ำและอะซิโตนไตรลด้วยชุดกรองเฟสเคลื่อนที่ด้วยกระดาษกรองไนลอนเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
2. นำน้ำและอะซิโตนไตรลไปเข้าเครื่องกำจัดก๊าซ ประมาณ 30 นาที
3. เตรียมอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างน้ำต่ออะซิโตนไตรล ร้อยละโดยปริมาตร (v/v) ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรลต่อน้ำ ร้อยละโดยปริมาตร

ลำดับที่	อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรลต่อน้ำ
1	30:70
2	40:60
3	50:50
4	60:40
5	70:30

3.2.2 การวิเคราะห์สารมาตรฐานอาร์บูติน

1. ชั่งสารมาตรฐานอาร์บูติน มา 0.100 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 2 ขั้นตอนปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วย น้ำกลั่น 2 ขั้นตอนจะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน มา 1 2 4 6 และ 8 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 2 ขั้นตอนจะได้ความเข้มข้น 100, 200 400 600 และ 800 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. จากนั้นก็กรองสารมาตรฐานด้วยชุดกรองสารมาตรฐานที่มีกระดาษกรองโนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน และเก็บใส่ขวดเก็บสารที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์
4. นำสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ตามวิธีการของเฟสเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันตามตารางที่ 3.1 เพื่อหาปริมาณพื้นที่ได้พีกและค่ารีเทนชันไทม์ ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร (nm)

3.2.3 การวิเคราะห์สารมาตรฐานวิตามินซี

1. ชั่งสารมาตรฐานวิตามินซี มา 0.100 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น 2 ขั้นตอน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินซี มา 1 2 4 6 และ 8 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. จากนั้นกรองสารมาตรฐานด้วยชุดกรองสารมาตรฐานที่มีกระดาษกรองโนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน และเก็บใส่ขวดเก็บสารที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ เพื่อทำการฟอสฟอไรต์
4. นำสารละลายมาตรฐานวิตามินซีมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ตามวิธีการของเฟสเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันตามตารางที่ 3.1 เพื่อหาปริมาณพื้นที่ได้พีกและรีเทนชันไทม์ ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร (nm)

3.2.4 การวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดโคจิก

1. ชั่งสารมาตรฐานกรดโคจิกมา 0.100 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น 2 ขั้นตอน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก มา 1 2 4 6 และ 8, มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 100 200 400 600 และ 800 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. จากนั้นก็กรองสารมาตรฐานด้วยชุดกรองสารมาตรฐานที่มีกระดาษกรองโนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเก็บใส่ขวดเก็บสารที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ เพื่อทำการพามาตรฐาน
4. นำสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ตามวิธีการของเฟสเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันตามตารางที่ 3.1 เพื่อหาปริมาณพื้นที่ใต้พีค และรีเทนชันไทม์ ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร (nm)

3.2.5 การวิเคราะห์สารผสมวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิก

1. ชั่งสารมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิก มาอย่างละ 0.100 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น 2 ขั้นตอน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 2 ขั้นตอนให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานผสมที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมมา 1 2 4 6 และ 8 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 2 ขั้นตอนให้ครบ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานผสมที่มีความเข้มข้น 100 200 400 600 และ 800 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. จากนั้นกรองสารมาตรฐานด้วยชุดกรองสารมาตรฐานที่มีกระดาษกรองโนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเก็บใส่ขวดเก็บสารที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์
4. ดูดสารละลายมาตรฐานผสมวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิกด้วยหลอดฉีดยาสำหรับ HPLC ขนาด 50 ไมโครลิตร มา 20 ไมโครลิตร

5. นำสารละลายมาตรฐานผสมวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิกมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ตามวิธีการของเฟสเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันตามตารางที่ 3.1 เพื่อหาสถานะที่เหมาะสมของการแยกพีคของสารผสมและหาปริมาณพื้นที่ใต้พีคและรีเทนชันไทม์ ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร (nm)

3.2.6 การประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนามาจากสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

1. นำสารตัวอย่างสกัดหยาบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เลือกไว้คือ สารสกัดหยาบเกสรอินทผลัม มาประมาณ 0.05 กรัม มาละลายในเมทานอลเกรดสำหรับใช้กับ HPLC ประมาณ 10 มิลลิลิตร และเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 2 ขั้นตอนสำหรับ HPLC
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของอาร์บูติน กรดโคจิก และวิตามินซี ความเข้มข้นประมาณ 1000 ppm สำหรับเปรียบเทียบ
3. จากนั้นก็กรองสารตัวอย่างสกัดหยาบ และสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดด้วยชุดกรองสารมาตรฐานที่มีกระดาษกรองโนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ในขวดขนาดเล็กพร้อมฉีดยาใน HPLC
4. เปิดสารตัวอย่างสกัดหยาบและสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดที่กรองแล้วในข้อ 3.2.6 (3) ด้วยเข็มสำหรับฉีดยา HPLC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร (nm) ที่อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรลีนต่อน้ำ 40 : 60 ร้อยละโดยปริมาตร ฉีดในเครื่อง HPLC บันทึกเปรียบเทียบโครมาโทแกรมสารละลายมาตรฐานผสมทั้ง 3 ชนิด และสารตัวอย่างสกัดหยาบ
5. เติมสารมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูติน และสารกรดโคจิกลงไปในสารตัวอย่างสกัดหยาบเกสรอินทผลัม และทำการฉีดยาที่ผสมสารมาตรฐานและสารตัวอย่างนี้ใน HPLC จากนั้นบันทึกเปรียบเทียบโครมาโทแกรม