

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ของการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ละชนิด โดยใช้สภาวะคงที่ในทุกสารมาตรฐานดังนี้คือ

สภาวะที่ใช้ คือ

1. คอลัมน์ (Column) ; Inertsil® ODS-3; 4.6 x 250 mm ,5 μm
2. ดีเทคเตอร์ (Detector) ; Diode Array Detector ที่ความยาวคลื่น 220 nm
3. ซอฟต์แวร์ (Software) ; Class VP 5
4. อุณหภูมิ (Temperature) ; 35 องศาเซลเซียส
5. อัตราการไหล (Flow rate) ; 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที
6. ปริมาตรที่ฉีด (Injection volume) ; 20 ไมโครลิตร

4.1 ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานอาร์บูติน

ผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่พบว่าที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.1 พบว่าที่อัตราส่วนอะซิโตไนโตรล์ต่อน้ำ 60:40 ร้อยละโดยปริมาตร ได้ค่ารีเทนชันไทม์ (t_r) น้อยสุดที่เวลาเฉลี่ย 2.688 นาที และที่อัตราส่วนอะซิโตไนโตรล์ต่อน้ำ 30:70 ร้อยละโดยปริมาตร ได้ค่า t_r มากสุดที่เวลาเฉลี่ย 2.851 นาที

ตารางที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่อะซิโตไนโตรล์ต่อน้ำ ร้อยละโดยปริมาตร (v/v) กับค่ารีเทนชันไทม์ (t_r) ของสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน

อะซิโตไนโตรล์:น้ำ	ค่ารีเทนชันไทม์ (t_r) (นาที)			ค่ารีเทนชันไทม์ (t_r)เฉลี่ย (นาที)
30:70	2.795	2.869	2.891	2.851
40:60	2.827	2.825	2.827	2.826
50:50	2.699	2.688	2.763	2.716
60:40	2.645	2.699	2.720	2.688
70:30	2.773	2.741	2.731	2.748

4.2 ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานวิตามินซี

ผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่พบว่าที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อัตราส่วนของอะซิโตไนโตรล์ต่อน้ำ 70:30 ร้อยละโดยปริมาตร ได้ค่า t_r น้อยสุดที่เวลาเฉลี่ย 2.261 นาที และที่อัตราส่วนของอะซิโตไนโตรล์ต่อน้ำ 30:70 ร้อยละโดยปริมาตร ได้ค่า t_r มากสุดที่เวลาเฉลี่ย 2.567 นาที ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่อะซิโตไนโตรล์ต่อน้ำ (v/v) กับค่ารีเทนชันไทม์ (t_r) ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี

อะซิโตไนโตรล์:น้ำ (v/v)	ค่ารีเทนชันไทม์ (t_r) (นาที)			ค่ารีเทนชันไทม์ (t_r)เฉลี่ย (นาที)
30:70	2.571	2.539	2.593	2.567
40:60	2.345	2.347	2.345	2.346
50:50	2.475	2.485	2.517	2.492
60:40	2.517	2.507	2.485	2.503
70:30	2.208	2.283	2.293	2.261

4.3 ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดโคจิก

ผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่พบว่าที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่อัตราส่วนอะซิโตนไตรลต์ต่อน้ำ 50:50 ร้อยละโดยปริมาตร ได้ค่า t_r น้อยสุดที่เวลาเฉลี่ย 2.972 นาที และที่อัตราส่วนอะซิโตนไตรลต์ต่อน้ำ 70:30 ร้อยละโดยปริมาตร ได้ค่า t_r มากสุดที่เวลาเฉลี่ย 3.552 นาที ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรลต์ต่อน้ำ (v/v) กับค่ารีเทนชันไทม์ (t_r) ของสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก

อะซิโตนไตรลต์:น้ำ (v/v)	ค่ารีเทนชันไทม์ (t_r) (นาที)			ค่ารีเทนชันไทม์ (t_r)เฉลี่ย (นาที)
30:70	3.285	3.328	3.285	3.299
40:60	3.157	3.155	3.156	3.156
50:50	2.997	2.955	2.965	2.972
60:40	3.451	3.479	3.398	3.442
70:30	3.562	3.543	3.551	3.552

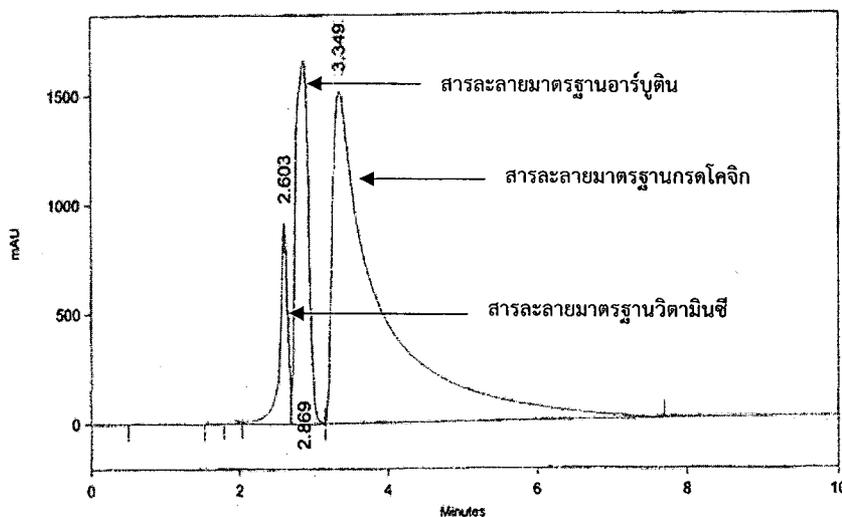
4.4 ผลการวิเคราะห์สารผสม

ผลการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมของสารต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิดพร้อมกัน คือ วิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิก โดยวิธีโครมาโทกราฟี

4.4.1 อัตราส่วนของอะซิโตนไตรลต์ต่อน้ำ ; 30:70 ร้อยละโดยปริมาตร

จากการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง วิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิกพบว่าโครมาโทแกรมดังรูปที่ 4.1 และผลการวิเคราะห์ทางพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีคือ ค่าแควาซิตีแฟกเตอร์ (capacity factor ; k') ค่าเซพพารา

ชั้นแยกเตอร์ (separation factor ; α) ค่ารีโซลูชัน (Resolution ; R_s) และค่าจำนวนเพลตทางทฤษฎีของคอลัมน์ (theoretical plate number ; N) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.4



รูปที่ 4.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง วิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิก ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และอัตราส่วนระหว่างเฟสเคลื่อนที่ของอะซิโตไนโตรลต์ต่อน้ำ ; 30:70 ร้อยละโดยปริมาตร

ตารางที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ารีเทนชันใหม่กับค่า k' , α , R_s และ N ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิก ที่อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ อะซิโตไนโตรลต์ต่อน้ำ ; 30 : 70 ร้อยละโดยปริมาตร

สารมาตรฐาน	ค่ารีเทนชันใหม่ (t_r) (นาที)	ค่า k	ค่า α	ค่า R_s	ค่า N
วิตามินซี	2.603	3.281	1.152	0.409	443.639
อาร์บูติน	2.869	3.781			
กรดโคจิก	3.349	4.508	1.192	0.16	2.918

หมายเหตุ: $t_0 = 0.608$ คอลัมน์ที่ใช้ Inertsil ® ODS-3; 4.6x 250 mm ,5 μm

จากตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์พบว่าที่สภาวะเฟสเคลื่อนที่อะซิโตไนโตรลต์ต่อน้ำ

อัตราส่วน 30:70 ร้อยละโดยปริมาตร ค่า k' ของวิตามินซีมีค่า 3.281 ตามด้วยอาร์บูตินมีค่า 3.781 และกรดโคจิกมีค่า 4.508 ตามลำดับ พบว่าค่า k' อยู่ในช่วง 1-10 แสดงว่าสารละลายมาตรฐานเกิดอัตราการยากับคอลัมน์ได้นานจึงถูกเฟสเคลื่อนที่พาออกมาได้ช้า และค่า R_s ระหว่างสารมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินมีค่า 0.409 และค่า R_s ระหว่างสารมาตรฐาน อาร์บูตินกับ กรดโคจิก มีค่า 0.409 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 1.25 นั้นแสดงว่าพีกของสารผสมดังกล่าวแยกออกจากกันได้ไม่ดีเท่าที่ควร จึงทำให้พีกเกิดการเหลื่อมล้ำกันและค่า α ระหว่างสารมาตรฐานวิตามินซีกับ อาร์บูตินมีค่า 1.152 และ ค่า α ระหว่างสารมาตรฐานอาร์บูตินกับกรดโคจิกมีค่า 1.192 ซึ่งมีค่ามากกว่า 1 แสดงให้เห็นว่าการแยกออกจากกันได้ดีระหว่างพีก 2 พีกของสารดังกล่าวหรือถ้าค่า α มีค่ามากจะแสดงให้เห็นว่าพีกของสาร 3 ชนิด ที่อยู่ติดกันมีระยะห่างมากกว่าค่า α ที่มีค่าต่ำ และถ้าค่าของ N มีค่าที่มากแสดงว่าประสิทธิภาพของการแยกของสารต่อเฟสคงที่ในคอลัมน์นั้นจะสูงโดยจะสังเกตจากแถบของการแยก หรือความกว้างของพีกว่ามีค่าน้อย

4.4.2 อัตราส่วนของอะซิโตไนโตรลต์่อน้ำ 40 :60 ร้อยละโดยปริมาตร

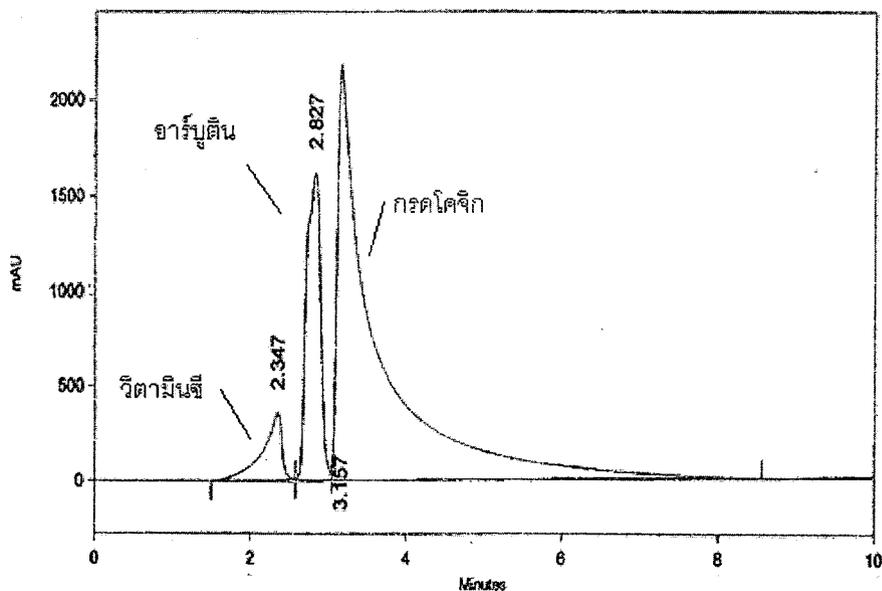
จากการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง

วิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิกพบว่ามีโครมาโทแกรมดังรูปที่ 4.2 และผลการวิเคราะห์ทางพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟี คือค่า k' ค่า α ค่า R_s และค่า N ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ารีเทนชันใหม่กับค่า k' , α , R_s และ N ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิก ที่อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ อะซิโตไนโตรลต์่อน้ำ ; 40 : 60 ร้อยละโดยปริมาตร

สารมาตรฐาน	ค่ารีเทนชันใหม่ (t_r) (นาที)	ค่า k'	ค่า α	ค่า R_s	ค่า N
วิตามินซี	2.347	2.892	-	-	1356.293
อาร์บูติน	2.827	3.688	} 1.275	} 1.920	4427.529
กรดโคจิก	3.157	4.235			

หมายเหตุ: $t_0 = 0.603$ คอลัมน์ที่ใช้ Inertsil® ODS-3; 4.6x 250 mm ,5 μ m



รูปที่ 4.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง วิตามินซี อาร์บูติน และ กรดโคจิก ที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรและอัตราส่วนของอะซิโตไนโตรลต์่อน้ำ 40 :60 ร้อยละโดยปริมาตร

จากตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์พบว่าที่สภาวะเฟสเคลื่อนที่อะซิโตไนโตรลต์่อน้ำ อัตราส่วน 40:60 ร้อยละโดยปริมาตร มีค่า t_r ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูติน และกรดโคจิก มีค่า 2.347, 2.827, 3.157 ตามลำดับ และค่า k' ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูติน และกรดโคจิก มีค่า 2.892, 3.688, 4.235 ตามลำดับ ซึ่งหมายถึงค่า k' จะขึ้นอยู่กับค่า t_r ถ้าค่า t_r มากค่า k' ก็จะมากตามไปด้วยและค่า k' ที่ดีควรอยู่ในช่วง 1-10 ซึ่งเป็นช่วงที่ดีที่สุดของการวิเคราะห์นั้น แสดงให้เห็นว่าสารละลายมาตรฐานเกิดอัตรกิริยากับคอลัมน์ได้ไม่ช้าหรือนานจนเกินไปจึงถูกเฟสเคลื่อนที่พาออกมาในเวลาที่ดีพอสมควร และค่า R_s มีค่ามากที่สุด ในสภาวะอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตไนโตรลต์่อน้ำ 40:60 ร้อยละโดยปริมาตร ซึ่งค่า R_s ระหว่างสารละลายมาตรฐานวิตามินซีและอาร์บูตินมีค่า 1.920 ซึ่งมีค่ามากกว่า 1.25 แสดงให้เห็นว่าพีกของสารละลายมาตรฐานดังกล่าวแยกออกจากกันอย่างเห็นได้ชัดและค่า α ระหว่างสารละลายมาตรฐานวิตามินซีกับอาร์บูติน มีค่า 1.275 และค่า α ระหว่างสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินกับกรดโคจิก มีค่า 1.148 แสดงให้เห็นว่าการแยกออกจากกันของพีกทั้ง 2 สามารถแยกออกจากกันได้ดี และเมื่อนำไปหาค่า N พบว่า ค่า N ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิก มีค่า 1356.293, 4427.529 และ 23.281

ตามลำดับ ซึ่งค่า N ของสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินมีค่ามากทำให้พีคของอาร์บูตินเรียวแหลมต่างจากพีคของกรดโคจิกซึ่งมีค่า N น้อยทำให้พีคดูกว้างไม่เรียวแหลม

4.4.3 อัตราส่วนของอะซิโตไนโตรลต์่อน้ำ; 50:50 ร้อยละโดยปริมาตร

จากการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิก พบว่ามีโครมาโทแกรมดังรูปที่ 4.3 และผลการวิเคราะห์ทางพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีคือ ค่า k' ค่า α ค่า R_s และค่า N ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.6

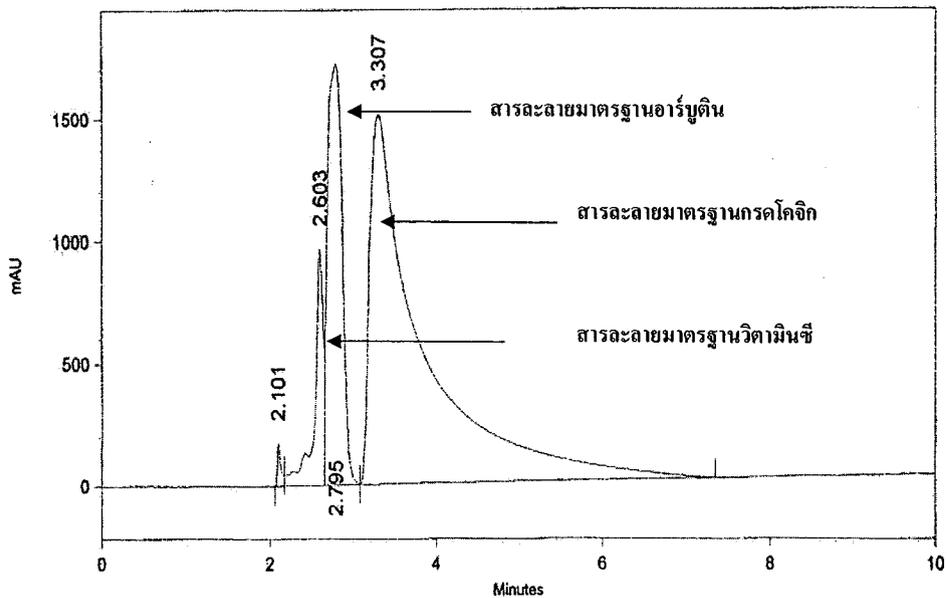
ตารางที่ 4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ารีเทนชันใหม่กับค่า k' , α , R_s และ N ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิก ที่อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ อะซิโตไนโตรลต์่อน้ำ ; 50 : 50 ร้อยละโดยปริมาตร

สารมาตรฐาน	ค่ารีเทนชันใหม่(t_r) (นาที)	ค่า k'	ค่า α	ค่า R_s	ค่า N
วิตามินซี	2.603	3.309	-	-	1668.306
อาร์บูติน	2.795	3.627	} 1.096	} 0.768	4327.862
กรดโคจิก	3.307	4.475			

หมายเหตุ: $t_0 = 0.604$ คอลัมน์ที่ใช้ Inertsil® ODS-3; 4.6x 250 mm ,5 μ m

จากตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์พบว่าที่สภาวะเฟสเคลื่อนที่อะซิโตไนโตรลต์่อน้ำอัตราส่วน 50:50 ร้อยละโดยปริมาตร มีค่า k' ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี 3.309 ตามด้วยอาร์บูตินมีค่า 3.627 และกรดโคจิกมีค่า 4.475 ตามลำดับ และค่า R_s ระหว่างสารมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิกมีค่าน้อยกว่า 1.25 แสดงว่าพีคของสารผสมทั้ง 3 แยกออกจากกันไม่ได้ดีเท่าที่ควรจึงทำให้พีคเกิดการเหลื่อมล้ำกัน และค่า α ระหว่างสารมาตรฐานวิตามินซีกับอาร์บูตินมีค่า 1.096 และค่า α ระหว่างสารมาตรฐานอาร์บูตินกับกรดโคจิกมีค่า 1.233 ซึ่งมีค่ามากกว่า 1 แสดงให้เห็นว่าการแยกออกจากกันได้ดีระหว่างพีค 2 พีคของสารดังกล่าวหรือถ้าค่า α มีค่ามากจะแสดงให้เห็นว่าพีคของสาร 3 ชนิด ที่อยู่ติดกันมีระยะห่างมากกว่าค่า α ที่มีค่าต่ำ และ

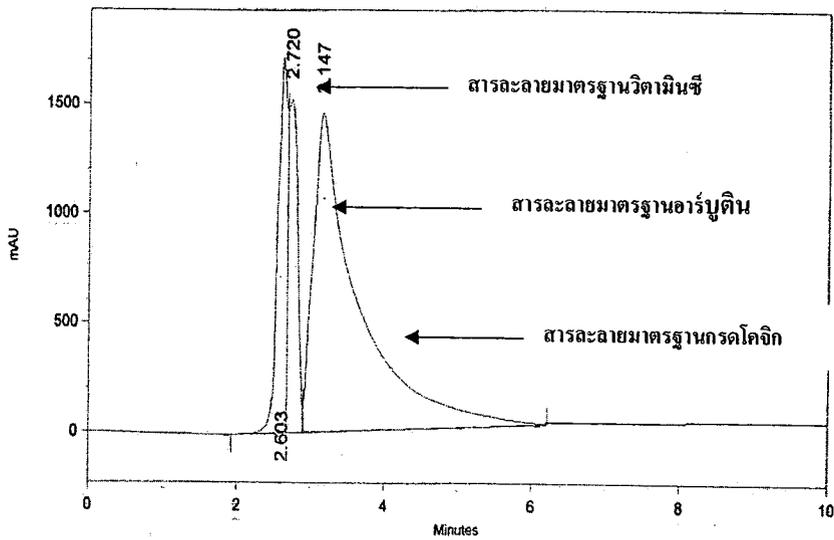
ถ้าค่าของ N มีค่าที่มากแสดงว่าประสิทธิภาพของการแยกของสารต่อเฟสคงที่ในคอลัมน์นั้นจะสูง โดยจะสังเกตจากแถบของการแยก หรือความกว้างของพีคว่ามีค่าน้อย เช่นค่า N ของสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินมีค่าที่สูงทำให้มีขนาดพีคที่เรียวแหลม



รูปที่ 4.3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างวิตามินซี อาร์บูติน และ กรดโคจิก ที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรและอัตราส่วนของอะซิโตไน ไตรลกับน้ำ ; 50:50 ร้อยละโดยปริมาตร

4.4.4 อัตราส่วนของอะซิโตไนไตรลต่อน้ำ ; 60:40 ร้อยละโดยปริมาตร

จากการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง วิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิกพบว่ามีโครมาโทแกรมดังรูปที่ 4.4 และผลการวิเคราะห์ทาง พารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีคือ ค่า k' ค่า α ค่า R_s และค่า N ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7



รูปที่ 4.4 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง วิตามินซี อาร์บูติน และ กรดโคจิก ที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรและอัตราส่วนของอะซิโตไนไตรล์ต่อน้ำ ; 60:40 ร้อยละโดยปริมาตร

ตารางที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ารีเทนชันใหม่กับค่า k' , α , R_s และค่า N ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิก ที่อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตไนไตรล์ต่อน้ำ ; 60 :40 ร้อยละโดยปริมาตร

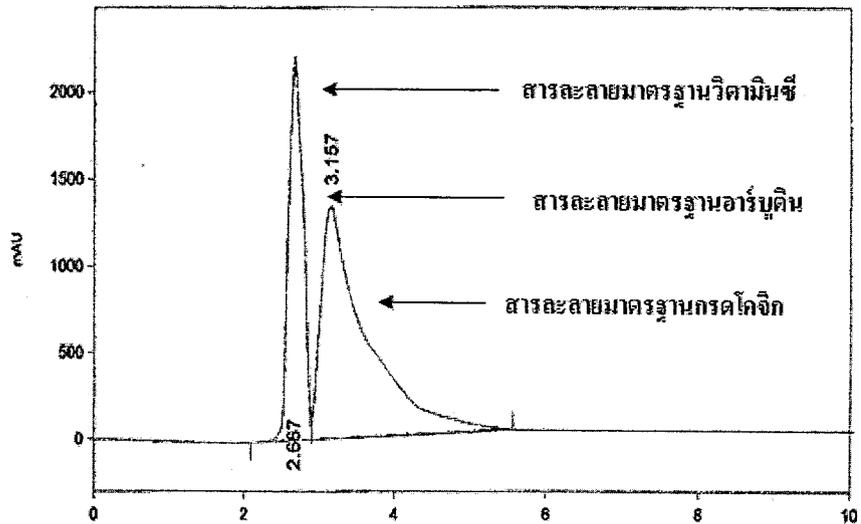
สารมาตรฐาน	ค่ารีเทนชันใหม่ (t_r) (นาที)	ค่า k	ค่า α	ค่า R_s	ค่า N
วิตามินซี	2.603	3.281	1.058	0.468	1668.306
อาร์บูติน	2.720	3.473			4098.714
กรดโคจิก	3.147	4.175	1.202	0.251	23.134

หมายเหตุ: $t_0 = 0.608$ คอลัมน์ที่ใช้ Inertsil® ODS-3; 4.6x 250 mm ,5 μ m

จากตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์พบว่าที่สภาวะเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรล์ต่อน้ำอัตราส่วน 60:40 ร้อยละโดยปริมาตร มีค่า k' ของวิตามินซี 3.281 ตามด้วยอาร์บูตินมีค่า 3.473 และกรดโคจิกมีค่า 4.175 ตามลำดับ และค่า R_s ระหว่างสารมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิกมีค่าน้อยกว่า 1.25 แสดงว่าพีกของสารผสมดังกล่าว แยกออกจากกันได้ไม่เต็มที่เท่าที่ควร จึงทำให้พีกเกิดการเหลื่อมล้ำกัน และค่า α ระหว่างสารมาตรฐานวิตามินซีกับอาร์บูตินมีค่า 1.058 และค่า α ระหว่างสารมาตรฐานอาร์บูตินกับกรดโคจิกมีค่า 1.202 ซึ่งมีความมากกว่า 1 แสดงให้เห็นว่าการแยกออกจากกันได้ดีระหว่างพีก 2 พีกของสารดังกล่าวหรือถ้าค่า α มีค่ามาก จะแสดงให้เห็นว่าพีกของสาร 3 ชนิด ที่อยู่ติดกันมีระยะห่างมากกว่าค่า α ที่มีค่าต่ำ และถ้าค่าของ N มีค่าที่มากแสดงว่าประสิทธิภาพของการแยกของสารต่อเฟสคงที่ในคอลัมน์นั้นจะสูงโดยจะสังเกตจากแถบของการแยก หรือความกว้างของพีกว่ามีค่าน้อย เช่นค่า N ของสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกมีค่าน้อยมากทำให้พีกดูกว้างและมีหางยาวเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินและวิตามินซีซึ่งมีค่ามากทำให้พีกดูเรียวและแหลม

4.4.5 อัตราส่วนของอะซิโตนไตรล์ต่อน้ำ ; 70:30 ร้อยละโดยปริมาตร

จากการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิกพบว่ามีโครมาโทแกรมดังรูปที่ 4.5 และผลการวิเคราะห์ทางพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีคือ ค่า k' ค่า α ค่า R_s และค่า N ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.8



รูปที่ 4.5 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง วิตามินซี อาร์บูติน และ กรดโคจิก ที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรและอัตราส่วนระหว่าง เฟสเคลื่อนที่ของอะซิโตไนไตรล์ต่อน้ำ ; 70:30 ร้อยละโดยปริมาตร
 หมายเหตุ : พีกของวิตามินซีและพีกอาร์บูตินไม่สามารถแยกออกจากกันได้

ตารางที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ารีเทนชันใหม่กับค่า k' , α , R_s และค่า N ของ สารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิก ที่อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ อะซิโตไนไตรล์ต่อน้ำ ; 70 : 30 ร้อยละโดยปริมาตร

สาร มาตรฐาน	ค่ารีเทนชัน ใหม่ (t_r) (นาที)	ค่า k	ค่า α	ค่า R_s	ค่า N
วิตามินซี	-	-	-	-	-
อาร์บูติน	2.667	2.063	-	-	3940.541
กรดโคจิก	3.157	2.553	1.237	0.288	

หมายเหตุ: $t_0 = 0.604$ คอลัมน์ที่ใช้ Inertsil® ODS-3; 4.6x 250 mm ,5 μ m

จากตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์พบว่าที่สภาวะเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรลต่อ น้ำอัตราส่วน 70:30 ร้อยละโดยปริมาตร วิตามินซีและอาร์บูตินเกิดฟักที่ t_r เดียวกันคือ 2.667 นาที และค่า k' ของวิตามินซีกับอาร์บูตินมีค่า 2.063 และกรดโคจิกมีค่า 2.553 ตามลำดับ พบว่า สารละลายมาตรฐานวิตามินซีกับอาร์บูตินและกรดโคจิก พบว่าค่า k' อยู่ในช่วง 1-10 แสดงว่า สารละลายมาตรฐานเกิดอัตราการเกิดปฏิกิริยากับคอลัมน์ได้ในเวลาที่ตีพอสสมควรคือไม่นานจนเกินไปและไม่เร็วจนเกินไป และค่า R_s ระหว่างสารมาตรฐานวิตามินซีกับอาร์บูตินและกรดโคจิกมีค่าน้อยกว่า 1.25 แสดงว่าฟักของสารผสมทั้ง 3 แยกออกจากกันได้ไม่เต็มที่เท่าที่ควรจึงทำให้ฟักเกิดการเหลื่อมล้ำกัน และค่า α ของสารมาตรฐานวิตามินซีกับอาร์บูตินและกรดโคจิกมีค่ามากกว่า 1 แสดงว่า ระยะห่างของฟักทั้ง 3 ที่อยู่ติดกันมีระยะห่างมากกว่าค่า α ที่มีค่าต่ำกว่า 1 และถ้าค่าของ N มีค่าที่มากแสดงว่าประสิทธิภาพของการแยกของสารต่อเฟสคงที่ในคอลัมน์นั้นจะสูงโดยจะสังเกต จากแถบของการแยก หรือความกว้างของฟักว่ามีค่าน้อย

4.5 ผลของความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ได้ทำการทดลองเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินต่อ คาร์เทนซินโทม และวิเคราะห์ความเป็นเส้นตรง (Linearity) พบว่าคาร์เทนซินโทมเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตามความเข้มข้น ดังผลในตารางที่ 4.9

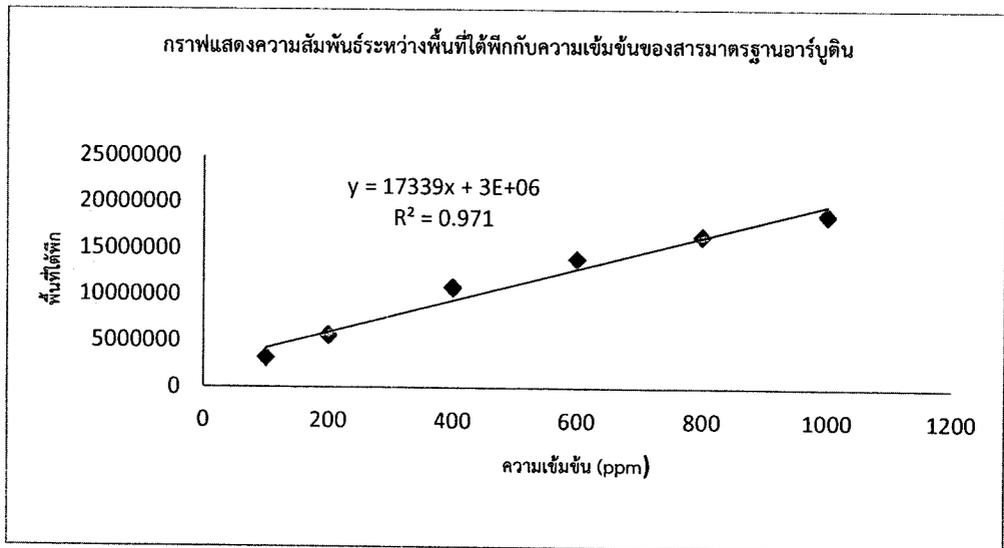
ตารางที่ 4.10 แสดงผลความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้ฟักของสาร มาตรฐานอาร์บูติน และได้ทำการพลอตเป็นกราฟมาตรฐานในรูปที่ 4.6 เพื่อแสดงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง ซึ่งเมื่อค่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ค่าของพื้นที่ใต้ฟักก็เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงเช่นกัน

ตารางที่ 4.9 แสดงค่ารีเทนชันใหม่ของสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน

ความเข้มข้น (ppm)	ค่ารีเทนชันใหม่(t _r) (นาที)			ค่าเฉลี่ย (\bar{x}) (นาที)	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ร้อยละค่า เบี่ยงเบน มาตรฐาน สัมพัทธ์ (%RSD)
	ครั้งที่ฉีด					
	1	2	3			
100	2.788	2.789	2.788	2.788	0.0004	0.0169
200	2.787	2.787	2.787	2.787	0	1.590
400	2.784	2.785	2.786	2.785	0.0008	0.029
600	2.788	2.788	2.788	2.788	0	0
800	2.783	2.784	2.783	2.783	0.0004	0.0169
1000	2.787	2.784	2.785	2.786	0.0012	0.044

ตารางที่ 4.10 แสดงค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค			ค่าเฉลี่ย(\bar{x})	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ร้อยละค่า เบี่ยงเบน มาตรฐาน สัมพัทธ์ (%RSD)
	ครั้งที่ฉีด					
	1	2	3			
100	3149478	3175921	3157491	3160963	11071	0.350
200	5959966	5611087	5381347	5650800	237883	4.209
400	10707947	11062832	10679305	10816695	174437	1.612
600	13853472	13669118	14478602	14000397	346416	2.474
800	16687806	16442242	16285794	16471947	165459	1.000
1000	19356289	17924624	19094203	18791705	622385	3.312



รูปที่ 4.6 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน

จากกราฟมาตรฐานรูปที่ 4.6 พบว่าผลของความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานอาร์บูตินด้วยอัตราส่วนของอะซิโตนไตรลต่อน้ำ 40:60 ร้อยละโดยปริมาตร ได้สมการเส้นตรง $R^2 = 0.971$ ซึ่งได้ค่าความเป็นเส้นตรงตามเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ของค่ารีเทนชันไทม์ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซีที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าค่ารีเทนชันไทม์ไม่เปลี่ยนแปลงมากเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.11 แสดงค่ารีเทนชันใหม่ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี

ความ เข้มข้น (ppm)	ค่ารีเทนชันใหม่(t_r) (นาที)			ค่าเฉลี่ย (\bar{x}) (นาที)	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ร้อยละค่า เบี่ยงเบน มาตรฐาน สัมพัทธ์ (%RSD)
	ครั้งที่ฉีด					
	1	2	3			
100	2.059	2.059	2.054	2.057	0.0023	0.1145
200	2.053	2.055	2.059	2.055	0.0024	0.1213
400	2.058	2.058	2.057	2.058	0.0004	0.229
600	2.059	2.059	2.059	2.059	0	0
800	2.058	2.058	2.058	2.058	0	0
1000	2.057	2.059	2.055	2.057	0.0016	0.0793

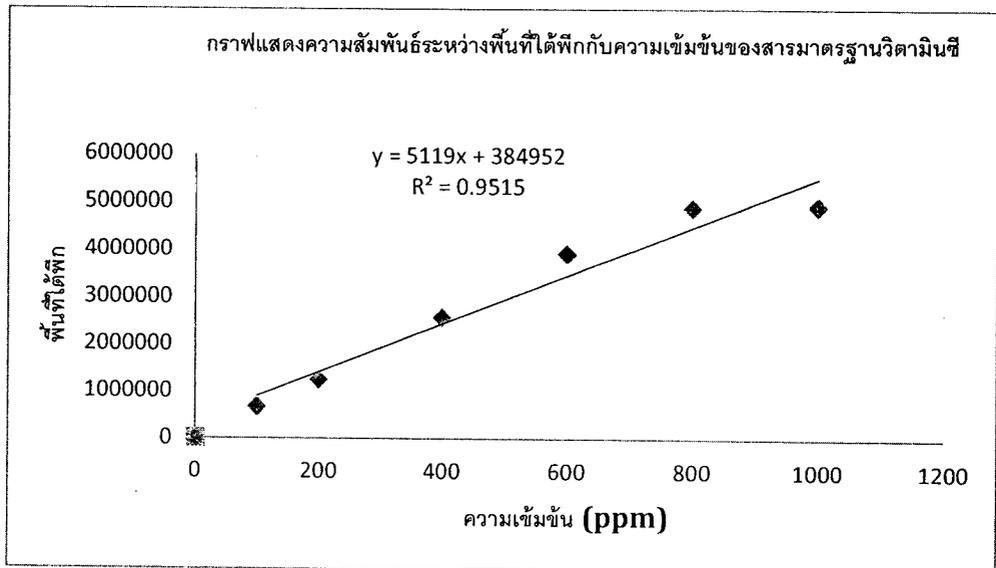
จากผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินซีต่อความเป็นเส้นตรง (Linearity) พบว่าค่ารีเทนชันใหม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้จากค่าเชิงสถิติที่แสดงในค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่มีค่าต่ำ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 600 และ 800 ppm พบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าเป็น 0

ตารางที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์ของพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานวิตามินซีที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ที่ค่อนข้างเป็นเส้นตรงเมื่อฉีดซ้ำ 3 ครั้ง และการเพิ่มขึ้นของพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยเทียบกับความเข้มข้นเป็นดังกราฟมาตรฐานในรูปที่ 4.7

ตารางที่ 4.12 แสดงค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี

ความ เข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค			ค่าเฉลี่ย (\bar{x})	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ร้อยละค่า เบี่ยงเบน มาตรฐาน สัมพัทธ์ (%RSD)
	ครั้งที่ฉีด					
	1	2	3			
100	679849	662577	647580	663335	13184	1.987
200	1260807	1274690	1203153	1246217	30973	2.485
400	2627778	2541171	2514402	2561117	48386	1.889
600	3903331	3985576	3857226	3915378	53086	1.355
800	4924480	4648530	5059512	4877507	171038	3.506
1000	5088851	5093550	4563051	4915151	284979	5.065

จากผลการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ค่าพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นที่ต่างกันของวิตามินซีได้ผลดังตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี

จากกราฟมาตรฐานพบว่าผลของความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานวิตามินซีด้วยอัตราส่วนของอะซิโตนไตรล์ต่อน้ำ 40:60 ร้อยละโดยปริมาตรได้สมการเส้นตรง $R^2 = 0.9515$ ซึ่งได้ค่าความเป็นเส้นตรงตามเกณฑ์ที่ยอมรับได้

สารละลายมาตรฐานกรดโคจิก แสดงผลจากผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกต่อความเป็นเส้นตรง (Linearity) พบว่าค่ารีเทนชันใหม่ไม่เปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้น ดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 แสดงค่ารีเทนชันใหม่ของสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก

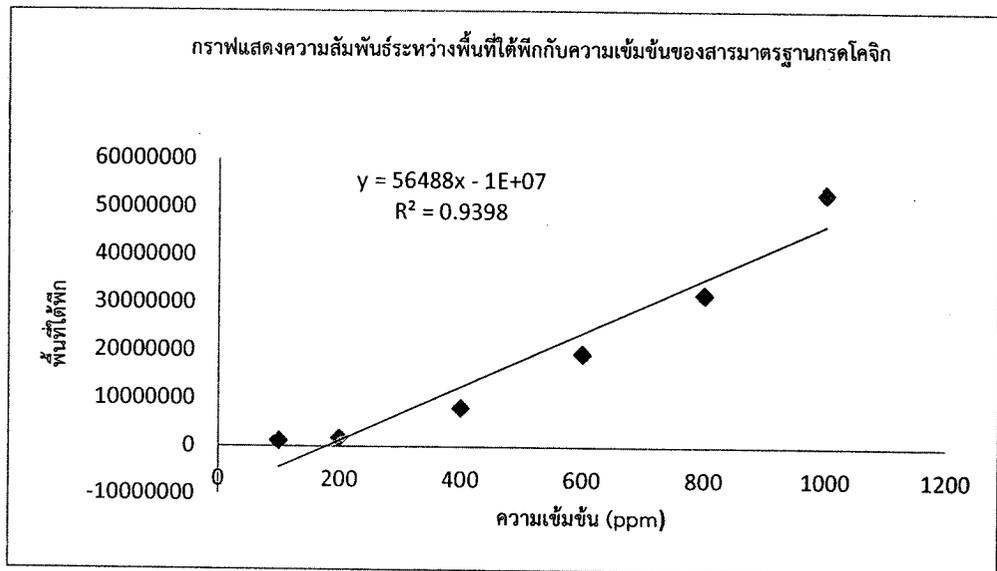
ความเข้มข้น (ppm)	ค่ารีเทนชันใหม่(t _r) (นาที)			ค่าเฉลี่ย (\bar{x}) (นาที)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)
	ครั้งที่ฉีด					
	1	2	3			
100	3.083	3.080	3.079	3.080	0.0017	0.0551
200	3.081	3.081	3.081	3.081	0	0
400	3.083	3.085	3.083	3.084	0.0009	0.0305
600	3.085	3.087	3.087	3.087	0.0009	0.0305
800	3.086	3.084	3.081	3.083	0.0020	0.0666
1000	3.083	3.083	3.083	3.083	0	0

จากตารางที่ 4.13 พบว่าที่ความเข้มข้น 200 และ 1000 ppm ในการฉีดทั้ง 3 ครั้ง ได้ค่ารีเทนชันใหม่คงเดิม ทำให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าเป็น 0

ตารางที่ 4.14 แสดงค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก

ความ เข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค			ค่าเฉลี่ย (\bar{x})	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ร้อยละค่า เบี่ยงเบน มาตรฐาน สัมพัทธ์ (%RSD)
	ครั้งที่ฉีด					
	1	2	3			
100	1191715	1205373	995631	1130906	95816	9.623
200	1634757	2102369	1453446	1703191	273381	18.809
400	7517248	8228391	8545880	8097173	430065	5.032
600	44819337	8982092	19097864	19433098	18043890	78.992
800	45060017	45224361	25515096	31933158	18680551	36.263
1000	17439353	78715842	63061752	53072316	25994149	41.220

ตารางที่ 4.14 แสดงความสัมพันธ์ของพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกกับพื้นที่ใต้พีคที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ซึ่งแสดงผลความเป็นเส้นตรงโดยการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ค่าพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของกรดโคจิกได้ที่รูป 4.8



รูปที่ 4.8 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก

จากกราฟมาตรฐานพบว่าผลของความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานกรดโคจิกด้วยอัตราส่วนของอะซิโตนไทรล์ต่อน้ำ 40:60 ร้อยละโดยปริมาตร ได้สมการเส้นตรง $R^2 = 0.9398$ ซึ่งได้ค่าความเป็นเส้นตรงตามเกณฑ์ที่ยอมรับได้

4.6 ผลของการหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจสอบ ลิมิตออฟดีเทคชัน (Limit of Detection;LOD) และลิมิตออฟควอนติเตชัน (Limit of Quantitation ;LOQ)

ในการหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด LOD และ LOQ เป็นการหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการทดลอง จากการวัดสัญญาณของสารที่ต้องการตรวจวัดกับสัญญาณรบกวน (noise) โดยการฉีดสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าได้ผลดังตารางที่ 4.15

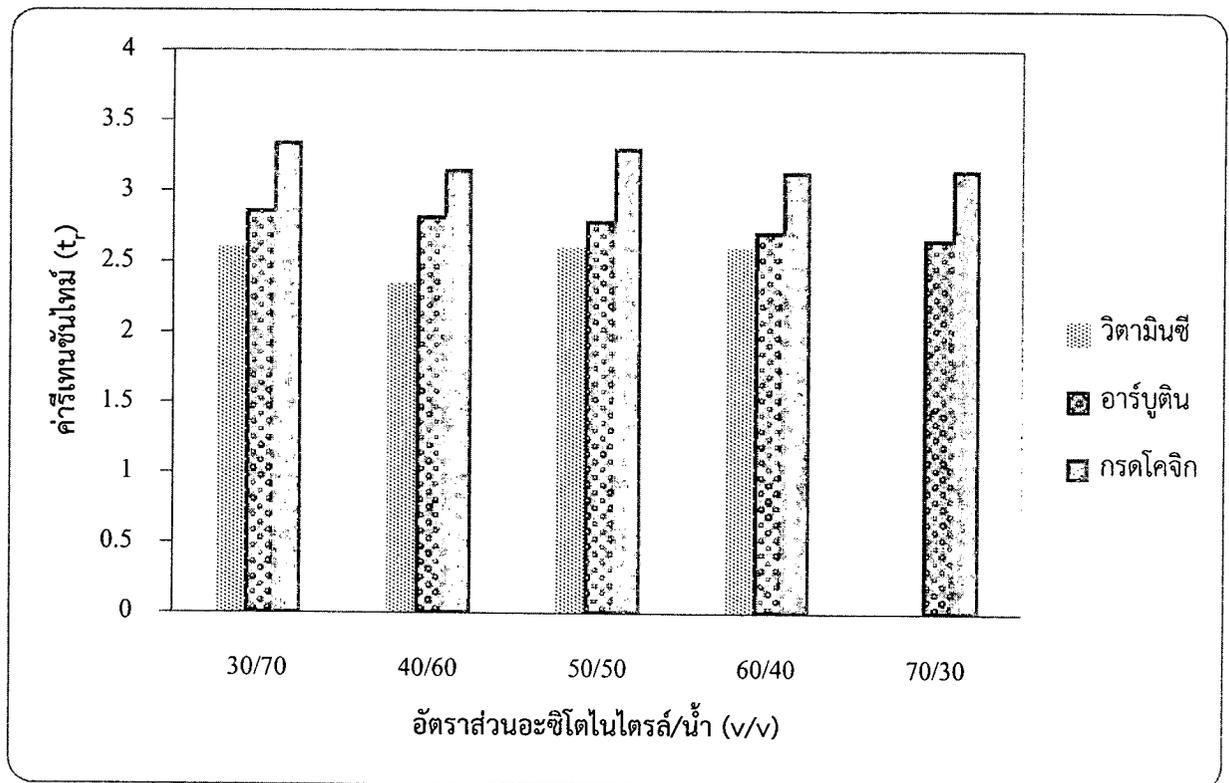
ตารางที่ 4.15 แสดงค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ของสารละลายมาตรฐาน วิตามินซี อาร์บูติน และกรดโคจิก

ค่า	วิตามินซี		อาร์บูติน		กรดโคจิก	
	มิลลิกรัม ต่อลิตร	(กรัมต่อ 100กรัม)	มิลลิกรัม ต่อลิตร	(กรัมต่อ 100กรัม)	มิลลิกรัม ต่อลิตร	(กรัมต่อ 100 กรัม)
LOD (\bar{x})	2.307	0.023	1.611	0.017	1.580	0.016
LOQ (\bar{x})	7.692	0.077	5.370	0.053	5.267	0.053

จากผลการทดลองหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวัด ลิมิตออฟดีเทคชัน (Limit of Detection; LOD) และลิมิตออฟควอนตีเตชัน (Limit of Quantitation ; LOQ) พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถวัดได้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

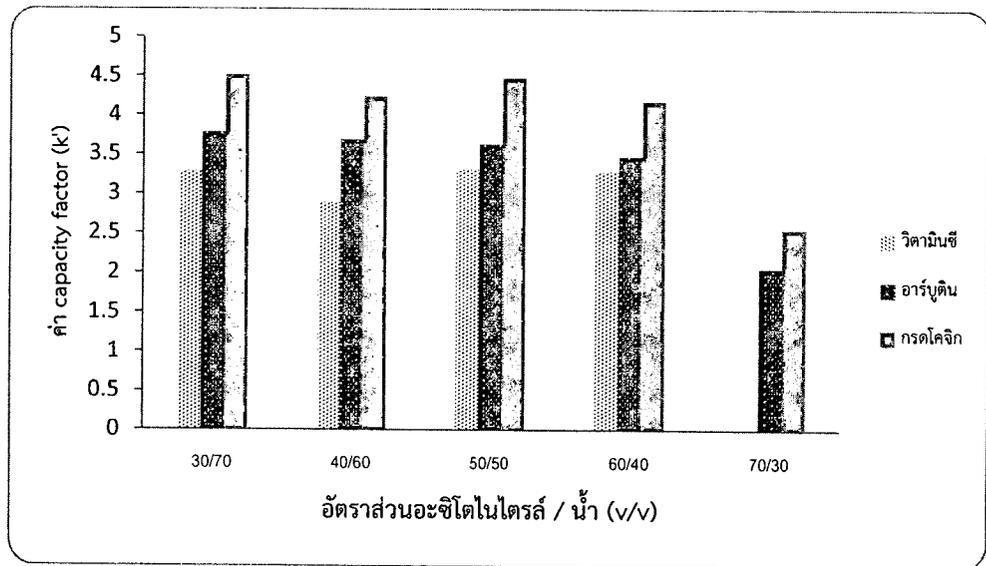
4.7 ผลการวิเคราะห์อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไนโตรล์ต่อน้ำ

อัตราส่วนของอะซิโตนไนโตรล์และน้ำมีผลต่อพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟี ซึ่งทำให้ค่าที่แตกต่างกันเมื่อปรับอัตราส่วน ได้แก่ ค่า Retention time (t_r) ค่า Capacity factor (k') ค่า Separation factor (α) ค่า Resolution (R_s) และค่า Column efficiency (N) ผลการแสดงความสัมพันธ์กับตัวแปรดังกล่าว แสดงในรูปที่ 4.9



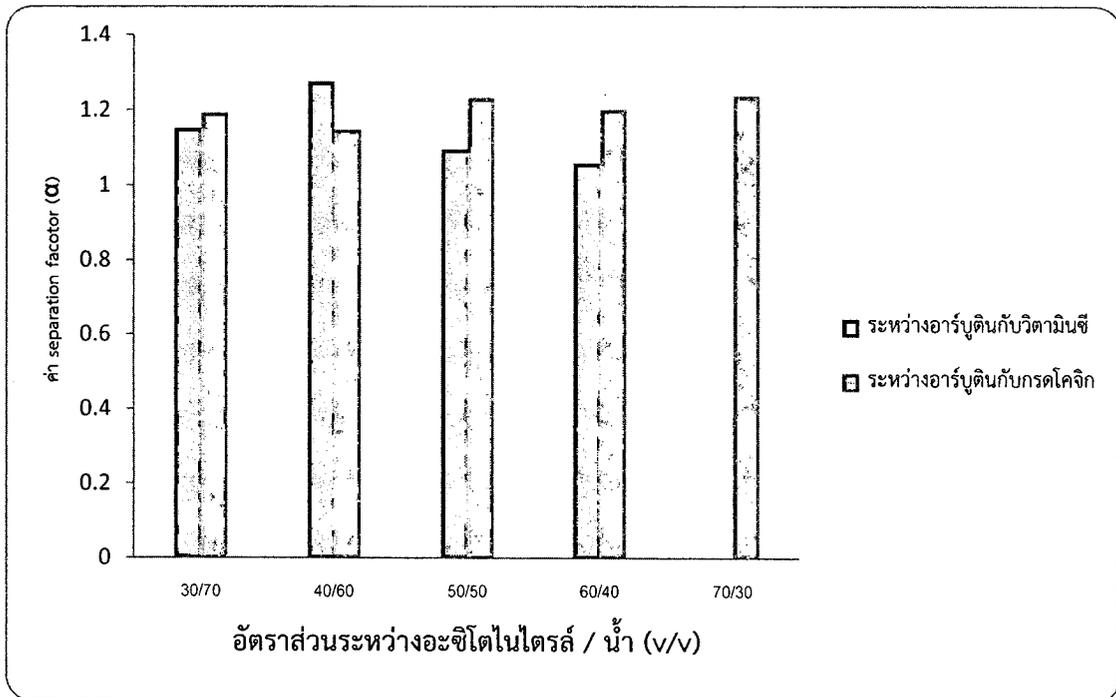
รูปที่ 4.9 ภาพแผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรโซลต่อน้ำกับค่า t ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูติน และกรดโคจิก

จากภาพแผนภูมิแท่งพบว่าค่า t ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิก ออกมาที่เวลาต่างกันตามอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรโซลต่อน้ำที่แตกต่างกัน ซึ่งสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกใช้เวลานานที่สุดในการถูกชะออกนอกคอลัมน์ และที่ความมีขี้ของเฟสเคลื่อนที่ลดลง (มีปริมาณน้ำลดลง) พบว่าสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก และวิตามินซี ไม่มีความเปลี่ยนแปลงของค่ารีเทนชันใหม่มากนัก แต่ที่อัตราส่วน 70/ 30 ร้อยละโดยปริมาตร ไม่สามารถแยกพิกของวิตามินซีและอาร์บูตินออกจากกันได้ เนื่องด้วยคอลัมน์ที่ใช้เป็นคอลัมน์ C_{18} ซึ่งมีความมีขี้ต่ำ และเฟสเคลื่อนที่คืออัตราส่วนของสารที่มีขี้ สารที่ออกมาช้าแสดงว่ามีความมีขี้ต่ำ และเมื่อลดความมีขี้ลง สารจะออกมาเร็วขึ้น



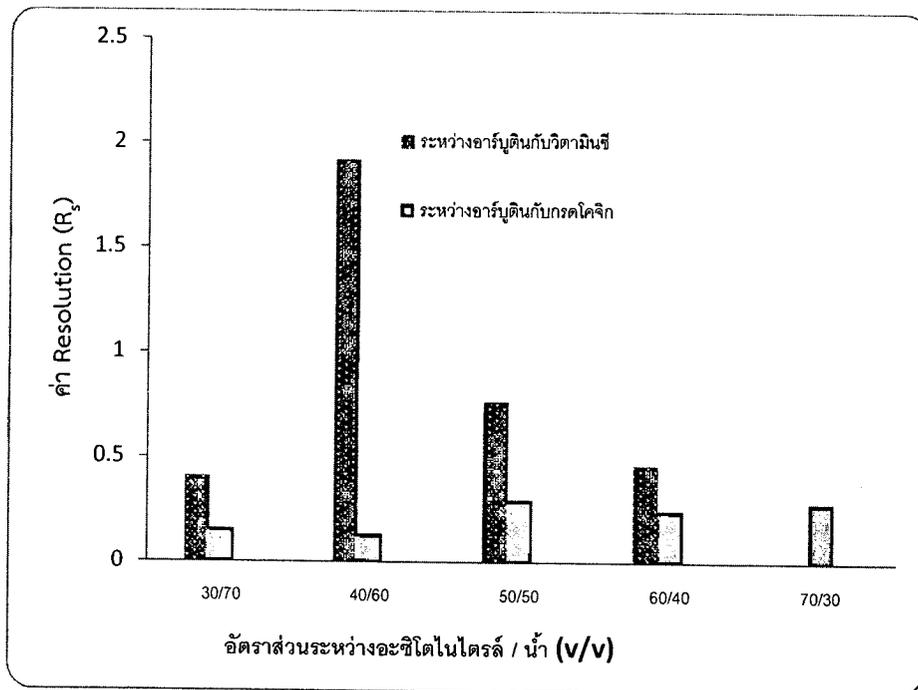
รูปที่ 4.10 ภาพแผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรรล์ต่อน้ำกับค่า k' ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูติน และกรดโคจิก

จากรูปที่ 4.10 ภาพแผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ของค่า k' กับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ พบว่าแนวโน้มจะไม่แตกต่างจากค่ารีเทนชันใหม่ เมื่อลดอัตราส่วนของน้ำลง ความมีขี้ของเฟสเคลื่อนที่ลดลงส่งผลต่อค่า k' ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิกก็จะลดลงตามไปด้วยซึ่งค่าของ k' ที่ดีควรอยู่ในช่วง 1-10



รูปที่ 4.11 ภาพแผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรรล์ต่อน้ำกับค่า α ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูติน และกรดโคจิก

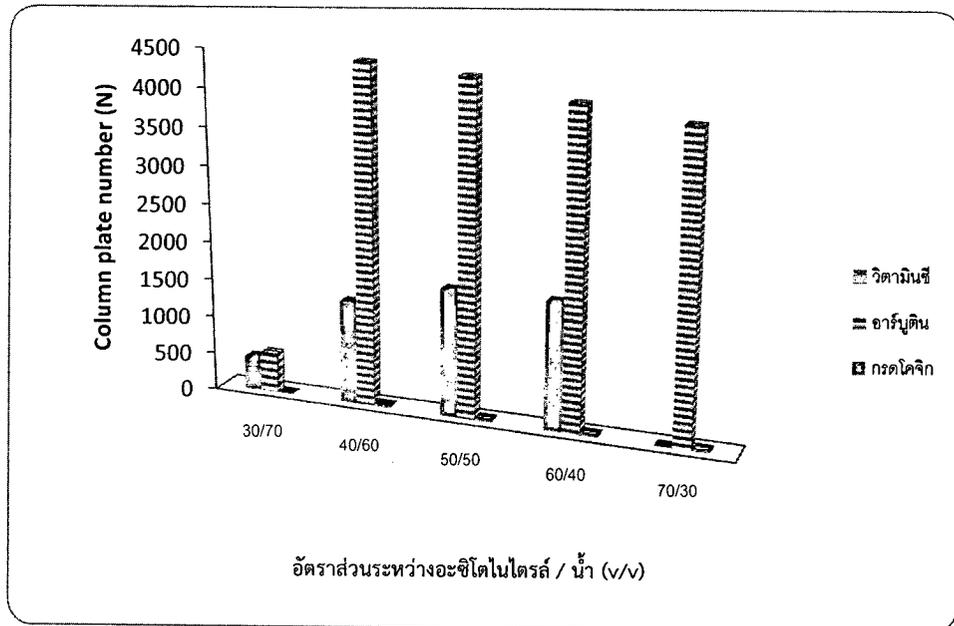
จากรูปที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรรล์ต่อน้ำกับค่า α ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิกเมื่อเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณของน้ำจะทำให้ระยะห่างระหว่างพีกของอาร์บูตินกับวิตามินซีเพิ่มขึ้นที่สภาวะ 40:60 และลดลงตั้งแต่ 50 เปอร์เซ็นต์ของอะซิโตนไตรรล์ และมีค่า α สูงที่สุดที่อัตราส่วน 40:60 ส่วนระยะห่างระหว่างสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินกับกรดโคจิก มีค่า α สูงที่สุดที่อัตราส่วน 70:30 จากค่า α ที่เปลี่ยนแปลงนี้ แสดงให้เห็นว่าควรปรับอัตราส่วนให้เหมาะสม ระยะห่างระหว่างพีกที่น้อยอาจแสดงให้เห็นว่าพีกอาจแยกไม่สมบูรณ์ และค่าระยะห่างที่มากอาจทำให้เสียเวลาในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.12 ภาพแผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรลต่อน้ำกับค่า R_s ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูติน และกรดโคจิก

จากรูปที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตน

ไตรลต่อน้ำกับค่า R_s ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูติน และกรดโคจิก พบว่าค่า R_s ระหว่างพีกของอาร์บูตินและวิตามินซี ที่อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรลต่อน้ำ 40:60 มีค่า R_s มากกว่า 1.25 แสดงว่าความสามารถในการแยกออกจากกันของพีกอาร์บูตินและวิตามินซีมีค่าดีที่สุด ส่วนเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนระหว่างอะซิโตนไตรลต่อน้ำ 30:70, 50:50, 60:40 และ 70:30 การแยกของพีกอาร์บูตินและวิตามินซีมีค่า R_s น้อยกว่า 1.25 ส่วนการแยกของพีกระหว่างพีกของอาร์บูตินและกรดโคจิกมีค่าต่ำกว่า 1.25 ทั้งหมด เนื่องจากพีกของกรดโคจิกมีค่าความกว้างของพีกมากทำให้ค่า R_s มีค่าต่ำแม้ว่าจะเกิดการแยกของพีกออกจากกันชัดเจนก็ตาม การเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้คือเมื่อลดความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรลต่อน้ำลง พบว่า ค่า R_s ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดนี้จะลดลงตามไปด้วย ค่า R_s ของพีกอาร์บูตินกับวิตามินซีมีค่าสูงสุดที่อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรลต่อน้ำ 40:60 ซึ่งเป็นค่าที่ดีที่สุดจึงเหมาะสมที่จะนำมาวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดนี้



รูปที่ 4.13 ภาพแผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรล์ต่อน้ำกับค่า N ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูติน และกรดโคจิก

จากรูปที่ 4.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไตรล์ต่อน้ำกับค่า N ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูติน และกรดโคจิก ซึ่งเป็นจำนวนเพลตทางทฤษฎีนั้นหมายถึงถ้าค่า N มีค่ามากก็แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของการแยกของสารต่อเฟสเคลื่อนที่ในคอลัมน์นั้นสูง หมายถึงจำนวนเพลตในการแยกมีค่ามาก จะสังเกตแถบของการแยกหรือความกว้างของพีคมีค่าน้อย แต่ถ้า N มีค่าน้อยนั้นคือคอลัมน์จะมีประสิทธิภาพน้อยลงตามไปด้วย และจากค่าที่แสดงพบว่าสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกมีค่า N ที่ต่ำมาก ซึ่งเป็นข้อสังเกตว่าถ้าพีคใดที่มีลักษณะความกว้างของพีคมาก จะให้ค่า N ต่ำ กว่าพีคที่มีความกว้างของพีคน้อย เช่น พีคของอาร์บูติน จะมีค่า N มากกว่าพีคของวิตามินซีและพีคของกรดโคจิก

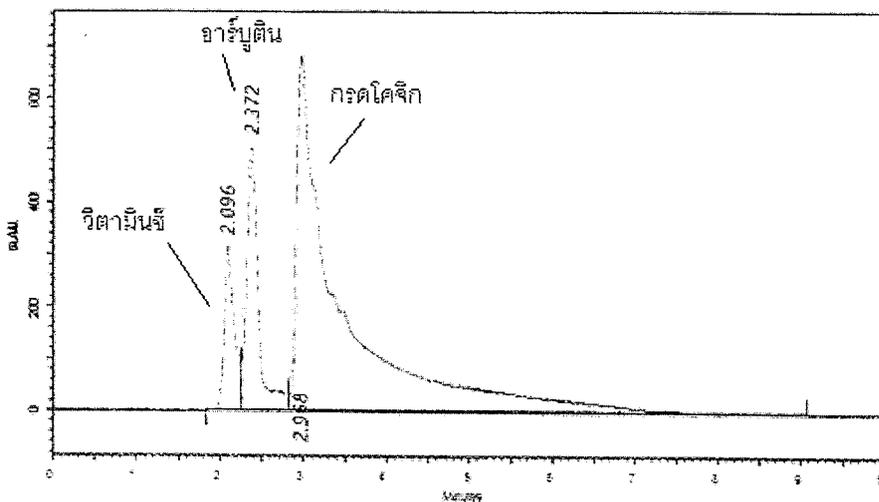
4.8 ผลการทดสอบวิธีการวิเคราะห์กับสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

หลังจากที่ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารต้านการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนสหลายชนิดพร้อมกันแล้วนั้น ได้มีการทดสอบวิธีการที่พัฒนาที่ดีที่สุดด้วยการฉีดสารตัวอย่างสกัดหยาบของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในสภาวะที่ดีที่สุดดังนี้

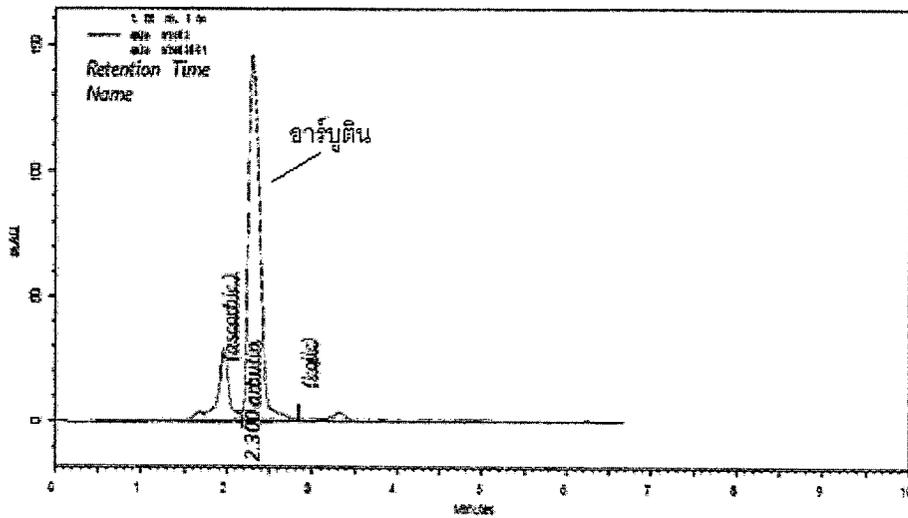
สภาวะที่ใช้ คือ

1. คอลัมน์ (Column) ; Inertsil® ODS-3; 4.6 x 250 mm ,5 μm
2. ดีเทคเตอร์ (Detector) ; Diode Array Detector ที่ความยาวคลื่น 220 nm
3. ซอฟต์แวร์ (Software) ; Class VP 5
4. อุณหภูมิ (Temperature) ; 35 องศาเซลเซียส
5. อัตราการไหล (Flow rate) ; 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที
6. ปริมาตรที่ฉีด (Injection volume) ; 20 ไมโครลิตร
7. เฟสเคลื่อนที่ : อัตราส่วนอะซิโตนไตรรล์ : น้ำที่ 40 : 60 ร้อยละโดยปริมาตร

นำสารละลายผสมของสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน กรดโคจิก และวิตามินซี ฉีดลงใน HPLC ในสภาวะดังกล่าวข้างต้น ได้ผลดังรูปที่ 4.14

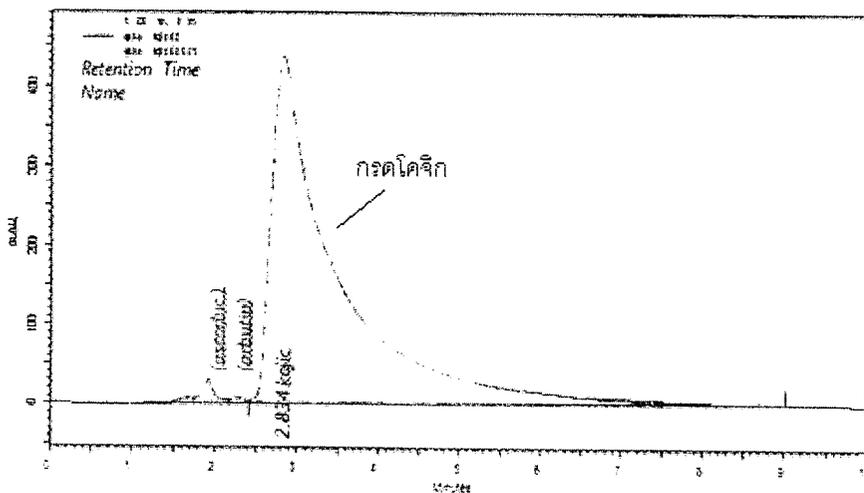


รูปที่ 4.14 โครมาโทแกรมของสารผสมอาร์บูติน กรดโคจิกและวิตามินซี ที่อัตราส่วนอะซิโตนไตรรล์ต่อน้ำคือ 40 : 60 (v/v) คอลัมน์ Inertsil® ODS-3; 4.6x 250 mm ,5 μm อุณหภูมิคอลัมน์ 35 °C



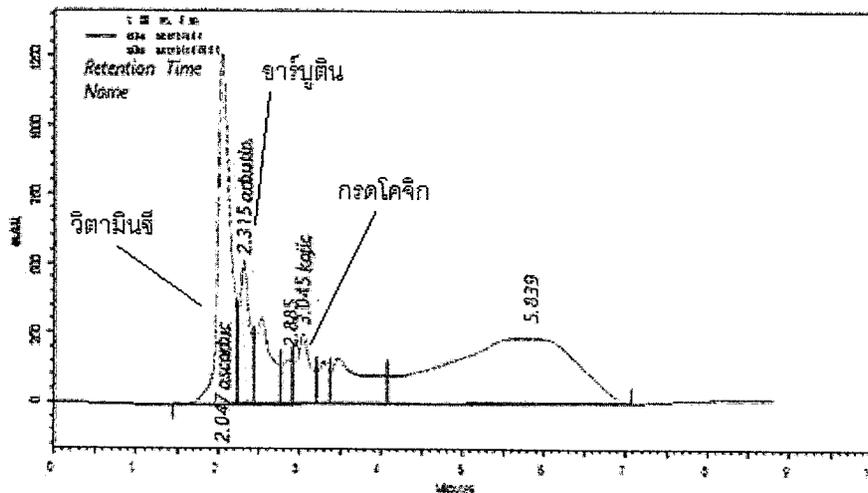
รูปที่ 4.16 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบเกสรอินทผลัมที่เติมสารมาตรฐานอาร์บูติน

สารตัวอย่างสกัดหยาบเกสรอินทผลัมได้ถูกเติมสารมาตรฐานอาร์บูตินและวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ HPLC ตามสภาวะเดิม พบว่าสังเกตเห็นพีคของอาร์บูตินชัดเจน ที่ตำแหน่งรีเทนชันไทม์ 2.30 นาที จากนั้น จึงลองทำการเติมสารมาตรฐานกรดโคจิกลงไปในสารตัวอย่างสกัดหยาบเกสรอินทผลัม พบผลการทดลองดังรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบเกสรอินทผลัมที่เติมสารมาตรฐานกรดโคจิก

จากรูปที่ 4.17 สารตัวอย่างสกัดหยาบเกสรอินทผลัมได้ถูกเติมสารมาตรฐานกรดโคจิก และชั้นพีคของกรดโคจิกที่ 2.834 นาที และจากนั้นได้ทำการทดลองโดยการเติมสารมาตรฐาน วิตามินซีลงในสารตัวอย่างสกัดหยาบเกสรอินทผลัม ได้ผลดังรูปที่ 4.18

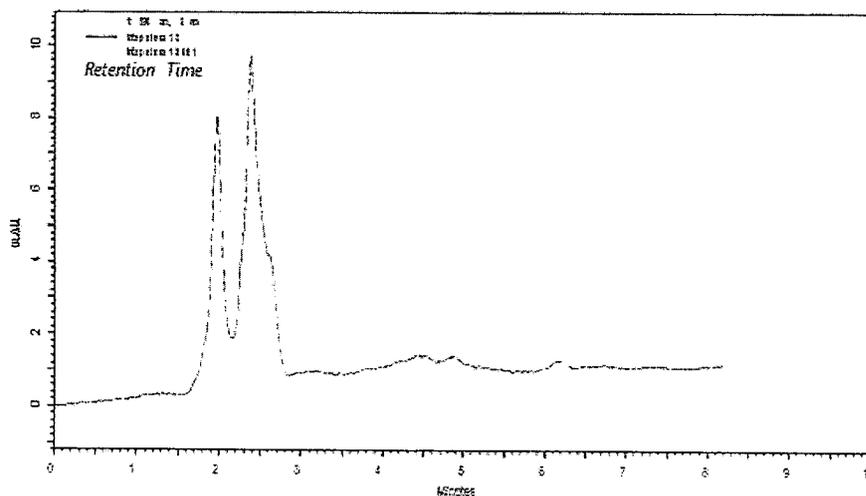


รูปที่ 4.18 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบเกสรอินทผลัมที่เติมสารมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิก

รูปที่ 4.18 สารตัวอย่างสกัดหยาบเกสรอินทผลัมที่เติมสารมาตรฐานวิตามินซี กรดโคจิก และอาร์บูตินลงไป พบพีคของสารทั้ง 3 ชนิดชัดเจน แสดงให้เห็นว่าวิธีการที่พัฒนาเพื่อวิเคราะห์ สารกลุ่มต้านอนุมูลอิสระทั้งสามชนิดพร้อมกันด้วยวิธี HPLC สามารถดำเนินการได้กับสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยที่สามารถแยกสารทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้

จากรูปที่ 4.14 เป็นการทดสอบวิธีการจากการพัฒนาอีกครั้ง แต่เวลาที่ใช้ในการทดลองแตกต่างกันออกไป ได้ลองใช้คอลัมน์ที่ใช้เป็นคอลัมน์กับวิธีการที่ทดสอบ แต่เป็นชนิด Inertsil® ODS-3; 4.6x 250 mm ,5 µm เดียวกันทุกประการ และสภาวะที่ใช้ในการทดลองเหมือนเดิมทุกประการเช่นกัน ผลการทดลองสามารถยืนยันลำดับการชะได้เหมือนเดิมแต่ค่ารีเทนชันใหม่มีการเปลี่ยน สารที่วิเคราะห์ออกมาจากคอลัมน์เร็วขึ้นเล็กน้อย ทำให้สมมติฐานด้านการเกิดอันตรกิริยาของสารยังเหมือนเดิม

เมื่อนำสารตัวอย่างสกัดหยาบเกสรอินทผลัม 1200 ppm ฉีดใน HPLC พบว่าได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบเกสรอินทผลัม ที่อัตราส่วนอะซิโตไนโตรลล์ต่อน้ำคือ 40 : 60 (v/v) คอลัมน์ Inertsil® ODS-3; 4.6x 250 mm ,5 µm อุณหภูมิคอลัมน์ 35 °C

จากรูปที่ 4.15 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบที่มีค่ารีเทนชันใหม่ในตำแหน่งไม่ตรงกับสารวิตามินซี อาร์บูติน และกรดโคจิก แสดงว่าสารสกัดหยาบเกสรอินทผลัมชนิดนี้ไม่มีสารทั้ง 3 ชนิดนี้อยู่ หากการทดสอบวิธีการได้ทำการเดิมสารมาตรฐานทั้ง 3 ลงไปในสารตัวอย่างสกัดหยาบนี้ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ารีเทนชันใหม่กับค่า k' , α , R_s และค่า N ของสารตัวอย่างสกัดหยาบอินทผลัมที่เติมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี อาร์บูตินและกรดโคจิก ที่อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ อะซิโตไนโตรลต์่อน้ำ ; 40 : 60 (v/v) ด้วยคอลัมน์ Inertsil® ODS-3; 4.6x 250 mm ,5 μ m อุณหภูมิคอลัมน์ 35 °C

สารมาตรฐาน	ค่ารีเทนชันใหม่(t_r) (นาที)	ค่า k'	ค่า α	ค่า R_s	ค่า N
วิตามินซี	2.096	2.447	} 1.185 } } 1.338 }	} 0.3312 } } 0.596 }	439.3216
อาร์บูติน	2.372	2.901			2250.5536
กรดโคจิก	2.968	3.882			1566.04871

หมายเหตุ: $t_0 = 0.604$ คอลัมน์ที่ใช้ Inertsil® ODS-3; 4.6x 250 mm ,5 μ m

จากตารางที่ 4.16 เป็นการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ของโครมาโตกราฟี ค่า k' มีค่าอยู่ในช่วงที่สารค่อนข้างออกมาเร็ว แต่ไม่เร็วจนเกินไป และสารทั้ง 3 ชนิดมีค่าของ α ที่ไม่ห่างจากกันมาก แต่ก็ค่อนข้างจะใกล้มาก ค่า α ที่มีค่ามากจะบอกถึงระยะห่างระหว่างพีกที่ติดกันว่ามีค่าต่างกันมากหรือน้อยเพียงใด ระยะห่างของพีกของวิตามินซีและอาร์บูตินมีค่าน้อยกว่าระยะห่างระหว่างพีกของอาร์บูตินและกรดโคจิก