

บทที่ 2

วิธีการทดลองและผลการทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. UV - 265 ของบริษัท Shimadzu
2. Dual wavelength flying spot scanning densitometer รุ่น CS - 9301 PC ของบริษัท Shimadzu
3. เครื่องชั่งสารอย่างละเอียดที่ตำแหน่งรุ่น BP 210S ของบริษัท Sartorius Ag
Gottingen, Germany

2.2 สารเคมี

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| 1. rotenone | ของบริษัท SIGMA |
| 2. chloroform | ของบริษัท Fluka Switzerland |
| 3. methanol | ของบริษัท Fluka Switzerland |
| 4. caffeine | ของบริษัท Merck |
| 5. silica gel 60 F ₂₅₄ | ของบริษัท Merck |

ตัวทำละลายทำการกลั่นก่อนใช้เสมอ

2.3 สมุนไพรและตัวอย่างยาจากสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

2.3.1 สมุนไพรที่ใช้ แสดงในตาราง 2.1

ตาราง 2.1 แสดงสมุนไพรและส่วนของสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

สมุนไพร	ส่วนที่ใช้ในการทดลอง
1. ขี้เหล็ก (<i>Cassia siamea</i> Lamk.)	ใบแก่และใบอ่อน(สด)
2. ฟ้าทะลายโจร (<i>Andrographis paniculata</i> .)	ใบแก่และใบอ่อน(สด)
3. ขมิ้นชัน (<i>Curcuma longa</i> Linn.)	เหง้า(สด)
4. มะแว้งเครือ (<i>Solanum trilobatum</i> Linn.)	ผลแก่และผลอ่อน(สด)
5. ใบไม้ก๊วย (<i>Ginkgo biloba</i> L.)	ใบที่ตากแห้งแล้ว
6. มะขามแขก (<i>Cassia acutifolia</i> Delile.)	ใบที่ตากแห้งแล้ว
7. รางจืด (<i>Thunbergia laurifolia</i> Lindl.)	ใบแก่และใบอ่อน(สด)

2.3.2 ตัวอย่างยาจากสมุนไพร แสดงในตาราง 2.2

ตาราง 2.2 แสดงชื่อยาสมุนไพร , ห้างร้าน บริษัทผู้ผลิต , lot . no และวัน เดือน ปี ที่ผลิต
ตัวอย่างยาจากสมุนไพร

ชื่อตัวอย่างสมุนไพร	ห้างร้านที่จำหน่ายหรือบริษัทผู้ผลิต	lot . no.	วัน / เดือน / ปี ที่ผลิต
1. Barakol	องค์การเภสัชกรรม	TCR 015	03 / 12 / 99
2. ยาขี้เหล็ก	ชุมชนปทุมมอโสภ อ.เมือง จ.นครปฐม	—	12 / 05 / 00
3. ฟ้าทะลายโจรแคปซูล	บริษัทผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทย จำกัด	CFT 011	05 / 03 / 99
4. ยาเม็ดฟ้าทะลายโจร	ห้างขายยา ตราใบห่อ	—	15 / 07 / 99
5. ขมิ้นชันแคปซูล	บริษัทผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทย จำกัด	CTU 032	15 / 11 / 99
6. ขมิ้นชันแคปซูล	องค์การเภสัชกรรม	Z.112002	5 / 12 98
7. ฟิตเน่ พลัส สารสกัด จากใบไม้ก๊วย จี ไวส์	บริษัทนิวคอนเซพท์ โปรดักท์ จำกัด	—	02 / 02 / 99
8. Ginkgo biloba เครื่องดื่ม สมุนไพรเพื่อสุขภาพ	ชุมชนปทุมมอโสภ อ.เมือง จ. นครปฐม	—	04 / 01 / 00

ชื่อตัวอย่างยาสมุนไพร	ห้างร้านที่จำหน่ายหรือบริษัทผู้ผลิต	lot . no.	วัน / เดือน / ปี ที่ผลิต
9. ยาขงสมุนไพรตราพิตเน่ (จากมะขามแขก)	บริษัทนิวคอนเซพท์ โปรดักท์ จำกัด	430414	08 / 04 / 00
10. ยาขงมะขามแขก	ชุมชนปทุมมอโสศ อ.เมือง จ.นครปฐม	12	02 / 05 / 00
11. ขาสมุนไพรรางจืด	บริษัทเอกสมุนไพร จำกัด	0243	21 / 01 / 00
12. ขาสมุนไพรรางจืด	อี . เอ. อาร์	—	—

*หมายเหตุ เครื่องหมาย — หมายถึง ไม่ได้ระบุไว้บนฉลากยา

2.4 ตัวอย่างชาและกาแฟที่ใช้ในการทดลอง แสดงในตาราง 2.3

ตาราง 2.3 บริษัทผู้ผลิต และ วัน เดือน ปี ที่ผลิตตัวอย่างชาและกาแฟ

ชื่อตัวอย่างชาและกาแฟ	บริษัทผู้ผลิต	วัน เดือน ปี ที่ ผลิต
1. ใบชา ตราสามม้า	บริษัทห้างใบชาอู๋ ปอกี้ จำกัด	6 / 98
2. ชาผงลิปตัน ชนิดซองฉลากสีเหลือง	บริษัท รอยโก้ฟู้ดส์ (ประเทศไทย) จำกัด	11 / 05 / 00
3. กาแฟอิมบูญ (กาแฟผงแห้งคั่ว)	ศูนย์สินค้าเพื่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม	—
4. กาแฟสำเร็จรูปที่สกัดคาเฟอีนออก ตราเตสเตอร์ชอย (Taster's choice)	บริษัทเดอะเนสเล่ คอมพานี อิงค์ จำกัด ไวท์เพลนส์ นิวยอร์ก สหรัฐอเมริกา	20 / 11 / 99

*หมายเหตุ เครื่องหมาย — หมายถึง ไม่ได้ระบุไว้บนฉลากยา

2.5 การทดลองและผลการทดลอง

2.5.1 การเปรียบเทียบ ลายแบบโครมาโทกราฟี (chromatographic fingerprint) ของสมุนไพรสดกับตัวอย่างยาจากสมุนไพร

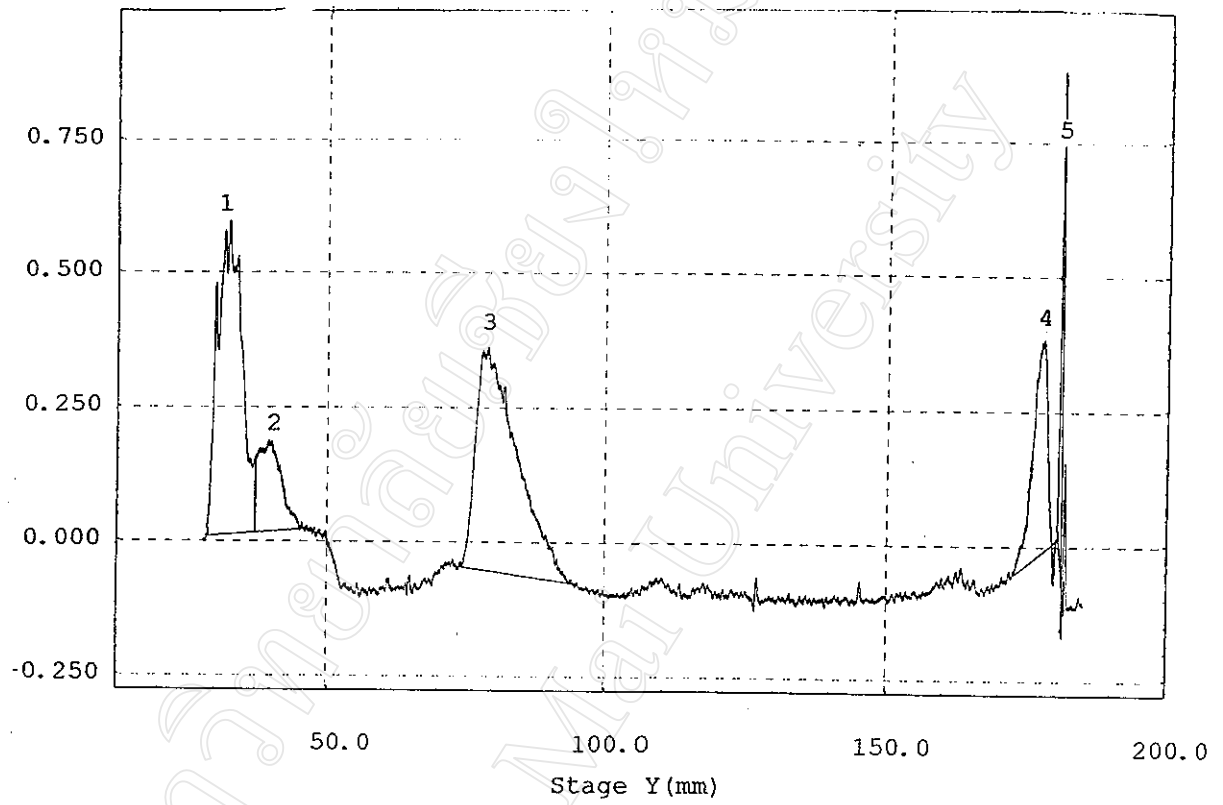
2.5.1.1 นำสมุนไพรสด ตัวอย่างที่ 1 - 5 และ 7 และตัวอย่างยาจากสมุนไพรที่ 1 - 13 มาอย่างละ 10 กรัม บดให้ละเอียดแล้วสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยแช่ให้ท่วมและทิ้งไว้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองและระเหยให้แห้ง จากนั้นจึงนำสารสกัดที่ได้ spot บน แผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (thin layer chromatography plate) ที่เคลือบด้วย silica gel 60 F₂₅₄ แล้วชะด้วย developing solvent ที่เหมาะสม ดังตาราง 2.4

ตาราง 2.4 แสดงตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสมุนไพรสด ตัวอย่างยาจากสมุนไพรและ developing solvent ที่เหมาะสม

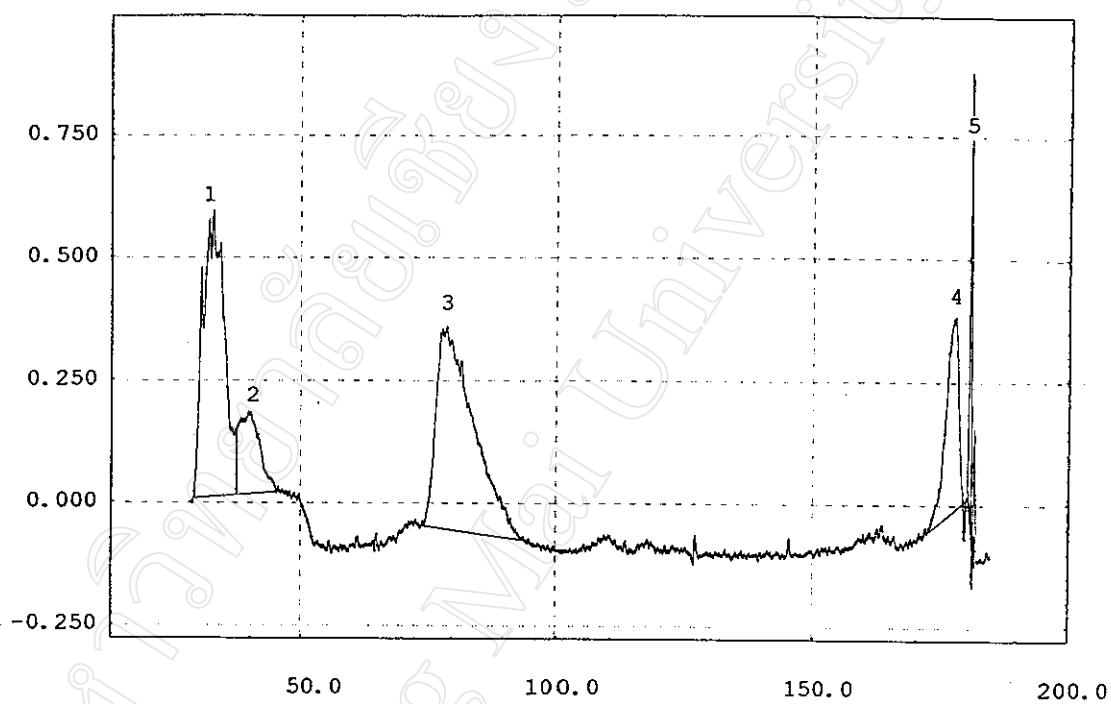
สมุนไพรและยาจากสมุนไพร	ตัวทำละลาย	Developing solvent
1. ขี้เหล็ก	methanol	ethyl acetate : methanol : ethanol : water 40.5 : 5.5 : 2 : 4
2. ฟ้าทะลายโจร	ethanol	diethyl ether : chloroform : ethyl acetate : hexane : methanol 10 : 8 : 4 : 6 : 1
3. ขมิ้นชัน	ethanol	chloroform : ethanol : glacial acetic acid 95 : 5 : 1
4. มะแว้งเครือ	ethanol	chloroform : toluene 55 : 45
5. เปราะก้วย	ethanol	chloroform : methanol : acetone 9 : 4 : 3
6. มะขามแขก	methanol	ethyl acetate : methanol : water 100 : 17 : 13
7. รากจืด	ethanol	ethyl acetate : methanol : water 7 : 1 : 1

ส่วนสมุนไพร ชนิดที่ 6 คือ มะขามแขก บดให้ละเอียด เติมน้ำตาลลงไปพอท่วม แล้วทำให้ร้อนใน waterbath จนกระทั่งเดือด จากนั้นทำให้เย็นลงและ centrifuge กรองแล้วนำสารที่กรองได้ไประเหยให้แห้ง นำมาทำโครมาโทกราฟีผิวบาง (thin layer chromatography)

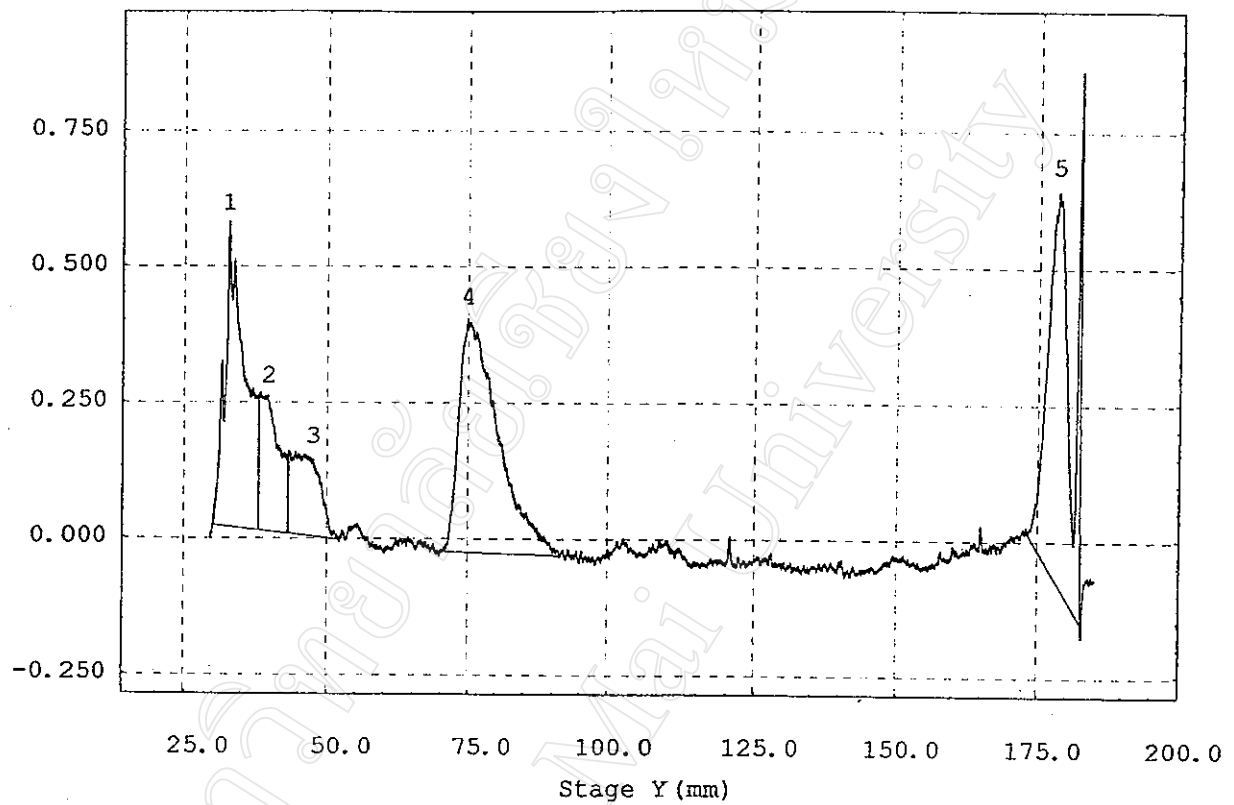
2.5.1.2 นำแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (thin layer chromatography plate) (ในข้อ 2.5.1.1) มาศึกษาลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) โดยใช้เดนสิโตมิเตอร์ (densitometer) ได้ผลดังรูป 2.1 - 2.23



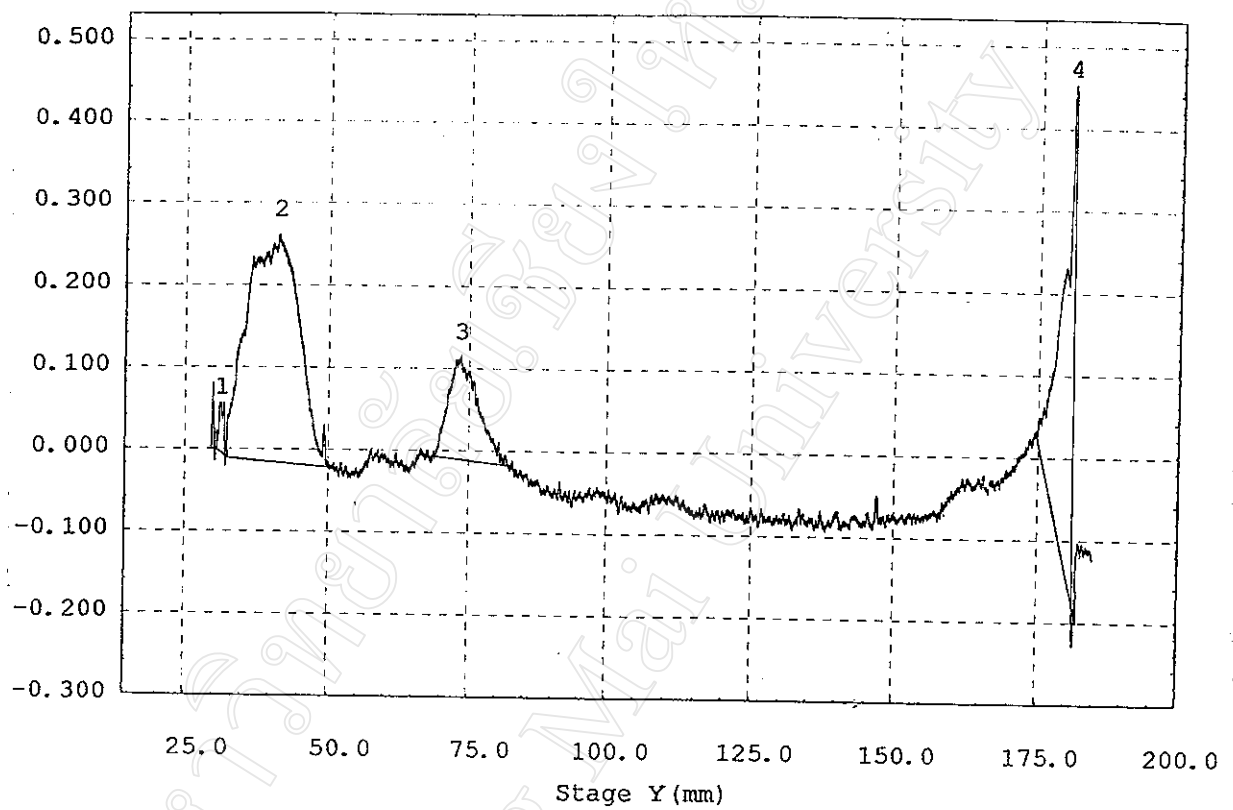
รูป 2.1 ลายแบบโครมาโทกราฟี (chromatographic fingerprint) ของขี้เหล็ก(ใบแก่)
ที่ความยาวคลื่น 365 nm



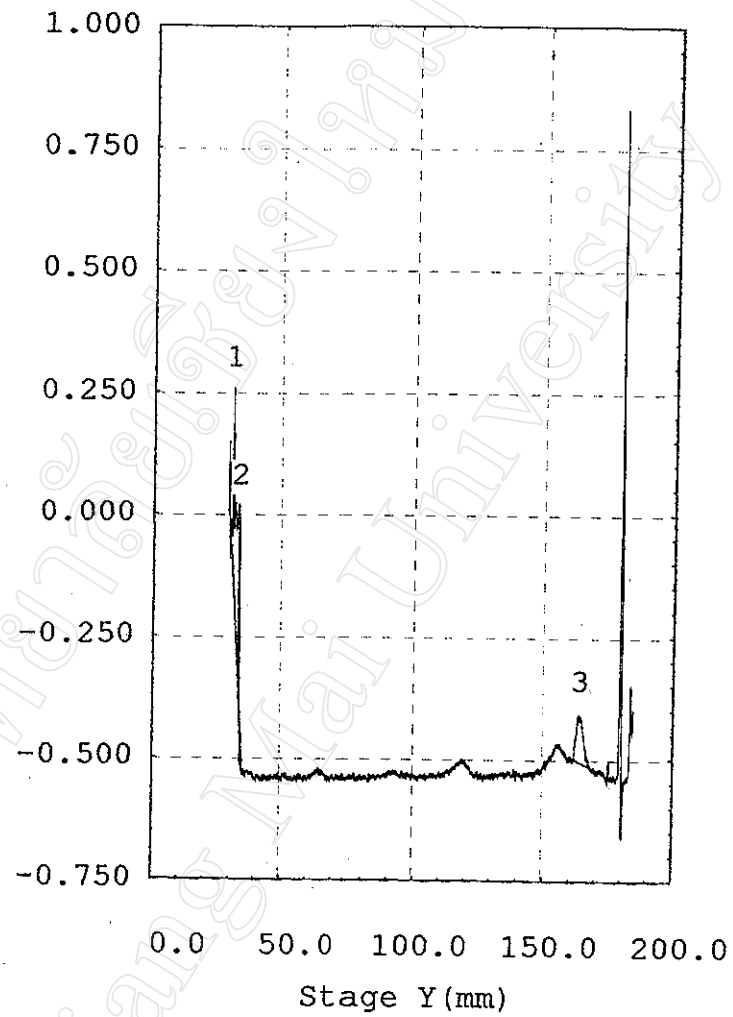
รูป 2.2 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของขี้เหล็ก(ใบอ่อน)
ที่ความยาวคลื่น 365 nm



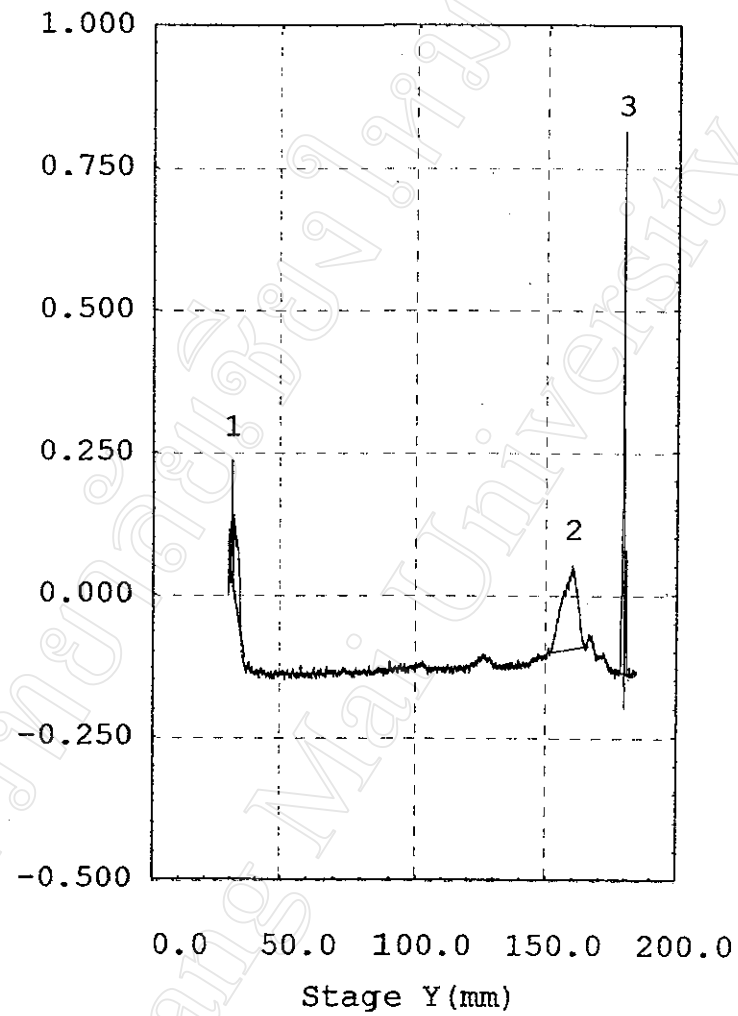
รูป 2.3 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของยา barakol ของ
องค์การเภสัชกรรม lot.no. TCR 015 (วัน / เดือน / ปี ที่ผลิต คือ 13 / 12 / 99)
ที่ความยาวคลื่น 365 nm



รูป 2.4 ลายแบบโครมาโทกราฟี (chromatographic fingerprint) ของยาเม็ดจีเหิล็ก ของ
 ชุมชนปฐมอโศก อ.เมือง จ.นครปฐม (วัน / เดือน / ปี ที่ผลิต คือ 12 / 05 / 00)
 ที่ความยาวคลื่น 365 nm



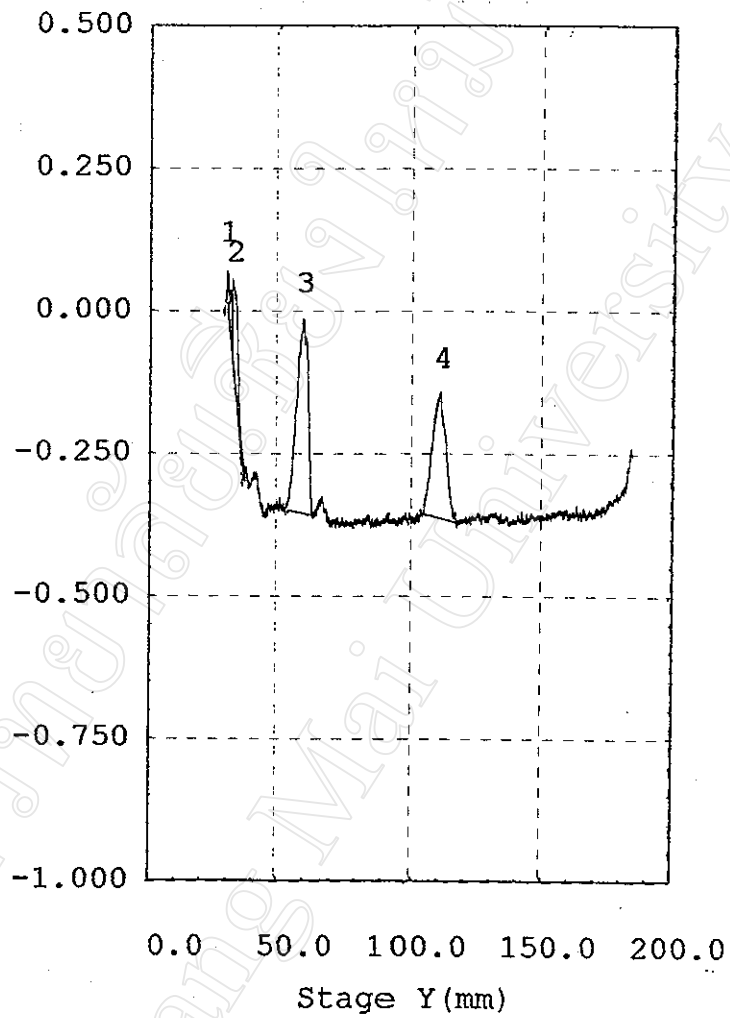
รูป 2.5 ลายแบบโครมาโทกราฟี (chromatographic fingerprint) ของฟ้าทะลายโจร (ใบแก่)
ที่ความยาวคลื่น 254 nm



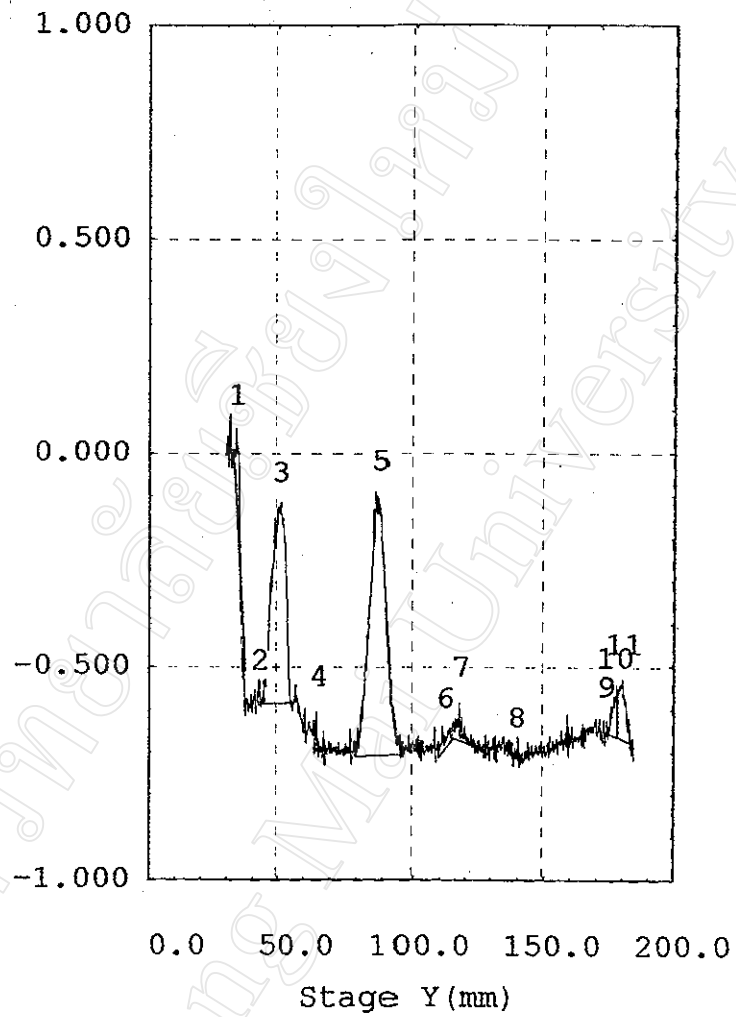
รูป 2.6 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของฟ้าทะลายโจร(ใบอ่อน)
ที่ความยาวคลื่น 254 nm



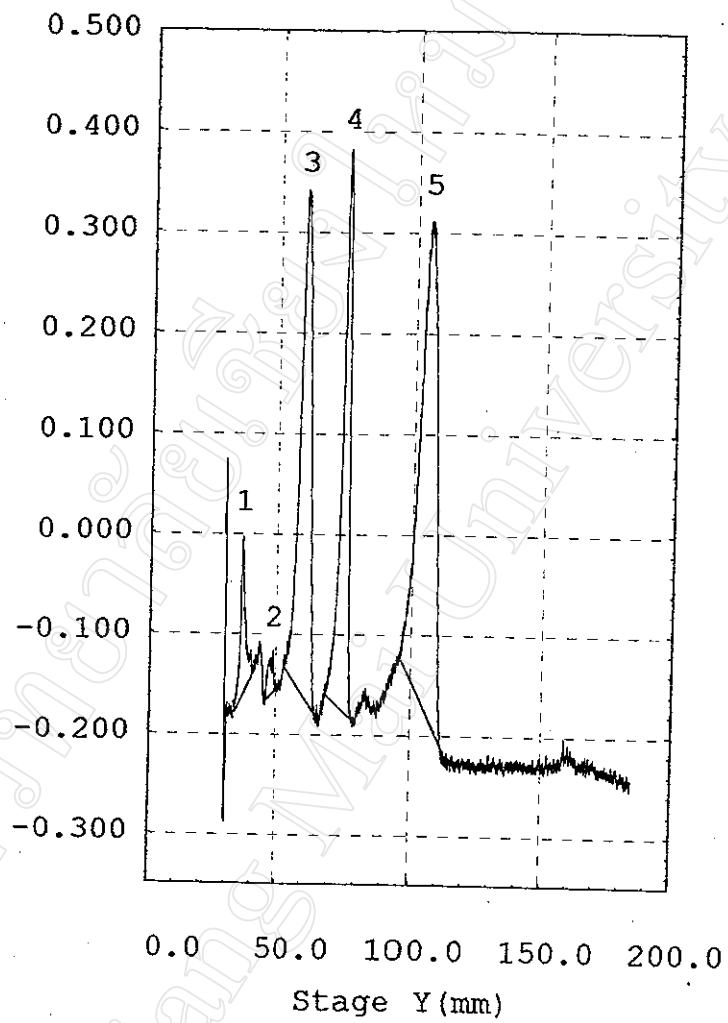
รูป 2.6.1 TLC โคโรนาไทเทรตของฟ้าทะลายโจร



รูป 2.7 ลายแบบโครมาโทกราฟี (chromatographic fingerprint) ของยาฟ้าทะลายโจรแคปซูล
ของบริษัทผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทย จำกัด lot.no. CFT 011 (วัน/เดือน/ปีที่ผลิต
คือ 05/03/99) ที่ความยาวคลื่น 254 nm



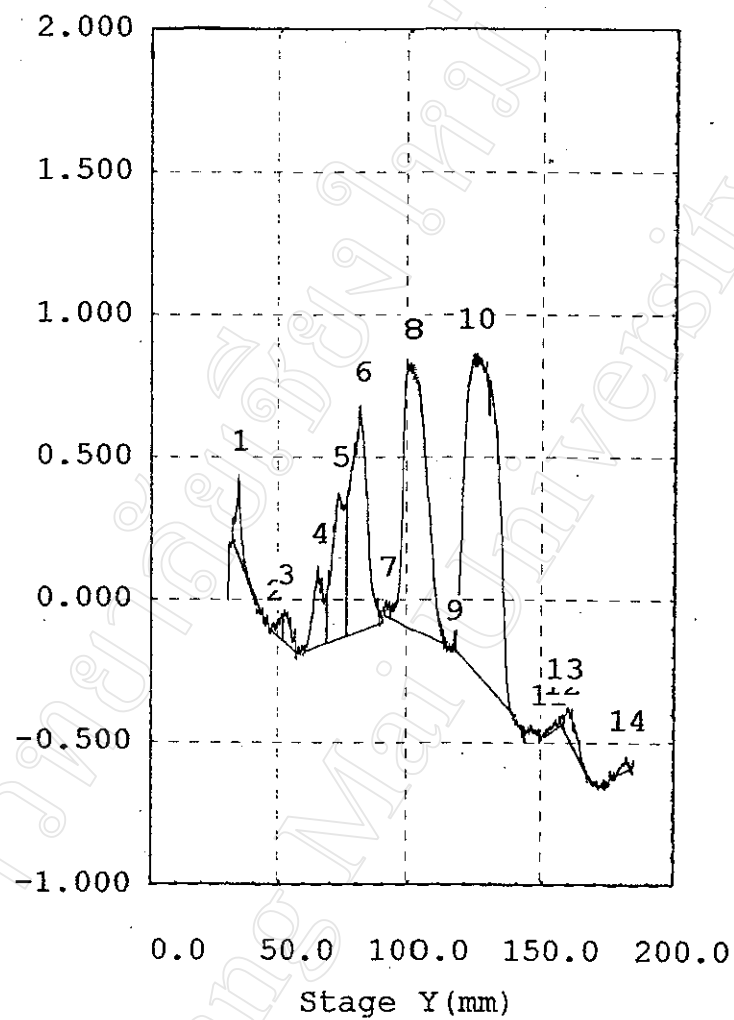
รูป 2.8 ลายแบบโครมาโทกราฟี (chromatographic fingerprint) ของยาเม็ดฟ้าทะลายโจร
ของห้าง ขยายตราใบห่อ (วัน/เดือน/ปีที่ผลิต คือ 15/07/99) ที่ความยาวคลื่น 254 nm



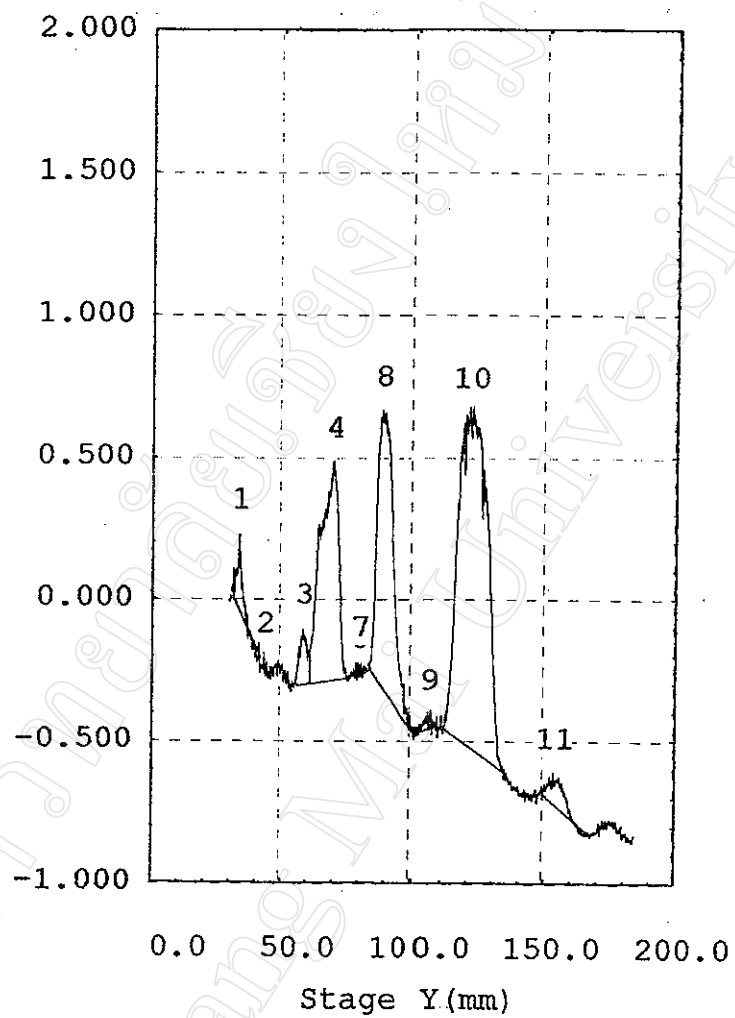
รูป 2.9 ลายแบบโครมาโทกราฟี (chromatographic fingerprint) ของขมิ้นชัน
ที่ความยาวคลื่น 366 nm



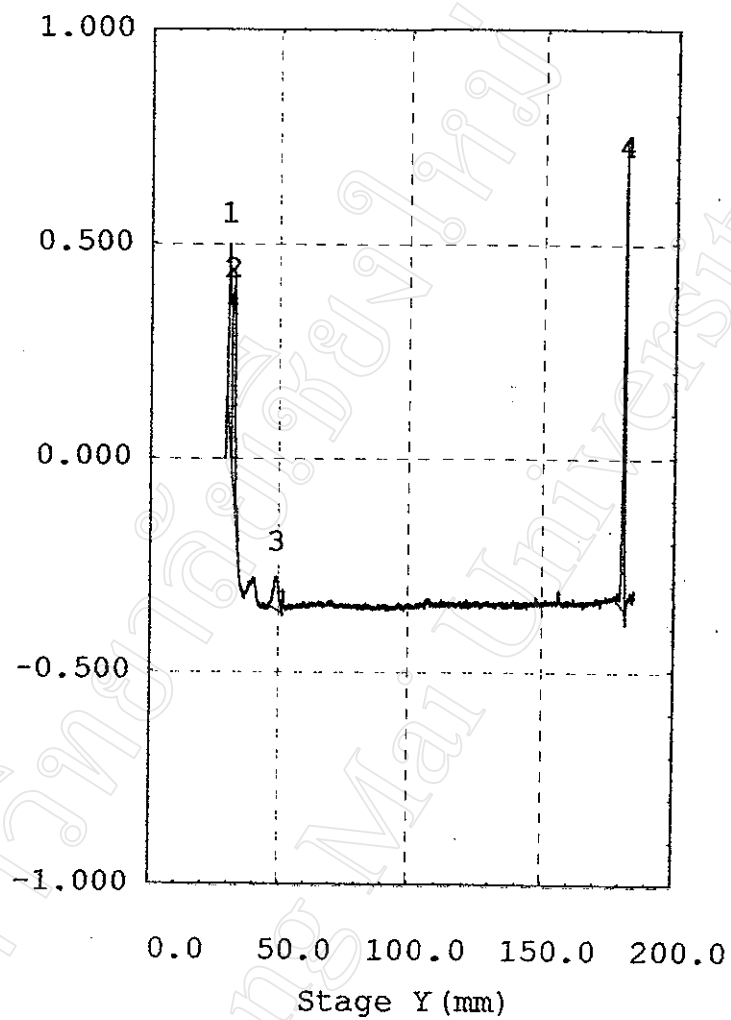
2.9.1 TLC โครมาโทแกรมของขมิ้นชัน



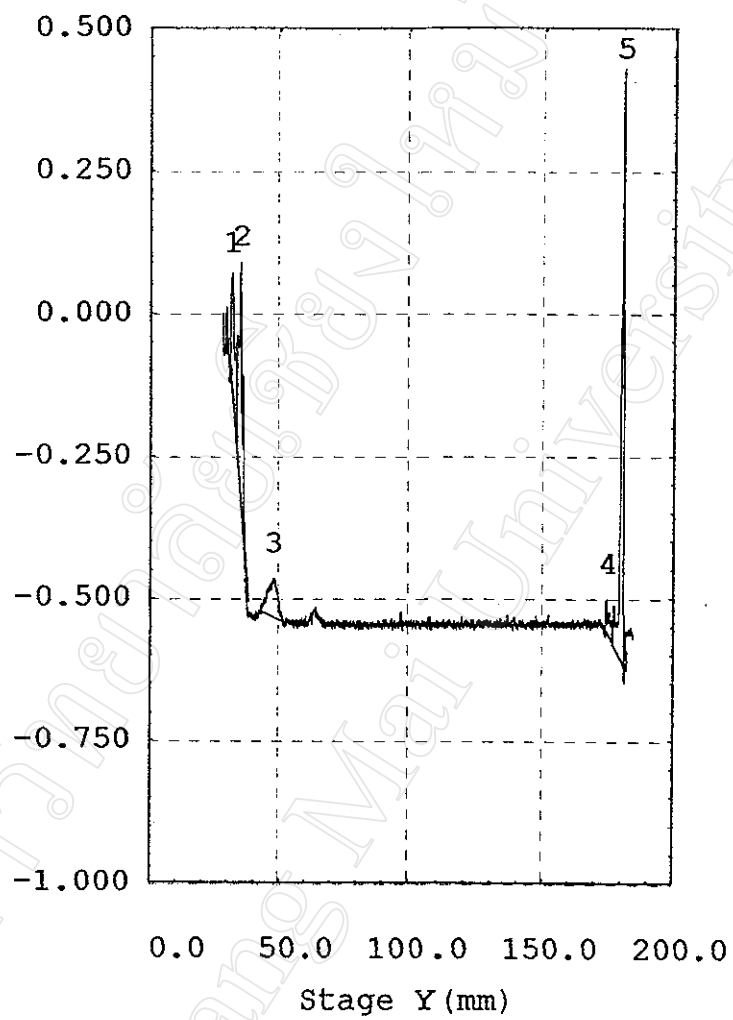
รูป 2.10 ลายแบบโครมาโทกราฟี (chromatographic fingerprint) ของขมิ้นชันแคปซูลตัวอย่างที่ 5 ของบริษัทผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทย จำกัด lot.no. CTU 032 (วัน/เดือน/ปี ที่ผลิต คือ 15/11/99) ที่ความยาวคลื่น 366 nm



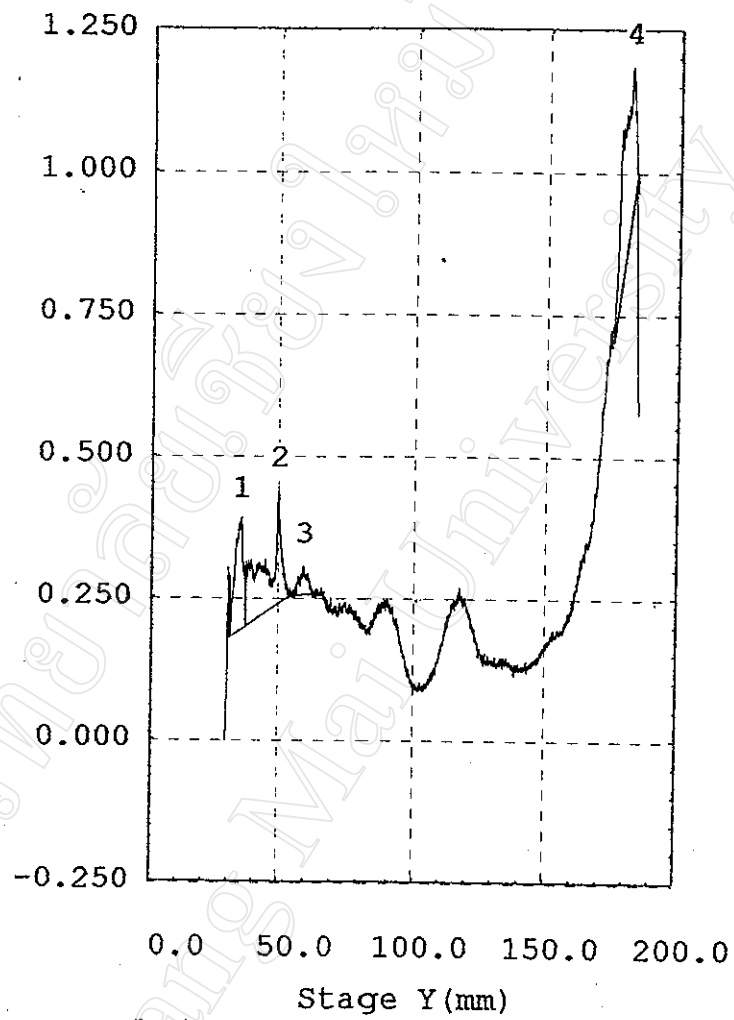
รูป 2.11 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของขมิ้นชันแคปซูลตัวอย่างที่ 6 ขององค์การเภสัชกรรม lot.no. Z.112002 (วัน/เดือน/ปี ที่ผลิต คือ 15/12/98) ที่ความยาวคลื่น 366 nm



รูป 2.12 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของมะแว้งเครือ (ผลแก่)
ที่ความยาวคลื่น 366 nm



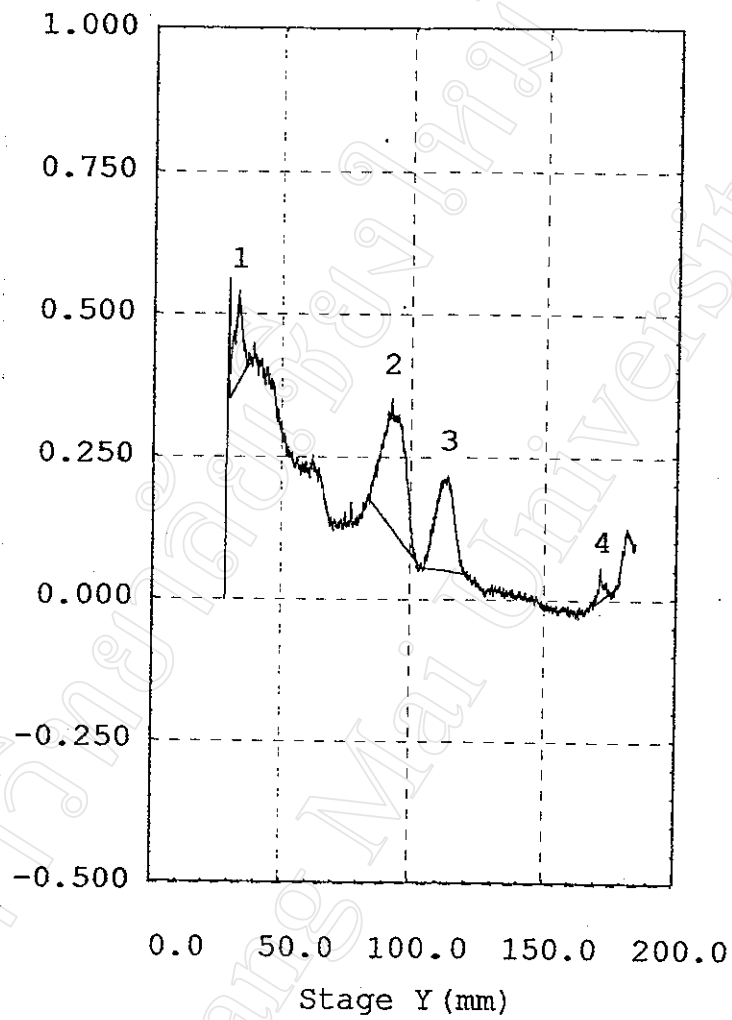
รูป 2.13 ลายแบบโครมาโทกราฟี (chromatographic fingerprint) ของมะแว้งเครือ (ผลอ่อน)
ที่ความยาวคลื่น 366 nm



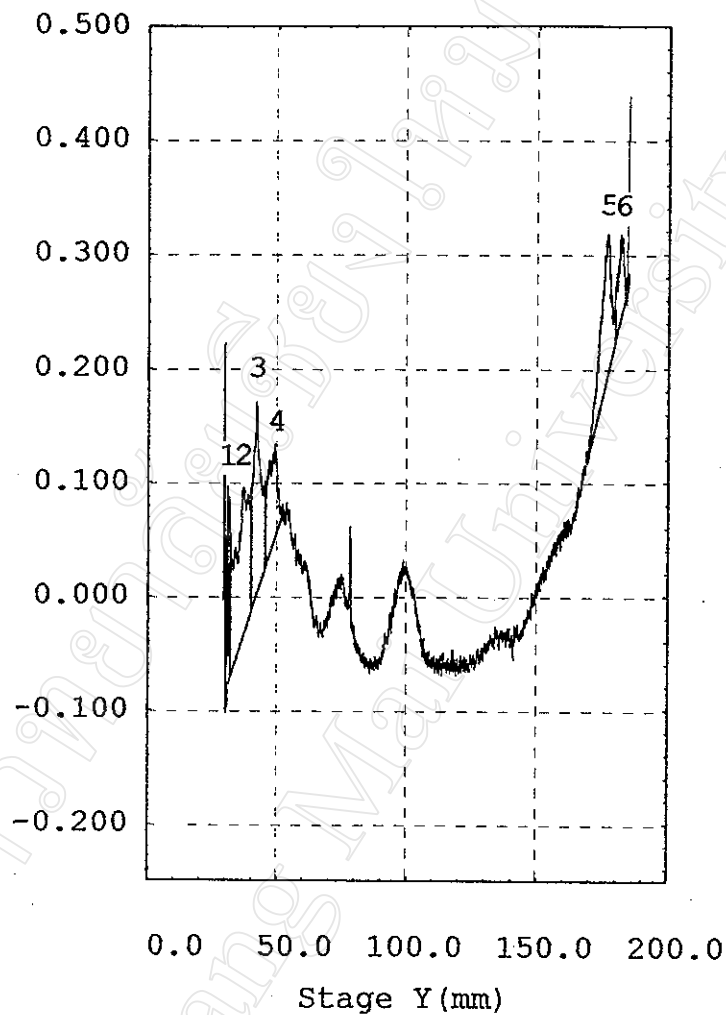
รูป 2.14 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของใบเป้งิ้วก้วย
ที่ความยาวคลื่น 330 nm



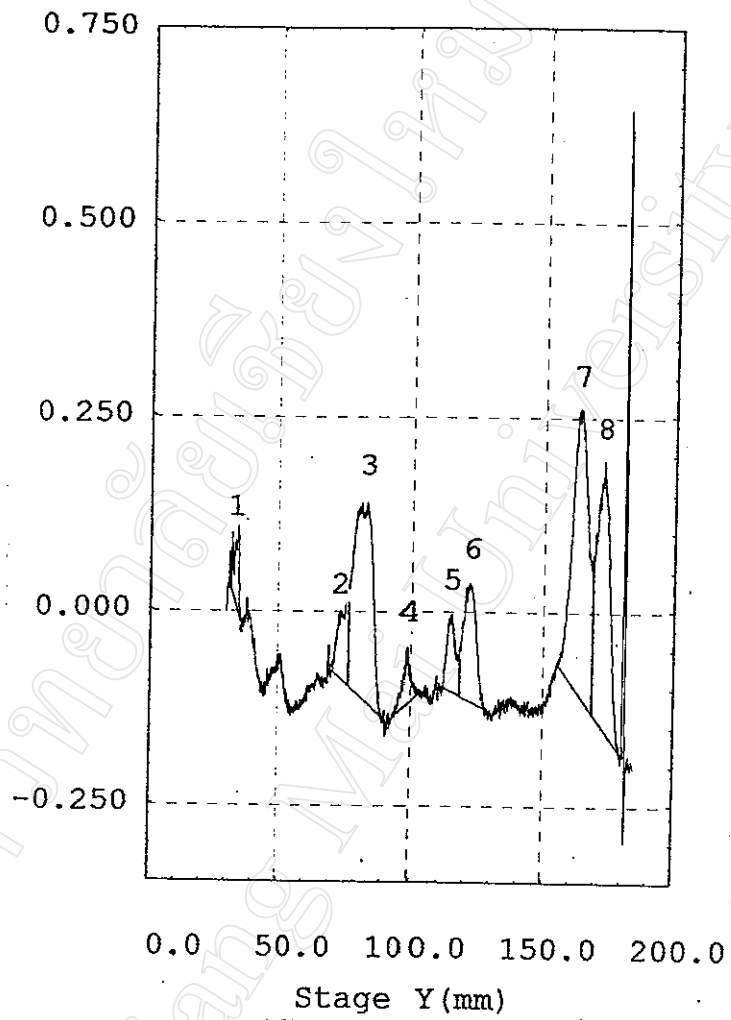
2.14.1 TLC โคโรนาโทแกรมของใบแป๊ะก๊วย



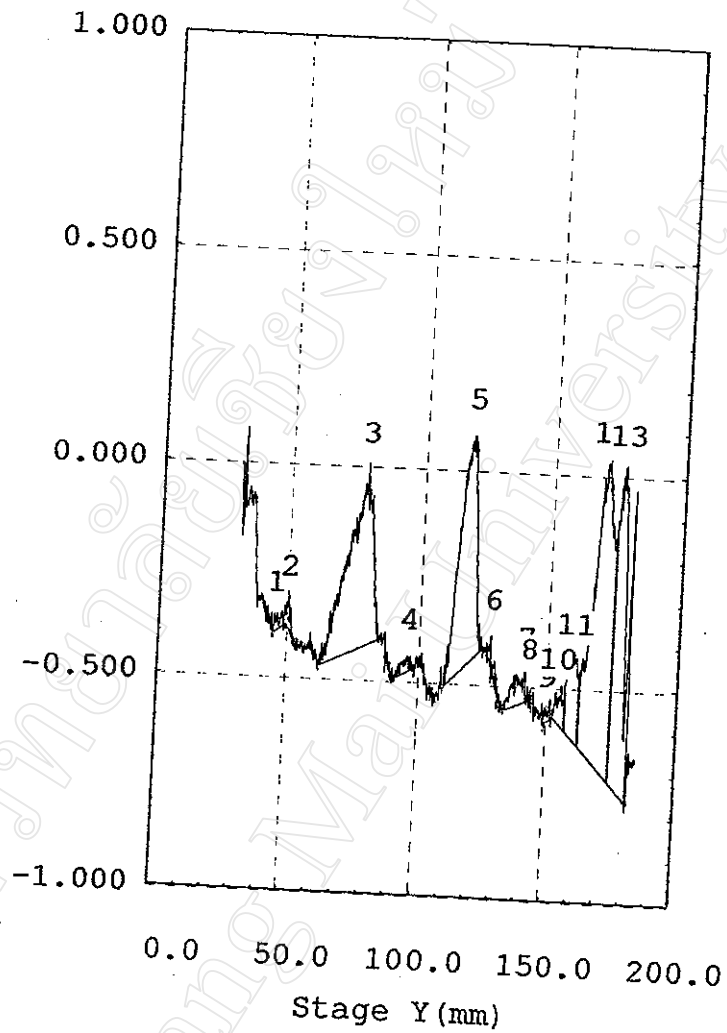
รูป 2.15 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของฟีดเน่ พลัส สารสกัดจาก
ใบแป๊ะก๊วย จีไวส์ ของบริษัทนิวคอนเซพท์ โปรดักท์ จำกัด (วัน/เดือน/ปีที่ผลิต
คือ 02/02/99) ที่ความยาวคลื่น 330 nm



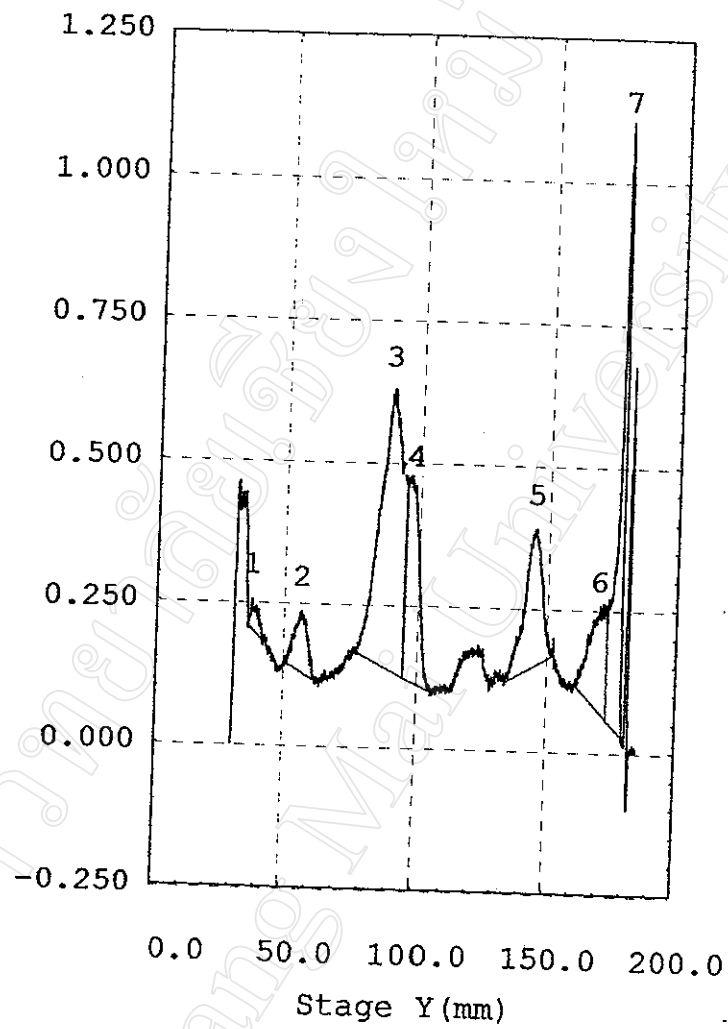
รูป 2.16 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของ *Ginkgo biloba* เครื่องดื่มสมุนไพรเพื่อสุขภาพ ของชุมชนปทุมอโศก อ.เมือง จ.นครปฐม (วัน/เดือน/ปีที่ผลิต คือ 04/01/00) ที่ความยาวคลื่น 330 nm



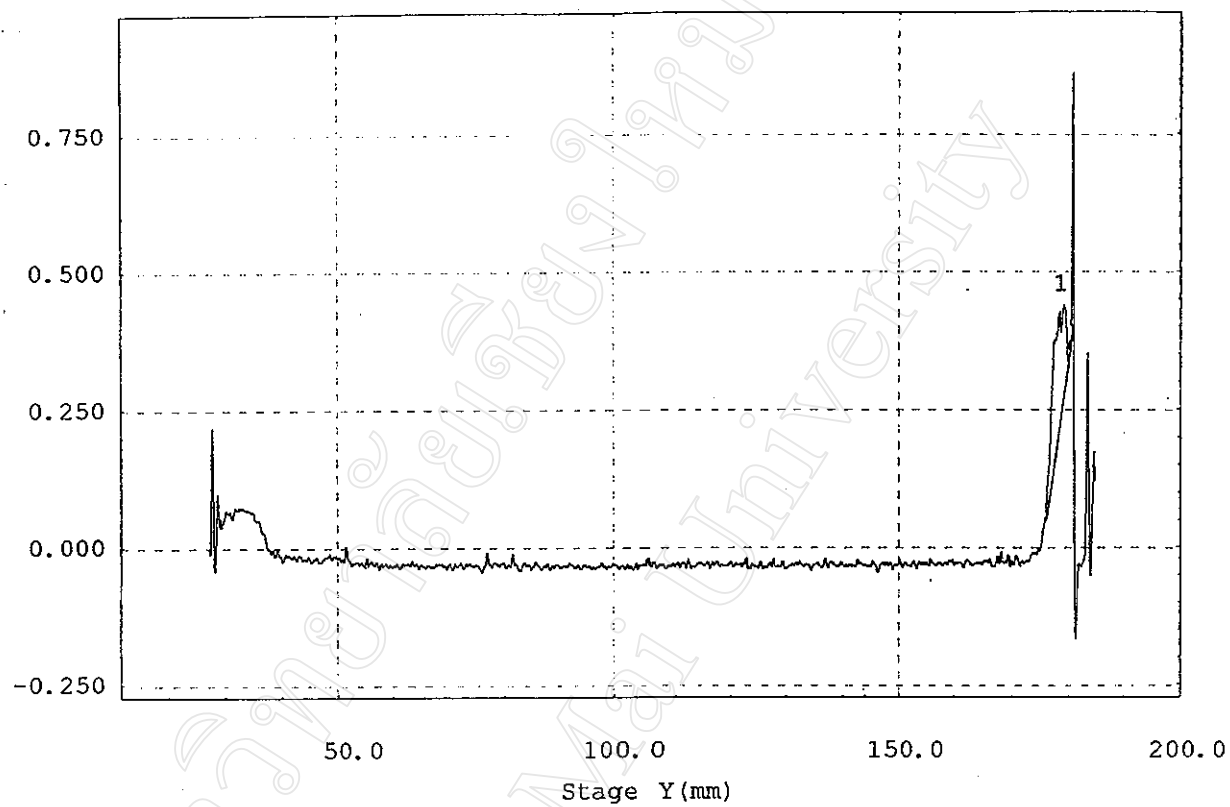
รูป 2.17 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของใบมะขามแขก ที่ความยาวคลื่น 254 nm



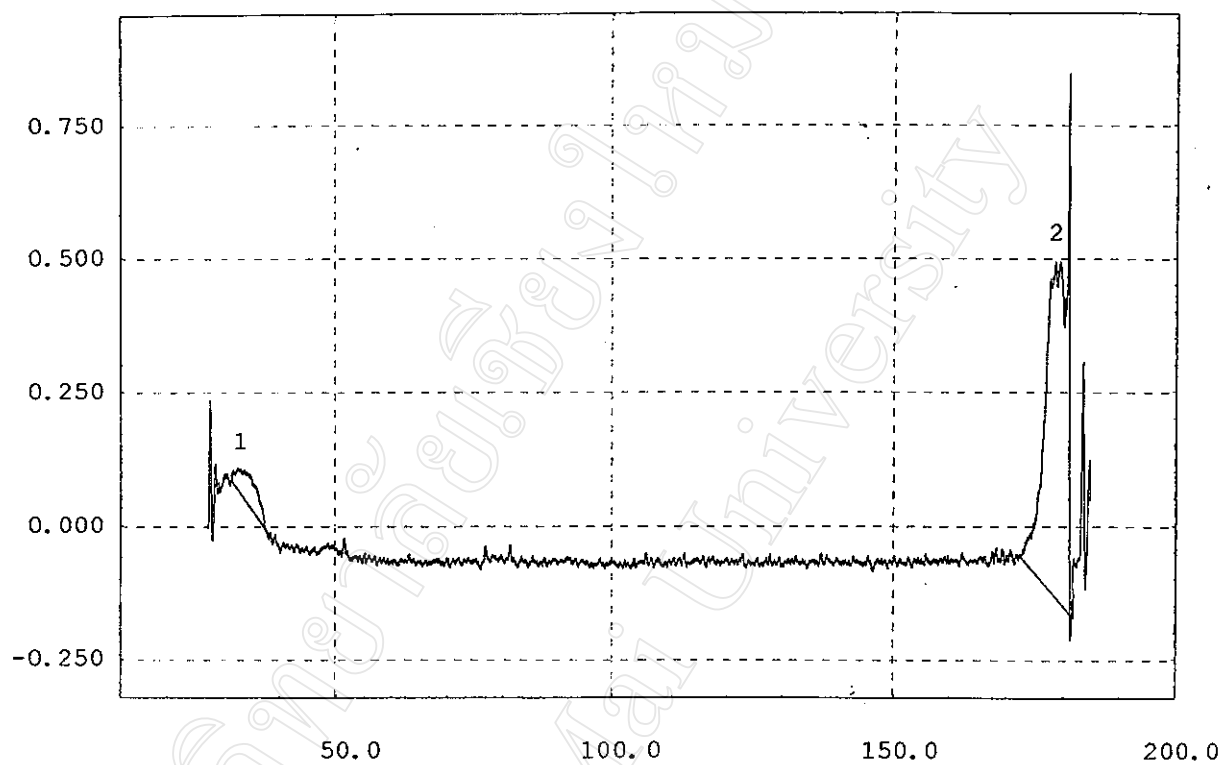
รูป 2.18 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ยาขงสมุนไพรรักษาฝีเน
ของบริษัชนิวคอนเซพท์ โปรดักท์ จำกัด lot.no. 430414 (วัน/เดือน/ปีที่ผลิต
คือ 08/04/00) ที่ความยาวคลื่น 254 nm



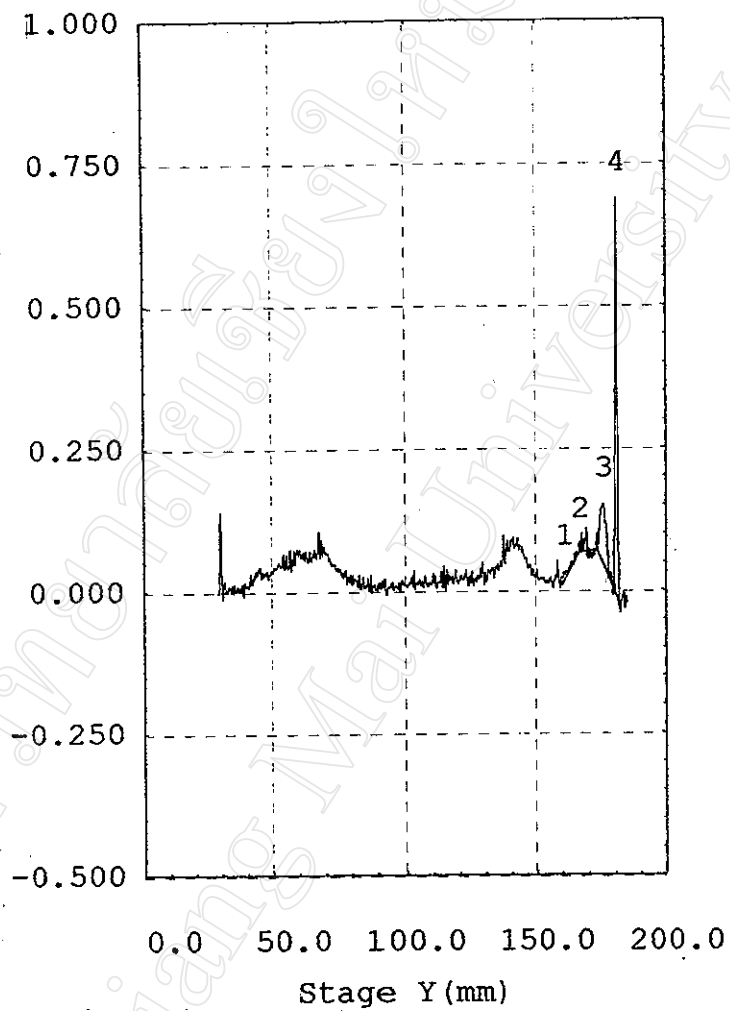
รูป 2.19 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของยาขงมะขามแขก ของ
 ชุมชนปทุมอโศก อ.เมือง จ.นครปฐม lot.no. 12 (วัน/เดือน/ปีที่ผลิตคือ 02/05/00)
 ที่ความยาวคลื่น 254 nm



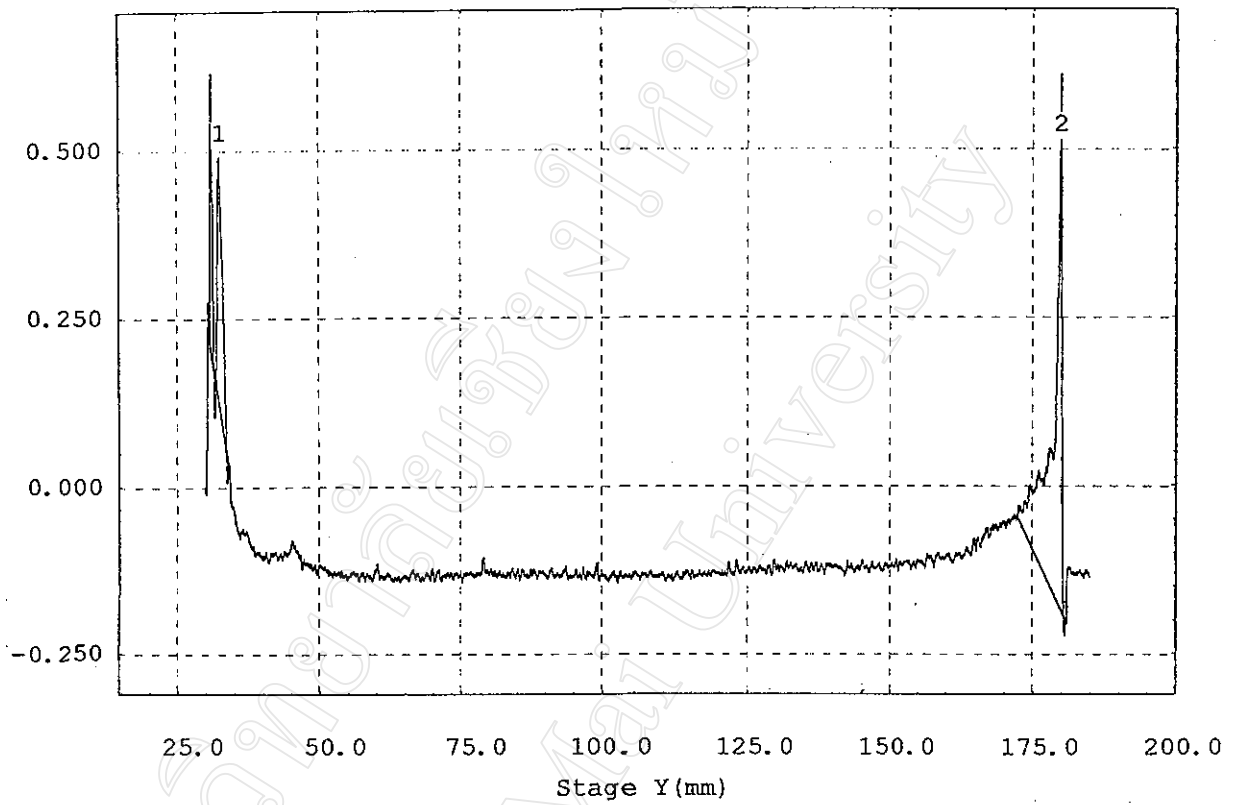
รูป 2.20 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของรางจืด (ใบแก่)
ที่ความยาวคลื่น 454 nm



รูป 2.21 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของรางจืด (ใบอ่อน)
ที่ความยาวคลื่น 454 nm



รูป 2.22 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของชาสมุนไพรรางจืด
ตัวอย่างที่ 11 ของบริษัทเอกสมุนไพร จำกัด lot.no. 0243 (วัน/เดือน/ปีที่ผลิต
คือ 21/01/00) ที่ความยาวคลื่น 454 nm



รูป 2.23 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของชาสมุนไพรรางจืด
ตัวอย่างที่ 12 ของบริษัท อี.เอ.อาร์ ที่ความยาวคลื่น 454 nm

2.5.1.3 หาค่า R_f จากแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (thin layer chromatography plate) ของสมุนไพรตัวอย่างจากสมุนไพรทั้งหมดโดยส่องดูด้วย UV —light ทั้งแบบช่วงความยาวคลื่นสั้น (short wavelength) และ แบบช่วงความยาวคลื่นยาว (long wavelength) ดังตาราง 2.5 และผลของค่า R_f แสดงดังตาราง 2.6 – 2.12

ตาราง 2.5 แสดงค่าความยาวคลื่น (wavelength) ของ UV — light ที่ใช้ตรวจสอบแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (thin layer chromatography plate) ของสารสกัดจากสมุนไพรและ ตัวอย่างยาจากสมุนไพรที่ได้ค่า R_f ดังตาราง 2.6 – 2.12

สมุนไพรและตัวอย่างยาจากสมุนไพร	ความยาวคลื่น (nm)
1. ขี้เหล็ก	365
2. ฟ้าทะลายโจร	254
3. ขมิ้นชัน	365
4. มะแว้งเครือ	365
5. เปี๊ยะก้วย	365
6. มะขามแขก	254
7. รวงจีด	365

ตาราง 2.6 แสดงค่า R_f ของใบขี้เหล็กเทียบกับยาจากขี้เหล็ก

ค่า R_f			
ใบแก่	ใบอ่อน	ยา barakol (ขององค์การเภสัชกรรม)	ยาเม็ดขี้เหล็ก (ของชุมชนปทุมอโศก อ.เมือง จ.นครปฐม)
0.26	0.28	0.10	0.18
0.34	0.34	0.19	0.21
0.39	0.39	0.28	0.28
0.51	0.50	0.32	0.32
0.68	0.68	0.43	0.80
0.78	0.74	0.49	0.92
0.84	0.84		

ตาราง 2.7 แสดงค่า R_f ของใบฟ้าทะลายโจรเทียบกับยาจากฟ้าทะลายโจร

ค่า R_f			
ใบแก่	ใบอ่อน	ฟ้าทะลายโจรแคปซูล (ของบ.ผลิตภัณฑ์ สมุนไพรไทยจำกัด)	ยาเม็ดฟ้าทะลายโจร (ของห้างขายยาตราใบห่อ)
0.20	0.12	0.20	0.13
0.43	0.37	0.55	0.37
0.74	0.74	0.82	0.57
0.93	0.97		0.97

ตาราง 2.8 แสดงค่า R_f ของขมิ้นชันสดเทียบกับยาจากขมิ้นชัน

ค่า R_f		
ขมิ้นชันสด	ขมิ้นชันแคปซูล (ของ บ.ผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยจำกัด)	ขมิ้นชันแคปซูล (ขององค์การเภสัชกรรม)
0.07	0.15	0.14
0.17	0.33	0.28
0.27	0.45	0.36
0.43	0.52	0.41
0.70	0.65	0.66
	0.79	0.87
	0.85	

ตาราง 2.9 แสดงค่า R_f ของผลแก่เทียบกับผลอ่อนของมะแว้งเครือสด

ค่า R_f	
ผลแก่	ผลอ่อน
0.03	0.05
0.10	0.12

ตาราง 2.10 แสดงค่า R_f ของใบแป๊ะก๊วย(ใบที่แห้งแล้ว)เทียบกับยาจากแป๊ะก๊วย

ค่า R_f		
ใบแป๊ะก๊วย (ใบที่แห้งแล้ว)	พิตเน่ พลัส สารสกัดจาก ใบแป๊ะก๊วยจี ไวส์ (ของ บ.นิวกอนเซพท์ โปรดักท์ จำกัด)	Ginkgo biloba เครื่องดื่ม สมุนไพรเพื่อสุขภาพ (ของชุมชนปฐมอโศก อ.เมือง จ.นครปฐม)
0.08	0.17	0.08
0.14	0.31	0.17
0.19	0.35	0.22
0.45	0.52	0.41
0.82	0.87	0.55
0.93	0.79	0.60
		0.87

ตาราง 2.11 แสดงค่า R_f ของใบมะขามแขก(ใบที่แห้งแล้ว)เทียบกับยาจากใบมะขามแขก

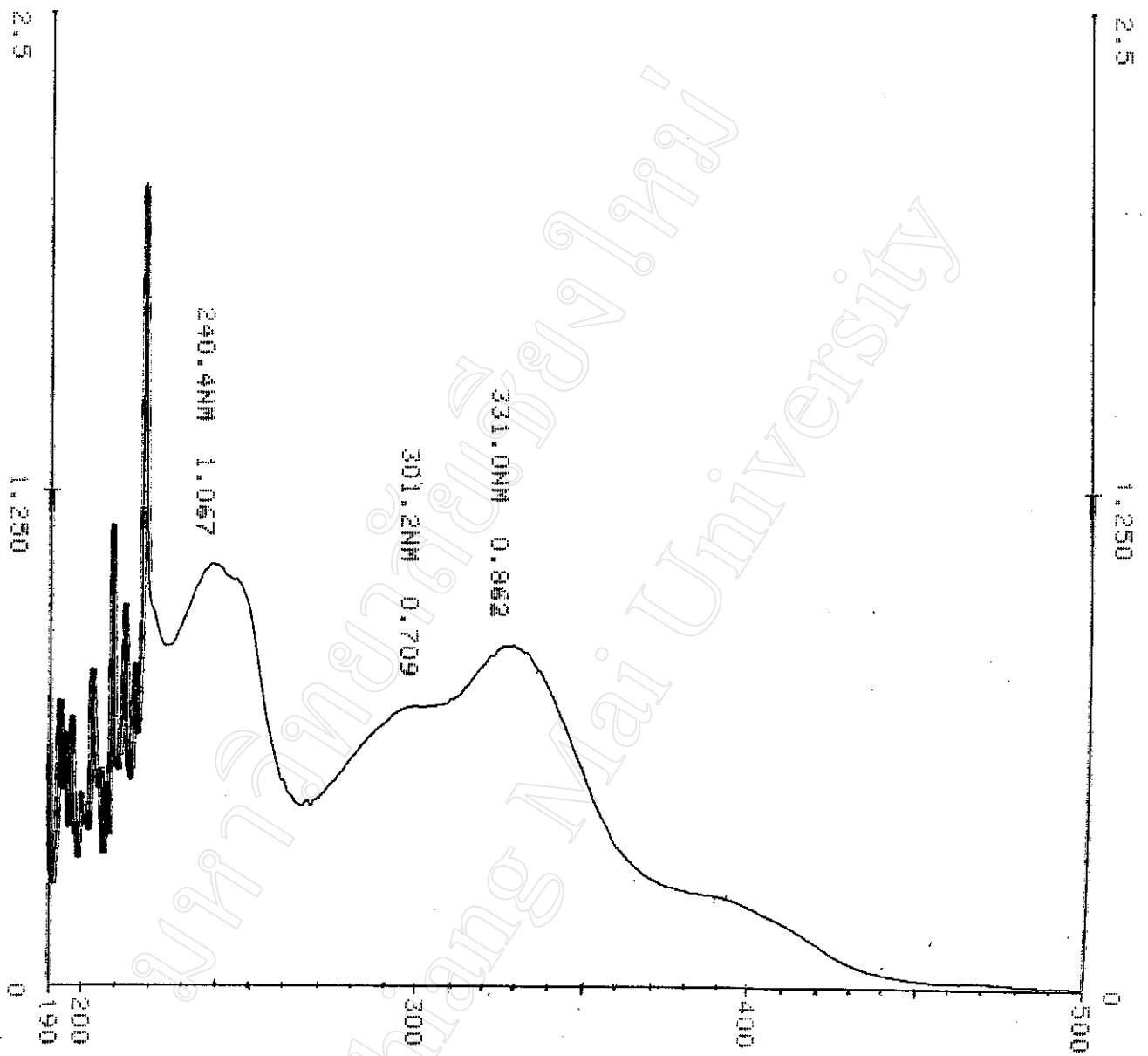
ค่า R_f		
ใบมะขามแขก (ใบที่แห้งแล้ว)	ยาขงสมุนไพร(มะขามแขก) คราฟิเตน (ของบ.นิวคองเซพท์ โปรดักท์ จำกัด)	ยาขงมะขามแขก (ของชุมชนปทุมอโศก อ.เมือง จ.นครปฐม)
0.15	0.13	0.11
0.23	0.19	0.19
0.30	0.27	0.37
0.35	0.33	0.45
0.47	0.37	0.60
0.53	0.43	0.63
0.57	0.47	0.70
0.61	0.55	0.74
0.88	0.59	
0.92	0.64	
0.95	0.70	
	0.91	
	0.96	
	0.98	

ตาราง 2.12 แสดงค่า R_f ของใบรางจืดเทียบกับยาจากรางจืด

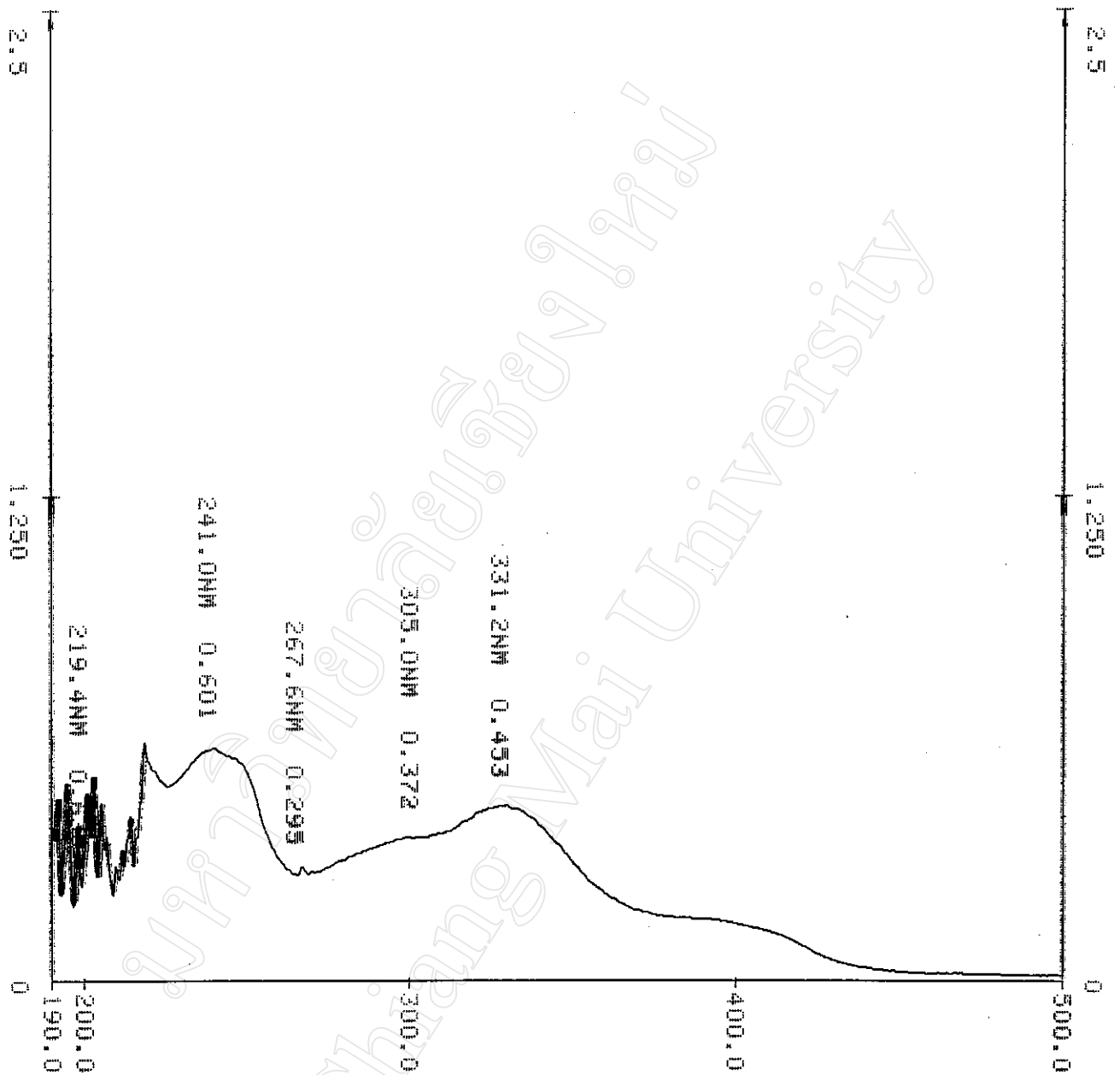
ค่า R_f			
ใบแก่	ใบอ่อน	ชาสมุนไพรรางจืด (ของบ.เอกสมุนไพร จำกัด)	ชาสมุนไพรรางจืด (ของบ.อี.เอ.อาร์)
0.15	0.14	0.19	0.20
0.33	0.28	0.73	0.33
0.45	0.36	0.98	0.92
0.52	0.41		

2.5.2 การตรวจสอบสารสำคัญในใบอ่อนขี้เหล็กและ ตัวอย่างยาจากขี้เหล็ก โดยวิธี UV - VIS spectrometry

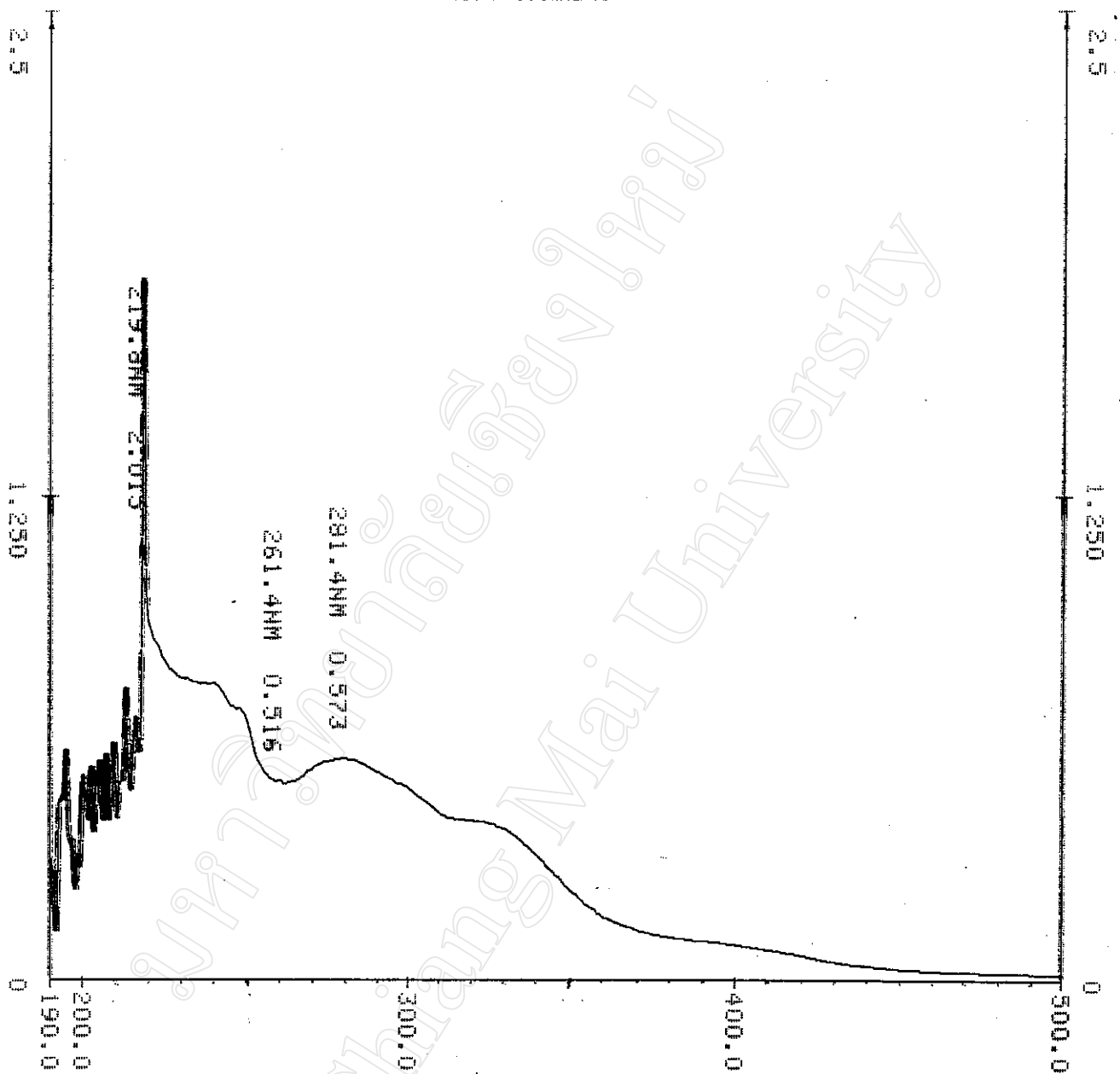
2.5.2.1 นำสารสกัดจากใบอ่อนสดขี้เหล็กและตัวอย่างยาจากขี้เหล็กจำนวน 2 ชนิด โดยสารสกัดที่ได้นี้ จะไม่ระเหยให้แห้ง ใช้เมทานอล (methanol) สกัดและทำให้เจือจาง แล้วนำไป scan ด้วย UV - 265 spectrometer ได้ผลดังรูป 2.24 - 2.26



รูป 2.24 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของไบอีนซีเทติกในช่วงความยาวคลื่น 190 - 500 nm



รูป 2.25 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของยา barakol (ขององค์การเภสัชกรรม lot.no. TCR 015 วัน/เดือน/ปี
ที่ผลิต 03/12/99)ในช่วงความยาวคลื่น 190 - 500 nm



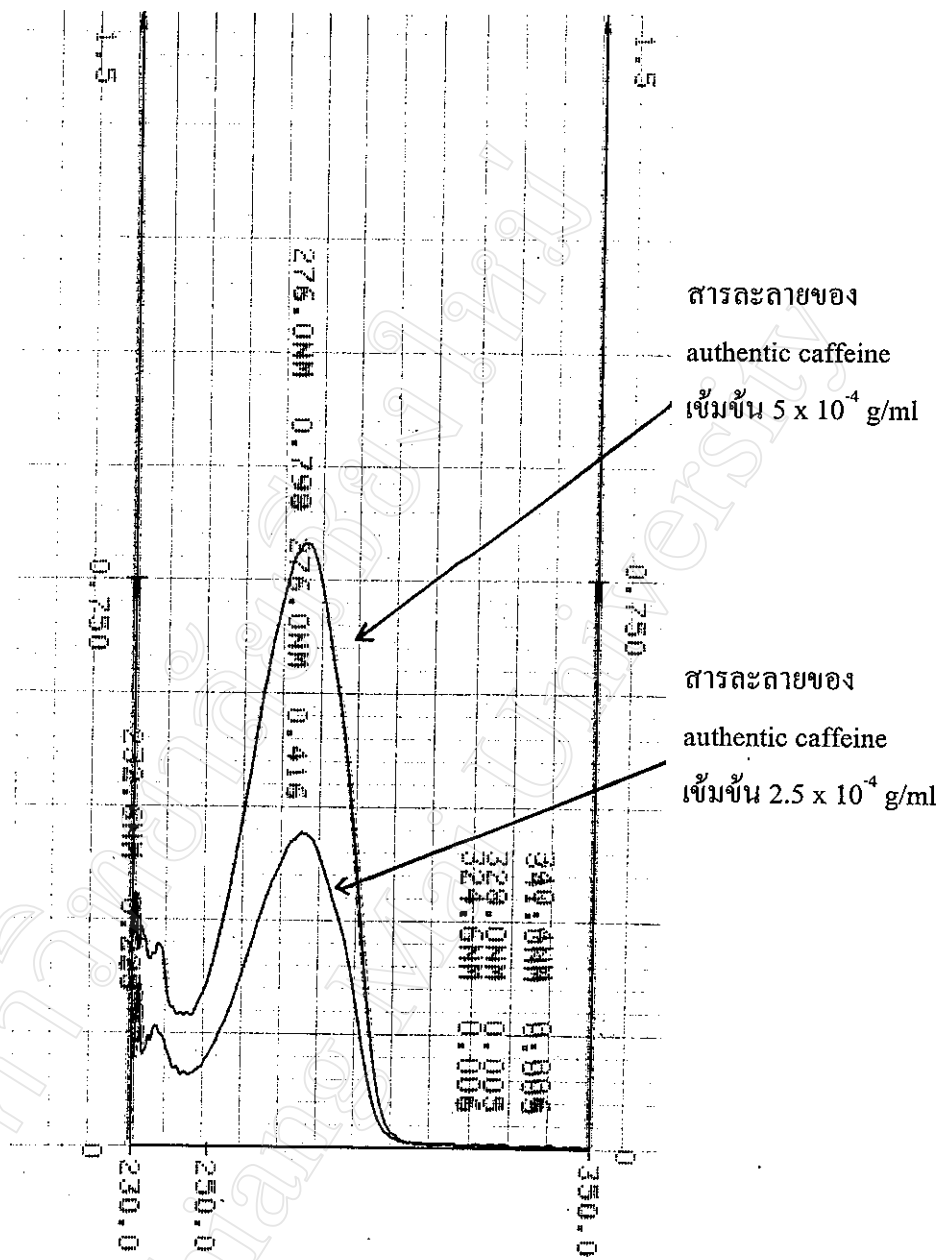
รูป 2.26 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของยาขี้เหล็ก ของชุมชนปทุมโตก อ.เมือง จ.นครปฐม
(วัน/เดือน/ปีที่ผลิตคือ 12/05/00) ในช่วงความยาวคลื่น 190 - 500 nm

2.5.2.2 แบ่งสารสกัดจากใบอ่อนขี้เหล็ก และตัวอย่างยาจากขี้เหล็กจำนวน 2 ชนิด ในข้อ 2.5.2.1 มาทำโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยใช้ เอทิลอะซิเตด (ethyl acetate) : เมทานอล (methanol) : เอทานอล (ethanol) : น้ำ (40.5 : 5.5 : 2 : 4) เป็น developing solvent พบว่า เกิดการแยกเป็นแถบต่างๆ ส่องดูด้วย UV – light short wavelength ที่บนแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (TLC plate) ได้ค่า R_f ดังตาราง 2.6

2.5.3 การหาปริมาณคาเฟอีนในชาและกาแฟโดยวิธี UV - VIS spectrometry และโดยวิธีใช้ densitometer

2.5.3.1 scan หา λ_{max} ของคาเฟอีน

ชั่ง authentic caffeine 0.0500 กรัมและละลายด้วยคลอโรฟอร์มจนสารละลายมีปริมาตร 100 ml จะได้สารละลายคาเฟอีนเข้มข้น 5×10^{-4} g/ml และเจือจาง สารละลายคาเฟอีนจาก 5×10^{-4} g/ml ให้มีความเข้มข้นเป็น 2.5×10^{-4} g/ml โดยปิเปตสารละลายคาเฟอีนเข้มข้น 5×10^{-4} g/ml มา 12.5 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 ml แล้วเติมคลอโรฟอร์ม จนมีปริมาตรครบ 25 ml นำสารละลายทั้ง 2 มา scan ด้วย UV - 265 spectrometer ในช่วงความยาวคลื่น 230 - 350 nm ดังแสดงในรูป 2.27



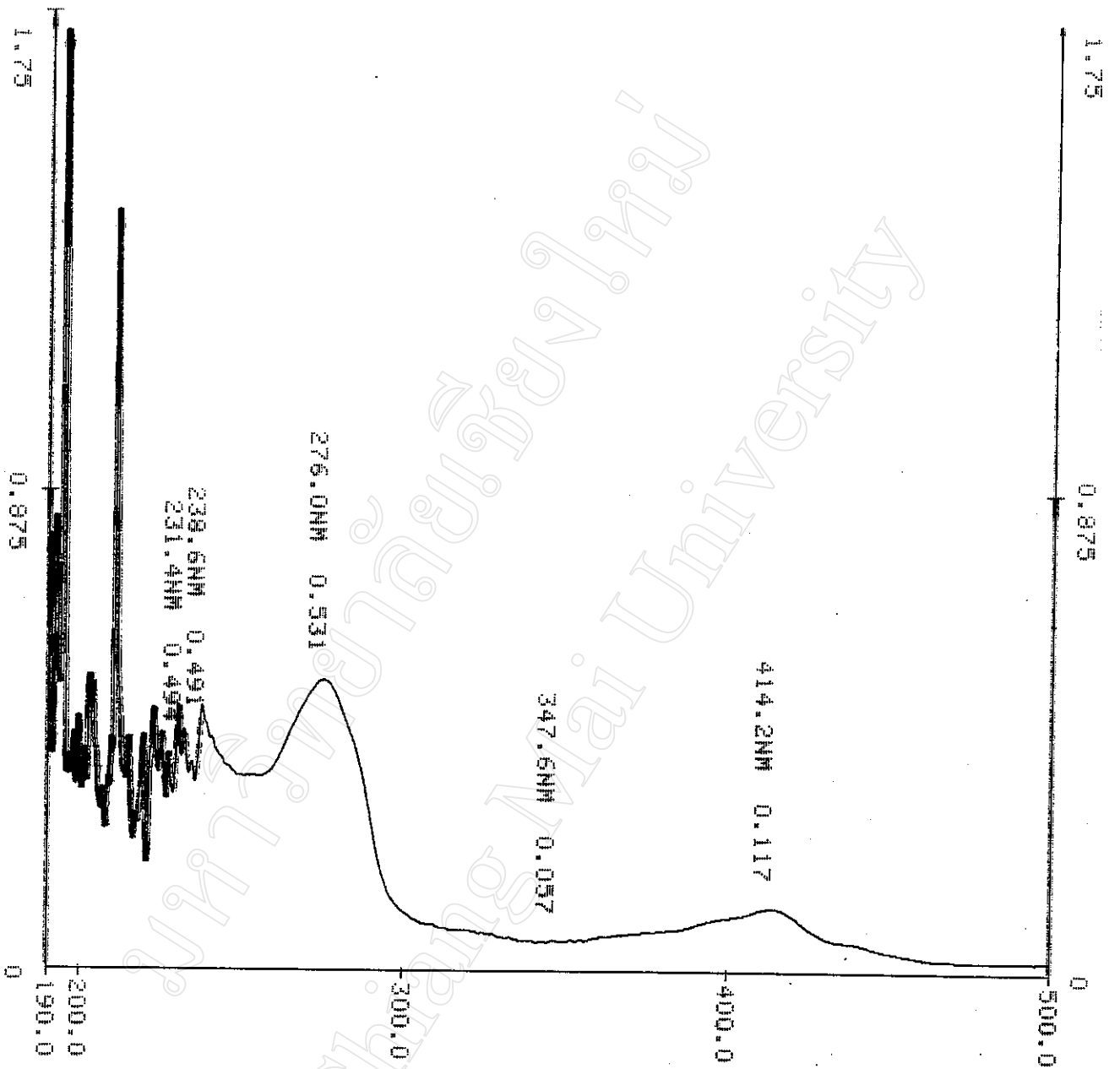
รูป 2.27 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของคาเฟอีน ในช่วงความยาวคลื่น 200 - 350 nm

จากรูป 2.27 พบว่า $\lambda_{\max}$ ของ authentic caffeine มีค่า 276 nm

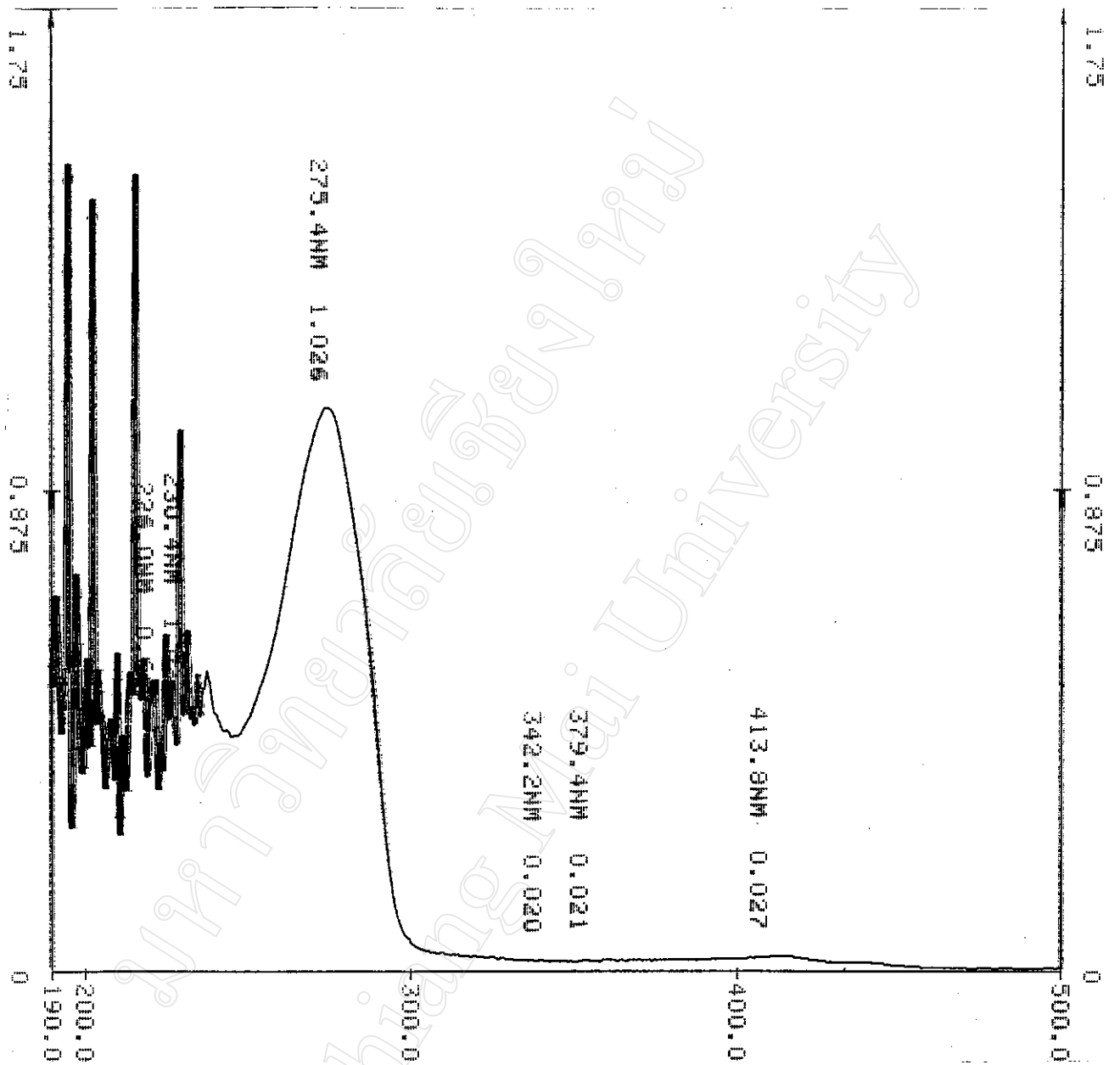
2.5.3.2 scan สารละลายตัวอย่างชาและกาแฟในช่วงความยาวคลื่น 190 - 500 nm

นำชาและกาแฟของบริษัทต่างๆ มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มแล้วนำไปวัดหา $\lambda_{\max}$

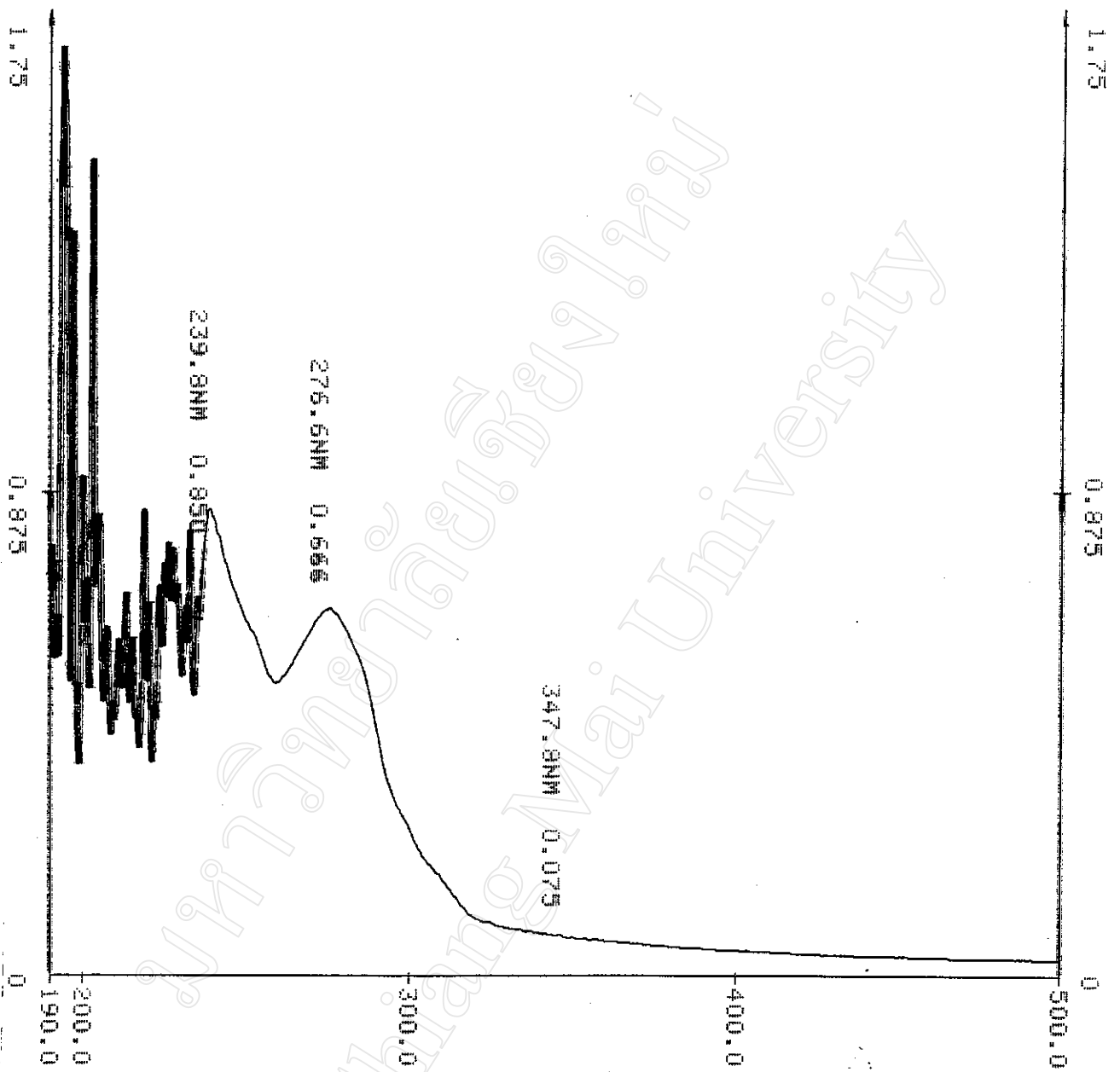
ได้ผลดังรูป 2.44 - 2.47



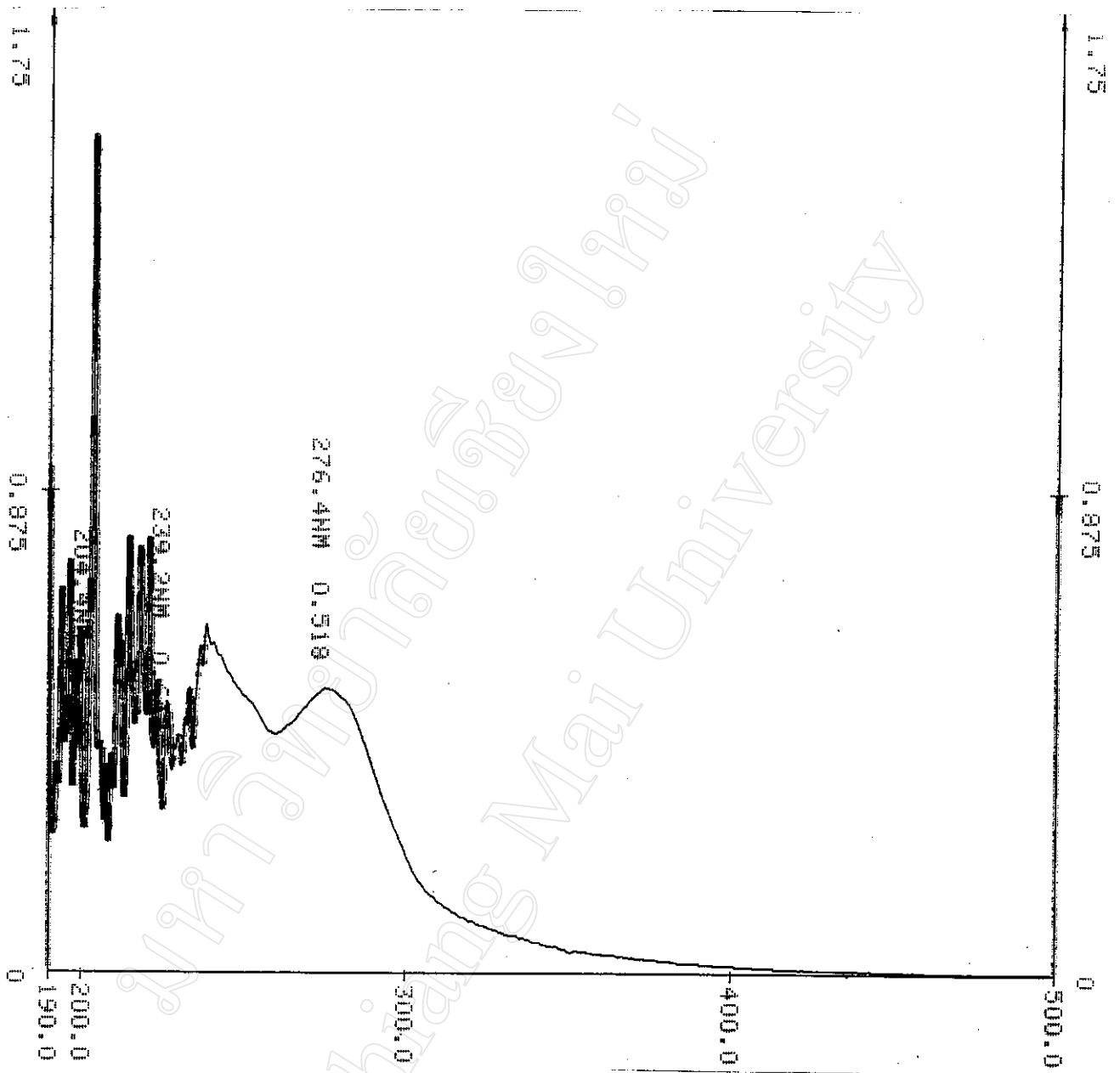
รูป 2.28 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของชาตราสามม้า ช่วงความยาวคลื่น 190-500 nm



รูป 2.29 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของชาลิปตัน ช่วงความยาวคลื่น 190-500 nm



รูป 2.30 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของกาแฟอิมบูญ ช่วงความยาวคลื่น 190-500 nm



รูป 2.31 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของกาแฟที่สกัดเอาคาเฟอีนออก ตราทดสอบ
ช่วงความยาวคลื่น 190-500 nm

จากการ scan ตัวอย่างชาและกาแฟ พบว่าตัวอย่างชาและกาแฟทั้ง 4 ชนิด คือ

ชาตราสามม้า พบ $\lambda_{\max}$ ที่ 276.0 nm

ชาลิปตัน พบ $\lambda_{\max}$ ที่ 275.4 nm

กาแฟอิมบูญ พบ $\lambda_{\max}$ ที่ 276.6 nm

กาแฟที่สกัดเอาคาเฟอีนออก ตราทดสอบชอย พบ $\lambda_{\max}$ ที่ 276.4 nm

แสดงว่าตัวอย่างชา และกาแฟทั้ง 4 ชนิด มีคาเฟอีนอยู่ จึงปรากฏ $\lambda_{\max}$ ที่ 276 nm

2.5.3.3 การหาปริมาณคาเฟอีนในชาและกาแฟ

ชั่งตัวอย่างชาและกาแฟจำนวน 4 ชนิด ดังนี้

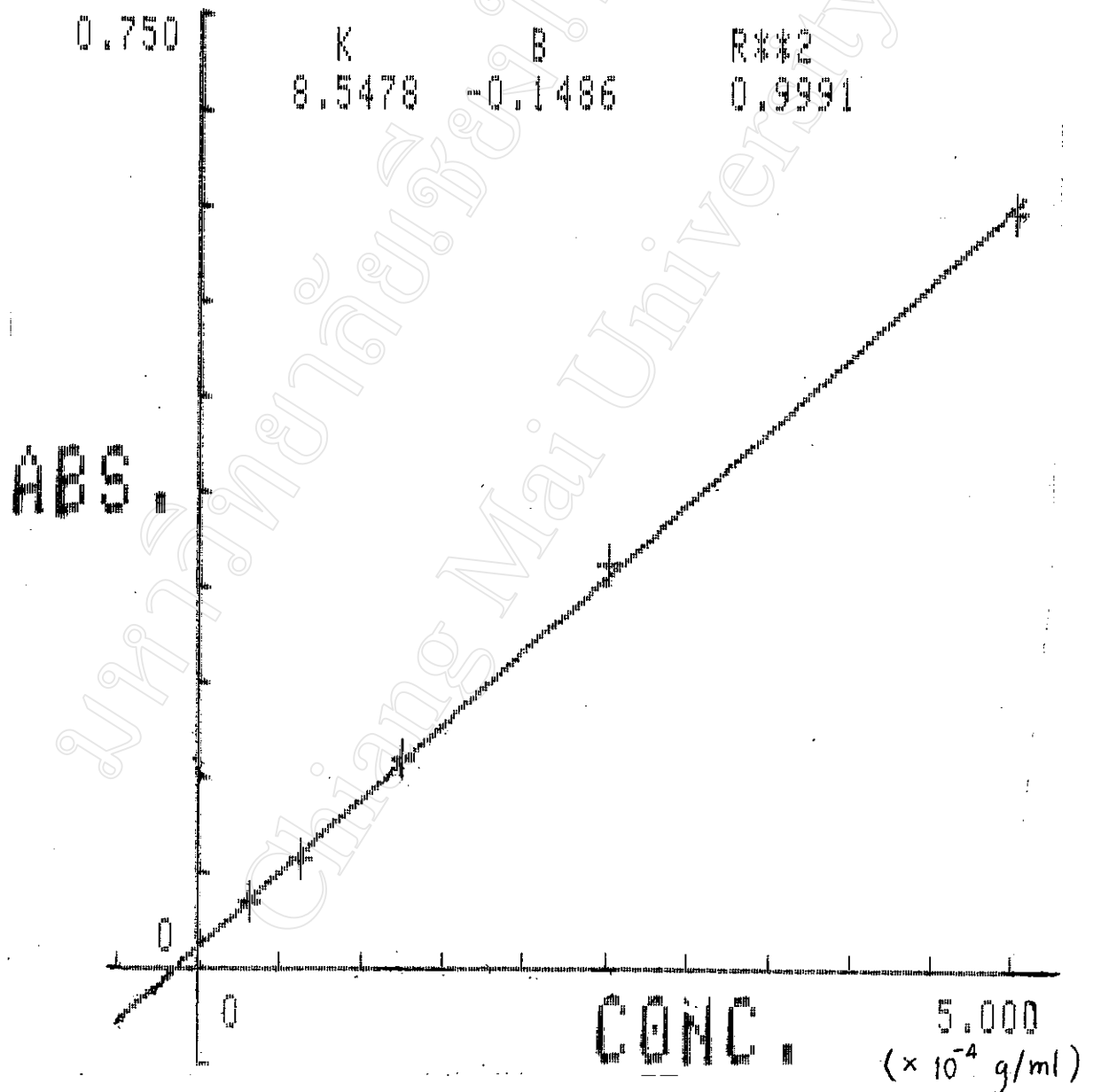
1. ชั่งใบชาแห้งตราสามม้า (บดให้ละเอียด) 5.0000 กรัม แล้วสกัดโดยวิธี soxhlet extraction ด้วยคลอโรฟอร์ม 150 ml เป็นเวลา 4–5 ชั่วโมง พบว่าได้สารสกัดทั้งหมด 135 ml
2. ชั่งชาผงลิปตันและกาแฟอิมบูญ ตัวอย่างละ 5.0000 กรัม แล้วสกัดโดยวิธี soxhlet extraction ด้วยคลอโรฟอร์ม ตัวอย่างละ 150 ml เป็นเวลา 4–5 ชั่วโมง พบว่าได้สารสกัดทั้งหมดของชาลิปตัน 121.5 ml และกาแฟอิมบูญ 137.5 ml
3. ชั่งกาแฟที่สกัดเอาคาเฟอีนออก ตราทดสอบชอย 10.0000 กรัม แล้วสกัดโดยวิธี soxhlet extraction ด้วยคลอโรฟอร์ม 150 ml เป็นเวลา 4–5 ชั่วโมง พบว่าได้สารสกัดทั้งหมด 128 ml

2.5.3.4 การหาปริมาณคาเฟอีนในชาและกาแฟโดยวิธี UV – VIS spectrometry

1. การทำ calibration curve ของคาเฟอีน

เตรียมสารละลายคาเฟอีน (authentic caffeine) เข้มข้น 5.0000×10^{-4} g/ml โดยเตรียมเช่นเดียวกันกับข้อ 2.5.3.1 แล้วเจือจาง (dilute) ให้มีความเข้มข้น 2.5000×10^{-4} g/ml โดยปิเปตสารละลายคาเฟอีนที่เข้มข้น 5.0000×10^{-4} g/ml มา 12.5 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 ml แล้วเติมคลอโรฟอร์ม จนปริมาตรของสารละลายครบ 25 ml จากนั้น เจือจาง (dilute) สารละลายคาเฟอีนที่เข้มข้น 2.5000×10^{-4} g/ml ให้มีความเข้มข้น 1.2500×10^{-4} g/ml โดยปิเปตสารละลายคาเฟอีนที่เข้มข้น 2.5000×10^{-4} g/ml มา 12.5 ml ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 ml เติมคลอโรฟอร์มจนมีปริมาตรครบ 25 ml จากนั้นเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 0.6250×10^{-4} g/ml และ 0.3125×10^{-4} g/ml ตามลำดับโดยทำเช่นเดียวกัน นำสารละลายมาตรฐานของคาเฟอีน ที่ได้

มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 276 nm. โดย UV-265 spectrometer จะได้ absorbance (abs) ที่ความเข้มข้น (conc.) ต่างๆ และนำมาทำกราฟได้ดังรูป 2.32



รูป 2.32 calibration curve ของสารละลายคาเฟอีน (authentic caffeine)

2. ปิเปตสารสกัดที่ได้จากข้อ 2.5.3.3 มาตัวอย่างละ 1 ml spot บนแผ่นโครมาโทกราฟีฝิวบาง (TLC plate) จนหมด โดย spot เทียบกับ (authentic caffeine) ที่ไว้ให้แห้ง แล้วจึงนำมาชะด้วย developing solvent คือ เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) : เมทานอล (methanol) : สารละลายแอมโมเนีย (ammonia solution) 80 : 10 : 1 แล้วนำแผ่นโครมาโทกราฟีฝิวบาง (TLC plate) ส่องดูภายใต้ UV - light short wavelength จะพบแถบของคาเฟอีนมาตรฐานและคาเฟอีนที่มีอยู่ในตัวอย่างของ ชาและกาแฟดังตาราง 2.13

ตาราง 2.13 แสดง ค่า R_f ของตัวอย่างชาและกาแฟ 4 ชนิดเทียบกับ authentic caffeine

ค่า R_f				
authentic caffeine	ชาตราสามม้า	ชาลิปตัน	กาแฟอิมบรูว (กาแฟผงแห้งคั่ว)	กาแฟที่สกัดเอาคาเฟอีน ออกตราทดสอบชอย
0.61	0.69	0.67	0.59	0.50

3. การหาความเข้มข้นของตัวอย่างชาและกาแฟเมื่อเทียบกับ calibration curve

นำแผ่นโครมาโทกราฟีฝิวบาง (TLC plate) ของตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดที่ได้จากข้อ 2 มาจุดแถบที่มี R_f เท่ากับสารละลาย authentic caffeine มาละลายในคลอโรฟอร์ม 10 ml stir 15 - 20 นาที กรองและล้าง silica gel ที่ติดค้างบนกระดาษกรองด้วยคลอโรฟอร์มจนสารละลายที่ได้มีปริมาตรครบ 10 ml นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 276 nm ด้วย UV - 265 spectrometer ได้ผลดังแสดงใน ตาราง 2.14

ตาราง 2.14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของคาเฟอีนที่สกัดได้จากสารตัวอย่าง

สารตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น($\times 10^{-4}$ g/ml) จากรูป 2.32			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
ใบชาตราสามม้า	0.1654	0.1671	0.1672	0.1666	1.2652	1.2798	1.2808	1.2753
ชาลิปตัน	0.1535	0.1623	0.1541	0.1566	1.2304	1.3034	1.2356	1.2565
กาแฟอิมบูญ	0.0755	0.0741	0.0745	0.0747	0.5780	0.5678	0.5708	0.5722
กาแฟที่สกัดเอาคาเฟอีน	0.0408	0.0413	0.0432	0.0418	0.2009	0.2050	0.2207	0.2089
ตราทดสอบชอย								

4. การคำนวณหาปริมาณคาเฟอีนในชาและกาแฟ

ชาตราสามม้า

จากตาราง 2.14 ความเข้มข้นเฉลี่ยที่ได้คือ 1.2753×10^{-4} g/ml

นั่นคือ สารละลาย 10 ml มีค่าคาเฟอีน $1.2753 \times 10^{-4} \times 10 = 12.753 \times 10^{-4}$ กรัม

(จากสารสกัด 1 ml)

สารสกัด 135 ml มีคาเฟอีน $12.753 \times 10^{-4} \times 135 = 1721.655 \times 10^{-4}$ กรัม (อยู่ในชา 5 กรัม)

$\therefore$ ถ้า ชา 100 กรัม มีคาเฟอีน $\frac{1721.655 \times 10^{-4} \times 100}{5}$ กรัม

$= 34433.1 \times 10^{-4}$ กรัม หรือ 3.4433 กรัม

นั่นคือชาตราสามม้า มีปริมาณคาเฟอีน 3.4433 %

ในการคำนวณเช่นเดียวกันพบว่า

ชาลิปตัน 100 กรัม มีคาเฟอีน 3.0533 กรัม

กาแฟอิมบูญ 100 กรัม มีคาเฟอีน 1.5736 กรัม

กาแฟที่สกัดเอาคาเฟอีนออกตราทดสอบชอย 100 กรัม จะมีคาเฟอีน 0.2674 กรัม

2.5.3.5 การหาเปอร์เซ็นต์ recovery โดยวิธี UV – VIS spectrometry

1. ชั่ง authentic caffeine 0.0300 กรัม ละลายคลอโรฟอร์ม จนมีปริมาตรครบ 25 ml แล้ว ปิเปตสารละลายคาเฟอีนดังกล่าวมา 1 ml spot บนแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (TLC plate) จนหมด แล้วชะด้วย developing solvent เช่นเดียวกับตัวอย่างชาและกาแฟ ในข้อ 2.5.3.4 จากนั้นนำ TLC plate มาส่องดูภายใต้ UV – light short wavelength ได้ค่า R_f 0.61 แล้วขูดแถบคาเฟอีนมาละลายด้วยคลอโรฟอร์ม 10 ml stir 15 – 20 นาที กรองและล้าง silica gel ด้วยคลอโรฟอร์มจน สารละลายที่ได้มีปริมาตรครบ 10 ml นำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV – 265 spectrometer

ตาราง 2.15 ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายคาเฟอีน (authentic caffeine)

สารละลายคาเฟอีน (authentic caffeine)	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น ($\times 10^{-4}$ g/ml)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
ปริมาตร 10 ml	0.1557	0.1549	0.1552	0.1553	1.1827	1.1754	1.1784	1.1789

2. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ recovery

จากตาราง 2.15 ความเข้มข้นเฉลี่ยที่ได้คือ 1.1789×10^{-4} กรัม (จาก calibration curve รูป 2.32)

$$\begin{aligned} \text{นั่นคือ สารละลาย } 10 \text{ ml} \quad \text{มีคาเฟอีน} \quad & 1.1789 \times 10^{-4} \times 10 \quad \text{กรัม} \\ & = 11.789 \times 10^{-4} \quad \text{กรัม} \end{aligned}$$

$$\text{สารละลายทั้งหมด } 25 \text{ ml} \quad \text{มีคาเฟอีน} \quad 11.789 \times 10^{-4} \times 25 = 0.0295 \quad \text{กรัม}$$

$$\therefore \text{เปอร์เซ็นต์ recovery} = \frac{0.0295}{0.0300} \times 100$$

$$= 98.33 \quad \%$$

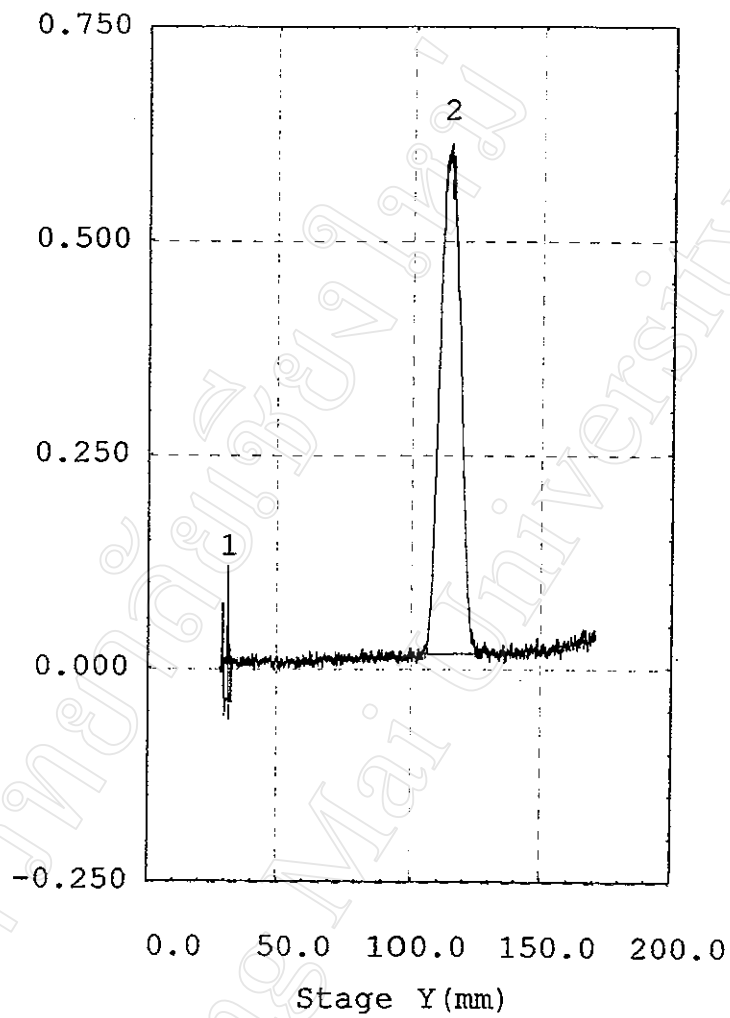
2.5.3.6 การหาปริมาณคาเฟอีนในชาและกาแฟโดยใช้ densitometer

1. การทำกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของสารละลายคาเฟอีน

1.1 ชั่งคาเฟอีน (authentic caffeine) มา 0.096 กรัมละลายด้วยคลอโรฟอร์มจนมีปริมาตรครบ 10 ml จะได้สารละลายคาเฟอีนเข้มข้น 9.6×10^{-3} g/ml จากนั้นเจือจางสารละลายคาเฟอีนที่เข้มข้น 9.6×10^{-3} g/ml ให้มีความเข้มข้น 4.8×10^{-3} g/ml โดยปีเปิดมา 5 ml ทำให้มีปริมาตรครบ 10 ml และทำให้สารละลายเจือจางลงเรื่อยๆ จนมีความเข้มข้น 2.4×10^{-3} , 1.2×10^{-3} , 0.6×10^{-3} และ 0.3×10^{-3} g/ml ตามลำดับ

1.2 ปีเปิดสารละลายคาเฟอีนความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมได้ในข้อ 1.1 มาความเข้มข้นละ 1 ml spot บนแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (TLC plate) ทิ้งให้แห้ง แล้วนำไปชะด้วย developing solvent เช่นเดียวกันกับข้อ 2.5.3.4 ใน TLC plate จะมีสารเป็นจำนวนกรัมเท่ากับ ความเข้มข้น ดังข้อ 1.1

1.3 นำแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (TLC plate) ในข้อ 1.2 ตรวจวัดด้วย densitometer ที่ค่าความยาวคลื่น 276 nm ผลการตรวจวัดด้วย densitometer ได้ดังรูป 2.33

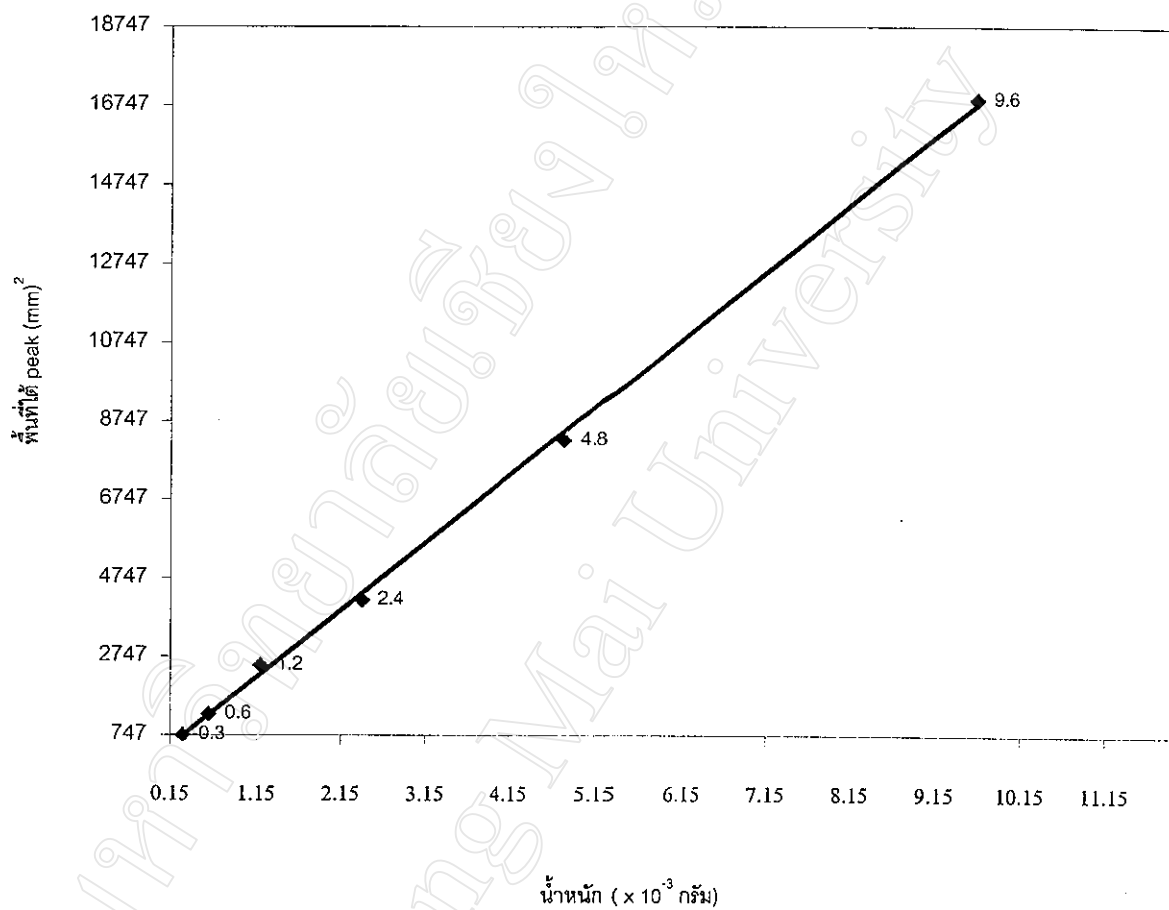


รูป 2.33 ลายแบบโครมาโทกราฟิก (chromatographic fingerprint) ของ standard caffeine
 ที่เข้มข้น 4.8×10^{-4} g/ml
 และได้ค่าพื้นที่ใต้ peak ของสารละลายคาเฟอีน (authentic caffeine) ดังตาราง 2.16

ตาราง 2.16 แสดงค่าน้ำหนัก ($\times 10^{-3}$ กรัม) และพื้นที่ใต้ peak (ตารางมิลลิเมตร) ของ authentic caffeine

น้ำหนักคาเฟอีนมาตรฐาน ($\times 10^{-3}$ กรัม)	พื้นที่ใต้ peak (ตารางมิลลิเมตร)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.3	723.911	796.859	720.878	747.2160
0.6	1300.851	1203.308	1312.433	1272.1971
1.2	2491.226	2680.086	2401.987	2524.433
2.4	4262.174	4407.399	3912.083	4193.8853
4.8	8246.384	8241.522	8298.551	8262.1521
9.6	16653.967	16312.681	17709.776	16892.1411

และได้ calibration curve ดังรูป 2.34

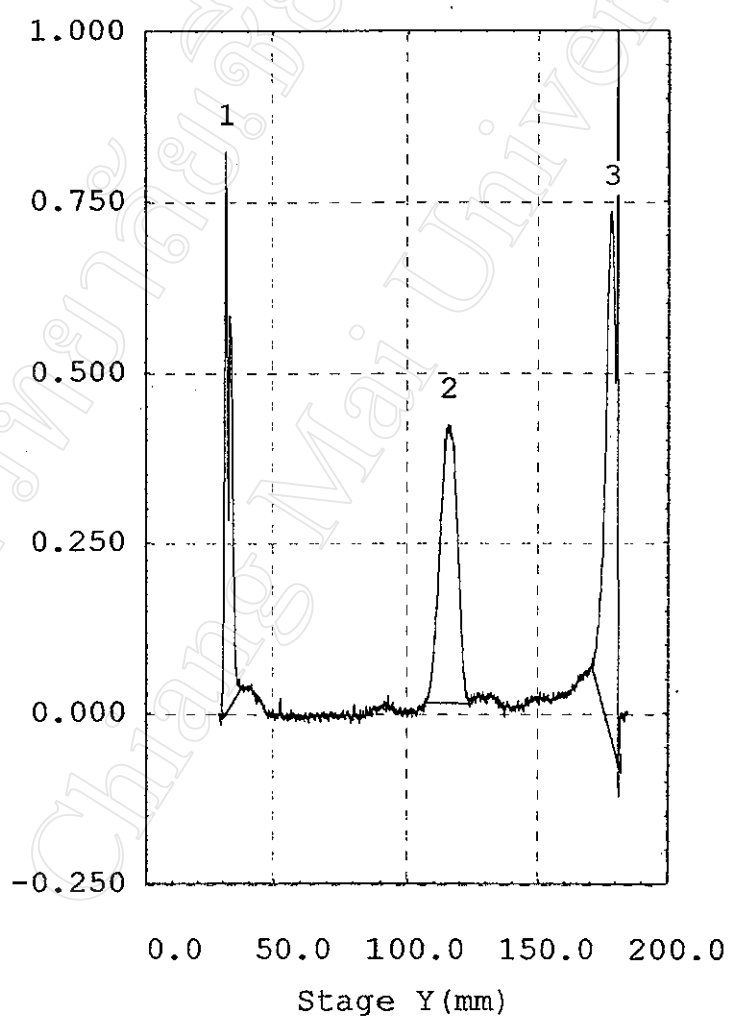


รูป 2.34 calibration curve ของคาเฟอีน (authentic caffeine)

1. การหาปริมาณคาเฟอีนในชาและกาแฟ

1.1 ปิเปตสารสกัดจากข้อ 2.5.3.3 ตัวอย่างละ 1 ml มา spot บนแผ่นโครมาโทกราฟีฝิวบาง (TLC plate) ทิ้งให้แห้ง แล้วนำไปชะด้วย developing solvent เช่นเดียวกันกับ ข้อ 2.5.3.4

1.2 นำแผ่นโครมาโทกราฟีฝิวบาง (TLC plate) ตรวจสอบด้วย densitometer ดังแสดงในรูป 2.35 ที่ค่าความยาวคลื่น 276 nm



รูป 2.35 ลายแบบโครมาโทกราฟิก(chromatographic fingerprint) ของชาตราสามม้า (peak ที่ 2 คือ คาเฟอีน)

และได้พื้นที่ใต้ peak และน้ำหนัก ($\times 10^{-3}$ กรัม) ของคาเฟอีน ดังแสดงในตาราง 2.17

ตาราง 2.17 แสดงค่าพื้นที่ใต้ peak (ตารางมิลลิเมตร)และน้ำหนัก ($\times 10^{-3}$ กรัม) ของคาเฟอีน
ในตัวอย่างชาและกาแฟ

สารตัวอย่าง	พื้นที่ใต้ peak (ตารางมิลลิเมตร)				น้ำหนัก ($\times 10^{-3}$ กรัม) จากกราฟรูปที่ 2.34			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
ใบชาตราสามม้า	4683.195	4768.241	4797.763	4749.733	1.295	1.320	1.328	1.314
ชาลิปตัน	5071.646	5182.871	5221.680	5158.732	1.408	1.440	1.451	1.433
กาแฟอิมบูญ	2347.155	2382.588	2577.056	2435.600	0.617	0.628	0.684	0.643
กาแฟที่สกัดเอา คาเฟอีนออก ตราเตสเตอร์ชอย	1222.152	1276.764	1253.286	1250.734	0.291	0.307	0.300	0.299

3. กำหนดปริมาณคาเฟอีนในชาและกาแฟ

ชาตราสามม้า

จากตาราง 2.17 น้ำหนักเฉลี่ยที่ได้คือ 1.314×10^{-3} กรัม

นั่นคือ สารสกัด 135 ml มีคาเฟอีน $1.314 \times 10^{-3} \times 135 = 177.39 \times 10^{-3}$ กรัม (อยู่ในชา 5 กรัม)

$$\begin{aligned} \therefore \text{ชา } 100 \text{ กรัม มีคาเฟอีน } &= \frac{177.39 \times 10^{-3} \times 100}{5} \text{ กรัม} \\ &= 3547.8 \times 10^{-3} \text{ กรัม หรือ } 3.5478 \text{ กรัม} \\ &\text{หรือ } 3.5478 \% \end{aligned}$$

ในการคำนวณเช่นเดียวกัน พบว่า

ชาลิปตัน 100 กรัม มีคาเฟอีน = 3.4822 กรัม (หรือ 3.4822 %)

กาแฟอิมบูญ 100 กรัม มีคาเฟอีน = 1.7683 กรัม (หรือ 1.7683 %)

กาแฟที่สกัดเอาคาเฟอีนออกตราเตสเตอร์ชอย 100 กรัม มีคาเฟอีน = 0.3827 กรัม
(หรือ 0.3827 %)

2.5.3.7 การหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของคาเฟอีน (authentic caffeine) โดยวิธี densitometer

1. ชั่งคาเฟอีน (authentic caffeine) 0.0300 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์มจนมีปริมาตรครบ 25 ml แล้วบีบเปิดมา 1 ml spot บนแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (TLC plate) ชะด้วย ethyl acetate : methanol : ammonia solution 80 : 10 : 1 ทิ้งแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (TLC plate) ให้แห้ง แล้วนำไปตรวจวัดด้วย densitometer ได้ผลดังตาราง 2.18

ตาราง 2.18 แสดงค่าพื้นที่ใต้ peak (ตารางมิลลิเมตร) และน้ำหนัก ($\times 10^{-3}$ กรัม) ของคาเฟอีน (จาก calibration curve)

สารละลายคาเฟอีน (authentic caffeine)	พื้นที่ใต้ peak (ตารางมิลลิเมตร)				น้ำหนัก ($\times 10^{-3}$ กรัม)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
ปริมาตร 1 ml	4223.370	4523.918	4150.021	4299.103	1.1616	1.2488	1.1403	1.1836

2. การคำนวณหา recovery ของคาเฟอีน (authentic caffeine)

จากตาราง 2.18 น้ำหนักเฉลี่ยของ authentic caffeine เท่ากับ 1.1836×10^{-3} กรัม
 สารละลายคาเฟอีน 25 ml มีคาเฟอีน $1.1836 \times 10^{-3} \times 25 = 29.59 \times 10^{-3}$ กรัม
 หรือ 0.02959 กรัม

$$\therefore \text{เปอร์เซ็นต์ recovery} = \frac{0.02959}{0.0300} \times 100$$

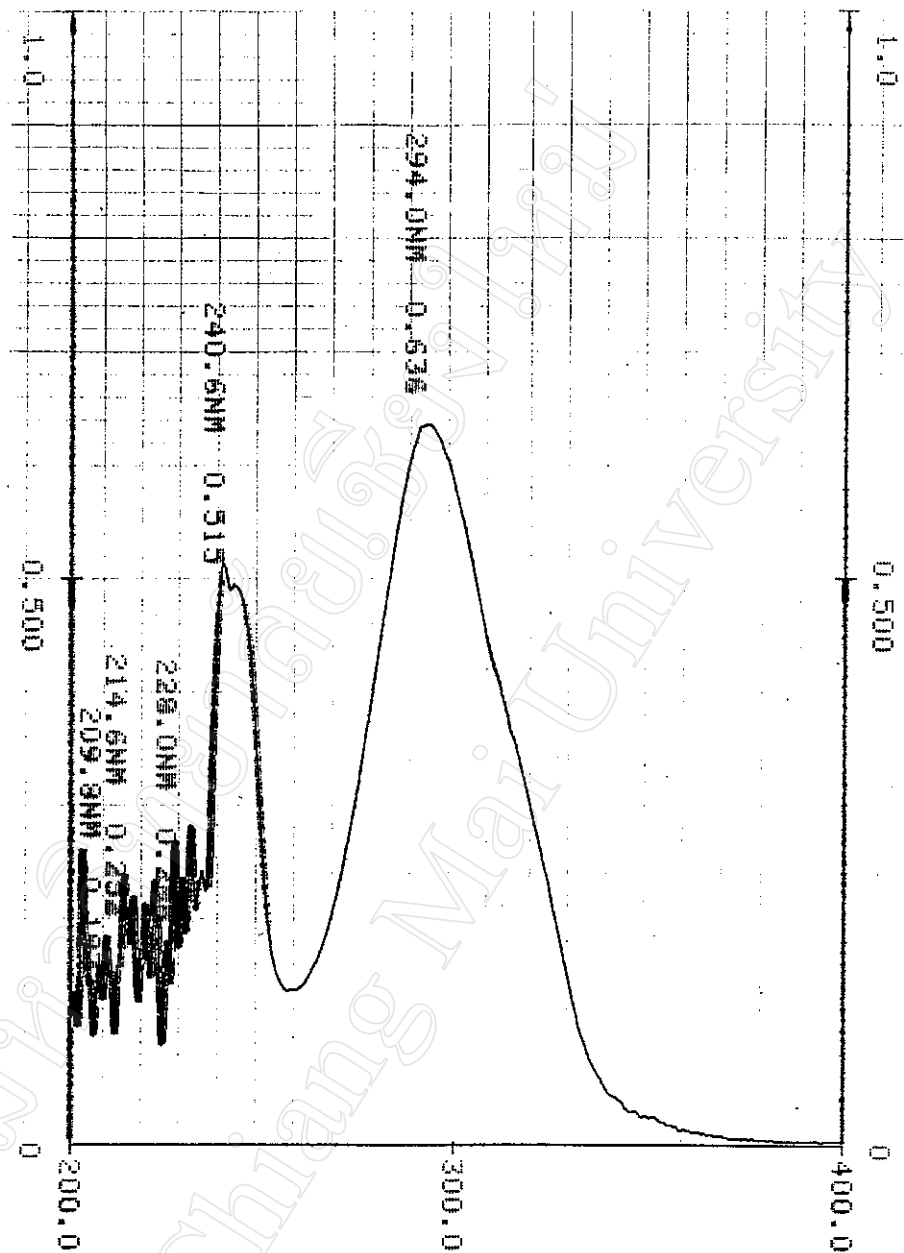
$$= 98.63 \%$$

2.5.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ rotenone

วิธีการทดลอง

2.5.4.1 การหาค่า $\lambda_{\max}$ ของ rotenone

1. เตรียม standard rotenone ความเข้มข้น 20×10^{-6} g/ml โดยชั่ง standard rotenone 0.0005 กรัม ละลายในคลอโรฟอร์ม ทำให้มีปริมาตรครบ 25 ml
2. นำ standard rotenone ความเข้มข้น 20×10^{-6} g/ml มา scan เพื่อตรวจหา $\lambda_{\max}$ ของ rotenone ด้วย UV – 265 spectrometer พบว่า $\lambda_{\max}$ อยู่ที่ 294 nm (ที่ absorbance > 0.5) ดังแสดงในรูป 2.36

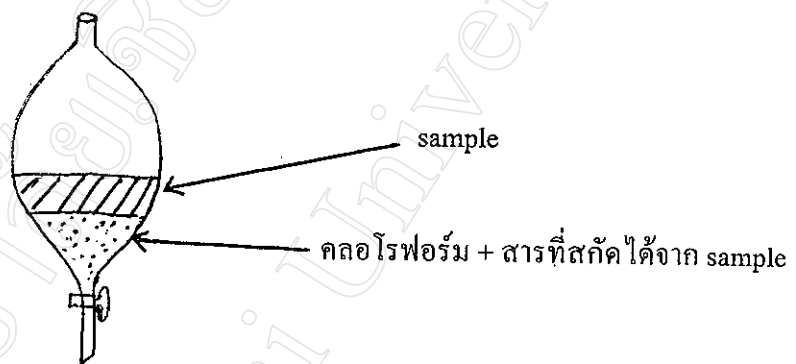


รูป 2.36 การ scan หา $\lambda_{\max}$ ของ rotenone ที่มีความเข้มข้น 20×10^{-6} g/ml ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 400 nm

จากรูป 2.36 พบว่า $\lambda_{\max}$ ของ rotenone มีค่าเท่ากับ 294.0 nm

2.5.4.2 การสกัด rotenone ออกจากตัวอย่าง

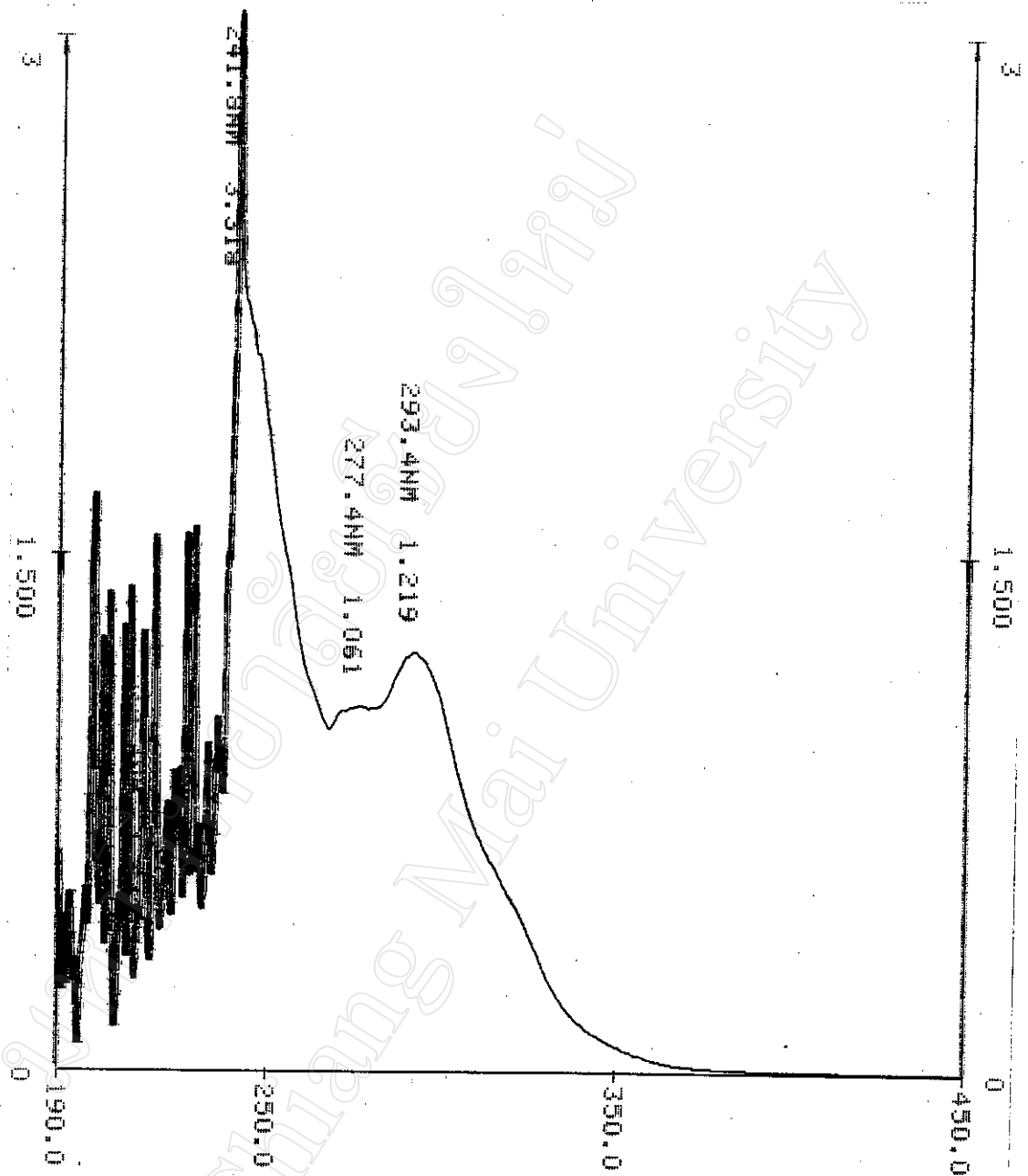
ปีเปตตัวอย่าง 2 ชนิดคือ BIOCIN 1/2 และ BIOCIN 1/3 มาตัวอย่างละ 5 ml ใส่ลงในกรวยแยก เต็มคลอโรฟอร์ม 10 ml เขย่า 5-6 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้นกัน แล้วไขเอาสารละลายชั้นล่างออก ดังรูป 2.37



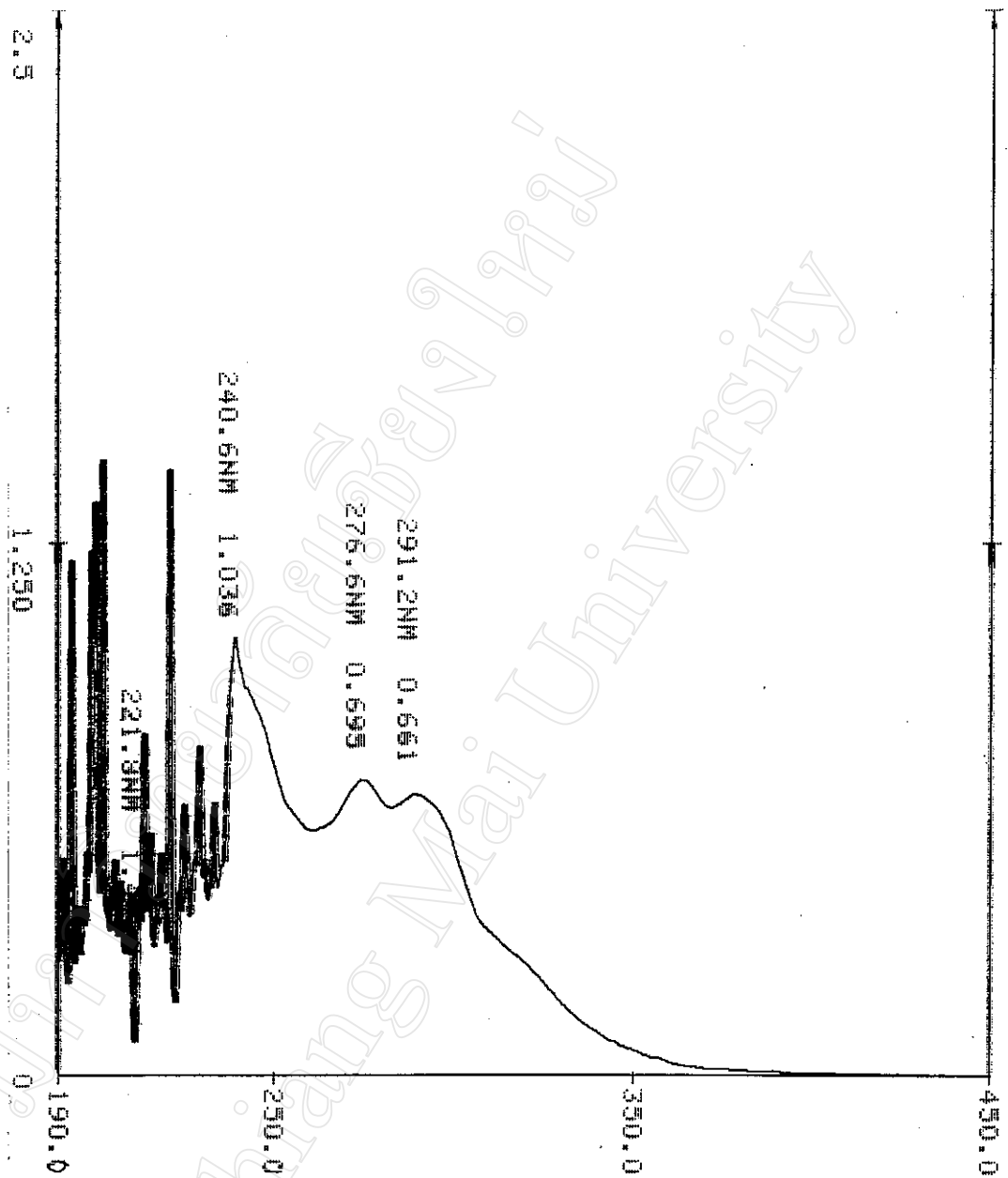
รูป 2.37 แสดงการสกัด rotenone ออกจาก sample

สกัดซ้ำอีก 9 ครั้ง ได้สารสกัดดังนี้ BIOCIN 1/2 ได้ 95.25 ml และ BIOCIN 1/3 ได้ 95.72 ml

2.5.4.3 scan สารสกัดจากตัวอย่าง 2 ชนิด คือ BIOCIN 1/2 และ BIOCIN 1/3 ที่ได้จากข้อ 2.5.4.2 ด้วย UV - 265 spectrometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 190 - 450 nm เพื่อศึกษาว่ามี rotenone อยู่หรือไม่โดยดูจากค่า $\lambda_{\max}$ ที่ 294 nm. แสดงดังรูป 2.38 - 2.39



รูป 2.38 การ scan สารสกัดจาก BIOCIN 1/2 ในช่วงความยาวคลื่น 190 - 450 nm



รูป 2.39 การ scan สารสกัดจาก BIOCIN 1/3 ในช่วงความยาวคลื่น 190 - 450 nm

จากรูป 2.38 และ 2.39 พบว่าตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดคือ BIOCIN 1/2 และ BIOCIN 1/3 มีค่า $\lambda_{\max}$ 293.4 และ 291.2 nm ตามลำดับ ซึ่งควรจะมี rotenone อยู่

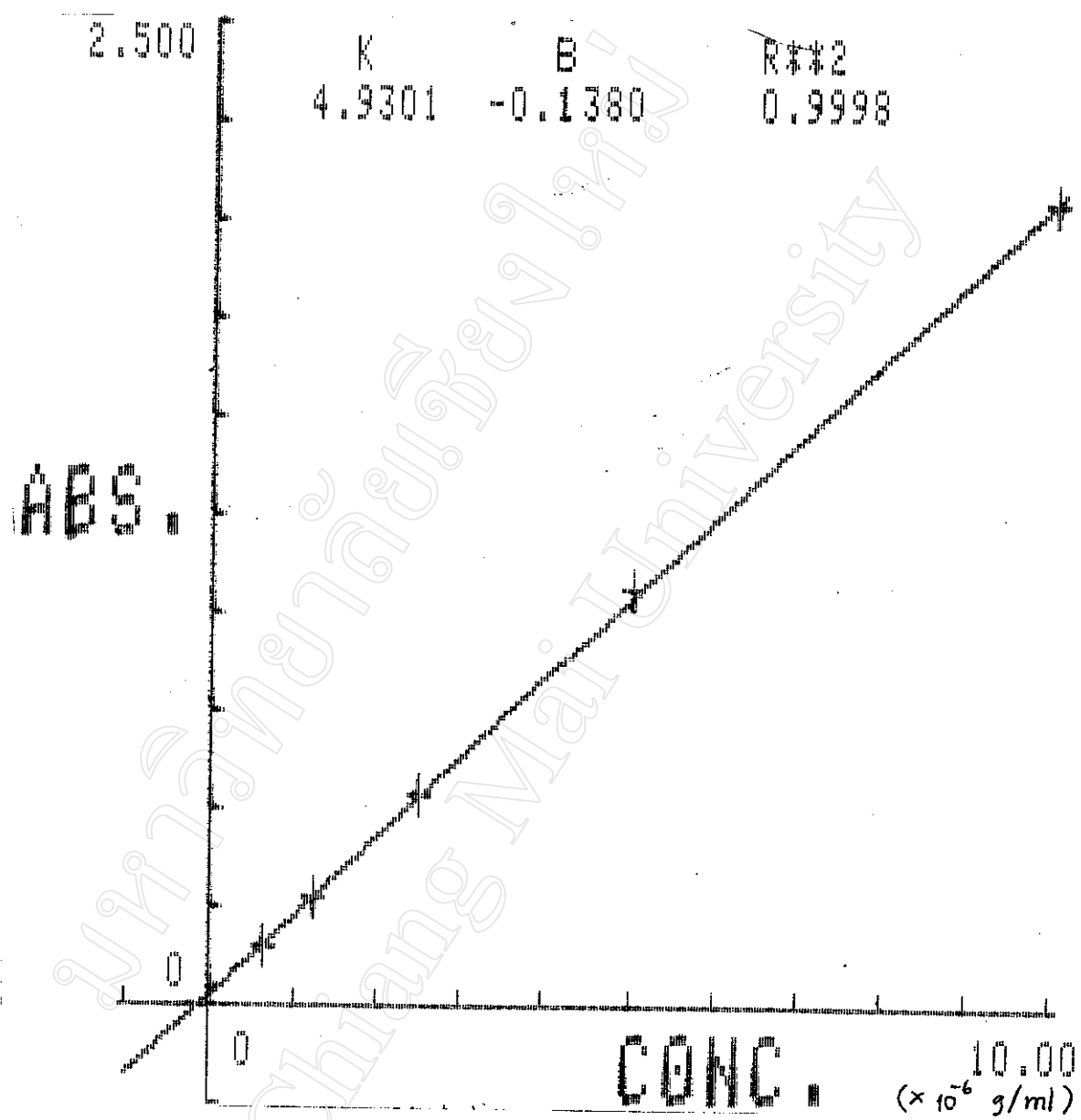
2.5.4.4 การทำกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของ rotenone

โดยเตรียม standard rotenone ที่มีความเข้มข้น 0.6250×10^{-6} , 1.2500×10^{-6} , 2.5000×10^{-6} , 5.0000×10^{-6} และ 10.000×10^{-6} g/ml ดังนี้

1. ชั่ง standard rotenone 0.0010 กรัม ละลายในคลอโรฟอร์มจนมีปริมาตร ครบ 100 ml จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10.0000×10^{-6} g/ml
2. เจือจาง (dilute) สารละลายจากข้อ 1 ให้มีความเข้มข้น 5.0000×10^{-6} g/ml โดยปิเปต(pipette) สารละลายเข้มข้น 10.0000×10^{-6} g/ml มา 5 ml แล้วทำให้มีปริมาตรจนครบ 10 ml ด้วยคลอโรฟอร์มจนมีปริมาตรครบ 10 ml แล้วเจือจาง (dilute) สารละลายเข้มข้น 5.0000×10^{-6} g/ml ให้มีความเข้มข้น 2.5000×10^{-6} , 1.2500×10^{-6} และ 0.6250×10^{-6} g/ml ตามลำดับ โดยทำเช่นเดียวกัน ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.19 และรูป 2.40

ตาราง 2.19 แสดงค่าความเข้มข้น($\times 10^{-6}$ g/ml)และค่าการดูดกลืนแสง(absorbance) ของ standard rotenone

ความเข้มข้น ($\times 10^{-6}$ g/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)
0.6250	0.1505
1.2500	0.2774
2.5000	0.5336
5.0000	1.0598
10.000	2.0484



รูป 2.40 แสดง calibration curve (CC) ของ standard rotenone โดยใช้ UV - 265 spectrometer

2.5.4.5 การหาปริมาณ rotenone ในตัวอย่าง

1. ปิเปต (pipette) สารสกัดจาก BIOCIN 1 / 2 95.25 ml มา 1 ml และ BIOCIN 1/3 95.72 ml มา 1 ml spot บนแผ่นโครมาโทกราฟีผิวนาง (TLC plate) เทียบกับ standard rotenone ชะด้วย 20 % ethyl acetate ใน toluene ทั้งแผ่นโครมาโทกราฟีผิวนาง (TLC plate) ให้แห้ง แล้วนำไปส่องดูภายใต้ UV – light short wavelength พบว่า R_f ของสารตัวอย่างแสดงดังตาราง 2.20

ตาราง 2.20 แสดงค่า R_f ของ BIOCIN 1 / 2 และ BIOCIN 1/3 เทียบกับ standard rotenone

ค่า R_f		
Standard rotenone	BIOCIN 1 / 2	BIOCIN 1 / 3
0.94	0.95	0.90

2. บูดแถบของ rotenone ในตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดออกมาละลายด้วยคลอโรฟอร์ม 10 ml stir 15 – 20 นาที กรองแล้วล้าง silica gel ด้วย คลอโรฟอร์ม จนมีปริมาตรเป็น 10 ml นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วย UV – 265 spectrometer ที่ $\lambda_{\max}$ 294 nm ได้ผลดังแสดงตาราง 2.21

ตาราง 2.21 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น ($\times 10^{-6}$ g/ml) ของ BIOCIN 1 / 2 และ BIOCIN 1/3

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น ($\times 10^{-6}$ g/ml)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
BIOCIN 1 / 2	0.2346	0.2348	0.2347	0.2347	1.0204	1.0182	1.0190	1.0192
BIOCIN 1/3	0.1005	0.1010	0.1013	0.1009	0.3592	0.3597	0.3598	0.3596

3. การคำนวณหาปริมาณ rotenone ในตัวอย่าง

BIOCIN 1/2

จากตาราง 2.12 ความเข้มข้นเฉลี่ยที่ได้คือ 1.0192×10^{-6} g/ml

$$\begin{aligned} \text{สารละลาย } 10 \text{ ml มี rotenone} &= 1.0192 \times 10^{-6} \times 10 && \text{กรัม} \\ &= 10.192 \times 10^{-6} && \text{กรัม} \end{aligned}$$

$$\text{สารสกัด } 95.25 \text{ ml มี rotenone } 10.192 \times 10^{-6} \times 95.25 = 970.788 \times 10^{-6} \text{ กรัม}$$

(มาจาก BIOCIN 1/2 5 ml)

$$\begin{aligned} \therefore \text{BIOCIN 1/2 } 1 \text{ ml มี rotenone } &= \frac{970.788 \times 10^{-6}}{5} && \text{กรัม} \\ &= 1.9420 \times 10^{-4} && \text{กรัม หรือ } 0.1942 \text{ mg} \end{aligned}$$

และในการคำนวณทำนองเดียวกัน BIOCIN 1/3 1 ml จะมี rotenone 0.0688 mg

2.5.4.6 การหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของ standard rotenone

1. ชั่ง standard rotenone 0.0001 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม จนมีปริมาตร 25 ml แล้วปิเปตมา 1 ml spot บนแผ่นโครมาโทกราฟีผิวนาง (TLC plate) ชะด้วย 20 % ethyl acetate ใน toluene แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง ส่องดูภายใต้ UV - light short wavelength พบว่าได้ค่า R_f เท่ากับ 0.94

2. ชูคแถบที่เป็น rotenone ออกมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 10 ml stir 15 - 20 นาที กรองและล้าง silica gel ด้วยคลอโรฟอร์มจนสารละลายที่ได้มีปริมาตร 10 ml นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วย UV - 265 spectrometer ได้ผลดังแสดงดังตาราง 2.22

ตาราง 2.22 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น ($\times 10^{-6}$ g/ml) ของ standard rotenone

Standard rotenone	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้น ($\times 10^{-6}$ g/ml)
ปริมาตร 10 ml	0.0979	0.3446

3. การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของ rotenone

จากตาราง 2.22 ความเข้มข้นของ rotenone มีค่าเท่ากับ 0.3446×10^{-6} กรัม

$$\begin{aligned} \text{สารละลาย } 10 \text{ ml มี rotenone} &= 0.3446 \times 10^{-6} \times 10 \text{ กรัม} \\ &= 3.446 \times 10^{-6} \text{ กรัม} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{สารละลายทั้งหมด } 25 \text{ ml มี rotenone} &= 3.446 \times 10^{-6} \times 25 = 86.15 \times 10^{-6} \text{ กรัม} \\ &\text{หรือ } 0.00008615 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \therefore \text{เปอร์เซ็นต์ recovery} &= \frac{0.00008615}{0.0001} \times 100 \\ &= 86.15 \% \end{aligned}$$