บทที่4
ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก ด้วยเทคนิค HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์

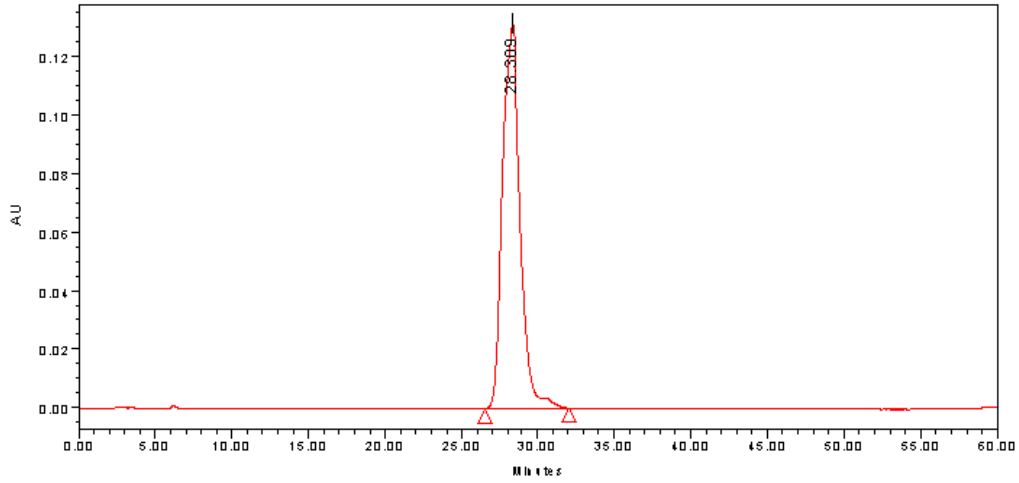
4.1.1 ศึกษาหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

ศึกษาหาอัตราการไหลที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก โดยใช้สัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ สารละลายอะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร

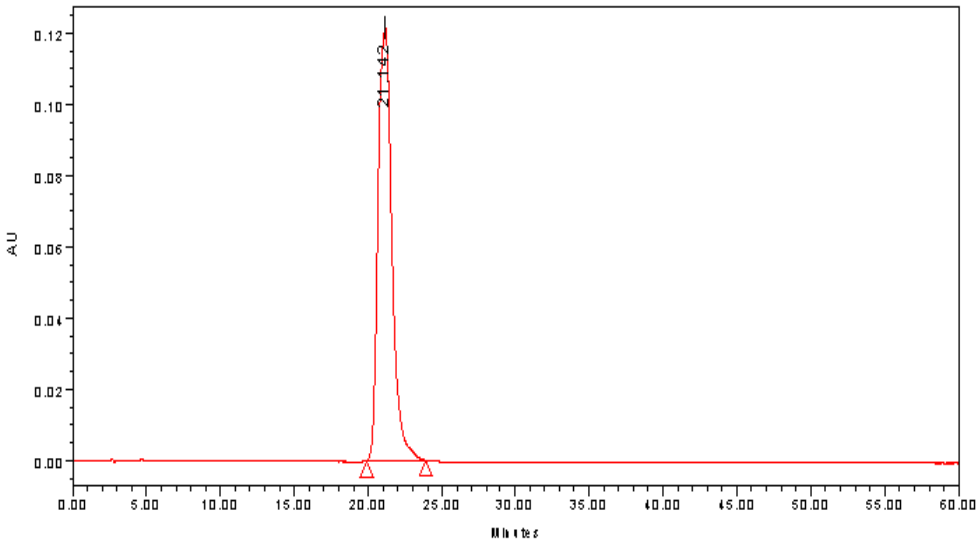
จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้สารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกทดสอบหาอัตราการไหลที่ 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก คือ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งเป็นอัตราการไหลที่เหมาะสมเนื่องจากมีเวลารีเทนชันเร็วกว่าอัตราการไหลที่ 0.6 และ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเวลารีเทนชัน (retention time) ในการแยกสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกที่อัตราการไหลต่าง ๆ

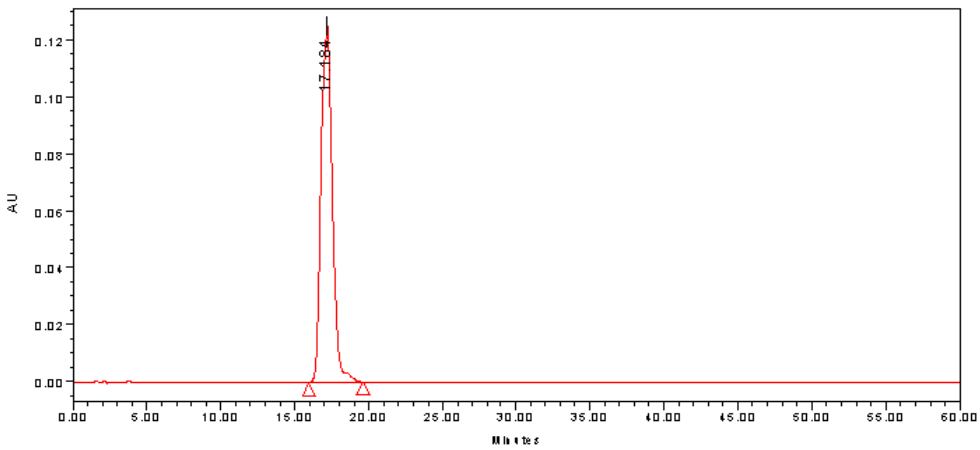
อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	เวลารีเทนชัน (นาที)
0.6	28.31
0.8	21.14
1.0	17.18



รูปที่ 4.1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ความเข้มข้น 100 ppm เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปที่ 4.2 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ความเข้มข้น 100 ppm เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

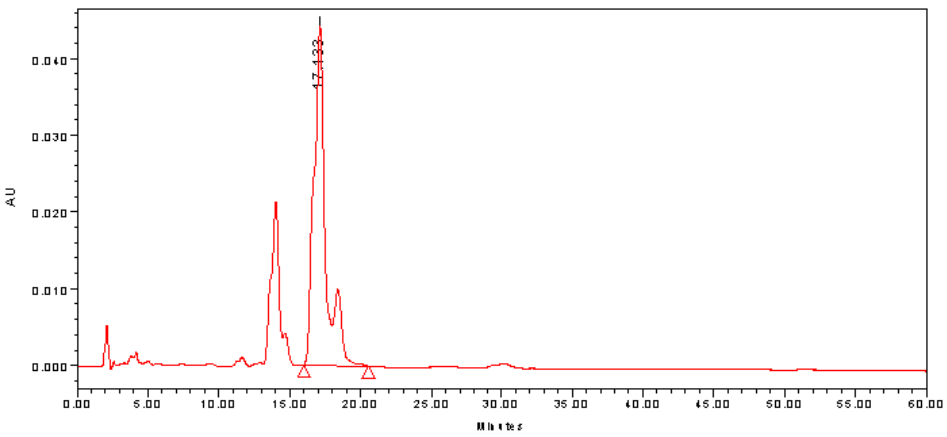


รูปที่ 4.3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ความเข้มข้น 100 ppm เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

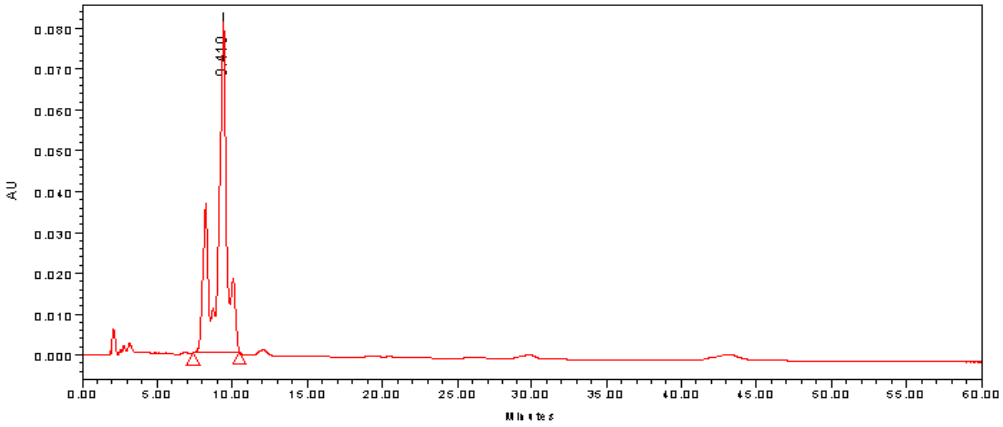
4.1.2 ศึกษาหาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่

ใช้สารละลายตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ HiQ sil C18 HS ขนาดอนุภาค 5 ไมครอนโดยศึกษาจากอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร และสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการศึกษาคืออะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น2% 10 : 90 15 : 85 และ 20 : 80 ปริมาตรโดยปริมาตรตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

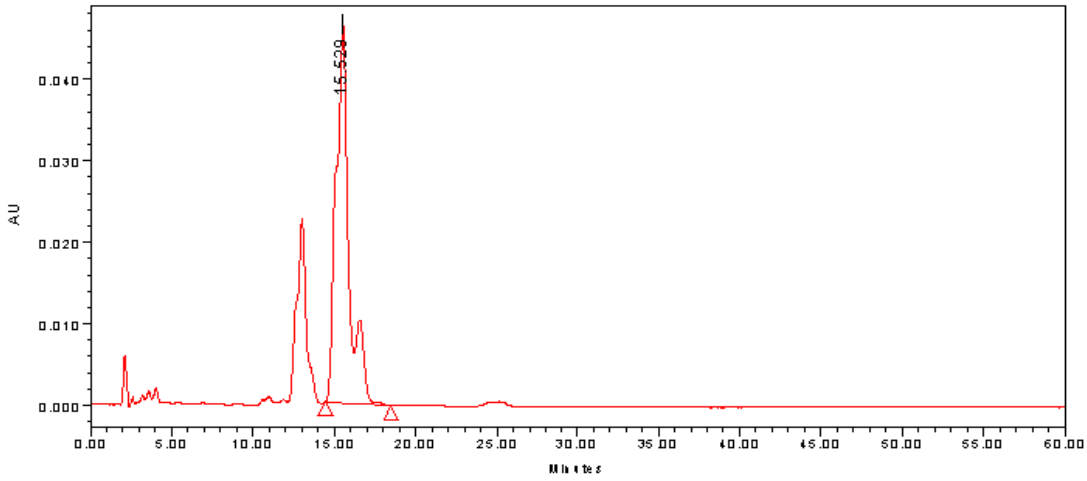
จากการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการแยกสารละลายตัวอย่างคือ อัตราส่วน อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร จากในรูปที่ 4.5 ได้ผลการแยกที่เวลารีเทนชันที่ 17.133 โดยอัตราส่วน 10 : 90 เมื่อทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างจะถูกชะออกจากคอลัมน์เร็วทำให้การแยกสารตัวอย่างไม่ดี (รูปที่ 4.4) และอัตราส่วน 20 : 80 เมื่อทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างจะถูกชะออกจากคอลัมน์เร็วทำให้เกิดการแยกที่ไม่สมบูรณ์ ลักษณะดังกล่าวเกิดจากกการเคลื่อนที่ยังไม่เหมาะสมเพียงพอ (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.4 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวดอกมะลิ 105 กล้องงอก โดยเฟสเคลื่อนที่อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น2% 10 : 90 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร



รูปที่ 4.5 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวดอกมะลิ 105 กล้องงอก โดยเฟสเคลื่อนที่อะซิโทไนไทรล์ : แอซิติกเข้มข้น2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร



รูปที่ 4.6 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายตัวอย่างข้าวดอกมะลิ 105 กล้องงอกโดยเฟสเคลื่อนที่อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น2% 20 : 80 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร

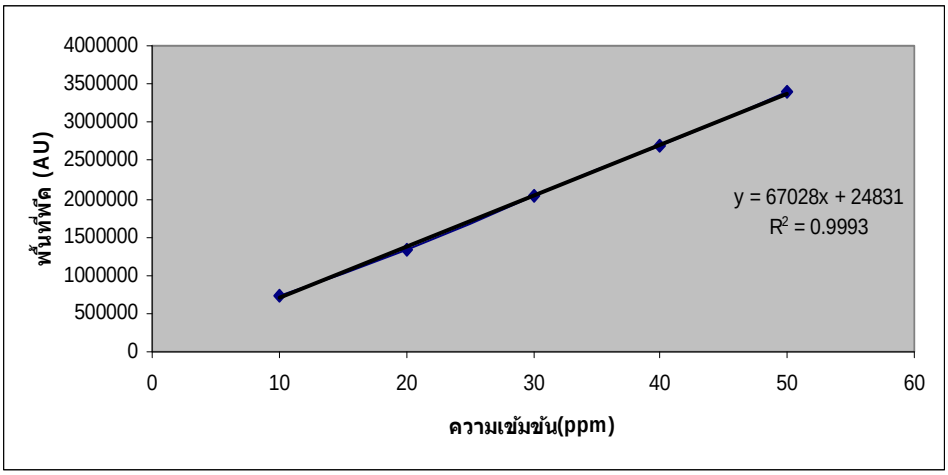
ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเฟสเคลื่อนที่สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เหมาะสมคืออะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร ซึ่งสามารถแยกสารประกอบกรดเฟอร์รูลิกจากสารตัวอย่างได้เนื่องจากมีความแรงของตัวทำละลายสำหรับการชะที่เหมาะสม (ภาคผนวก ก.) อัตราส่วนในการแยกสารละลายกรดเฟอร์รูลิกสรุปได้ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราส่วนในการแยกสารละลายกรดเฟอร์รูลิกที่อัตราส่วนต่างๆ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

อัตราส่วนของอะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% (ปริมาตรโดยปริมาตร)	อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	เวลารีเทนชัน (นาที)
10 :90	1.0	15.520
15 :85	1.0	17.133
20 :80	1.0	9.410

4.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก

นำสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 มาสร้างกราฟมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกโดยทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 10-50 mg/L ในเฟสเคลื่อนที่อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร ทำการตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้ง (ภาคผนวก ข.) แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดเฟอร์รูลิก ช่วงความเข้มข้น 10-50 mg/L โดยใช้เฟสเคลื่อนที่อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตรปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร

จากกราฟสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก รูปที่ 4.7 คำนวณค่าสัมประสิทธิการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9993 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ พบว่าปริมาณกรดเฟอร์รูลิกต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 1.4995 mg/L และปริมาณกรดเฟอร์รูลิกต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้(LOQ) เท่ากับ 4.9985 mg/L (ภาคผนวก ง.)

4.3 ศึกษาความเที่ยง (Precission)

ศึกษาโดยการนำสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก เข้มข้น 100 mg/L ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการตรวจวัดซ้ำ 5 ครั้ง ได้ค่า % RSD เท่ากับ1.37 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (% RSD ไม่ควรเกินร้อยละ 2.0) ดังแสดงตารางที่ 4.3

ตารางที่4.3 แสดงผลความเที่ยงสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก เข้มข้น 100 mg/L

ครั้งที่	**ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก (mg/L)**
1	99.37
2	98.03
3	99.1
4	100.48
5	101.59
ค่าเฉลี่ย	99.71
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.36
% RSD	1.37

4.4 ศึกษาความแม่นยำ (Accuracy)

ทำการศึกษาโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกจาก stock standard solution 100 mg/L ด้วยวิธี spiked sample

ตัวอย่างที่ทดสอบ มีปริมาณกรดเฟอร์รูลิก = 20 mg/L

ตัวอย่าง + spiked มีปริมาณกรดเฟอร์รูลิก = 68 mg/L

สารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ที่เติมมีความเข้มข้น = 50 mg/L

คำนวณร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ได้เท่ากับ (68-20)*100/50 = 96 %

ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (% recovery จะต้องอยู่ระหว่าง 85-115 %)

4.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก

4.5.1 การวิเคราะห์โดยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐาน (External Standard Method)

นำตัวอย่างข้าวกล้องงอกที่ผ่านการสกัดตามหัวข้อ 3.2.2 ที่สภาวะการทดลองที่ใช้ใช้เฟสเคลื่อนที่อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร

วิเคราะห์ผลที่ได้เทียบหาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกจากกราฟมาตรฐานหัวข้อ 4.2 โดยการฉีดตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง (n = 3) (ภาคผนวก ข.)

ตารางที่4.4 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก ด้วยเทคนิค External Standard Method

ตัวอย่างข้าว	**ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกเฉลี่ย (มิลลิกรัม/ตัวอย่าง100 กรัม)**
ดอกมะลิ 105	14.73
หอมมะลิแดง	13.74
เสาไห้	14.67

4.5.2 การวิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน (Standard Addition Method)

นำสารละลายที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.2.5.2 ที่สภาวะเหมาะสมอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร วัดพื้นที่พีคและเขียนกราฟระหว่างพื้นที่พีคกับปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงไปในปริมาณต่างๆ เพื่อหาปริมาณของกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก (ภาคผนวก ค.)

ตารางที่4.5 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกด้วยเทคนิค Standard Addition Method

ตัวอย่างข้าวกล้องงอก	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ความเข้มข้นสารมาตรฐานที่เติม (mg/L)	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกเฉลี่ย (mg/10 mL)	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกเฉลี่ย (mg/100 g)	% RSD
ดอกมะลิ 105	2.0636	2 4 6	1.56	15.60	6.03
หอมมะลิแดง	2.0377	2 4 6	1.79	17.90	14.24
เสาไห้	2.0582	2 4 6	1.63	16.36	0.18

จากตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกที่ได้สามารถคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับ แสดงว่าผลการวิเคราะห์มีความเที่ยงที่ยอมรับได้

ตารางที่4.6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกทั้ง 2 วิธี

ตัวอย่างข้าวกล้องงอก	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก	
	External Standard Method	**Standard Addition Method**
ดอกมะลิ 105	15.33±0.47	15.60±0.94
หอมมะลิแดง	16.00±0.24	17.90±2.55
เสาไห้	15.06±0.82	16.36±0.03

นำผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกไปทดสอบโดยวิธี เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างวิธีวิเคราะห์ แสดงผลดังตารางที่ 4.6 (การคำนวณในภาคผนวก จ.)

ตารางที่4.7 แสดงผลการวิเคราะห์ t-test ในตัวอย่างข้าวกล้องงอก ที่ระดับความมั่นใจ 99% *(P<0.01)*

ตัวอย่าง ข้าวกล้องงอก	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก (มิลลิกรัม/100กรัม)					
	External Standard			Standard Addition		
	Mean	SD	%RSD	Mean	SD	%RSD
ดอกมะลิ 105	15.33	0.47	3.08	15.60	0.94	6.03
หอมมะลิแดง	16.00	0.24	1.53	17.90	2.55	14.24
เสาไห้	15.06	0.82	5.47	16.36	0.03	0.18

จากผลการคำนวณ t-test ที่คำนวณได้ (t_{cal}) น้อยกว่าค่า จากตาราง (t_{table}) แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก ทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจ 99% *(P<0.01)* (การคำนวณในภาคผนวก จ.ตารางที่ จ.1)

ตารางที่4.8 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก และข้าวกล้อง

ตัวอย่าง พันธุ์ข้าว	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก (มิลลิกรัม/100กรัม)	
	ข้าวกล้องงอก	ข้าวกล้อง
ดอกมะลิ 105	14.73	14.48
หอมมะลิแดง	13.74	13.64
เสาไห้	14.67	14.80

จากผลการคำนวณ t-test ที่คำนวณได้ (t_{cal}) น้อยกว่าค่า จากตาราง (t_{table}) แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก ทั้งในตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้อง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจ 99% *(P<0.01)*(การคำนวณในภาคผนวก จ. ตารางที่ จ.2)