



ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเลือกภาวะของ CE

4.1.1 ขนาดและความยาวของคะพิลลารี

งานวิจัยนี้เลือกใช้ uncoated fused silica capillary ขนาด $75\ \mu\text{m}$ i.d. \times 60.2 cm (50 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) ในการใช้ uncoated fused silica capillary เนื่องจากสามารถหาได้ง่าย ราคาถูก ไม่ยุ่งยากในการเก็บรักษา และต้องการให้มี EOF เพื่อช่วยให้สารเคลื่อนที่ไปยังเครื่องตรวจวัดได้ โดยทั่วไปขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของคะพิลลารีที่ใช้ใน CE คือ 50 และ $75\ \mu\text{m}$ [Chankvetadze: 1997] ถึงแม้ว่าคะพิลลารีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $50\ \mu\text{m}$ จะให้ค่าการแยกของสาร (resolution) ที่ดีและทำให้เกิด Joule heating น้อยกว่า แต่เนื่องจากในงานวิจัยนี้สารที่ทำการวิเคราะห์มีความเข้มข้นต่ำจึงได้เลือกใช้คะพิลลารีขนาด $75\ \mu\text{m}$ ซึ่งให้สภาพไว (sensitivity) ที่ดีกว่า เนื่องจากใช้เครื่องยูวีในการตรวจวัดและตรวจวัดบนคอลัมน์ (on-column detection) ซึ่งความยาวของช่องว่างที่ให้แสงผ่าน (cell path length) ขึ้นอยู่กับเส้นผ่านศูนย์กลางของคะพิลลารี ดังนั้นถ้า cell path length ยิ่งมากจะทำให้สภาพไวสูงตามไปด้วย เหมาะในการวิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้นต่ำ (trace analysis) เหมือนในงานวิจัยนี้ และความยาวของคะพิลลารีที่เลือกใช้ คือ 60.2 cm เพื่อให้สารเกิดการแยกได้ดีขึ้น

4.1.2 ความยาวคลื่นของการตรวจวัด

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนสกัดห้วกวาวเครือขาวทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ คาอิดซิน พิววาริน กวาวคูริน คาอิดเซอิน และจีนิสเตอิน มีค่าการดูดกลืนแสง UV สูงสุดที่ความยาวคลื่น 245, 256, 204, 254 และ 266 nm ตามลำดับ และจากงานวิจัยก่อนหน้าที่วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวด้วย HPLC ได้ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm [Cherdshewasart *et al.*: 2007] ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารทั้ง 5 ชนิดที่ดีและมีสัญญาณรบกวนที่ต่ำ ดังนั้นจึงเลือกตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm

4.1.3 องค์ประกอบของบัฟเฟอร์

ในงานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณคาอิดซิน พิววาริน กวาวคูริน คาอิดเซอิน และจีนิสเตอินในส่วนสกัดห้วกวาวเครือขาวด้วย CZE และ MEKC โดยใช้สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte, BGE) ภาวะที่เป็นเบส

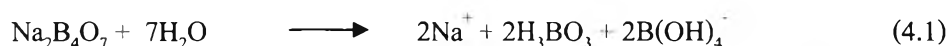
สำหรับ CZE อาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร ซึ่งขึ้นอยู่กับความแตกต่างของอัตราส่วนของค่าประจุต่อขนาดของสารตัวอย่าง สารละลายอิเล็กโทรไลต์ส่วนใหญ่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ทั่วไป หรือบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยสารเติมแต่งบางชนิดที่ไม่ทำให้กลไกของการแยกเปลี่ยนแปลงไป สารเติมแต่งบัฟเฟอร์ เช่น ตัวทำละลายอินทรีย์ ในงานวิจัยนี้ใช้บอเรตบัฟเฟอร์ที่มีหรือไม่มีสารเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอะซิโตน ไทรอลหรือเมทานอล

สำหรับ MEKC มีการเติมสารลดแรงตึงผิวเพื่อทำหน้าที่เป็น pseudo stationary phase กลไกการแยกของสารขึ้นอยู่กับ partitioning ของสารระหว่างไมเซลล์เฟสและเอควีเฟส และความสามารถของการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร ในงานวิจัยนี้ใช้บัฟเฟอร์ประกอบด้วยบอเรตบัฟเฟอร์ที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีหรือไม่มีสารเติมตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเลือกใช้เป็นบอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 ที่มีสารลดแรงตึงผิวเป็นโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) และตัวทำละลายอินทรีย์เป็นอะซิโตน ไทรอลหรือเมทานอล

1) pH ของบัฟเฟอร์

งานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณคาอิดซิน พิวราลิน กวาวคูริน คาอิดเซอิน และจินิสเตอินในส่วนสกัดกวาวเครือขาวในบัฟเฟอร์ภาวะที่เป็นเบส โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 เพื่อให้สารที่สนใจทั้ง 5 ชนิดซึ่งเป็นกรดอ่อน [Aussenac *et al.*: 1998] แยกตัวกลายเป็นประจุและทำให้เกิด EOF มาก

pH ของ BGE มีผลต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารและ EOF ดังนั้นเพื่อให้ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์คงที่ ในการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์จึงนิยมเตรียมโดยละลาย $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ด้วยน้ำ จะได้บัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 โดยไม่ต้องปรับ pH ใด ๆ [Altria และ Fabre 1995] ซึ่งสามารถอธิบายได้ดังสมการที่ 4.1



ในสารละลายบัฟเฟอร์ประกอบด้วยกรดอ่อน (HA) และเกลือของกรดอ่อน (A^-) ดังสมการของ Henderson-Hasselbalch [Chang 1991]

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (4.2)$$

ในกรณีนี้ HA คือ H_3BO_3 และ A^- คือ $\text{B}(\text{OH})_4^-$ จากสมการที่ (4.1) และ (4.2) ทำให้ในสารละลายมี H_3BO_3 ซึ่งเป็นกรดอ่อน และ $\text{B}(\text{OH})_4^-$ ซึ่งเป็นคู่กรด สารละลายจึงมีสภาพเป็นบัฟเฟอร์และจะมีความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร ไมเกรชันไทม์ และ EOF ที่มีความเที่ยง

2) สารลดแรงตึงผิว (surfactant) [Khaledi: 1998]

SDS เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้กันมากใน CE เนื่องจาก SDS เป็นสารที่มีความบริสุทธิ์สูง หาง่าย ราคาถูก มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี มีค่า CMC ต่ำ และ SDS ถูกใช้อย่างกว้างขวางในการแยกสารประเภทฟีนอล กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน เพปไทด์และโพรตีน เป็นต้น

4.2 การหาภาวะของ CZE

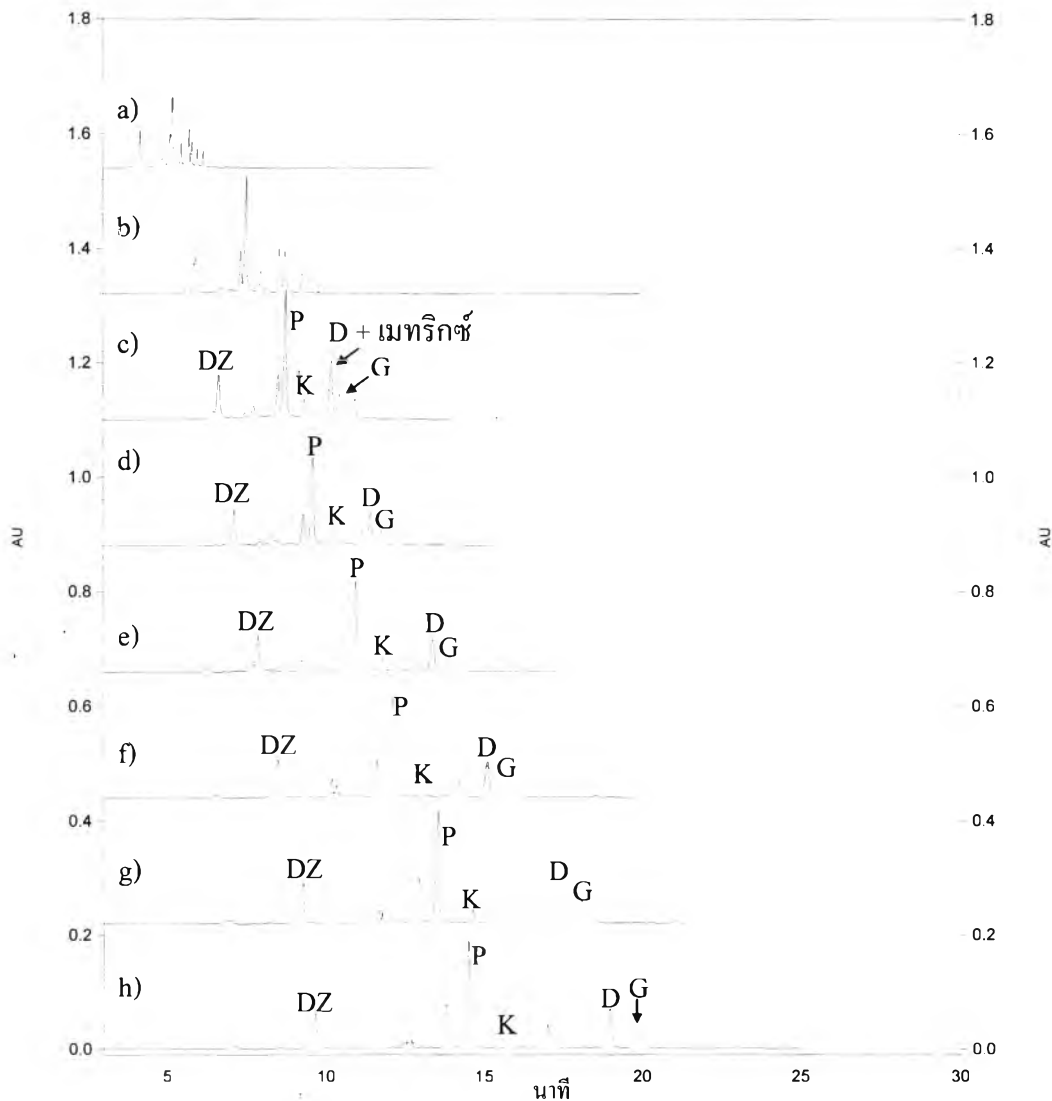
ในงานวิจัยนี้ทำการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณคาอิดซิน พิวราริน กวาควูริน คาอิดเซอินและจีนิสเตอิน โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ ผลของชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์และศักย์ไฟฟ้า ที่มีต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสาร

4.2.1 ผลของความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)

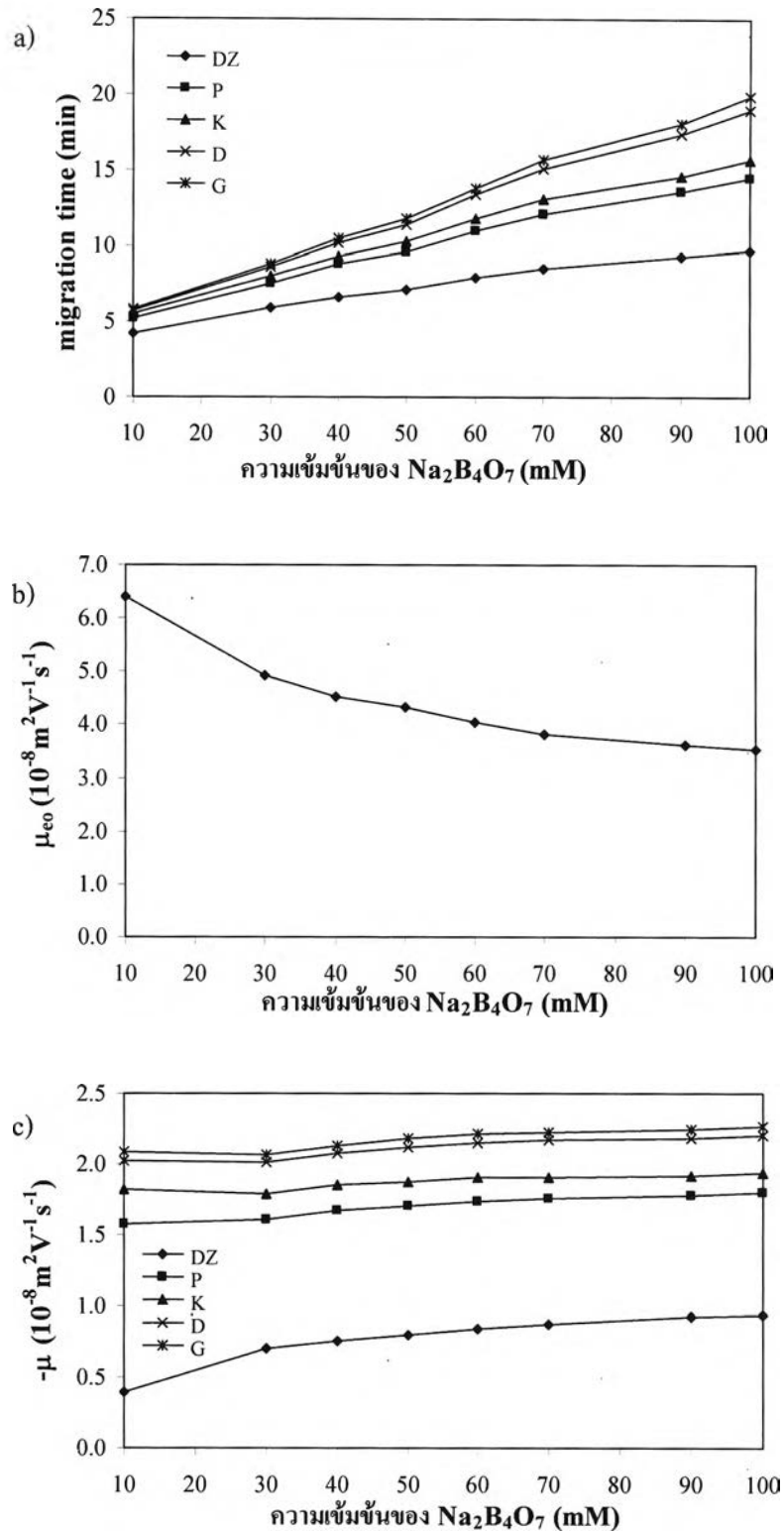
ในช่วงแรกของการทดลองได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ในช่วง 10 ถึง 100 mM ต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของคาอิดซิน (D) พิวราริน (P) กวาควูริน (K) คาอิดเซอิน (DZ) และ จีนิสเตอิน (G) ในส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย คือ กวาควูริน และจีนิสเตอินให้มีความเข้มข้นอย่างละ 50 ppm (สารละลายมาตรฐานหัวข้อ 3.4.2) โดยใช้อุณหภูมิ 25 °C ศักย์ไฟฟ้า 20 kV ผลที่ได้แสดงดังอิเล็กทรอนิกส์โทรฟีโรแกรมรูปที่ 4.1 พบว่า DZ เคลื่อนที่ออกมา ก่อนตามด้วย P, K, D และ G ตามลำดับ เนื่องจากความแตกต่างของอัตราส่วนระหว่างประจุต่อขนาดของสาร โดยสารที่มีประจุมากและขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ออกมาที่หลังสารที่มีประจุเล็กและขนาดใหญ่กว่า ซึ่งสารที่สนใจทั้ง 5 ชนิดเป็นสารในกลุ่มไอโซลาโวนจัดเป็นกรดอ่อนที่มีค่าคงที่การแตกตัวในช่วง pH 9 ถึง 10 และขนาดของสารกลุ่มนี้จะแตกต่างกันที่ส่วนโมเลกุลของฟีนอลและโมเลกุลของน้ำตาล [Aussenac *et al.*: 1998] ดังนั้น G เคลื่อนที่ออกมาช้าที่สุด เนื่องจาก G มีหมู่ไฮดรอกซิล 3 ตำแหน่ง ที่วงเบนซีนจึงสามารถแตกตัวได้มากกว่าสารอื่น ในขณะที่ DZ มีขนาดโมเลกุลมากที่สุดอีกทั้งมีหมู่ไฮดรอกซิลเพียง 1 ตำแหน่ง จึงมีผลให้ DZ เคลื่อนที่ออกมาเร็วที่สุด [Wang *et al.*: 1998] จากรูปที่ 4.1 สังเกตได้ว่า DZ ไม่สามารถแยกออกจากเมทริกซ์ได้ในทุกความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ และการเพิ่มความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ทำให้ P, K, D และ G สามารถแยกออกจากเมทริกซ์ได้ดีขึ้น โดยที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ขึ้นไปสามารถแยกพิทสารทั้ง 5 ชนิดออกจากเมทริกซ์ได้แต่ยังไม่สมบูรณ์ แต่ที่ความเข้มข้น 90 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ขึ้นไปกลับทำให้ G ไม่แยกออกจากเมทริกซ์ ผลของความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่มีผลต่อไมเกรชันโทมของสารแสดงดังรูปที่ 4.2a พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ สารเคลื่อนที่ออกมาได้ช้าลง เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของ BGE เป็นการเพิ่มความแรงไอออนิกทำให้ EOF ลดลงดังรูปที่

4.2b (ตั้งสมการที่ 2.10) และจากค่า t_{co} และ t_m นำมาคำนวณค่า μ ตามสมการที่ 2.15 โดยรวมนั้นเมื่อความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ สูงขึ้นขนาดของ μ หรือ $|\mu|$ (ดังรูปที่ 4.2c) เพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากผลของ Joule heating มากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BGE จึงมีผลทำให้ค่า μ มีค่าเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ในช่วง 10 ถึง 100 mM พบว่ายังไม่สามารถแยกพีคสารทั้ง 5 ชนิดออกจากเมทริกซ์ได้สมบูรณ์ จึงเลือกที่ความเข้มข้น 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่ไม่นานมากนักสำหรับใช้ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อไป



รูปที่ 4.1 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วย กวาวคูรินและจีนิสเตอีนอย่างละ 50 ppm) โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ: (a) 10, (b) 30, (c) 40, (d) 50, (e) 60, (f) 70, (g) 90 และ (h) 100 mM, พีค DZ = คาอิดเซอีน, P = พิวราริน, K = กวาวคูริน, D = คาอิดซิน, G = จีนิสเตอีน, ภาวะอื่นๆ ของ CE: uncoated fused silica capillary ขนาด $75 \mu\text{m} \times 60.2 \text{ cm}$ (50 cm ถึงเครื่องตรวจวัด), อุณหภูมิของคัพพิลลารี 25°C , ความต่างศักย์ที่ใช้แยกสาร 20 kV, บรรจุสารตัวอย่างด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 5 s, ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm



รูปที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นบอเรตต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสาร a) ไมเกรชัน ไทม์ b) ค่า μ_{co} c) ค่า μ ของสารทั้ง 5 ชนิด: ภาวะการทดลองดังรูป 4.1

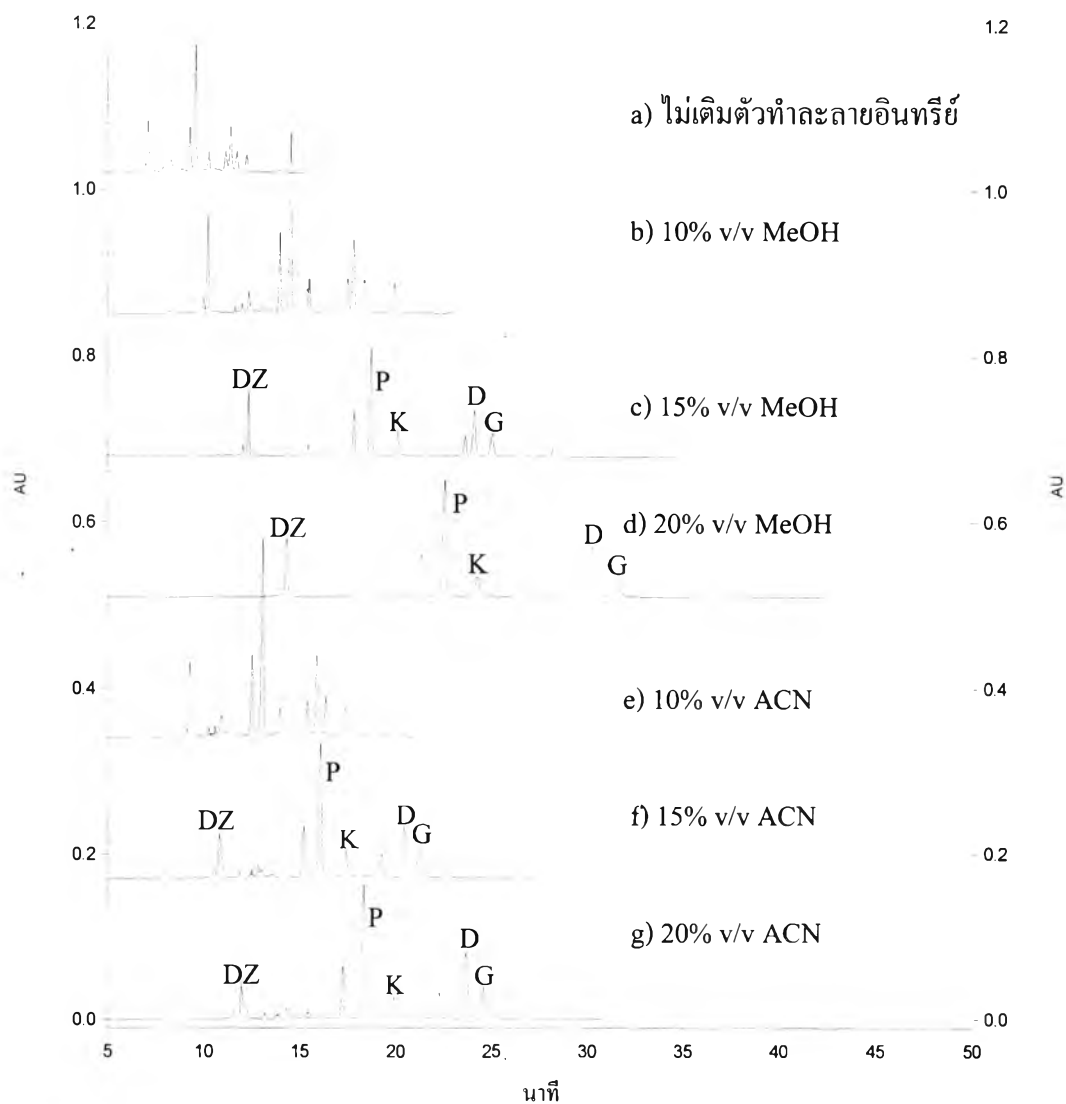
4.2.2 ผลของชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์

ได้ศึกษาชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อการแยกสาร โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ และตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเมทานอลหรืออะซิโตไนไตรล์ ในช่วง 10 ถึง 20% v/v สำหรับแยกและวิเคราะห์ส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เดิมสารที่มีอยู่น้อย (สารละลายมาตรฐานหัวข้อ 3.4.2) ผลการทดลองดังอิเล็กทรอนิกส์โทรฟีโรแกรมรูปที่ 4.3 ในกรณีที่ไม่มี การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปในบัฟเฟอร์ (รูปที่ 4.3a) พบว่าไม่สามารถแยกสารทั้ง 5 ตัวออกจากเมทริกซ์ได้สมบูรณ์ จึงได้ทำการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอะซิโตไนไตรล์ หรือเมทานอล ปริมาณที่แตกต่างกันตั้งแต่ 10 ถึง 20% v/v ในบัฟเฟอร์เพื่อปรับปรุงการแยกของสาร [Aussenac *et al.*: 1998] ดังรูปที่ 4.3b ถึง 4.3g

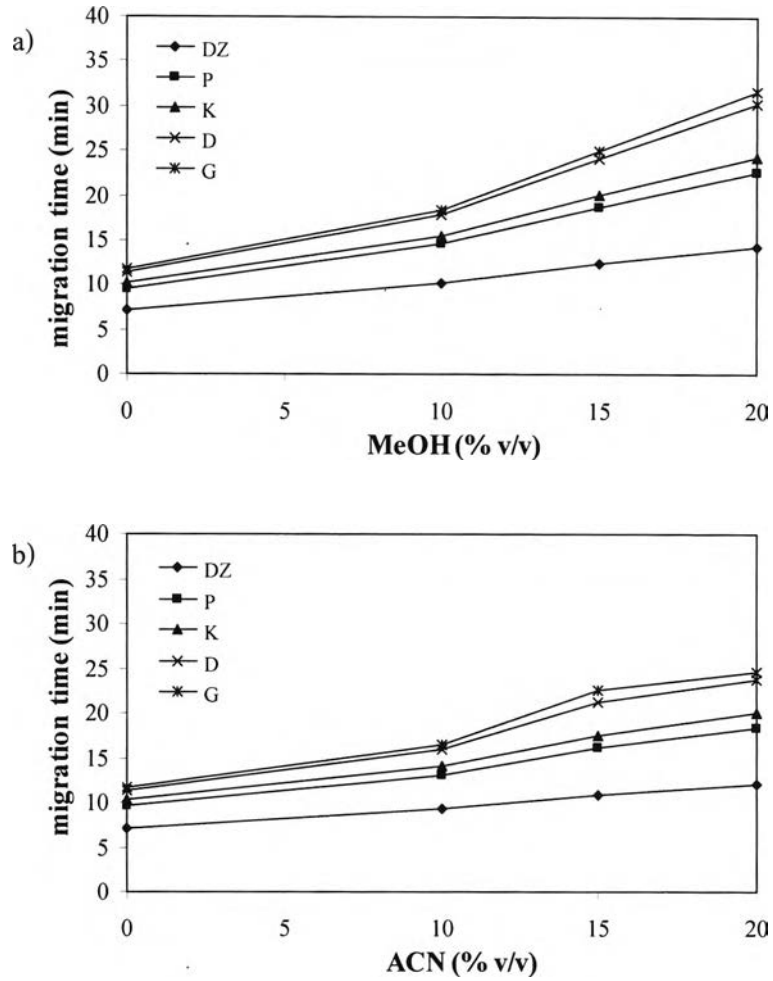
จากรูปที่ 4.3 พบว่าเมื่อปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์สูงขึ้นสารที่สนใจแยกออกจากเมทริกซ์ ได้ดีขึ้นโดยเฉพาะพีคของ P, D และ G โดยที่ 15% v/v ของตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งในเมทานอล และอะซิโตไนไตรล์ ให้การแยกสารที่สนใจทั้ง 5 ชนิดออกจากเมทริกซ์ได้ดีและแยกได้ดีกว่าเมื่อ เพิ่มความเข้มข้นเป็น 20% v/v ทั้งในเมทานอลและอะซิโตไนไตรล์ โดยพบว่ามีเมทริกซ์อื่นแยก ออกจาก D และ DZ อีกสำหรับเมทานอลและอะซิโตไนไตรล์ตามลำดับ และไม่พบว่ามีบัฟเฟอร์ใด สามารถแยกสารที่สนใจทั้ง 5 ชนิดออกจากเมทริกซ์ได้สมบูรณ์ทั้งหมด

การเพิ่มปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ ทำให้ไมเกรชันโทม์ของสารนานขึ้น (รูปที่ 4.4) เนื่องจากการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้ความหนืดของบัฟเฟอร์เพิ่มมากขึ้นดังสมการ 2.6 จึง ส่งผลทำให้ EOF ลดลง (รูปที่ 4.5) สารจึงเคลื่อนที่ออกมาช้า ทั้งนี้ปริมาณของตัวทำละลายที่ เพิ่มขึ้นการแตกตัวของสารจะลดลง ทำให้ $|\mu|$ ของสารลดลง (รูปที่ 4.6) และเมื่อเปรียบเทียบการ เติมตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดในปริมาณที่เท่ากัน พบว่าอะซิโตไนไตรล์จะใช้เวลาในการ วิเคราะห์ที่เร็วกว่าเนื่องจากความหนืดน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย อินทรีย์ ดังนั้น EOF ในบัฟเฟอร์ที่เติมอะซิโตไนไตรล์จึงลดลงน้อยกว่าการเติมเมทานอล (รูปที่ 4.5)

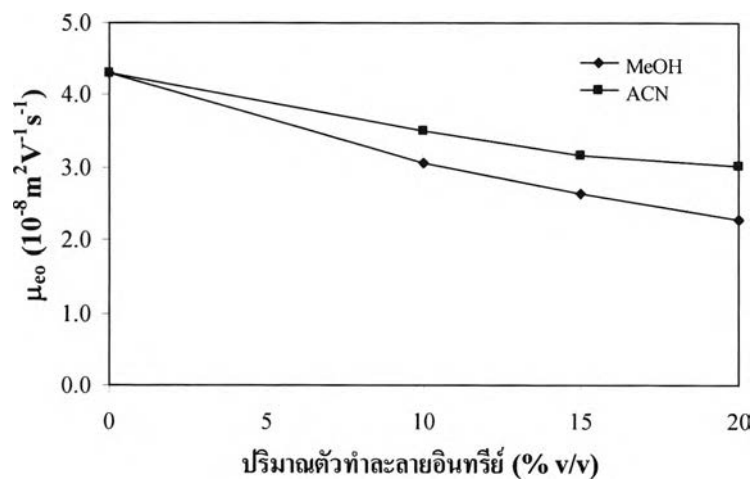
ดังนั้นจากการเปลี่ยนชนิดและปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเมทานอล หรืออะซิโตไน ไทรล์สามารถแยกได้เพียง K ออกจากเมทริกซ์ จึงศึกษาผลของความเข้มข้นทั้งบอเรตและตัวทำ ละลายอินทรีย์ควบคู่กันต่อไป โดยใช้ปริมาณ 15% v/v หรือ 20% v/v ของตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่ง ให้การแยกสารที่ดี



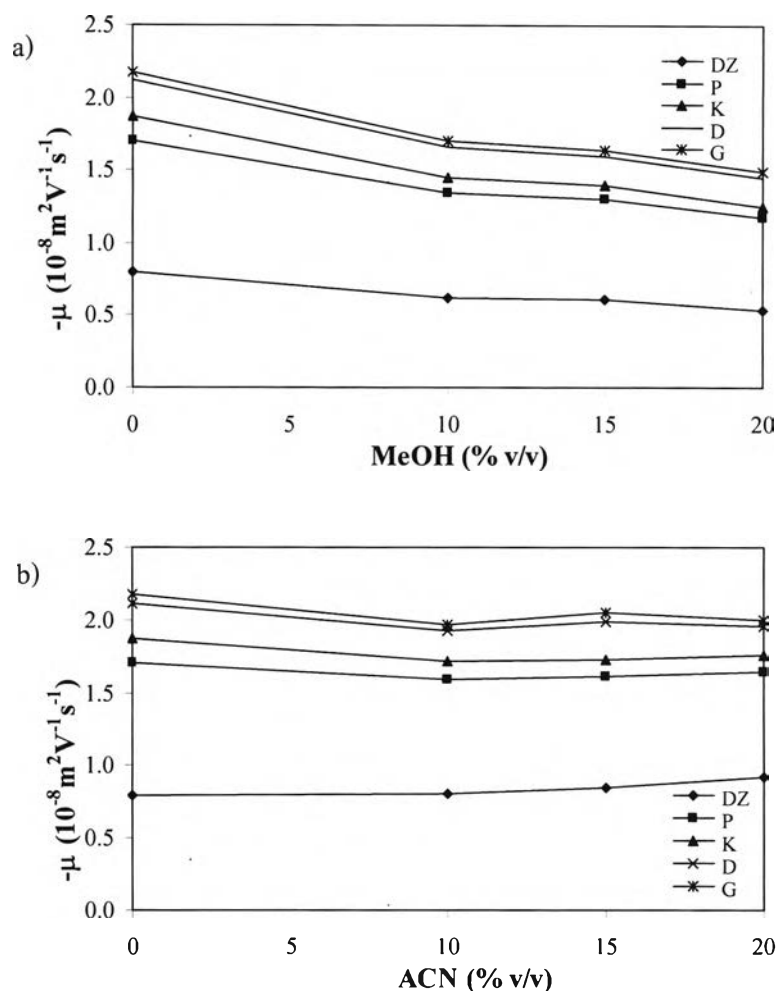
รูปที่ 4.3 อิเล็กโตรโครมาโตแกรมของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (กวาวคูริน 50 ppm และจันิสเตอิน 50 ppm) โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 ที่ความเข้มข้น 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, (a) ไม่เติมตัวทำละลายอินทรีย์ (b-d) มีเมทานอล (MeOH) และ (e-g) มีอะซิโตไนไตรล์ (ACN), และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.4 ไมเกรชันไทม์ของสารที่ความเข้มข้นต่างๆ ของตัวทำละลายอินทรีย์: a) เมทานอล (MeOH) และ b) อะซิโตไนไตรล์ (ACN): ภาวะการทดลองดังรูป 4.3



รูปที่ 4.5 ค่า μ_{eo} ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของตัวทำละลายอินทรีย์: (♦) เมทานอล (MeOH), (■) อะซิโตไนไตรล์ (ACN): ภาวะการทดลองดังรูป 4.3



รูปที่ 4.6 ค่า μ ของสารที่ความเข้มข้นต่างๆ ของตัวทำละลายอินทรีย์: a) เมทานอล (MeOH) และ b) อะซิโตไนไตรล์ (ACN): ภาวะการทดลองดังรูป 4.3

4.2.3 ผลของความเข้มข้นทั้งบอแรดและตัวทำละลายอินทรีย์

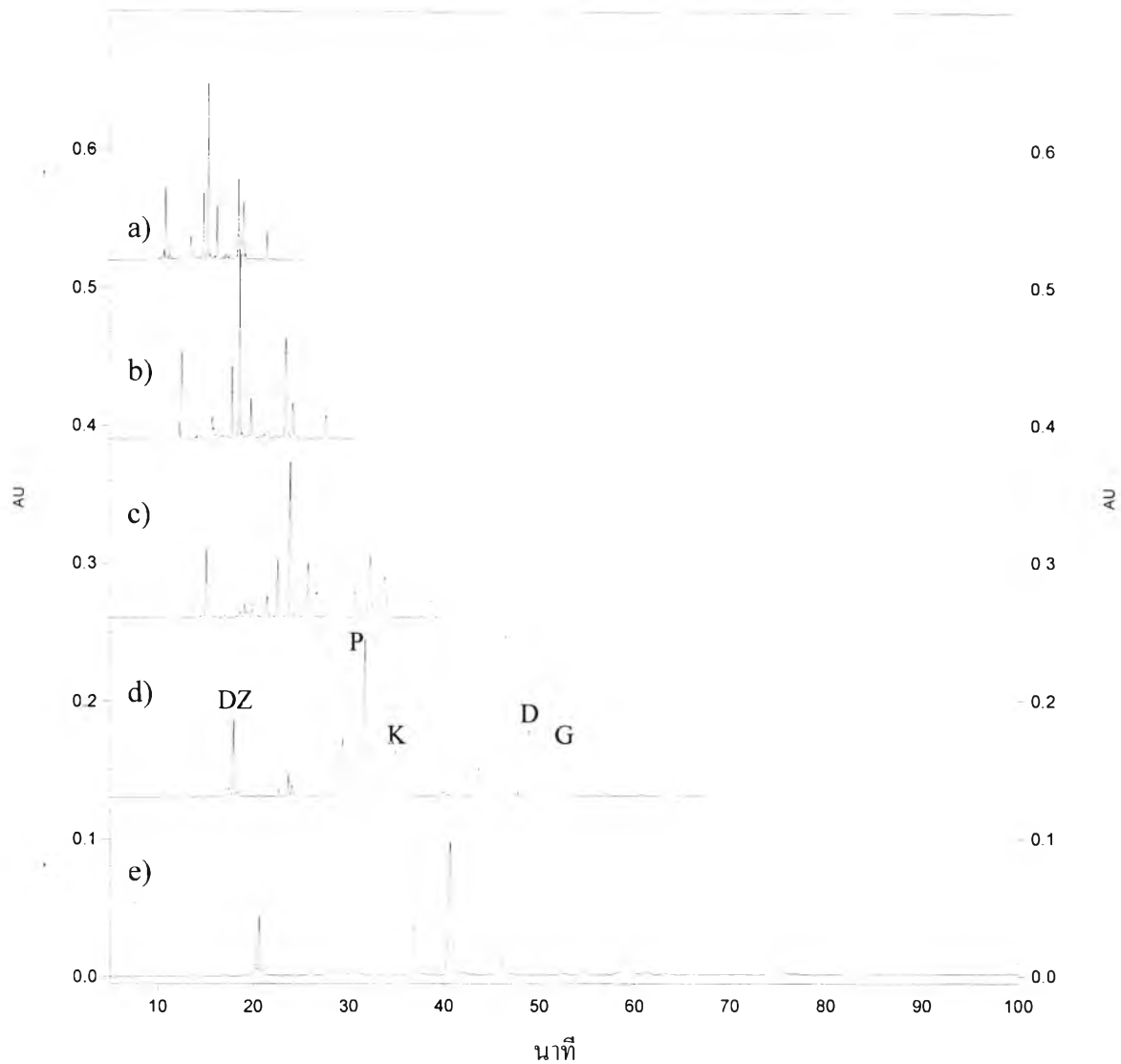
ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นบอแรดในช่วง 30 ถึง 70 mM ที่ประกอบด้วยปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ 15% v/v และ 20% v/v ของเมทานอลหรืออะซิโตไนไตรล์ สำหรับวิเคราะห์ส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย ผลการทดลองดังอิเล็กทรอนิกส์โทรฟีโรแกรมรูปที่ 4.7 ถึง 4.9

ในช่วงแรกเริ่มทำการทดลองใช้บอแรดบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 20% v/v ของตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าบัฟเฟอร์ที่ 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ขึ้นไป ที่ประกอบด้วย 20% v/v ของตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งเมทานอลและอะซิโตไนไตรล์ (รูปที่ 4.7 และ 4.8 ตามลำดับ) สามารถแยกสาร P K D และ G ออกจากเมทริกซ์ได้ดีขึ้นและแยกได้สมบูรณ์ที่ 60 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ในขณะที่ DZ แยกออกจากเมทริกซ์ได้ไม่ต่างกันนักและแยกออกจากเมทริกซ์ได้น้อยลงเมื่อความเข้มข้นบอแรดสูงถึง 70 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ จากการทดลองสังเกตว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ดังนั้นจึงทดลองลดปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ลงเป็น 15% v/v ของเมทานอลหรืออะซิโตไนไตรล์ (รูปที่ 4.9) พบว่าบัฟเฟอร์

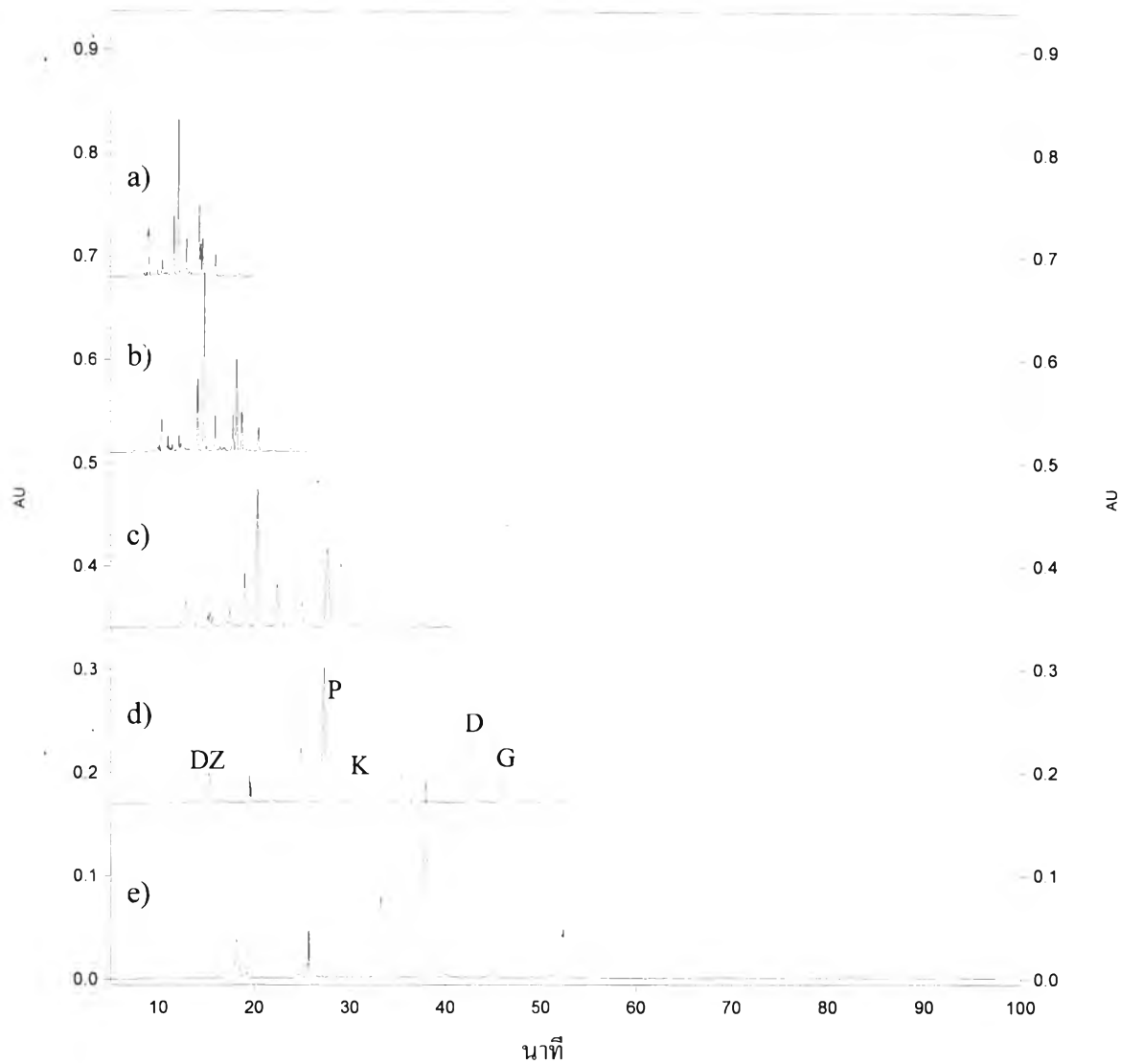
ที่ประกอบด้วย 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ขึ้นไป ที่ประกอบด้วย 15% v/v ของตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด สามารถแยกสารที่สนใจออกจากเมทริกซ์ได้ดีและไม่ต่างกันมากนัก ยกเว้น DZ ที่แยกออกจากเมทริกซ์ได้น้อยลงเมื่อความเข้มข้นบอเรตสูงถึง 70 mM โดยที่ 60 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด สามารถแยกสารที่สนใจทั้ง 5 ชนิดออกจากเมทริกซ์ได้สมบูรณ์ แต่การใช้อะซิโตนในไตรล์ทำให้ฟิกส์สารมีปลายฟิกส์ (tail) ยาว ในขณะที่การใช้เมทานอลพบว่าฟิกส์สารที่ได้มีลักษณะสมมาตรและแหลมคม

จากรูปที่ 4.10a ถึง 4.10b และ 4.10c ถึง 4.10d แสดงไมเกรชันโทม์ของสารที่ใช้บอเรตบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดปริมาณ 15% v/v และ 20% v/v ตามลำดับพบว่าโดยรวมอะซิโตนในไตรล์จะใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่เร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดและบอเรตในปริมาณที่เท่ากัน เนื่องจากความหนืดน้อยกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเมทานอล ดังนั้น EOF ในบัฟเฟอร์ที่เติมอะซิโตนในไตรล์จึงลดลงน้อยกว่าการเติมเมทานอล และที่ความเข้มข้นบอเรตเท่ากันเมื่อใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ EOF ลดลงมากขึ้นด้วยดังรูปที่ 4.11 เมื่อความเข้มข้นบอเรตในบัฟเฟอร์สูงขึ้น ความแรงไอออนิกของ BGE จะเพิ่มขึ้นทำให้ EOF ลดลงและใช้เวลาในการวิเคราะห์นานขึ้น นำค่าไมเกรชันโทม์ที่ได้คำนวณค่า μ แสดงดังรูปที่ 4.12 พบว่า โดยรวมแล้วค่า $|\mu|$ คงที่อาจเนื่องจากผลของ Joule heating มากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BGE จึงมีผลทำให้ค่า $|\mu|$ มีค่าเพิ่มขึ้นและเมื่อเพิ่มปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์มีผลทำให้ค่า $|\mu|$ ลดลง

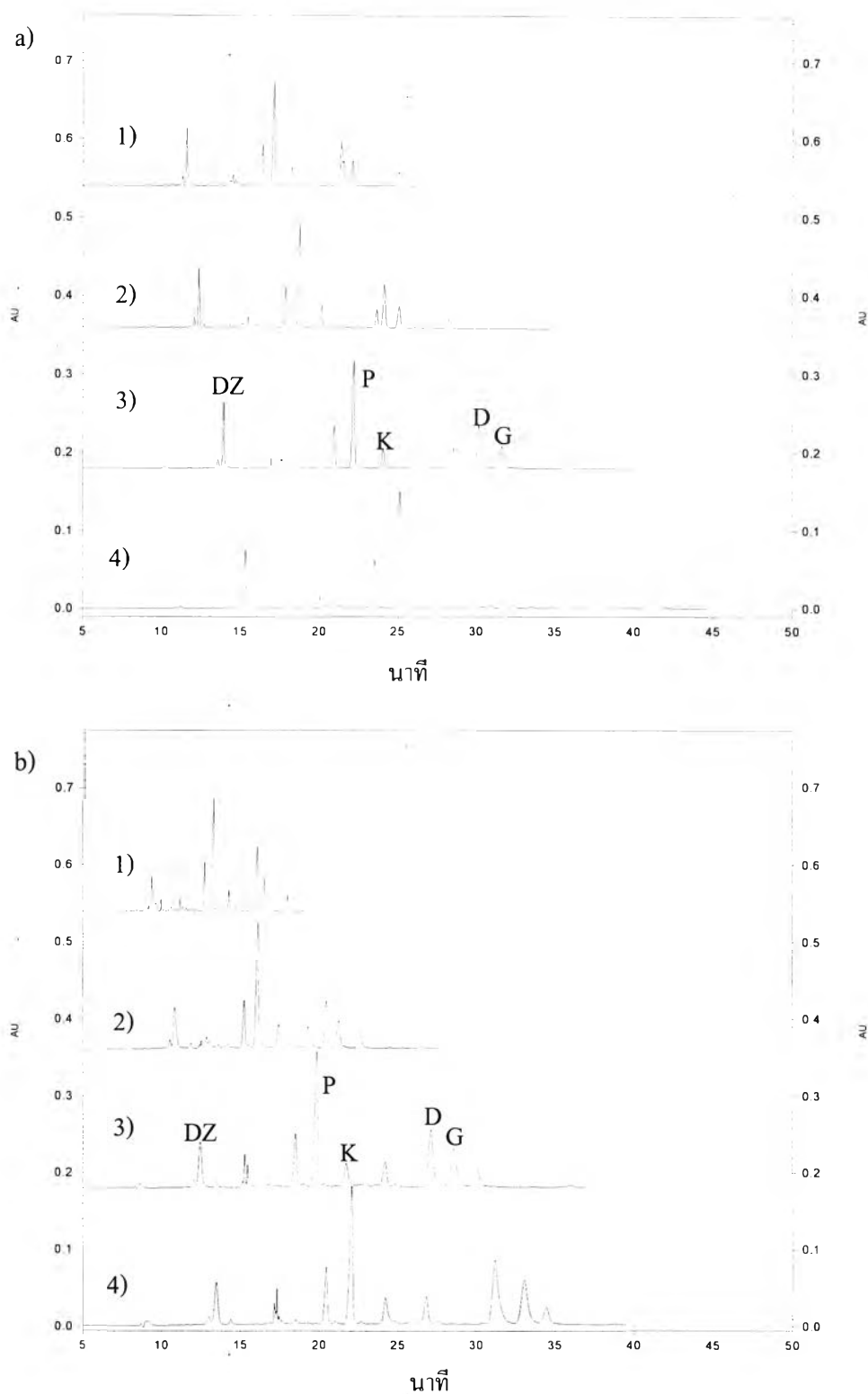
ดังนั้นจึงเลือกใช้บัฟเฟอร์ 60 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เป็น 15 % v/v เมทานอล ซึ่งให้การแยกสารที่ดีและใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่ไม่ยาวนานนัก สำหรับศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้าต่อไป



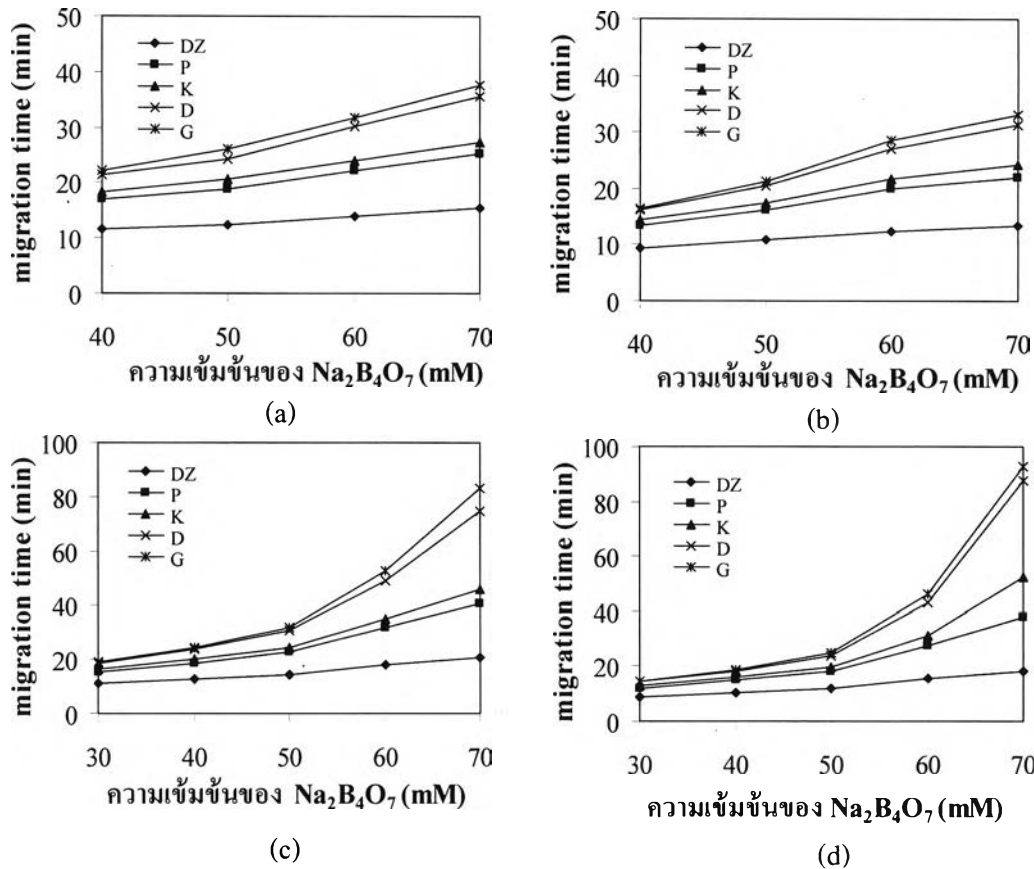
รูปที่ 4.7 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วย กวานีนและอะดีนีนอย่างละ 50 ppm) โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 20% v/v เมทานอล โดยมีความเข้มข้นต่างกัน: ความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, (a) 30, (b) 40, (c) 50, (d) 60 และ (e) 70 mM และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1



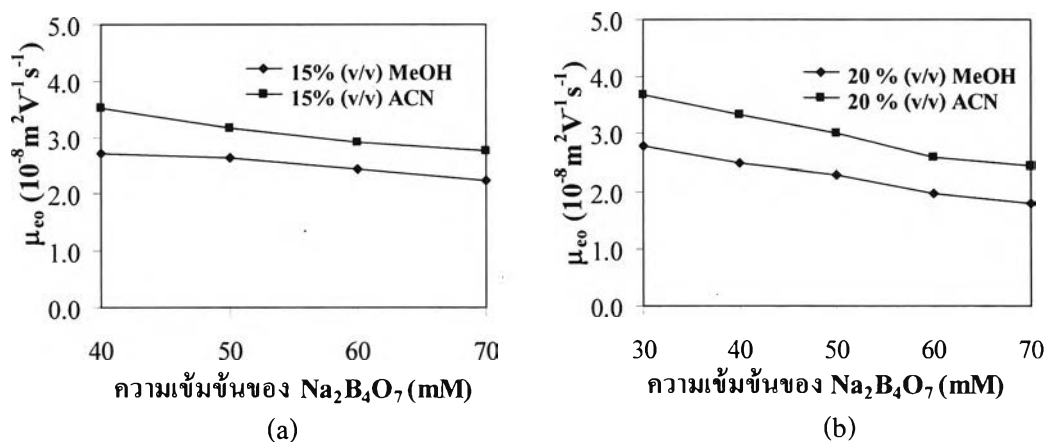
รูปที่ 4.8 อิเล็กโทรโฟโแกรมของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วย กวาวคูรินและจีนิสเตอีนอย่างละ 50 ppm) โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 20% v/v อะซิโตนไนไตรล์ โดยมีความเข้มข้นต่างๆกัน: ความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, (a) 30, (b) 40, (c) 50, (d) 60 และ (e) 70 mM และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1



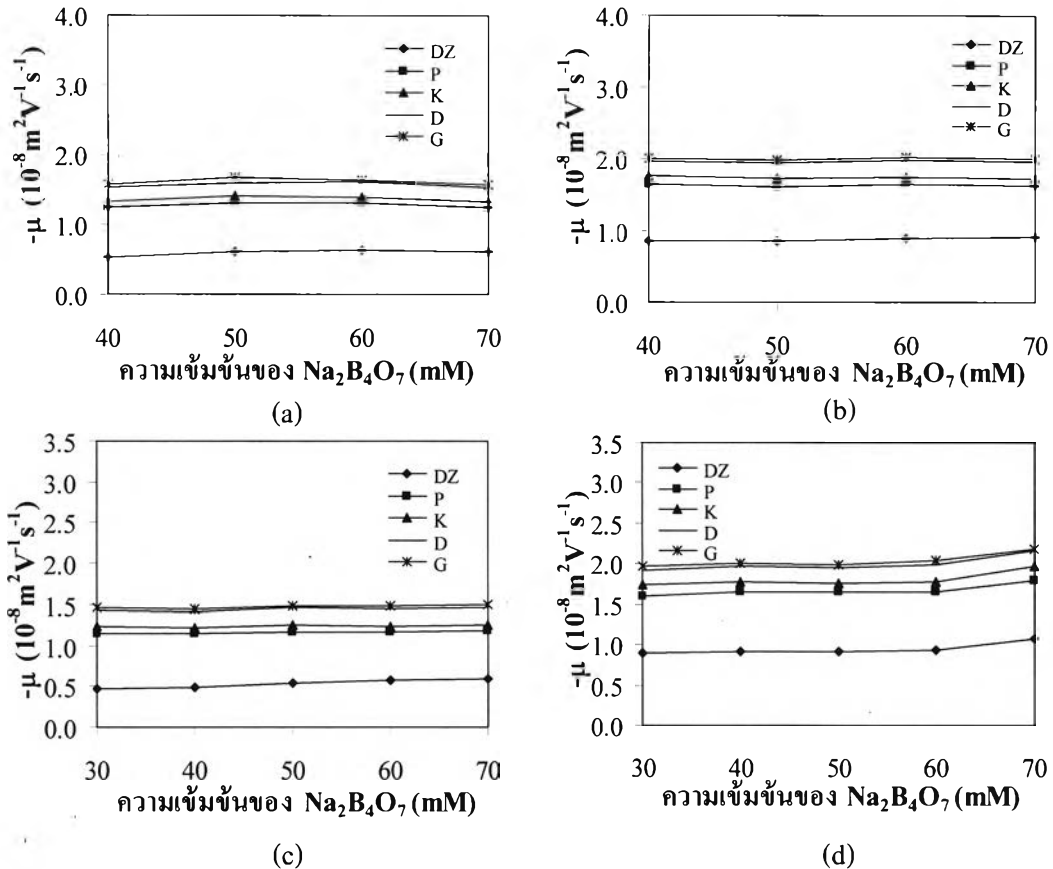
รูปที่ 4.9 อิเล็กโทรโฟโแกรมของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วย กวาวคูรินและจีนิสเตอินอย่างละ 50 ppm) โดยใช้ความเข้มข้นบอเร็ตต่างๆ ที่ประกอบด้วย 15% v/v ของตัวทำละลายอินทรีย์: (a) เมทานอล และ (b) อะซิโตนไทรอ์: ความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, (1) 40, (2) 50, (3) 60 และ (4) 70 mM และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.10 ไมเกรชันไทม์ของสารโดยใช้บอเรตความเข้มข้นต่างๆ ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ของเมทานอล (MeOH) หรืออะซิโตไนไทรล์ (ACN): (a) 15% v/v MeOH, (b) 15% v/v ACN, (c) 20% v/v MeOH และ (d) 20% v/v ACN: ภาวะการทดลองดังรูป 4.7, 4.8 และ 4.9



รูปที่ 4.11 ค่า μ_{eo} ที่บอเรตความเข้มข้นต่างๆ ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์: (a) 15% v/v และ (b) 20% v/v: (♦) เมทานอล (MeOH), (■) อะซิโตไนไทรล์ (ACN): ภาวะการทดลองดังรูป 4.7 ถึง 4.9



รูปที่ 4.12 ค่า μ ของสารที่บอรรถความเข้มข้นต่างๆ ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ของเมทานอล (MeOH) หรืออะซิโตไนไตรล์ (ACN): (a) 15% v/v MeOH, (b) 15% v/v ACN, (c) 20% v/v MeOH และ (d) 20% v/v ACN: ภาวะการทดลองดังรูป 4.7 ถึง 4.9

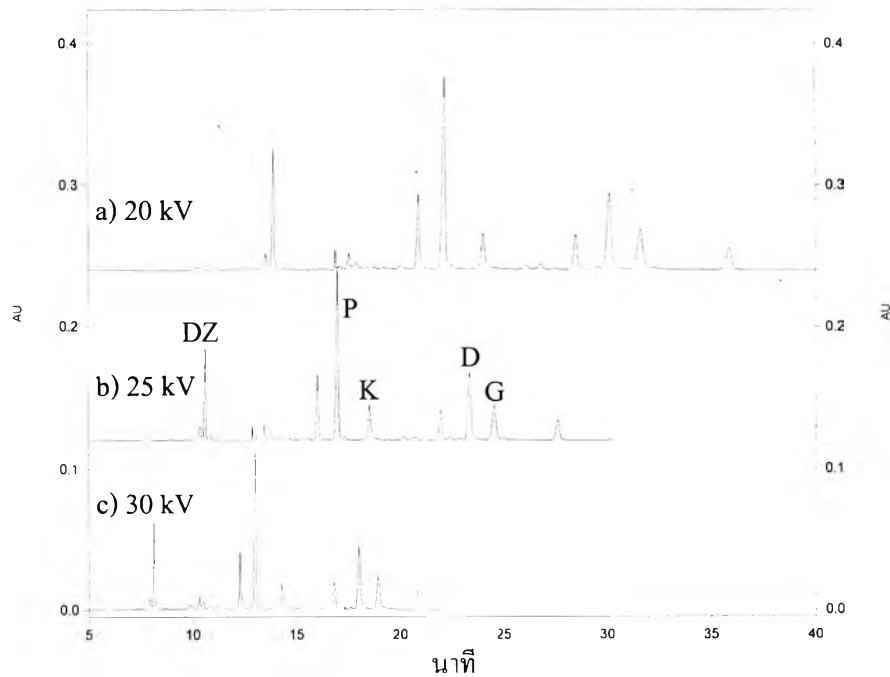
4.2.4 ผลของศักย์ไฟฟ้า

ทำการศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้าในช่วง 20 ถึง 30 kV ต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสาร โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 60 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วย 15 % v/v ของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเมทานอล ผลการทดลองที่ได้แสดงดังอเล็กโทรโฟโรแกรมที่ 4.13 พบว่าเมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้า จะมีผลทำให้เวลาในการวิเคราะห์เร็วขึ้นหรือไมเกรชันไทม์ของสารลดลง (รูปที่ 4.14a) ทั้งนี้เนื่องจากความเร็วของการเคลื่อนที่ของสาร (v_{cp}) แปรผันตรงกับความต่างศักย์หรือความเข้มของสนามไฟฟ้า (E) (สมการที่ 2.5) ในทางทฤษฎีนั้นค่า μ จะไม่ขึ้นกับศักย์ไฟฟ้า แต่จากการทดลองพบว่าเมื่อศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้นจะส่งผลทำให้ μ เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.14c) อีกทั้งทำให้ EOF เพิ่มขึ้นด้วย (รูปที่ 4.14b) ทั้งนี้เนื่องมาจาก Joule heating ที่เพิ่มขึ้น

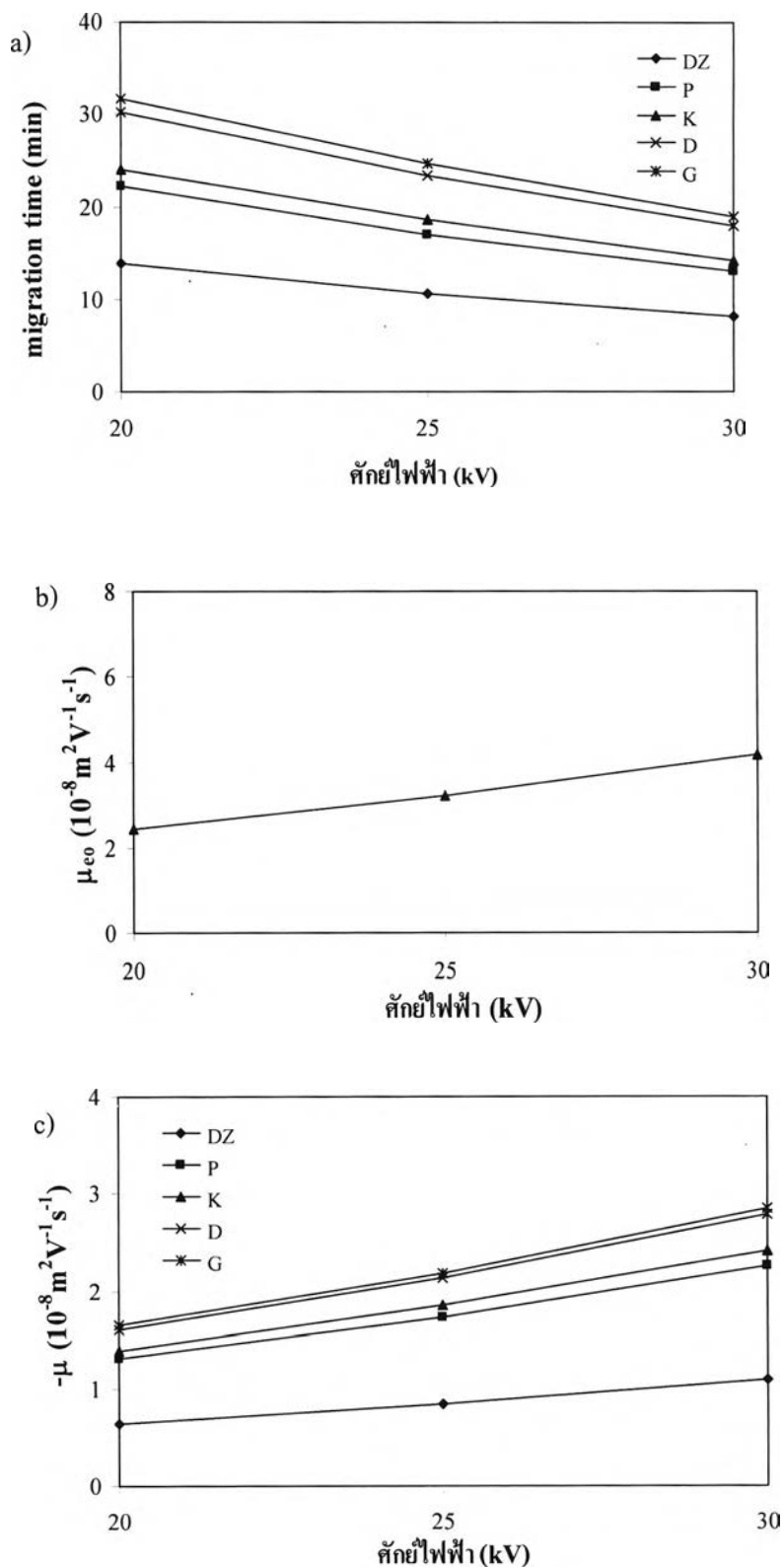
เมื่อเปรียบเทียบการแยกสารโดยใช้ 60 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วย 15 % v/v ของเมทานอล ที่ใช้ศักย์ไฟฟ้าต่างกัน พบว่าสารที่สนใจทั้ง 5 ชนิดแยกออกจากเมทริกซ์ได้สมบูรณ์ที่

ศักย์ไฟฟ้า 20 kV และ 25 kV ในขณะที่ DZ แยกออกจากเมทริกซ์ได้น้อยลงที่ศักย์ไฟฟ้า 30 kV และในทุกศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยกสารให้ฟีกสารที่แหลมคมและสมมาตร

ดังนั้นในงานวิจัยเลือกใช้ศักย์ไฟฟ้าที่ 25 kV ซึ่งให้การแยกสารที่สนใจออกจากเมทริกซ์ที่ดีสำหรับปริมาณวิเคราะห์และใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่เร็ว



รูปที่ 4.13 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย โดยใช้ 60 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วย 15% v/v ของเมทานอล, ใช้ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ กัน และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.14 ผลของศักย์ไฟฟ้าต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของสาร a) ไมเกรชันไทม์ b) ค่า μ_{co} c) ค่า μ ของสารทั้ง 5 ชนิด : ภาพการทดลองดังรูป 4.13

4.3 การหาภาวะของ MEKC

เพื่อเปรียบเทียบพฤติกรรมการณ์เคลื่อนที่และการแยกสารระหว่าง CZE และ MEKC สำหรับ MEKC ได้ทำการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณคาอิดซิน พิวาริน กวาวคูริน คาอิดเซอินและจีนิสเตอิน โดยศึกษาผลของความเข้มข้น โซเดียม โดเดซิลซัลเฟต (SDS) ผลของความเข้มข้นบอเรตบัฟเฟอร์ ชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ ที่มีต่อพฤติกรรมการณ์เคลื่อนที่และการแยกของสาร

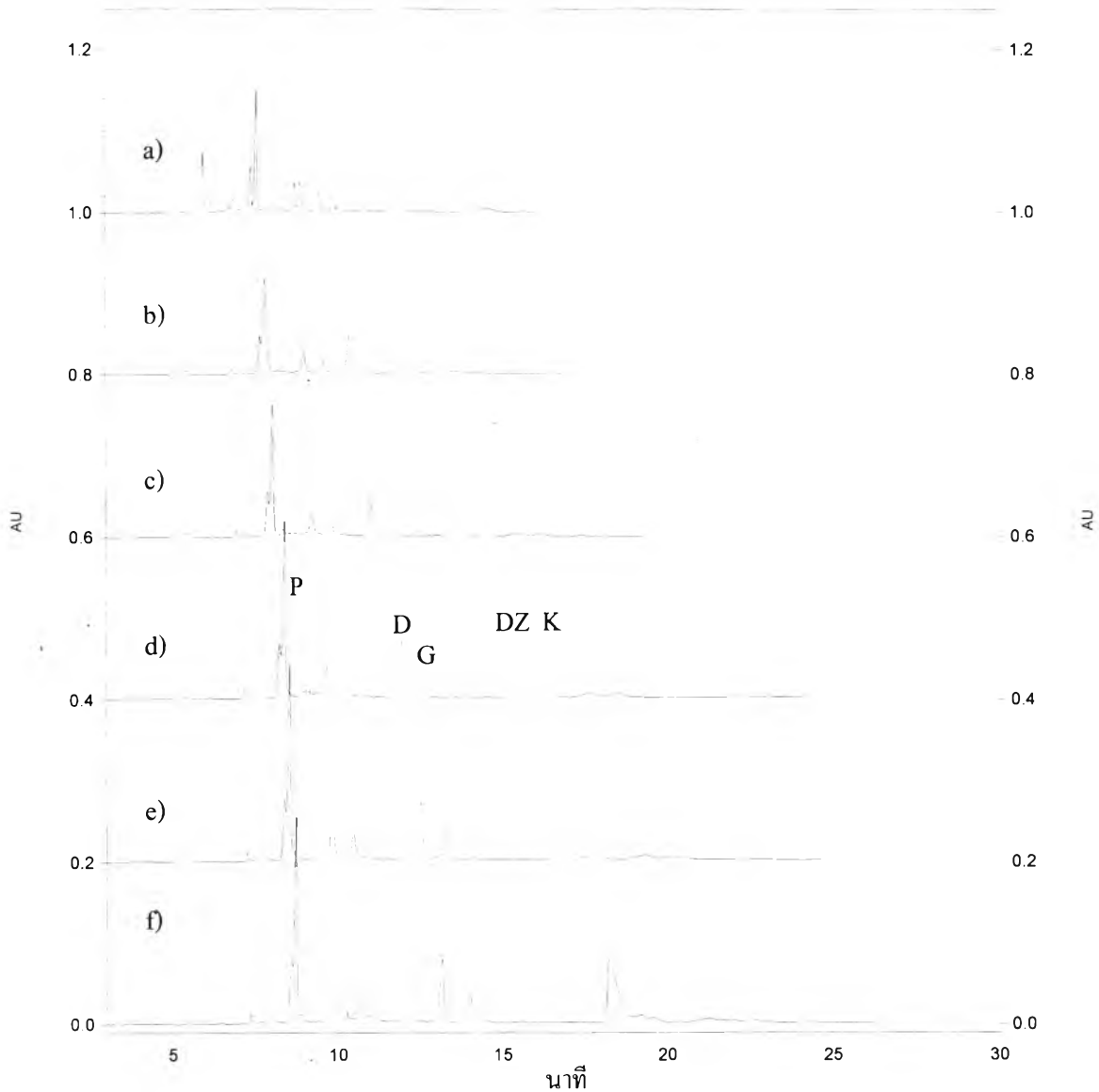
4.3.1 ผลของความเข้มข้น SDS

การเติม SDS ลงในบอเรตบัฟเฟอร์มีผลทำให้ค่า ionic strength ในบัฟเฟอร์สูงขึ้น ส่งผลให้เกิด joule heating มากขึ้น ดังนั้น MEKC จึงควรใช้บอเรตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า CZE (60 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) ในช่วงแรกของการทดลองได้ใช้บัฟเฟอร์ 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วยปริมาณของสารลดแรงตึงผิวต่างกันในช่วง 30 ถึง 80 mM โดยใช้อุณหภูมิ 25 °C ศักย์ไฟฟ้า 20 kV สำหรับแยกและวิเคราะห์ส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย ผลการทดลองดังอิเล็กทรอนิกส์โทรฟีโรแกรมรูปที่ 4.15 ในภาวะที่ไม่มีการเติม SDS ลงไปในบัฟเฟอร์ (รูปที่ 4.15a) พบว่าคาอิดซิน พิวาริน กวาวคูริน คาอิดเซอิน และจีนิสเตอินไม่แยกออกจากเมทริกซ์อื่นในส่วนสกัด เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS มีผลทั้งเพิ่มและลดการแยกของสารที่สนใจออกจากเมทริกซ์ โดยสาร P แยกออกจากเมทริกซ์ได้น้อยลงและไม่ต่างกันนักในทุกความเข้มข้นของ SDS เนื่องจากการเคลื่อนที่เข้าออกระหว่างไมเซลลาร์เฟสกับเอควียสเฟสของ P และเมทริกซ์ในส่วนสกัดกวาวใกล้เคียงกันมาก ในขณะที่สาร D, G, DZ และ K แยกออกจากเมทริกซ์ได้ดีขึ้นและแยกออกจากเมทริกซ์ได้สมบูรณ์ที่ 60 mM SDS แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS มากกว่า 60 mM SDS กลับทำให้ K แยกออกจากเมทริกซ์ได้น้อยลง และจากรูปที่ 4.16a แสดงไมเกรชันโทมของสารทั้ง 5 ชนิด พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS มีผลทำให้ไมเกรชันโทมเพิ่มขึ้น เนื่องจากจำนวนไมเซลล์มากขึ้นจึงเพิ่มอัตราส่วนของเฟส (phase ratio) ดังนั้นรีเทนชันแฟกเตอร์และไมเกรชันโทมของสารจึงมากขึ้น (ดังสมการ 2.18, 2.25 และ 2.26)

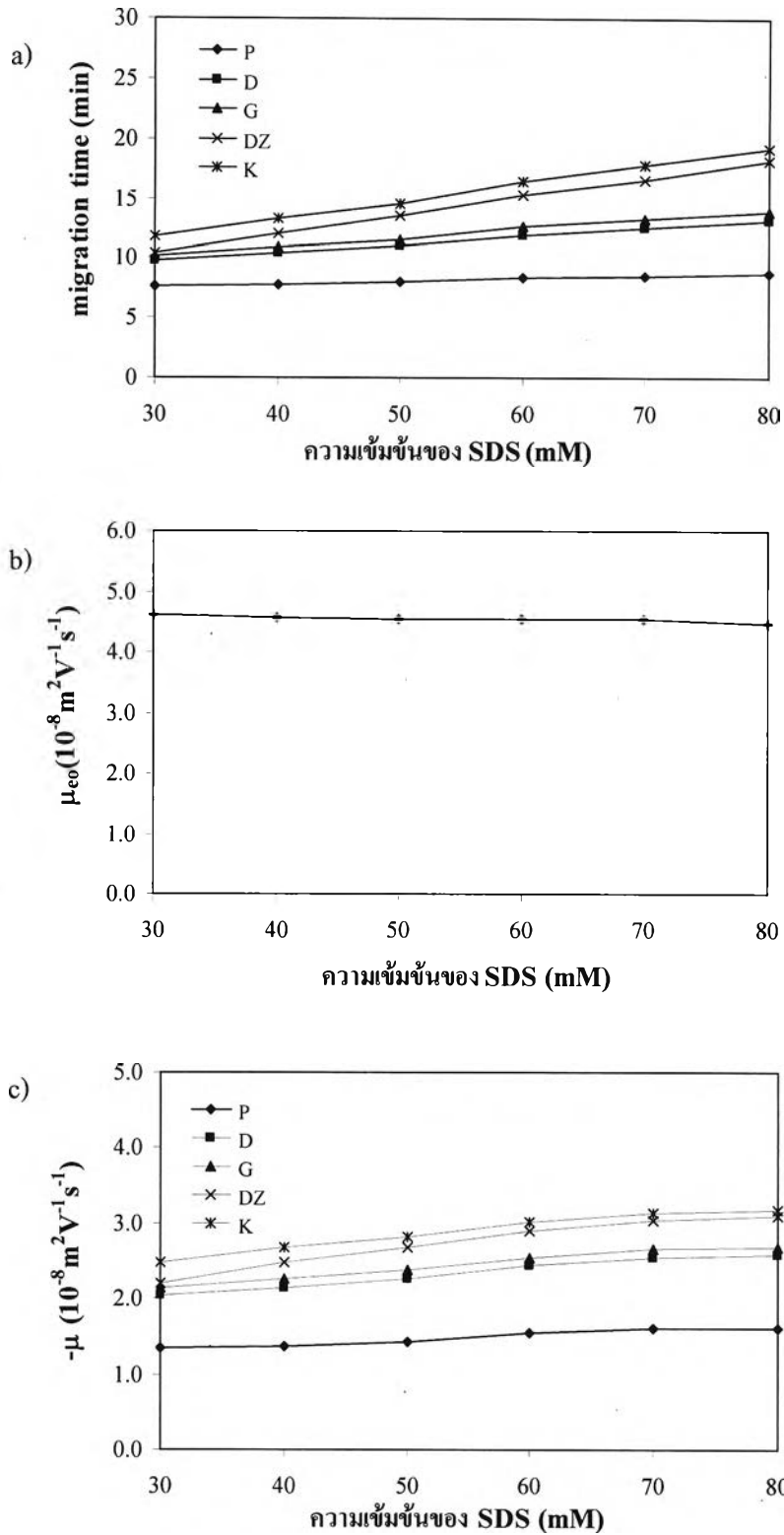
ผลของความเข้มข้นของ SDS ต่อค่า μ_{eff} แสดงดังรูปที่ 4.16b พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SDS มากขึ้น μ_{eff} ที่ได้โดยรวมมีค่าคงที่ เนื่องจากเมื่อองค์ประกอบบัฟเฟอร์มีความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ คงที่แต่มีความเข้มข้นของ SDS เปลี่ยนไปและมีความเข้มข้นมากกว่าค่า CMC (8.1 mM) มีผลทำให้ค่า μ_{eff} คงที่ เนื่องจากศักย์ไฟฟ้าซีต้า (ζ) ที่ชั้นของบัฟเฟอร์ติดกับพื้นผิวอะพอลาร์ มีค่าไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ [Terabe *et al.*: 1985] ที่เป็นเช่นนั้นเพราะที่ความเข้มข้น SDS มากกว่าค่า CMC ไอออน Na^+ จาก SDS ไม่สามารถเกิดเป็นชั้น double layer ติดกับผิวอะพอลาร์ที่มีประจุลบได้ ส่งผลให้ศักย์ไฟฟ้าซีต้าไม่เปลี่ยนแปลง (ดังสมการที่ 2.10) และจากค่า μ ที่คำนวณได้แสดงดัง

รูปที่ 4.16c พบว่า $|\mu|$ เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ SDS เพิ่มขึ้น เนื่องจาก $|\mu|$ แปรผันตรงกับรีเทนชันแฟกเตอร์ [Khaledi: 1998]

ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 60 mM SDS เนื่องจากใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นานนักและแยกสารที่สนใจได้ดี เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกสารทั้ง 5 ชนิดต่อไป



รูปที่ 4.15 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของส่วนสกัดควาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วยควาวคูรินและจีนิสเตอีนอย่างละ 50 ppm) โดยใช้ 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2 ที่ประกอบด้วย SDS ปริมาณต่างๆ กัน: (a) 0, (b) 30, (c) 50, (d) 60, (e) 70 และ (f) 80 mM SDS และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.16 ผลของความเข้มข้น SDS a) ไมเกรชันไทม์ b) ค่า μ_{co} c) ค่า μ ของสารทั้ง 5 ชนิด: ภาวะการทดลองดังรูป 4.15

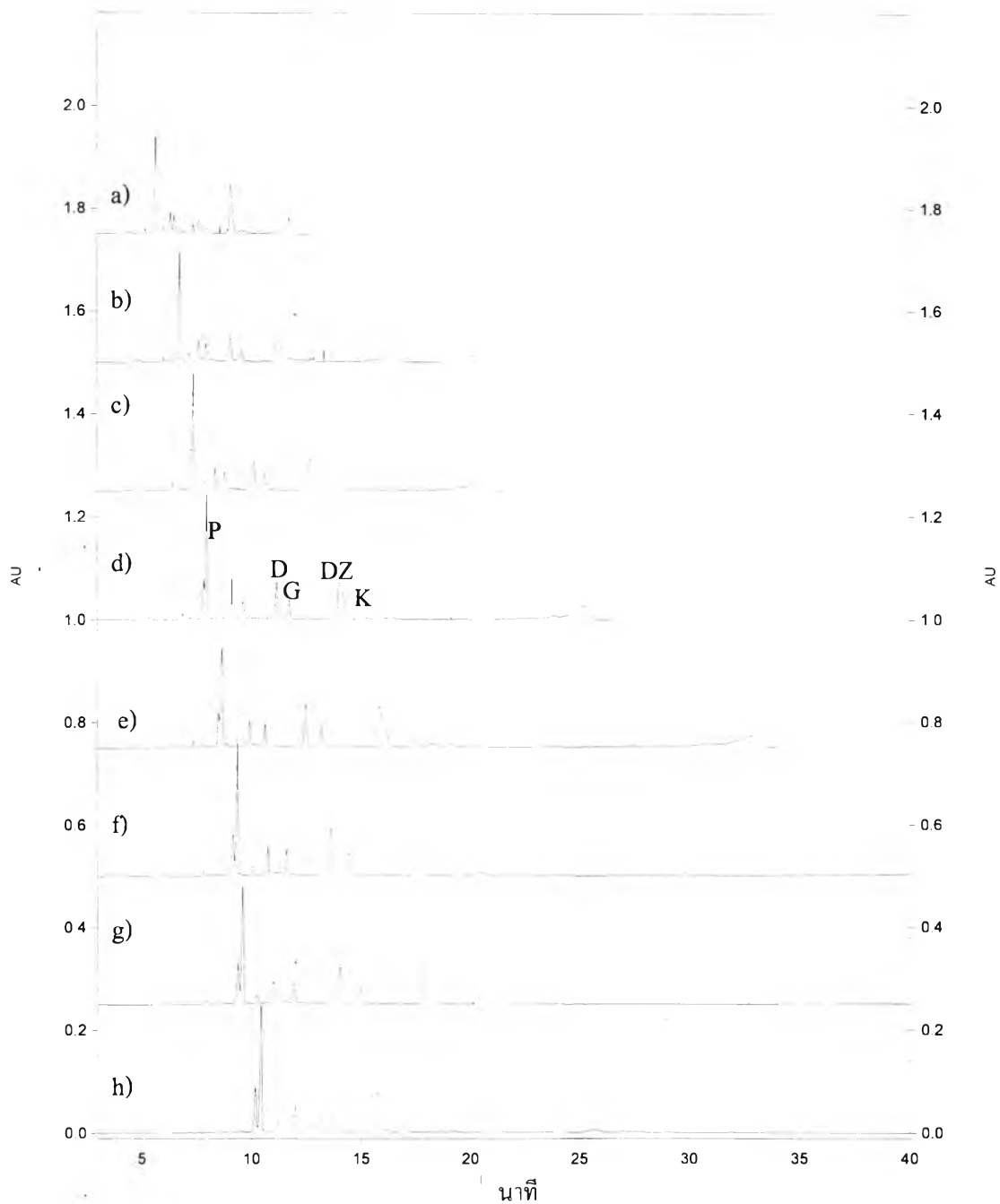
4.3.2 ผลของความเข้มข้นของบอเร็ตบัฟเฟอร์ ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของ SDS นั้นยังไม่สามารถแยกสารที่สนใจออกจากเมทริกซ์ได้ จึงทดลองแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ในช่วง 10 ถึง 50 mM ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS

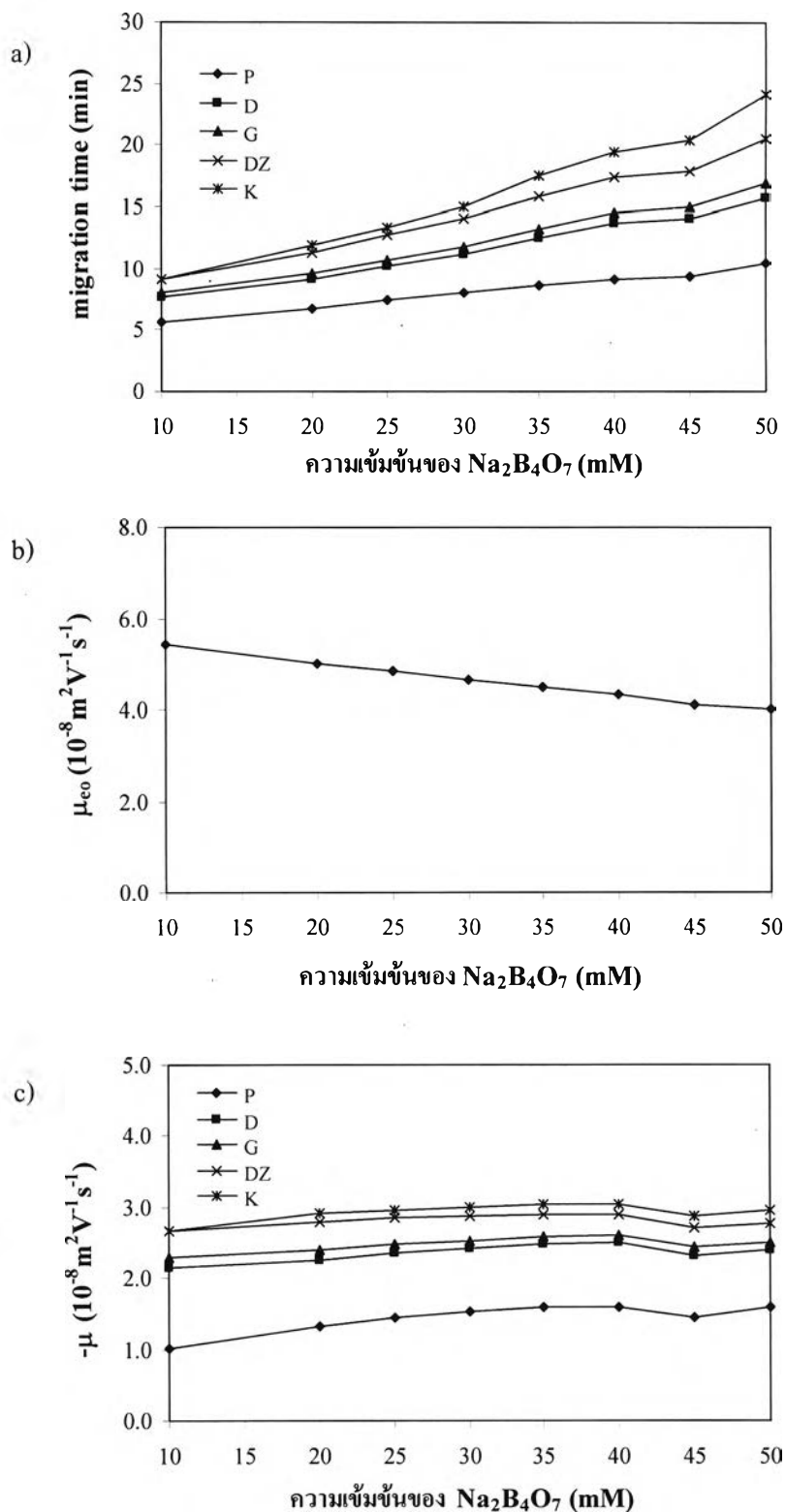
ผลที่ได้แสดงดังอิเล็กทรอนิกส์โรแกรมรูปที่ 4.17 พบว่าที่ความเข้มข้นบอเร็ตต่ำกว่า 25 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ไม่สามารถแยกสารที่สนใจทั้ง 5 ชนิดออกจากเมทริกซ์ได้ แต่เมื่อความเข้มข้นของบอเร็ตบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นส่งผลให้สารที่สนใจแยกออกจากเมทริกซ์ได้ดีขึ้น โดยที่ 25 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (ดังรูปที่ 4.17c) พบว่า DZ, K และ P เริ่มแยกออกจากเมทริกซ์อื่น และเมื่อใช้ 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ขึ้นไป พบว่า D, G, DZ และ K แยกออกจากเมทริกซ์ได้สมบูรณ์สังเกตจากไม่พบเมทริกซ์อื่นแยกออกจากสารที่สนใจอีก ยกเว้น P ที่ยังไม่สามารถแยกออกจากเมทริกซ์ได้สมบูรณ์

ผลของความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ต่อไมเกรชันโทมของสารแสดงดังรูปที่ 4.18a พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ เพิ่มขึ้น สารใช้เวลาในการเคลื่อนที่ออกมาได้ช้าลง เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของ BGE เป็นการเพิ่มความแรงไอออนิก ส่งผลทำให้ EOF ลดลงด้วยดังรูปที่ 4.18b (ดังสมการที่ 2.10) สำหรับค่า μ ที่คำนวณได้ดังรูปที่ 4.18c พบว่า $|\mu|$ เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ สูงขึ้นในช่วง 10 ถึง 40 mM แต่ $|\mu|$ ลดลงตั้งแต่ 45 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ขึ้นไป เป็นผลมาจาก effective charge (z) ของสารลดลง และผลรวมขนาดของไอออนมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ BGE เพิ่มขึ้น

อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ สูงๆ มีผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ Joule heating [Peng and Ye: 2006] อีกทั้ง MEKC นิยมใช้ความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ปริมาณต่ำๆ โดยที่ความเข้มข้นในช่วง 30 ถึง 35 ให้การแยกสารไม่ต่างกันมากนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้น 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด Joule heating ที่มากเกินไปและใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นานมากนัก



รูปที่ 4.17 อิเล็กโทรโฟโแกรมของส่วนสกัดหัวกวางเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วย กวางควินและจีนิสเตอินอย่างละ 50 ppm) โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS: ความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, (a) 10, (b) 20, (c) 25, (d) 30, (e) 35, (f) 40, (g) 45 และ (h) 50 mM และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1



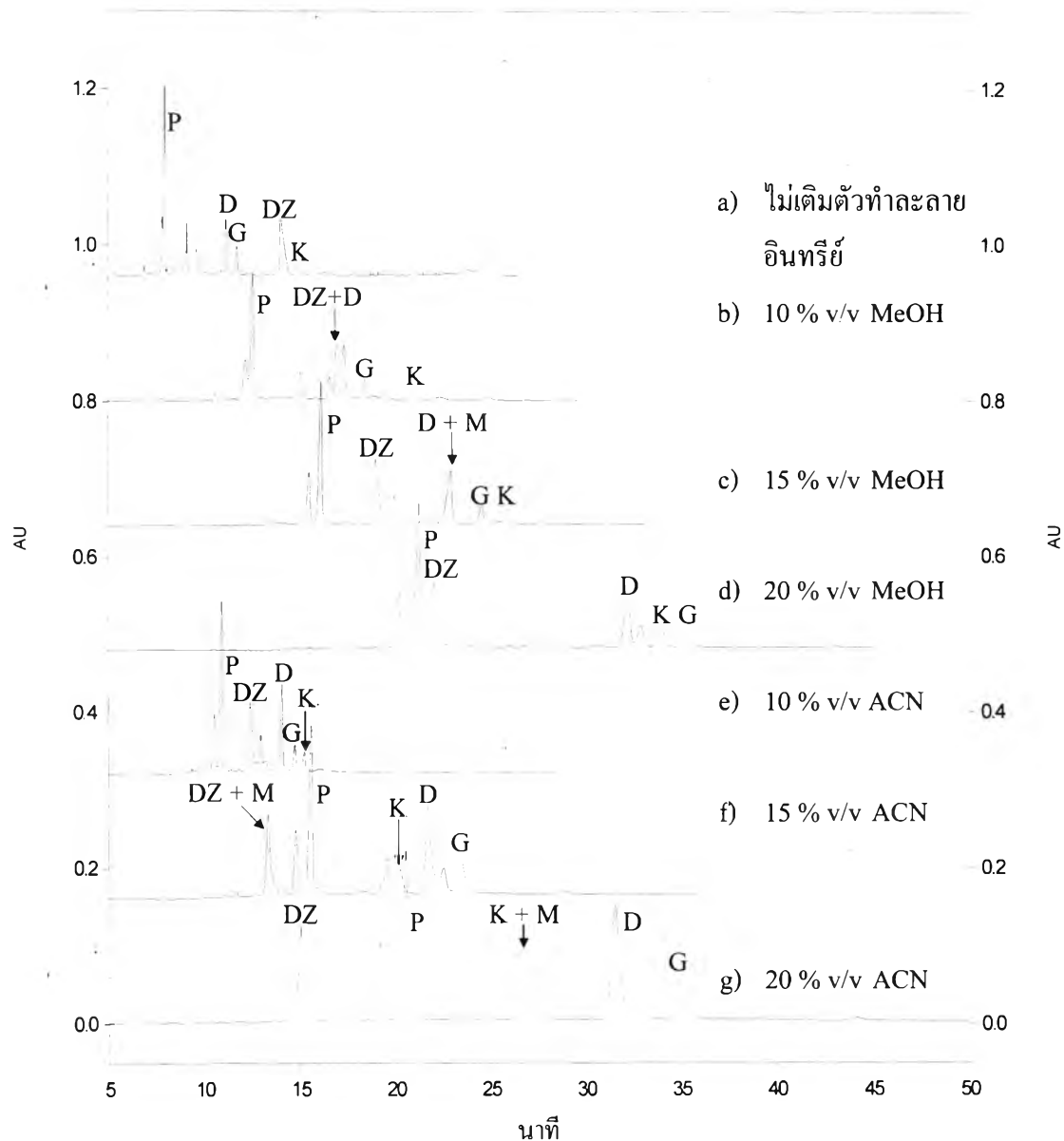
รูปที่ 4.18 ผลของความเข้มข้นขอรต a) ไมเกรชันโทม์ b) ค่า μ_{co} c) ค่า μ ของสารทั้ง 5 ชนิด: ภาวะการทดลองดังรูป 4.17

4.3.3 ผลของชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์

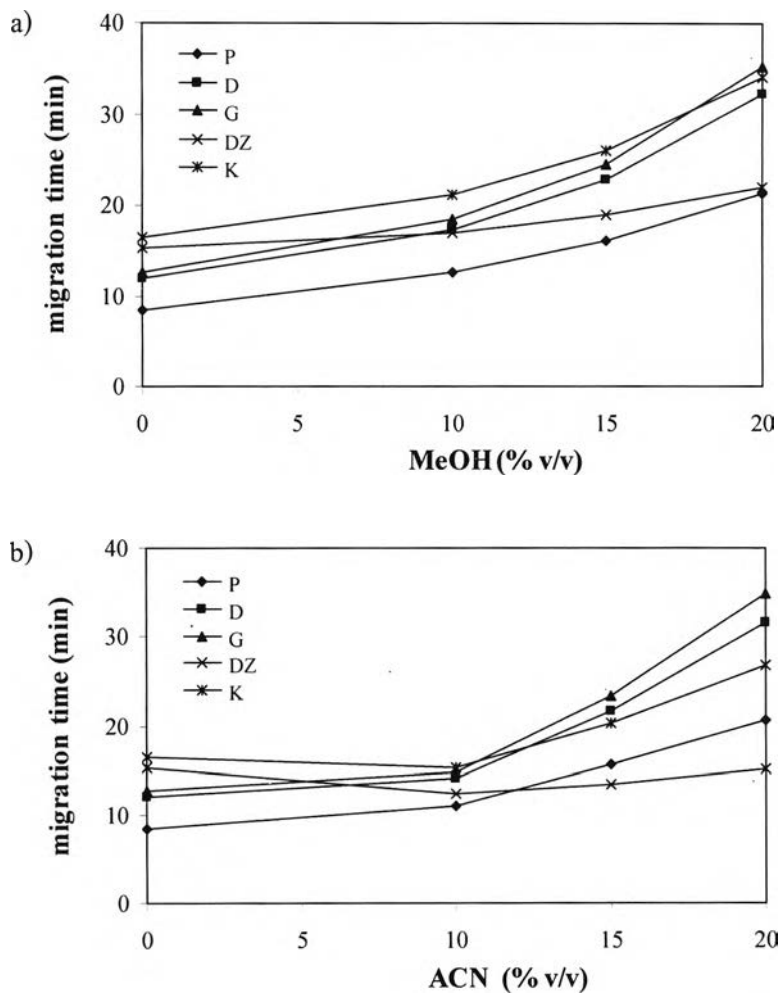
จากการใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 30 mM SDS และ 60 mM SDS ไม่สามารถแยกพีกสารที่สนใจทั้ง 5 ชนิดออกจากเมทริกซ์ได้สมบูรณ์ จึงได้เติมตัวทำละลายอินทรีย์ในช่วง 10 ถึง 20% v/v ลงในบัฟเฟอร์ เนื่องจากการเติมตัวทำละลายอินทรีย์อาจช่วยให้สาร partitioning ออกมาในเอเควียสเฟสเพิ่มขึ้น ที่นิยมใช้ทั่วไป คือ เมทานอลและอะซิโตไนโทล [Altria *et al.*: 2000] ผลแสดงดังอิเล็กทรอนิกส์โรแกรมรูปที่ 4.19 โดยเมื่อปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้น พบว่า P แยกออกจากเมทริกซ์ได้ดีขึ้นทั้งตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเมทานอลและอะซิโตไนโทล ในขณะที่ D, DZ, G และ K แยกออกจากเมทริกซ์ได้ต่างกันไป เนื่องจาก partitioning ระหว่างไมเซลลาร์เฟสกับเอเควียสเฟสของสารที่สนใจและสารอื่นในส่วนสกัดกาวเครือแตกต่างกัน และที่ 20% v/v เมทานอล พบว่าสามารถแยกสารที่สนใจออกจากเมทริกซ์ได้ดี อย่างไรก็ตามไม่มีบัฟเฟอร์ใดที่สามารถแยกสารทั้ง 5 ชนิดออกจากเมทริกซ์ได้สมบูรณ์

จากรูปที่ 4.20 พบว่าการเพิ่มปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ ทำให้สารเคลื่อนที่ออกมาได้ช้าลง ที่เป็นเช่นนี้เพราะความหนืดของบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นจากการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้น EOF ลดลง (รูปที่ 4.21) ดังสมการ 2.10 นอกจากนี้ตัวทำละลายอินทรีย์มีผลทำให้อัตราส่วนของประจุต่อขนาดของไมเซลลาร์เฟสที่มีประจุมีค่าลดลง $|\mu|$ ของสารจึงลดลง ดังนั้น $|\mu|$ ลดลง (รูปที่ 4.22) เนื่องจากผลทั้งความหนืดของบัฟเฟอร์ที่เพิ่มขึ้นและอัตราส่วนของประจุต่อขนาดของสารที่ลดลง เมื่อปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์มากขึ้นและเมื่อเปรียบเทียบการเติมตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดในปริมาณที่เท่ากัน พบว่าโดยรวมอะซิโตไนโทลจะใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่เร็วกว่าเล็กน้อย เนื่องจากระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์เป็นอะซิโตไนโทลมีความหนืดน้อยกว่าระบบของเมทานอล [Altria *et al.*: 2000] แต่การเติมอะซิโตไนโทลในช่วง 10 ถึง 20% v/v ไม่สามารถแยกสารที่สนใจทั้ง 5 ชนิดออกจากเมทริกซ์ได้

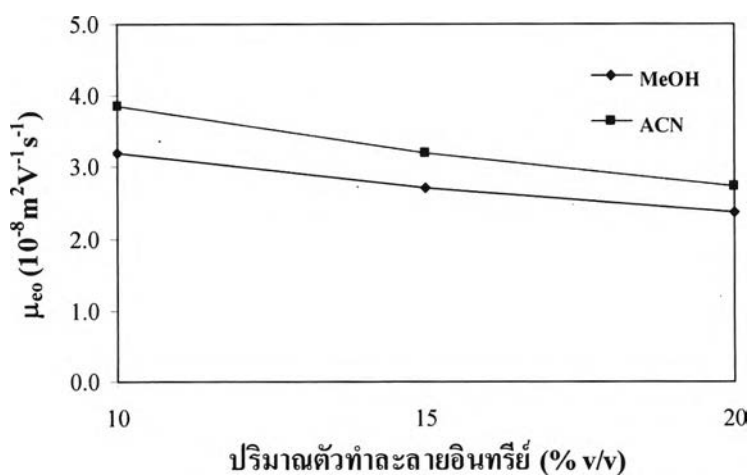
ดังนั้นจึงเลือกที่ 20% v/v เมทานอล เป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับ MEKC ในงานวิจัยนี้



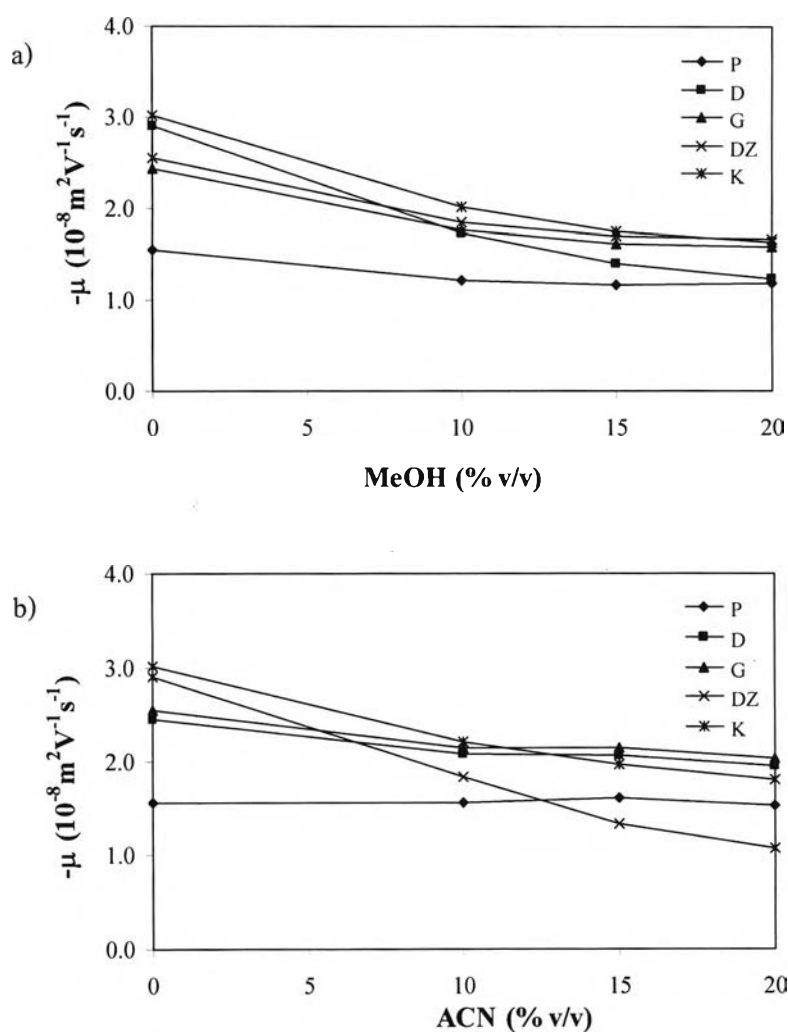
รูปที่ 4.19 อิเล็กโทรโครมาโตแกรมของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วย กวาวคูรินและจีนิสเตอินอย่างละ 50 ppm) โดยใช้ 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pH 9.2 ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS: (a) ไม่เติมตัวทำละลายอินทรีย์, (b-d) มีเมทานอล (MeOH) และ (e-g) มีอะซิโตไนไตรล์ (ACN): M = เมทริกซ์อื่นในส่วนสกัดกวาว และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.20 ไมเกรชันไทม์ของสารโดยใช้ 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS และตัวทำละลายอินทรีย์: a) เมทานอล (MeOH) และ b) อะซิโตไนไตรล์ (ACN): ภาวะการทดลองดังรูป 4.19



รูปที่ 4.21 ค่า μ_{eo} ที่ใช้ 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS และตัวทำละลายอินทรีย์: (♦) เมทานอล (MeOH), (■) อะซิโตไนไตรล์ (ACN): ภาวะการทดลองดังรูป 4.19



รูปที่ 4.22 ค่า μ ของสารที่ใช้ 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS และตัวทำละลายอินทรีย์: a) เมทานอล (MeOH) และ b) อะซิโตไนไทรล์ (ACN): ภาวะการทดลองดังรูป 4.19

จากการหาภาวะที่เหมาะสมของทั้ง CZE และ MEKC นั้น ภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกสารคาอิดซิน พิวราลิน กวาควูริน คาอิดเซอิน และจินิกสเตอินในส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวด้วย CZE คือ 60 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2 และ 15% v/v เมทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ สำหรับภาวะ MEKC คือ 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 9.2, 60 mM SDS เป็นสารลดแรงตึงผิวและ 20% v/v เมทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่อนำภาวะของ CZE (รูปที่ 4.13b) และ MEKC (รูปที่ 4.19c) ที่ได้มาเปรียบเทียบกัน พบว่า CZE สามารถแยกสารทั้ง 5 ชนิดออกจากเมทริกซ์ได้ดีกว่า อีกทั้งใช้เวลาในการแยกสารที่เร็วกว่า MEKC นอกจากนี้ขั้นตอนในการเตรียมสารใน MEKC ค่อนข้างยุ่งยากกว่าด้วย ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ CZE ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สนใจในส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาว โดยจะทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์และประยุกต์ใช้ในปริมาณวิเคราะห์ของสารที่สนใจในตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวต่อไป

4.4 การตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์สำหรับ CZE

4.4.1 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์

ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) หมายถึงความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ด้วยเครื่องมือตามภาวะที่ใช้ และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) หมายถึงความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างน่าเชื่อถือจากผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือตามภาวะที่ใช้ [Swartz and Krull: 1997] นิยามเป็นความเข้มข้นของสารที่ให้อัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนเท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ ส่วนขีดจำกัดของการตรวจวัดในตัวอย่าง (sample detection limit, SDL) หมายถึงความเข้มข้นของสารต่ำสุดในตัวอย่างจริงที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องมือ และขีดจำกัดของปริมาณวิเคราะห์ในตัวอย่าง (sample quantitation limit, SQL) หมายถึงความเข้มข้นของสารต่ำสุดในตัวอย่างจริงที่สามารถรายงานผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือได้ ซึ่งจะคล้ายกับ LOD และ LOQ ตามลำดับ และคำนึงถึงปริมาณของตัวอย่าง (sample quantity) การเจือจาง (dilution factor) หรือการเพิ่มความเข้มข้น (concentration factor) และวิธีการเตรียมตัวอย่าง เป็นต้น ในกรณีของงานวิจัยนี้ SDL และ SQL ของสารที่สนใจในตัวอย่างส่วนสกัดกาวเครือขาว สามารถคำนวณได้ดังสมการที่ 4.3 และ 4.4

$$SDL \text{ (mg/kg)} = \frac{V \times LOD \times f}{w} \text{ (mg/kg)} \quad (4.3)$$

และ

$$SQL \text{ (mg/kg)} = \frac{V \times LOQ \times f}{w} \text{ (mg/kg)} \quad (4.4)$$

w คือ น้ำหนักของตัวอย่างส่วนสกัดกาวเครือขาวที่ชั่งมา (กรัม)

V คือ ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลายตัวอย่างกาวเครือขาวก่อนเจือจาง (มิลลิลิตร)

f คือ จำนวนเท่าที่เจือจางสารละลายตัวอย่างกาวเครือขาวจากเริ่มต้น (dilution factor)

LOD คือ ขีดจำกัดของการตรวจวัด (ppm)

LOQ คือ ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (ppm)

ผลการทดลองของค่า LOD, LOQ, SDL และ SQL ของสารที่สนใจทั้ง 5 ชนิด แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ด้วย CZE

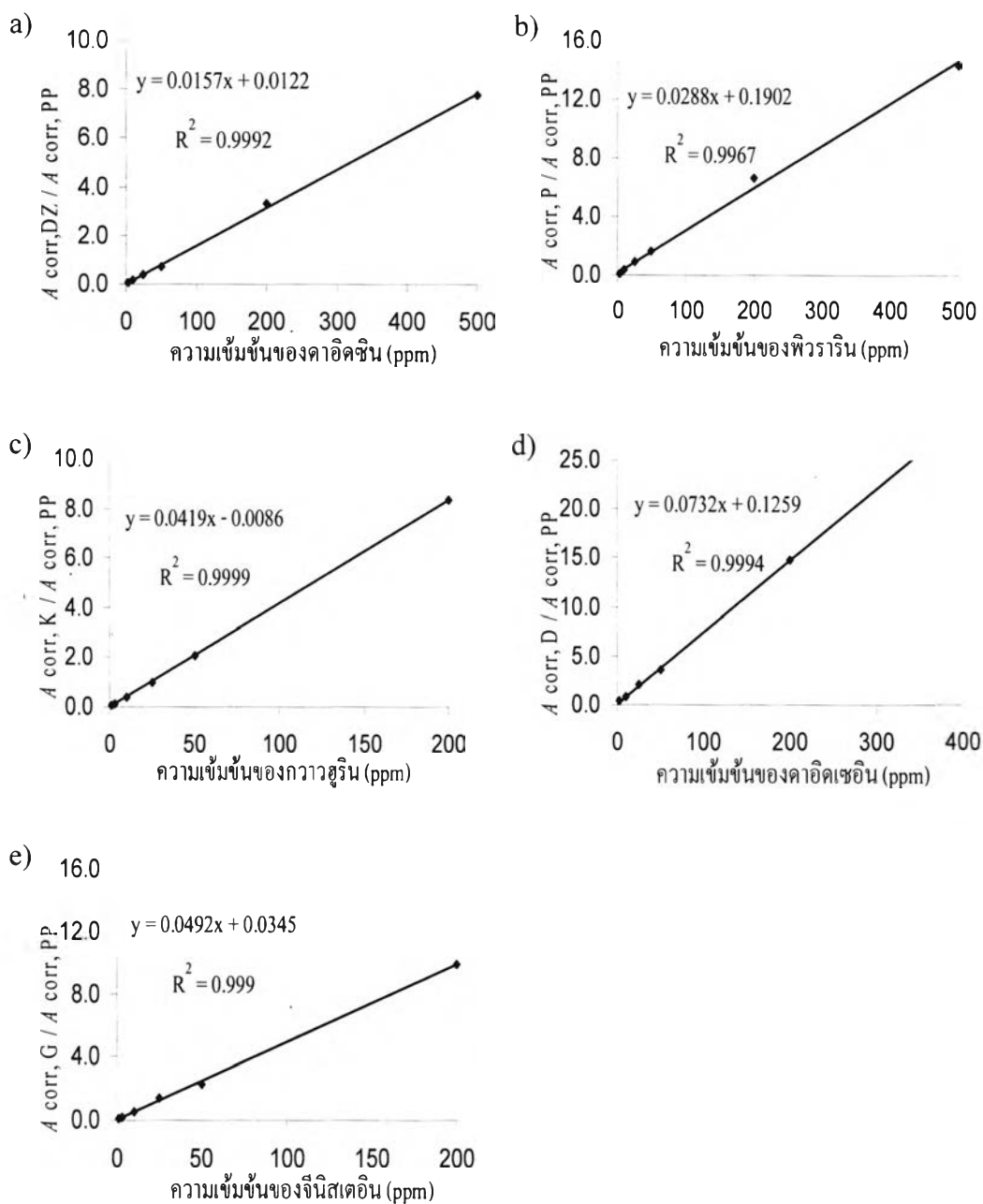
สาร	ขีดจำกัดของเครื่องมือ		ขีดจำกัดของตัวอย่าง	
	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	SDL (mg/kg)	SQL (mg/kg)
คาอิดซิน	0.7	2.6	1.1	4.2
พิวราริน	0.2	0.8	0.4	1.3
กวาวคูริน	0.2	0.7	0.3	1.2
คาอิดเซอิน	0.1	0.4	0.2	0.6
จีนิสเตอิน	0.2	0.8	0.4	1.3

4.4.2 กราฟมาตรฐาน

การทำกราฟมาตรฐานใช้วิธี internal standard เพื่อลดความผิดพลาดเนื่องจากการฉีดสารที่ไม่เท่ากันในแต่ละครั้ง โดยมีโพพิลพาราเบนเป็น internal standard (ISTD) เนื่องจากสารตัวนี้ไม่มีอยู่ในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ ไม่ทำปฏิกิริยาและมีการดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับสารที่สนใจทั้ง 5 ชนิด จึงเหมาะที่จะใช้เป็น internal standard ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยเติมสารละลายโพพิลพาราเบนลงไปในการวิเคราะห์มาตรฐานและสารละลายตัวอย่างในปริมาณที่เท่ากันและให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของโพพิลพาราเบนเป็น 100 ppm

ได้ทำกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกวาวเครือขาวทั้ง 5 ชนิด โดยความเข้มข้นของคาอิดซิน พิวราริน และคาอิดเซอินในช่วง 3 ถึง 500 ppm จีนิสเตอินและกวาวคูรินในช่วง 1 ถึง 200 ppm

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของ A_{corr} ของสารมาตรฐานกับ ISTD ($A_{\text{corr,สารมาตรฐาน}}/A_{\text{corr,pp}}$) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ใน CE นิยมใช้ corrected peak area ดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.6) แสดงดังอิเล็กทรอนิกส์โทรฟีโรแกรมรูปที่ 4.23 โดยที่ค่า R^2 จะมีค่าใกล้เคียง 1 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่าง อัตราส่วน $A_{\text{corr,สารมาตรฐาน}}/A_{\text{corr,pp}}$ กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานมีความสัมพันธ์ในลักษณะเชิงเส้นตรง



รูปที่ 4.23 กราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ a) คาอิดซิน b) ฟิวราริน c) กวางดูริน d) คาอิดซิน และ e) จิ้นีสเตอีน ด้วย CZE

4.4.3 ความเที่ยงและความแม่นยำของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

การหาความเที่ยงและความแม่นยำของ CZE ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารทั้ง 5 ชนิด ทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของคาอิดซิน: พิวาริน: กวาวคูริน: คาอิดเซอิน: จินิสเตอิน ที่ทราบปริมาณแน่นอนแล้ว spike สารดังกล่าวลงไปในเมทริกซ์ที่เป็นบัฟเฟอร์ โดยประกอบด้วย 100 ppm ของโพพิลพาราเบนเป็น ISTD ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานที่ใช้คือ 20 และ 75 ppm ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้งภายในวันเดียวกัน และเปรียบเทียบความแตกต่างเป็นเวลา 5 วัน ได้ค่าไมเกรชันใหม่ ดังตารางที่ 4.2 และอัตราส่วนของ A_{corr} ของสารมาตรฐานกับ ISTD ดังตารางที่ 4.3

จากตารางที่ 4.2 และ 4.3 พบว่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) ของไมเกรชันใหม่และอัตราส่วนของ A_{corr} ของสารมาตรฐานกับ ISTD ที่วิเคราะห์ ทั้งภายในวันเดียวกันและต่างวันกันนั้น มีค่าน้อยกว่า 5% ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ แสดงให้เห็นว่า CZE มีความเที่ยงสูงทั้งไมเกรชันใหม่และพื้นที่

ความแม่นยำของ CZE หาได้จากการเตรียมสารละลายมาตรฐานทั้ง 5 ชนิดลงในเมทริกซ์ที่เป็นบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย ISTD แล้วคำนวณอัตราส่วนของ A_{corr} ระหว่างสารมาตรฐานและ ISTD นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อทราบปริมาณของสารละลายมาตรฐาน จากนั้นคำนวณออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ recovery แสดงดังตารางที่ 4.4 จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์ recovery นั้นอยู่ในช่วง 99.7 ถึง 106.6 ซึ่งอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ เนื่องจากช่วงเปอร์เซ็นต์ recovery และเปอร์เซ็นต์ RSD ที่ยอมรับได้นั้นพิจารณาโดยใช้หลักการของ Horwitz [Gonzalez *et al.*: 2007] ตัวอย่างเช่น ในกรณีที่วิเคราะห์สารที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ppm ค่าที่ยอมรับได้ คือ เปอร์เซ็นต์ recovery ในช่วง 80 ถึง 110 และ 90 ถึง 107 ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์ RSD < 7.3 และ < 5.3 ตามลำดับ สำหรับที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 10 ppm นั้น ค่าเปอร์เซ็นต์ recovery ที่ยอมรับได้จะอยู่ในช่วงกว้างกว่านี้และเปอร์เซ็นต์ RSD จะมากกว่านี้ งานวิจัยนี้วิเคราะห์สารความเข้มข้นน้อยกว่า 100 ppm และจากการทดลองพบว่า recovery (%) นั้นอยู่ในช่วง 99.7 ถึง 106.6 และเปอร์เซ็นต์ RSD < 5% แสดงว่ามีค่าความแม่นยำของปริมาณวิเคราะห์ที่ยอมรับได้สำหรับการทำปริมาณวิเคราะห์

ตารางที่ 4.2 ความเที่ยงของไมเกรชันโทมส์สำหรับ CZE

ภายในวันที่	RSD (%) และค่าเฉลี่ยของไมเกรชันโทมส์ (นาที)									
	DZ		P		K		D		G	
	20 ppm	75 ppm	20 ppm	75 ppm	20 ppm	75 ppm	20 ppm	75 ppm	20 ppm	75 ppm
1	0.76 (11.09)	1.45 (10.87)	0.40 (18.19)	2.33 (18.04)	0.45 (20.04)	2.49 (19.93)	0.60 (25.93)	3.25 (25.84)	0.62 (27.46)	3.41 (27.39)
2	0.76 (11.22)	0.53 (11.00)	0.76 (18.49)	0.63 (18.45)	0.76 (20.40)	0.71 (20.44)	0.76 (26.56)	3.72 (27.24)	0.76 (28.16)	1.14 (28.39)
3	1.03 (11.39)	0.88 (11.07)	1.54 (19.07)	1.54 (18.62)	1.76 (21.11)	1.73 (20.66)	2.84 (27.82)	2.20 (27.06)	2.66 (29.59)	2.33 (28.79)
4	2.02 (11.06)	1.19 (10.96)	3.06 (18.21)	1.28 (18.16)	3.26 (20.11)	1.43 (20.07)	4.55 (25.95)	1.90 (26.11)	4.43 (27.63)	2.05 (27.67)
5	0.33 (11.40)	0.76 (11.09)	0.65 (19.12)	0.97 (18.51)	0.72 (21.20)	1.05 (20.49)	0.99 (27.93)	1.40 (26.82)	1.11 (29.73)	1.49 (28.49)
ต่างวันกัน	1.42 (11.23)	0.80 (11.00)	2.45 (18.62)	1.33 (18.36)	2.67 (20.57)	1.51 (20.32)	3.65 (26.84)	2.28 (26.61)	3.78 (28.51)	2.09 (28.15)

หมายเหตุ : แต่ละตัวอย่างในแต่ละวันทำการฉีดซ้ำ 5 ครั้ง

: ค่าเฉลี่ยของไมเกรชันโทมส์แสดงในวงเล็บ

ตารางที่ 4.3 ความเที่ยงของอัตราส่วนพื้นที่ ($A_{\text{corr. สารมาตรฐาน}} / A_{\text{corr. PP}}$) สำหรับ CZE

ภายในวันที่	RSD (%) และค่าเฉลี่ยของอัตราส่วน $A_{\text{corr. สารมาตรฐาน}} / A_{\text{corr. PP}}$									
	DZ		P		K		D		G	
	20 ppm	75 ppm	20 ppm	75 ppm	20 ppm	75 ppm	20 ppm	75 ppm	20 ppm	75 ppm
1	4.68 (0.302)	1.89 (1.25)	3.29 (0.746)	1.91 (2.34)	1.67 (0.748)	2.93 (3.03)	4.52 (1.47)	1.68 (5.32)	4.51 (1.05)	2.51 (3.92)
2	1.13 (0.295)	0.45 (1.25)	2.92 (0.743)	2.56 (2.36)	0.86 (0.747)	2.20 (3.01)	3.61 (1.45)	2.03 (5.42)	4.63 (1.03)	1.61 (3.98)
3	2.99 (0.297)	0.52 (1.26)	1.98 (0.751)	3.99 (2.44)	3.06 (0.750)	2.72 (3.14)	2.59 (1.54)	3.16 (5.58)	3.94 (1.08)	1.59 (3.95)
4	3.18 (0.314)	0.43 (1.26)	4.72 (0.751)	1.59 (2.45)	4.92 (0.749)	3.45 (3.27)	4.41 (1.56)	1.25 (5.92)	4.32 (1.09)	2.92 (3.95)
5	4.80 (0.307)	0.35 (1.27)	1.10 (0.784)	3.19 (2.43)	0.82 (0.814)	1.50 (3.31)	0.54 (1.60)	2.46 (5.92)	2.13 (1.09)	4.20 (3.96)
ต่างวันกัน	2.50 (0.303)	0.57 (1.26)	2.19 (0.755)	2.57 (2.41)	3.84 (0.762)	4.31 (3.15)	3.96 (1.52)	4.96 (5.63)	2.22 (1.07)	0.55 (3.95)

หมายเหตุ : แต่ละตัวอย่างในแต่ละวันทำการฉีดซ้ำ 5 ครั้ง

: ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วน $A_{\text{corr. สารมาตรฐาน}} / A_{\text{corr. PP}}$ แสดงในวงเล็บ

ตารางที่ 4.4 ความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์สำหรับ CZE

สาร	ปริมาณสารที่เติม (ppm)	recovery (%)	RSD (%)
DZ	20	102.1 ± 3.7	3.6
	75	99.7 ± 1.4	1.4
P	20	101.7 ± 3.7	3.7
	75	102.3 ± 1.3	1.3
K	20	106.6 ± 0.5	0.4
	75	101.9 ± 4.3	4.2
D	20	105.6 ± 2.3	2.2
	75	101.5 ± 1.2	1.2
G	20	101.4 ± 3.8	3.7
	75	100.1 ± 0.9	0.9

หมายเหตุ : แต่ละตัวอย่างทำการฉีดซ้ำ 5 ครั้ง

4.5 การวิเคราะห์ด้วย HPLC

4.5.1 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์

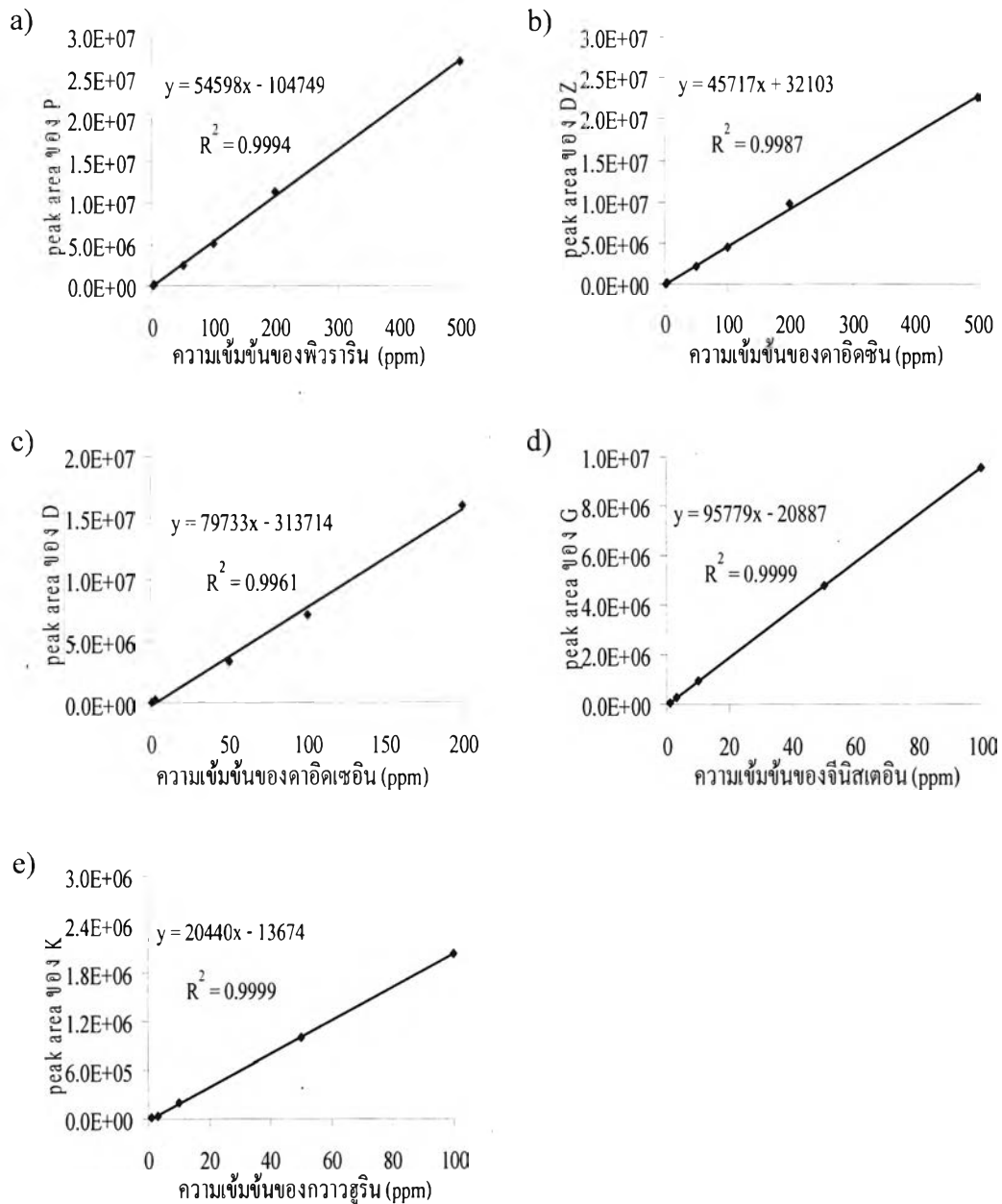
สำหรับค่า LOD, LOQ, SDL และ SQL ที่ได้จาก HPLC ของสารสำคัญทั้ง 5 ชนิด แสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่าค่า LOD ของสารสำคัญทั้ง 5 ชนิดมีค่าต่ำกว่า LOD ที่ได้จาก CE ดังตารางที่ 4.1 เนื่องจากในงานวิจัยนี้ path length ของ detection cell สำหรับ HPLC มีความกว้างกว่า CE เนื่องจากคอลัมน์ของเทคนิค HPLC มีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่าอะฟิลลารีที่ใช้ใน CE จึงมีความไวในการตรวจวัดที่ดีกว่า

ตารางที่ 4.5 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์สำหรับ HPLC

สาร	ขีดจำกัดของเครื่องมือ		ขีดจำกัดของตัวอย่าง	
	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	SDL (mg/kg)	SQL (mg/kg)
คาอิดซิน	0.02	0.07	0.032	0.11
พิวราริน	0.03	0.1	0.048	0.16
กวาวคูริน	0.03	0.1	0.048	0.16
คาอิดเซอิน	0.03	0.1	0.048	0.16
จีนิสเตอิน	0.02	0.06	0.032	0.096

4.5.2 กราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณด้วย HPLC ไม่ได้ใช้ internal standard เนื่องจากเป็นที่ยอมรับกันว่า ปริมาณที่ฉีดสารใน HPLC มีความเที่ยงสูง กราฟมาตรฐานสำหรับ HPLC ของสารทั้ง 5 ชนิด แสดง ดังรูปที่ 4.24



รูปที่ 4.24 กราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ a) คาอิดซิน b) พีวราลิน c) กวาวคูริน d) คาอิดเซอิน และ e) จีนิสเตอิน ด้วย HPLC

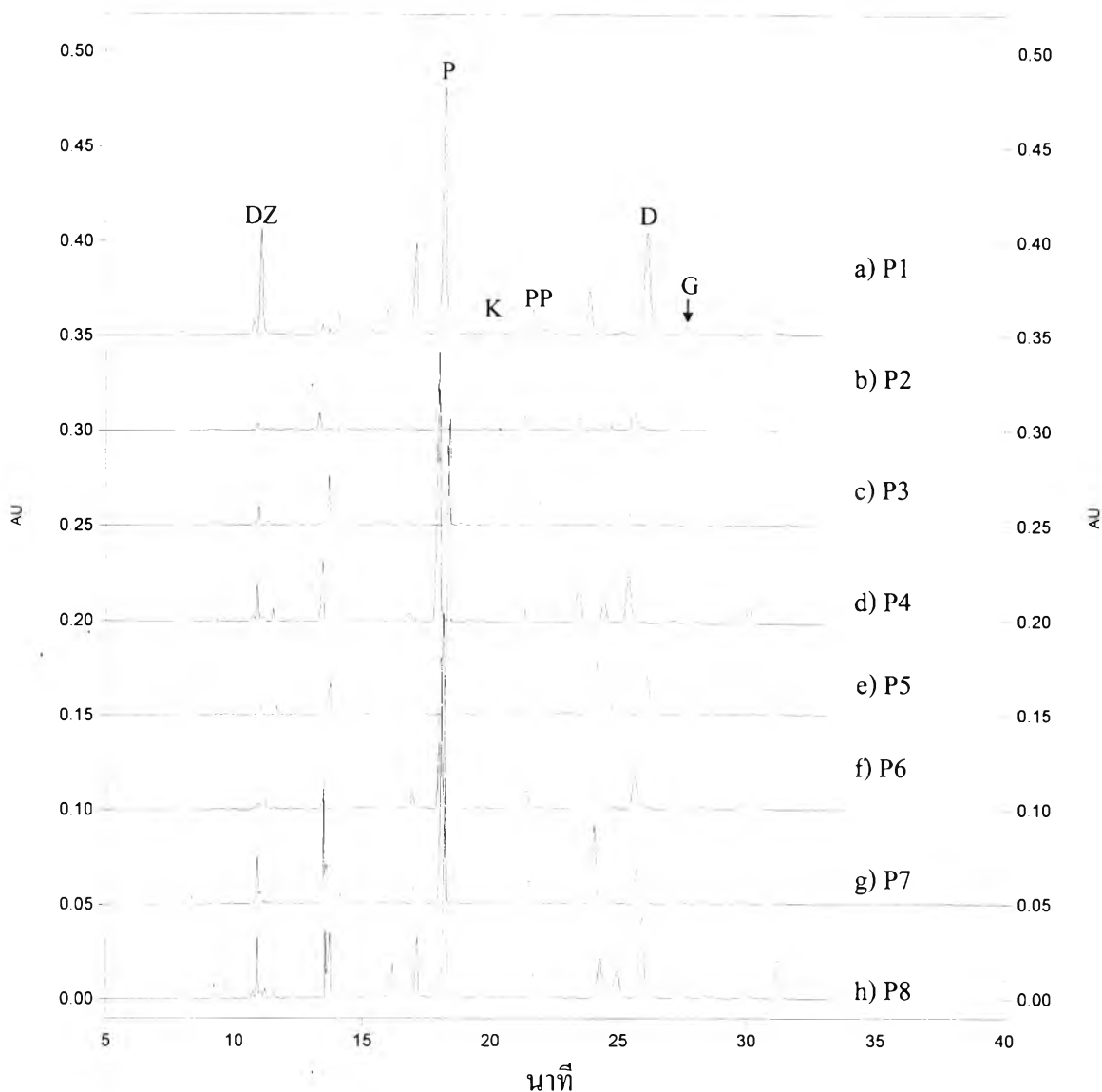
4.6 การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในหัวกวาวเครือขาวด้วย CZE และ HPLC

ตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นหัวกวาวเครือขาวที่มาจากแหล่งเพาะปลูกต่างกันหรือลักษณะพฤกษศาสตร์ต่างกันทั้งหมด 8 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์ปริมาณสารที่สนใจทั้ง 5 ชนิดโดยทำการเตรียมตัวอย่าง (หัวข้อที่ 3.5) และเจือจางตามความเหมาะสม แล้วนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกันระหว่าง CZE และ HPLC ภาวะที่ใช้แสดงในหัวข้อ 4.2 และหัวข้อ 3.11 ตามลำดับ อิเล็กโทรโฟโกราฟีและโครมาโทแกรมของตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวที่ได้จาก CZE และ HPLC แสดงดังรูปที่ 4.25 และ 4.26 ตามลำดับ ได้ทำการยืนยันพิกของสารที่สนใจแต่ละชนิดด้วยการ spike สารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิดและทำการเปรียบเทียบยูวีสเปกตรัมของพิกสารในตัวอย่างกับสารมาตรฐานด้วย ใน CE สามารถกำจัดสารที่ออกมาที่หลังสารที่สนใจโดยการไล่ที่ความดันสูงภายใน 1 ถึง 2 นาที ในขณะที่ HPLC ไล่สารอื่นที่ค้างในคอลัมน์ด้วยการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งใช้เวลาประมาณ 25 ถึง 30 นาที

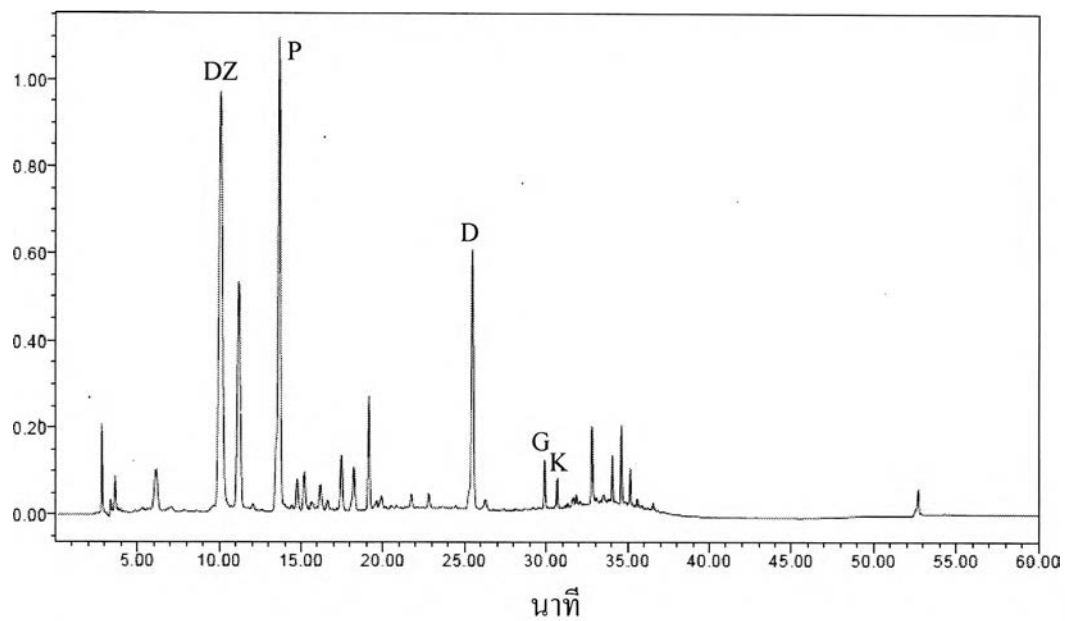
สำหรับ CZE สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของสารสำคัญทั้ง 5 ชนิด (หน่วย ppm) ได้โดยนำค่า $A_{\text{corr. สารสำคัญในตัวอย่าง}} / A_{\text{corr. PP}}$ แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารแต่ละชนิดในรูปที่ 4.23 สำหรับ HPLC หาความเข้มข้นของสารจากการนำพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารแต่ละชนิดในรูปที่ 4.24 จากนั้นนำค่าความเข้มข้นที่ได้คำนวณเป็นปริมาณสารในหน่วยมิลลิกรัมต่อน้ำหนักส่วนตัวอย่าง 1 กิโลกรัม (mg/kg) ผลดังตารางที่ 4.6 โดยเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ 2 ครั้ง พบว่าในตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวทั้ง 8 ตัวอย่างนั้น สามารถตรวจพบสารสำคัญทั้ง 5 ชนิด โดยตัวอย่าง P1 มีปริมาณสารที่สนใจแต่ละชนิดมากที่สุด ยกเว้น G ที่มีปริมาณมากที่สุดในตัวอย่างไม่ P5 ในขณะที่ตัวอย่าง P6 มีปริมาณสาร DZ, D และ K น้อยที่สุด โดยปริมาณวิเคราะห์ของ K ด้วย HPLC มีค่ามากกว่า SQL แต่ปริมาณวิเคราะห์ด้วย CZE พบว่า K มีปริมาณสารระหว่าง SDL และ SQL ส่วนสาร P และ G มีปริมาณน้อยที่สุดในตัวอย่าง P2 และ P5 ตามลำดับ อีกทั้งพบว่าในตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวแต่ละตัวอย่างมีปริมาณ P มากกว่าสารที่สนใจชนิดอื่น

เมื่อเปรียบเทียบเชิงสถิติของปริมาณวิเคราะห์ระหว่าง CZE และ HPLC ด้วยวิธี paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ดังภาคผนวก) พบว่าค่า t stat มีค่าน้อยกว่า t-critical two tail ในทุกกรณี ดังนั้นปริมาณวิเคราะห์ที่ได้จาก CZE และ HPLC ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในเชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ดังนั้น CZE จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแต่ละชนิดในตัวอย่างกวาวเครือขาว โดย CZE มีข้อได้เปรียบเหนือ HPLC คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่สั้นเนื่องจากไม่เสียเวลาไล่สารออกจากคอลัมน์



รูปที่ 4.25 อิเล็กโทรโฟโแกรมของตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวด้วย CZE โดยใช้ 60 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วย 15% v/v เมทานอล ที่ pH 9.2 เป็น BGE: ภาวะอื่นๆ ของ CE ดังรูปที่ 4.1 โดยมีการเตรียมสารละลายตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวคั่งหัวข้อ 3.5 แล้วนำไปเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 60 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ และ 15% v/v เมทานอล ซึ่งมี dilution factor เป็น 2 สำหรับตัวอย่าง P2 ถึง P8 และ dilution factor เป็น 8 สำหรับตัวอย่าง P1



รูปที่ 4.26 โครมาโทแกรมของตัวอย่างหัวกวาวเครือขาว P1 ด้วย HPLC โดยใช้ ACN/ 2% acetic acid เป็นเฟสเคลื่อนที่: ภาวะอื่นๆ ของ HPLC ดังหัวข้อที่ 3.12 โดยมีกรดเตรียมสารละลายตัวอย่าง กวาวเครือขาวดังหัวข้อ 3.5 แล้วนำไปเจือจางด้วยเมทานอลซึ่งมี dilution factor เป็น 10 สำหรับ ตัวอย่าง P1

ตารางที่ 4.6 ปริมาณวิเคราะห์ของสารสำคัญทั้ง 5 ชนิดในแต่ละตัวอย่างหัวกวาวเครือขาว ด้วย CZE และ HPLC (แต่ละตัวอย่างทำการฉีดซ้ำ 2 ครั้ง)

ตัวอย่าง	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ (mg/kg)									
	CZE					HPLC				
	DZ	P	K	D	G	DZ	P	K	D	G
P1	195.5±1.3	213.7±0.2	4.14±0.02	26.4±1.0	2.57±0.08	200.3±1.1	214.5±0.3	4.27±0.01	26.5±0.6	2.59±0.01
P2	3.72±0.29	15.5±0.2	0.91±0.04	3.95±0.17	1.31±0.04	3.55±0.03	16.4±0.1	0.93±0.02	4.18±0.01	1.33±0.01
P3	4.99±0.16	20.9±0.6	0.20±0.01	2.52±0.03	1.35±0.03	4.84±0.04	21.7±0.1	0.23±0.01	2.66±0.01	1.40±0.01
P4	9.30±0.04	58.7±0.1	0.31±0.01	5.18±0.03	1.67±0.10	9.15±0.15	56.0±1.0	0.32±0.01	5.24±0.01	1.68±0.03
P5	2.31±0.01	76.0±1.2	0.24±0.01	4.69±0.06	0.68±0.02	2.33±0.01	77.6±0.2	0.22±0.01	4.74±0.16	0.70±0.01
P6	0.48±0.06	26.9±0.3	0.06±0.01*	1.93±0.03	1.31±0.04	0.56±0.01	27.6±0.1	0.09±0.01	2.06±0.01	1.32±0.01
P7	9.48±0.10	58.7±0.7	0.30±0.01	2.20±0.02	0.89±0.01	9.46±0.13	58.7±0.1	0.32±0.01	2.39±0.01	0.92±0.01
P8	17.7±1.1	41.3±2.3	0.31±0.01	8.55±0.27	2.65±0.06	16.8±0.1	40.6±0.1	0.31±0.01	8.64±0.01	2.68±0.01

หมายเหตุ : * หมายถึงปริมาณสารระหว่าง SDL และ SQL ของสารนั้นๆ