# การศึกษาเบื้องต้นเพื่อสกัดโปรแอนโทรไซยานิดินด้วยน้ำ และเอธิลแอลกอฮอล์ จากเมล็ดองุ่นพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย

T 058506

นางสาว ปิยะนุช ลีลาอดมลิปี
นางสาว ผกามาศ วงค์เตย์
นางสาว ศศิภา ธัญรัตนศรีสกุล
นางสาว อนงค์นาฏ เรืองสกุล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2546

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 58506
วัน,เดือน,ปี 2 ส.ค. 2549
b.....
1.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# Preliminary Study of Proanthocyanidin Extraction with Water and Ethanol from Grape Seed of Grown in Thailand

Miss Piyanuch Leelaudomlipi
Miss Pakamas Wongtay
Miss Anongnart Ruangskul
Miss Sasipa Thanyaratsrisakul

A Special Project Submitted in Partial of the Requirement for the Degree of
Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academie Year 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| หัวข้อโครงงานพิเศษ | การศึกษาเบื้องต้นเพื่อสกัดโปรแอนโทรไซยานิดินด้วยน้ำ และเอธานอล จากเมล็ดองุ่นพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย | |
| โดย | นางสาว ปิยะนุช | ลีลาอุดมลิปี |
| | นางสาว ผกามาศ | วงค์เตย์ |
| | นางสาว ศศิภา | ธัญรัตนศรีสกุล |
| | นางสาว อนงค์นาฏ | เรืองสกุล |
| ภาควิชา | ชีววิทยาประยุกต์ | |
| สาขาวิชา | เทคโนโลยีชีวภาพ | |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | ผศ. ดร. เรียม เศชะโสภณมณี | |
| ปีการศึกษา | 2546 | |

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

| คณะกรรมการตรวจสอบ | | ลายมือชื่อ |
|---|---|---|
| ประธานกรรมการ | รศ.ดร. จิติ หนูแก้ว | |
| กรรมการ | ผศ.ดร. เรียม เศชะโสภณมณี | |
| กรรมการ | ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ | |

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง )

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หัวข้อโครงงานพิเศษ** การศึกษาเบื้องต้นเพื่อสกัดโปรแอนโทรไซยานิดินด้วยน้ำและเอธานอลจากเมล็ดองุ่นพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย

**โดย** นางสาว ปิยะนุช ลีลาอุดมลิปี
นางสาว ผกามาศ วงค์เตย์
นางสาว ศศิภา ธัญรัตนศรีสกุล
นางสาว อนงค์นาฏ เรืองสกุล

**ภาควิชา** ชีววิทยาประยุกต์

**สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพ

**อาจารย์ที่ปรึกษา** ผศ. ดร. เรียม เตชะโสภณมณี

**ปีการศึกษา** 2546


---

## บทคัดย่อ


แหล่งของโปรแอนโทรไซยานิดินที่สมบูรณ์ในธรรมชาติแหล่งหนึ่ง คือ เมล็ดองุ่น นักวิจัยมากมายพยายามหาวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพ เพื่อการสกัดสารฟีโนลิกจากเมล็ดองุ่น เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเด่นช่วยบำรุงสุขภาพ และป้องกันโรค ในการศึกษาเบื้องต้น นี้ได้สกัดเมล็ดองุ่นด้วยน้ำ และ เอธิลแอลกอฮอล์ 99.8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ กัน นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ( High Pressure Liquid Chromatograph ) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่ผลิตขึ้นทางการค้า ( สารสกัดมาตรฐาน ) พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดตัวอย่างกับสารสกัดมาตรฐานคล้ายคลึงกัน การสกัดด้วยน้ำ ให้สารปริมาณมากที่สุดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ การสกัดด้วยเอธิลแอกอฮอล์เข้มข้นให้สารปริมาณมากที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **Special Project Title** | Preliminary Study of Proanthocyanidin Extraction with water and ethanol from grape seed of grown in Thailand |
| **Name** | Miss Piyanuch Leelaudomlipi 43050177 |
| | Miss Pakamas Wongtay 43050178 |
| | Miss Sasipa Thanyaratsrisakul 43050197 |
| | Miss Anongnart Ruangskul 43050207 |
| **Department** | Applied Biology |
| **Program** | Science |
| **Academic Year** | 2003 |
| **Special Project Advisor** | Asst. Prof. Dr. Ream Tachasopornmanee |


---


## Abstract

In this preliminary study, grape seed extracts were performed by using ethanol 99.8 percent and water. The effects of single factors such as the extraction temperature, extraction time were studied. Grape seed extracts were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to compared with grape seed extracts in commercial grade. Chemical composition of sample extracts were similar to the standard , Provin (commercial extracts). By extraction with water, the highest extraction yield was obtained by using temperature at 90 °C for 2 hour and by extraction with 99.8 percent ethanol the highest extraction yield was obtained by using temperature at 25 °C for 24 hour.


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสำเร็จได้ด้วยการสนับสนุนและการช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีอุปการะคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. เรียม เตชะโสภณมณี อาจารย์ที่ปรึกษาและกรรมการโครงงานพิเศษที่กรุณาเป็นอย่างยิ่งในการให้คำปรึกษาระหว่างการค้นคว้าวิจัย ให้ความอนุเคราะห์วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองตลอดจนการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. จิตติ หนูแก้ว และ ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ที่เป็นประธานกรรมการและกรรมการโครงงานพิเศษ ที่ช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้การเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับใช้ในการทดลอง และช่วยอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ ทำให้โครงงานพิเศษสามารถสำเร็จได้

สุดท้ายนี้ต้องขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และรุ่นพี่ เพื่อน ๆ ทุกท่าน และผู้มีส่วนร่วมในโครงงานพิเศษทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนและเป็นส่วนหนึ่งในความสำเร็จนี้

นางสาว ปิยะนุช ลีลาอุดมลิปี
นางสาว ผกามาศ วงค์เตย์
นางสาว ศศิภา ธัญรัตนศรีสกุล
นางสาว อนงค์นาฏ เรืองสกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | I |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | II |
| กิตติกรรมประกาศ | III |
| สารบัญ | IV |
| สารบัญตาราง | V |
| สารบัญรูป | VI |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของการวิจัย | 2 |
| 1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ | 3 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย | 69 |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล | 72 |
| บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ | 106 |
| เอกสารอ้างอิง | 108 |
| ภาคผนวก | 110 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


| | หน้า |
|---|---|
| ตารางที่ 1 เปรียบเทียบสารสกัดเมล็ดองุ่นกับสารสกัดเปลือกสน | 14 |
| ตารางที่ 2 ผลของอัตราการไหลและความดันที่มีต่อเวลาการแยกสาร | 30 |
| ตารางที่ 3 ตัววัดสัญญาณที่ปรับความยาวคลื่นได้ | 47 |
| ตารางที่4 แสดงค่าดรรชนี หักเหของสารบางชนิด | 50 |
| ตารางที่ 5 คุณสมบัติของ microparticular packings | 51 |
| ตารางที่ 6 การเลือกใช้ประเภทของ HPLC ในงานวิจัยจาก Analytical Chemistry Reviews, Aprill 1984 | 52 |
| ตารางที่ 7 การใช้เฟสที่อยู่กับที่ชนิด styrene-divinyl benzene ในการแยกขนาดของโมเลกุล | 60 |
| ตารางที่ 8 วัสดุที่ใช้เป็นเรซินแลกเปลี่ยนไอออนที่ใช้ในเทคนิค HPLC | 63 |
| ตารางที่ 9 แสดงปริมาณMobile Phase B ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ | 71 |
| ตารางที่10พีคของโครมาโทแกรมที่ retention time เดียวกัน ระหว่างสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐานกับสารสกัดเมล็ดองุ่น ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ | 86 |
| ตารางที่11ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ของพื้นที่ใต้กราฟของพีคหมายเลข 1 ถึง 7 ของโครมาโทแกรม ได้จากการสกัดด้วย น้ำในแต่ละอุณหภูมิ | 89 |
| ตารางที่12 สภาวะการสกัดที่มีพื้นที่ใต้กราฟมากที่สุดในแต่ละพีค โดยการสกัดด้วยน้ำ | 90 |
| ตารางที่13พีคของโครมาโทแกรมที่ retention time เดียวกัน ระหว่างสารสกัดเมล็ดองุ่น มาตรฐานกับสารสกัดเมล็ดองุ่น ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ | 102 |
| ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของพื้นที่ใต้กราฟของพีคหมายเลข 1 ถึง 7 ของโครมาโทแกรม ที่ได้จากการสกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ในแต่ละอุณหภูมิ | 104 |
| ตารางที่ 15 สภาวะการสกัดที่มีพื้นที่ใต้กราฟมากที่สุดในแต่ละพีค โดยการสกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ | 105 |
| ตารางที่ 16 สาเหตุและการแก้ไขปัญหาของการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC | 117 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | โมโนเมอร์ชนิดต่าง ๆ ของสารโปรไซยานิดิน | 6 |
| 2 | โครงสร้างของ catechin 6 ชนิดจากชาเขียว (1) ( + ) –catechin , (2) (2)-epicatechin , (3) (2)-epigallocatechin , (4) (2)-epicatechin gallate, (5) (2)-epigallocatechin gallate , (6) (2)-gallocatechin gallate | 8 |
| 3 | วิถีการสังเคราะห์สารโปรแอนโทรไซยานิดิน | 9 |
| 4 | กลไกการเกิดอนุมูลอิสระ | 21 |
| 5 | กลไกการทำงานของสารต่อต้านอนุมูลอิสระ | 22 |
| 6 | ปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ | 22 |
| 7 | เครื่องมือพื้นฐานของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง | 27 |
| 8 | Syringe pump | 32 |
| 9 | Reciprocating pump | 33 |
| 10 | แสดงไดอะแกรมของอุปกรณ์สำหรับทำแกรเดียนต์อีลูชัน | 35 |
| 11 | เข็มฉีดสารในเทคนิค HPLC | 36 |
| 12 | External Loop Valve | 37 |
| 13 | แสดงโครมาโทแกรม | 40 |
| 14 | แสดงโครมาโทแกรมการแยกสารผสมของวัตถุระเบิด 6 ชนิด ด้วยคอลัมน์ชนิดสามคูณสาม (i) และคอลัมน์ที่ใช้กันทั่ว ๆ ไป (ii) จะเห็นว่าคอลัมน์ชนิดสามคูณสาม ใช้เวลาในการแยกน้อยกว่า คอลัมน์ HPLC ชนิด 1.5 cm x 4.6 mm | 42 |
| 15 | ผลของ Guard column ในการแยกสาร | 44 |
| 16 | แสดงการเชื่อมต่อระหว่างGuard columnกับคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร (Analytical column) | 44 |
| 17 | ตัววัดสัญญาณชนิดวัดคลื่นแสงอัลตราไวโอเลต | 47 |
| 18 | Reverse phase chromatogram ของสารผสม | 54 |
| 19 | เฟสที่อยู่กับที่ชนิดไครัล | 56 |
| 20 | โครงสร้างบนผิวของซิลิกา | 57 |
| 21 | การเปลี่ยนหมู่ Si-OH ไปเป็น Si-O-Si โดยการให้ความร้อนกับซิลิกา | 57 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป (ต่อ)


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 22 | การใช้เทคนิค HPLC ประเภทการดูดซับแยกสารประกอบอะโรเมติก | 58 |
| 23 | การแยกด้วยภาวะ isocratic elution | 65 |
| 24 | เกรเดียนต์โลไพล์ระหว่างตัวทำละลาย Bและ A | 65 |
| 25 | การบันทึก blank gradient | 66 |
| 26 | โครมาโทแกรมที่ต้องการทำเกรเดียนต์ | 67 |
| 27 | โครมาโทแกรมที่ทำเกรเดียนต์ในรูปที่ 26 | 68 |
| 28 | โครมาโทรของสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐาน ( ยี่ห้อโปรวิน ) สำหรับการสกัดด้วยน้ำ | 73 |
| 29 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง | 74 |
| 30 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง | 75 |
| 31 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง | 76 |
| 32 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง | 77 |
| 33 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง | 78 |
| 34 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง | 79 |
| 35 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง | 80 |
| 36 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง | 81 |
| 37 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง | 82 |
| 38 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง | 83 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป (ต่อ)


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 39 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง | 84 |
| 40 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง | 85 |
| 41 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐาน ( ยี่ห้อโปรวิน ) สำหรับการสกัดด้วยน้ำ | 88 |
| 42 | โครมาโทรของสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐาน ( ยี่ห้อโปรวิน ) สำหรับการสกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ | 92 |
| 43 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง | 93 |
| 44 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง | 94 |
| 45 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง | 95 |
| 46 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง | 96 |
| 47 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง | 97 |
| 48 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง | 98 |
| 49 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง | 99 |
| 50 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง | 100 |
| 51 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง | 101 |
| 52 | โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐาน ( ยี่ห้อโปรวิน ) สำหรับการสกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ | 103 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

เนื่องจากสารสกัดเมล็ดองุ่น (*Vitis vinifera* )ประกอบด้วยสารประสิทธิภาพสูงที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระและต่อต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นั่นก็คือสารโปรแอนโธไซยานิดินส์ (Proanthocyanidins) หรือ *Oligomeric* Proanthocyanidin ( OPCs )มีฤทธิ์โดดเด่นในเชิงการรักษาโรค ( Haslam, *E.*,1989 ) สารโอพีซีเป็นสารประกอบธรรมชาติที่พบได้ในพืชทั่วไป ที่มีชื่อเรียกมากมายหลายชื่อ เช่น โปรแอนโธไซยานิดินส์ (proanthocynaidins),ลิวโคแอนโธไซยานินส์ (leucoanthocynanins), โปรไซยานิดินส์ (procyanidins), พิคโนจีนอล (pycnogenol) เป็นต้น ( Bombardelli E.*et al.*, 1995 ) ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าวิตามินซี อี และ สารเบต้าแคโรทีนมาก จากการศึกษาวิจัยพบว่าสารนี้ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆและลดการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ ชะลอและลดริ้วรอยบนผิวหนังทำให้ไม่แก่ก่อนวัย ( Schwitter B.,*et al.*,1993 ) ช่วยลดการอักเสบ เพิ่มความยืดหยุ่นให้กับผนังหลอดเลือดทำให้ระบบหมุนเวียนโลหิตดีขึ้น จึงลดความเสี่ยงในการเป็นโรคที่เกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจและหลอดเลือดในสมองได้ ลดอาการเส้นเลือดขอด ( Murray M.T., *et al* ., 1998 ) ลดอาการเส้นเลือดฝอยเปราะ ( Murray M.T., et al ., 1996 ) ลดคอเลสเตอรอลในกระแสโลหิต และลดขนาดของคอเลสเตอรอล ที่เกาะอยู่ตามผนังหลอดเลือด ( Schwitter B.*et al* ., 1993 ) ลดการเกิดต้อกระจก ลดความผิดปกติที่จอรับภาพในตา(เรตินา) ในผู้ป่วยเบาหวานที่มีการเสื่อมของเส้นประสาท และกล้ามเนื้อลูกตา ( Murray M.T., *et al* ., 1998 ) ลดอาการของโรคที่เกล็ดเลือดจับตัวกันมากผิดปกติ และสามารถควบคุมปริมาณน้ำตาลในเลือด (Datcnuc J.Y., *et al.* ,1980 )อีกทั้งยังช่วยให้เซลล์สามารถทนต่อสารเคมีและสภาพแวดล้อมที่เป็นพิษได้ดียิ่งขึ้น ( Dr. Masquclier , *et al* ., 1979 ) ด้วยการที่สารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีประโยชน์มากมายเช่นนี้ จึงทำให้มีผลิตภัณฑ์สารสกัดจากเมล็ดองุ่นออกมาวางตลาดมากขึ้น แต่เมื่อสังเกตจะพบว่า ขั้นตอนในการสกัดสารออกมาจากเมล็ดองุ่นนั้นยังมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดอยู่ ซึ่งสารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดนี้ก็เป็นสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ ( Won Young Lee , *et al.* , 2000 ) ถึงแม้ในขั้นตอนสุดท้ายของการสกัดจะมีการแยกเอาตัวทำละลายออกมาจากผลิตภัณฑ์ก็ตาม โอกาสที่ตัวทำละลายอินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ใช้จะยังตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ก็ยังคงมีสูงอยู่ นอกจากนี้การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดก็ยังไปลดประสิทธิภาพของสาร OPCs ที่สกัดได้อีกด้วย (Larry Taylor , et al ., 2000 )

การทำโครงงานพิเศษนี้จึงได้เลือกใช้วิธีการสกัดด้วยน้ำและแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นวิธีการที่ ปลอดภัยต่อสุขภาพ และยังทำให้การดูดซึมสาร OPCs ในหลอดเลือดดีขึ้นด้วย

เมื่อพิจารณาตลาดของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในประเทศไทย จะพบว่ายังมีผลิตภัณฑ์ออกมาไม่มากนัก และส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัทต่างชาติ ส่วนคนไทยที่คิดจะทำผลิตภัณฑ์สารสกัดจากเมล็ดองุ่น ออกมาขายก็ยังขาดความรู้ในเรื่องของการสกัดและสารสกัดที่ได้ยังมีมาตรฐานที่ไม่แน่นอนจึงไม่สามารถออกมาวางขายในท้องตลาดได้ ในการทำสารสกัดจากเมล็ดองุ่นจะใช้เมล็ดขององุ่นแดงที่ใช้ในการทำไวน์มาผลิต ซึ่งองุ่นที่ปลูกในประเทศไทยเมื่อนำมาสกัดก็จะมีปริมาณสาร OPCs ที่ต่างจากองุ่นที่ปลูกในต่างประเทศ ประกอบกับขั้นตอนการเก็บรักษาเมล็ดองุ่นก่อนที่จะนำมาสกัดก็มีผลต่อปริมาณสาร OPCs

ดังนั้น โครงงานพิเศษนี้จะทำการศึกษาเบื้องต้นถึงองค์ประกอบที่แน่นอนของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น ที่ผลิตจากองุ่นที่ปลูกในประเทศไทย ณ ไร่เทพสถิตย์ อำเภอเทพสถิตย์ จังหวัดชัยภูมิ โดยวิธีการสกัดด้วยน้ำและเอธิลแอลกอฮอล์ ซึ่งจะได้เป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษาในระดับที่สูงขึ้นไป

**1.2 วัตถุประสงค์**

ทำการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ในการสกัดสารจากเมล็ดองุ่นโดยการใช้น้ำและเอธิลแอลกอฮอล์ โดยที่ไม่มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัด

**1.3 ขอบเขตของการวิจัย**

1. สกัดสารจากเมล็ดองุ่นโดยวิธีการสกัดด้วยน้ำและเอธิลแอลกอฮอล์
2. นำสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบหาสภาวะการสกัดที่เหมาะสมที่สุด

**1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. เพื่อให้ทราบว่าในสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่ทำการสกัดได้นั้นจะมีสารชนิดเดียวกันกับสารมาตรฐานหรือไม่
2. เพื่อนำสภาวะการสกัดที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง ไปใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาระดับสูงขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและหลักการ

องุ่นเป็นไม้ยืนต้นชนิดเถาเลื้อยหรือไม้เลื้อย ผลมีเนื้อนุ่มมาก ผลองุ่นมีการเรียงตัวเป็นพวงยาวขนาดใหญ่ องุ่นหรือมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vitis vinifera* นี้ได้ถูกนำมาศึกษาถึงองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีตั้งแต่ยุคต้นๆของศตวรรษที่ 20 จนกระทั่งมาถึงปัจจุบันซึ่งทำให้พบว่า องุ่นในสายพันธุ์ที่ต่างกันจะมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกันไปด้วย จากการศึกษาทำให้เรารู้จักสารประกอบทางเคมีจำนวนมากที่สกัดแยกได้จากส่วนต่างๆขององุ่นไม่ว่าจะเป็นใบ ผล หรือว่าส่วนอื่นๆของต้นองุ่นแต่ในจำนวนสารประกอบทั้งหลายเหล่านี้ มีสารประกอบที่น่าสนใจที่สุดที่สกัดได้จากเมล็ดองุ่นคือ โอพีซี (OPC) ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์โดดเด่นในเชิงการรักษาโรค สารโอพีซีเป็นสารประกอบธรรมชาติที่พบได้ในพืชทั่วไป มีชื่อเรียกได้ต่างกันมากมายหลายชื่อ เช่น โปรแอนโธไซยานิดินส์ (proanthocynaidins), ลิวโคแอนโธไซยานินส์ (leucoantho cynanins), โปรไซยานิดินส์ ( procyanidins), พิคโนจีนอล (pycnogenol) เป็นต้น แหล่งของโอพีซีจากธรรมชาติได้แก่พืชต่างๆซึ่งพืชต่างๆซึ่งพืช 2 ชนิดที่นับว่าเป็นแหล่งสำคัญและได้รับความนิยมในการสกัดโอพีซี คือ เมล็ดองุ่นและเปลือกสน สารออกฤทธิ์สำคัญที่สกัดได้จากเมล็ดองุ่นนี้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง

ในขั้นตอนการผลิตไวน์นั้นจะมีการกำจัดเมล็ดองุ่นทิ้งออกไป โดยไม่ได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ใดๆต่อทั้งๆที่เมล็ดองุ่นนั้นอุดมไปด้วยสารโปรแอนโทรไซยานิดิน จึงได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการจะนำเมล็ดองุ่นที่เหลือดังกล่าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์

สารโปรแอนโทรไซยานิดินนั้นเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายว่าเป็น สารต่อต้านอนุมูลอิสระ ( Antioxidant ) ที่มีประสิทธิภาพสูงมาก สารแอนตี้ออกซิแดนท์ที่สกัดจากเมล็ดองุ่นมีประสิทธิภาพมากกว่าวิตามินซีถึงยี่สิบเท่า และมากกว่าวิตามินอีถึงห้าสิบเท่า ช่วยร่างกายต่อต้านอนุมูลอิสระ ช่วยกระชับผิวหนัง ชะลอความเหี่ยวย่น และความชรา ลดความเสี่ยงต่อการเกิดเส้นเลือดขอด, ริดสีดวง, ข้อบวม, อาการบาดเจ็บจากการเล่นกีฬา, อาการเกี่ยวกับตาในคนที่เป็นโรคเบาหวาน, เส้นเลือดฝอยเปราะแตกง่าย, ความดันโลหิตสูง และโรคหัวใจ และช่วยลดการสร้างฮีสตามีนทำให้บรรเทาอาการแพ้และบวมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.1 สารโปรแอนโทรไซยานิดิน**

2.1.1 โครงสร้างของสารโปรแอนโทรไซยานิดิน

สารโปรแอนโทรไซยานิดินเป็นกลุ่มของโครงสร้างโมเลกุลทางเคมี และประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียก โมโนเมอร์ โปรแอนโทไซยานิดินประกอบด้วยโมโนเมอร์ตั้งแต่สองโมเลกุลขึ้นไปมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเคมี เรียกสารที่ได้ว่า *Oligomeric* Proanthocyanidin หรือ OPCs

OPCs ที่ประกอบด้วยสองโมโนเมอร์จะเรียกว่า Dimers , ประกอบด้วยสามโมโนเมอร์จะเรียก Trimers , ประกอบด้วยสี่โมโนเมอร์เรียก Tetramers , ประกอบด้วยห้าโมโนเมอร์เรียก Pentamers เป็นต้น

ถ้าจะอธิบายให้เห็นภาพ Complexity ของสารประกอบที่ได้จากเมล็ดองุ่นสกัด มันจะประกอบด้วยสอง Proanthocyanidin Monomers ที่เรียก Catechin และ Epicatichin แต่ละ Monomer ที่มาประกอบกันจะต่อกันที่ตำแหน่ง Beta หรือ Alpha เพื่อให้ได้เป็น Dimer ,Trimer เป็นต้น นอกจากนี้ Catechin และ Epicatichin ยังสามารถจัดรูปแบบตัวเองเป็นโมเลกุลของ Ester จำนวนมากจากโมเลกุลของ Gallic Acid โดยจะเรียกว่า Catechin Gallate หรือ Epicatichin Gallate Catechin และ Epicatichin ยังสามารถ form ตัวเป็นน้ำตาลได้หลายชนิดและเป็นโปรตีนได้ด้วย โดยจะเรียกว่า Glycosidesและ Peptides ตามลำดับ ในความเป็นจริงจำนวนของ Dimer ที่สามารถเกิดขึ้นได้รวมทั้ง Gallic Acid และ Glucose Ester คือ 162 ชนิด ในแต่ละครั้งที่มีการเติมหมู่ Monomer เข้าไปจะทำให้จำนวน Combination ทั้งหมดเพิ่มขึ้น (พิจารณาตาม geometrically) คือ ไตรเมอร์ เพิ่มขึ้นมากกว่า 550 แบบ , เตตระ-เมอร์เพิ่มขึ้นกว่า 1,200 แบบ เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงทำให้โครงสร้างของสารนี้ไม่เหมือนกับสารประกอบที่เป็นสารอาหารที่มีโครงสร้างเพียงหน่วยเดียว เช่น วิตามินซี (Ascorbic Acid) หรือวิตามินอี (d-alpha tocopherol) แต่ OPCs มีโครงสร้างที่ซับซ้อนกว่าและในการที่จะระบุปริมาณก็จะยากกว่าด้วย

ความซับซ้อนของสาร OPCs นั้นมีมากพอ ๆ กับจำนวนบริษัทที่ขายสารสกัดจากเมล็ดองุ่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งความยากในการให้คำจำความของคำว่า OPCs ของคณะกรรมการที่ตั้งขึ้น ถ้าพูดกันตามความหมายจริง ๆ แล้ OPCs จะประกอบด้วยโมโนเมอร์ของโปรแอนโทร-ไซยานิดินตั้งแต่สองโมโนเมอร์ขึ้นไป อย่างไรก็ตามคำจำกัดความนี้จะรวมถึง โมโนเมอร์ที่ต่อกันเป็นสายโซ่ยาวที่เรียก Polymer และ Condensed Tannin ไว้ด้วย แต่ผู้ที่ทำการศึกษาบางกลุ่มกลับเชื่อว่าพอลิเมอร์และแทนนินไม่ได้เป็นองค์ประกอบของ OPCs และก็ยังมีความเห็นแตกต่างกันไปอีกมากมาย นอกจากนี้ยังมีความเห็นที่ไม่ตรงกันถึงคำจำกัดความของคำว่า

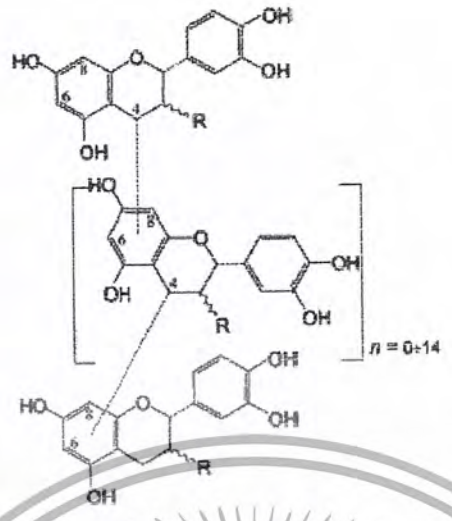
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พอลิเมอร์ว่าจะต้องประกอบด้วยโมโนเมอร์ตั้งแต่จำนวนเท่าไร คือ ตั้งแต่ห้าขึ้นไป , เจ็ดขึ้นไป หรือ สิบขึ้นไปก้นแน่

อย่างไรก็ตามมีหลักฐานที่แสดงว่า OPCs ขนาดเล็ก เช่น ไดเมอร์ , ไทรเมอร์ และเตตระเมอร์มีความสามารถในการละลายที่ดีกว่า OPCs ที่มีขนาดใหญ่กว่า และก็มีหลักฐานยืนยันอีกเช่นกันว่า พอลิเมอร์และแทนนินที่มีความสามารถในการละลายต่ำจะมีประโยชน์กว่าที่ความสามารถในการละลายสูง เมื่อไม่นานมานี้ Hagerman , et al. ได้ทำการทดลอง 15-30 ครั้งเพื่อที่จะแสดงให้เห็นว่า Polymeric Proanthocyanidins และ Tannins มีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารพอลีฟีนอลธรรมดา เนื่องจากพอลิเมอร์และแทนนินเป็นสารที่ถูกดูดซับได้ไม่ดี นักวิจัยจึงเห็นว่าน่าจะมีคุณสมบัติ Antioxidant Activity อยู่ที่บริเวณย่อย (Digestive Tract ) เพื่อที่จะป้องกันความสูญเสียอันเนื่องมาจากการเกิดออกซิเดชันของไขมัน โปรตีน และ คาร์โบไฮเดรต ระหว่างที่เกิดการย่อยสารเหล่านี้ ส่วนสารแอนติออซิแดนท์อื่น เช่น วิตามิน อี , ซี และ เบต้า-แคโรทีน ก็มีความสามารถในการถูกดูดซับพียงเล็กน้อย

สารสกัดจากเมล็ดองุ่นก็ประกอบด้วยโมโนเมอร์เช่นกัน แต่จะมีปริมาณมากหรือน้อยจะขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้ในการสกัด ซึ่งปริมาณโมโนเมอร์ที่มีอยู่ในสารสกัดเมล็ดองุ่นนั้นมีได้ตั้งแต่น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ไปจนมากถึง 30 เปอร์เซ็นต์ จึงเกิดการถกเถียงกันขึ้นในกลุ่มผู้ที่จำหน่ายสารสกัดเมล็ดองุ่นว่ามีปริมาณโมโนเมอร์เองเมล็ดองุ่นเท่าไรกันแน่ แต่จากการศึกษาพบว่า OPCs มีคุณสมบัติที่โมโนเมอร์ไม่มี เช่น การสร้างตัวของคอลลาเจน(Collagen Formation ) สารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีปริมาณโมโนเมอร์น้อยมากเมื่อเทียบกับสารสกัดชาเขียวซึ่งมีปริมาณโมโนเมอร์ที่เป็นประโยชน์สูงมาก เช่น Epigallocatechin Gallate ( EGCG ) อีกทั้งยังมีราคาต่ำมากเมื่อเทียบการการทำเมล็ดองุ่นสกัด แต่อีกนัยหนึ่งนั้นสารสกัดชาเขียวก็ไม่ได้เป็นแหล่งที่ดีที่สุดของ OPCs

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 1 โมโนเมอร์ชนิดต่าง ๆ ของสารโปร์ไซยานิดิน

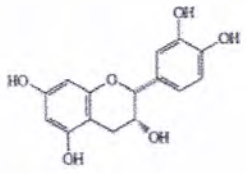
สารสกัดเมล็ดองุ่นอาจประกอบด้วยสารที่เราไม่รู้จักอีกมากมาย และบางทีสารที่เราไม่รู้จักอีกเป็นพันชนิดอาจจะเป็นสารที่มีคุณประโยชน์ทางชีวภาพ (Biologically Active Substances )ที่ไม่ใช่สาร OPCs เช่น Quercetin , Ferykuc Actd , Caffeic Acid , Coumaric Acid และ Myricetin ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ก็จะพบในพวก ผิว ,ก้าน และ โบ ของพืช สารประกอบเหล่านี้พบในสารสกัดเมล็ดองุ่นนั่นคือเมล็ดองุ่นอาจผ่านการหมักมาก่อนจึงทำให้สารประกอบเหล่านี้ติดแน่นมากับผิวของเมล็ดองุ่นระหว่างกระบวนการผลิต ดังนั้นเมื่อนำ Stem และเมล็ดมาทำการสกัดจึงพบสารเหล่านี้อยู่ด้วย ปริมาณและชนิดของสารประกอบดังกล่าวที่พบในสารสกัดเมล็ดองุ่นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับอิทธิพลของ วิธีการสกัด , พันธุ์องุ่น, แหล่งที่มีการเพาะปลูกองุ่น และ วิธีการเก็บรักษาเมล็ดองุ่นว่าดีแค่ไหน

ในธรรมชาติสาร oligomeric proanthocyanidins ( OPCs )ประกอบด้วยสารflavan-3-ol สาร flavan-3-ol เป็นสารที่มีความซับซ้อนมาก ส่วนสาร OPCs ก็เกิดจากการที่สาร flavan-3-ol มาต่อกันอย่างน้อย 2 โมเลกุลและ 3 โมเลกุล สาร flavan-3-ol 1 โมเลกุลจัดเป็น 1 โมโนเมอร์ แต่ละ flavan-3-ol ประกอบขึ้นมาจากสาร catechin ( ประจุ + ) และ epicatechin ( ประจุ - ) 2 โมโนเมอร์ประกอบขึ้นเป็นไดเมอร์และถ้า 3 โมโนเมอร์ก็จะประกอบกันขึ้นเป็นไตรเมอร์ โมโนเมอร์เป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์สารO PCs แต่ตัวมันเองจะไม่มี คุณสมบัติที่มี

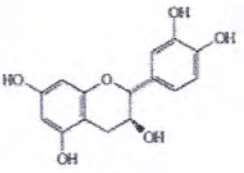
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ทางชีวภาพ เมื่อโมโนเมอร์มาประกอบกันเป็นไดเมอร์และไตรเมอร์ จะจัดเป็นโอลิโกเมอร์ซึ่งมีคุณสมบัติทางชีวภาพสูงมาก คุณสมบัติทางเคมีของสาร OPCs คือ ไม่มีสีแต่สามารถจะเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำเงินหรือสีแดงได้โดยอาศัยกระบวนการทางเอนไซม์ เมื่อสาร OPCs กลายเป็น red pigment anthocyanin และกลายมาเป็นสีแดงมันจะเสียลักษณะที่เป็นสาร OPCs ไป่ สารOPCs จัดอยู่ในพวกสาร polyphenol ที่เป็น antioxidant(antioxidant polyphenol ) โดยที่ทั้ง flavonoids และ flavanols ก็จัดเป็น antioxidant polyphenol เช่นกัน แต่สาร OPCs นั้นไม่ได้จัดเป็นสาร flavonoid และก็แน่นอนว่าสาร OPCs ไม่ใช่ bioflavonoids ด้วย เหมือนกับที่คอลัมน์ Consumer Education ของนิตยสารฉบับหนึ่งในเดือนเมษายนปี 1998 ได้ตีพิมพ์แบบผิด ๆ ไว้ ดังนั้นจึงเกิดความสับสนอย่างมากกับสารนี้ จริง ๆ แล้วสาร OPCs จัดเป็นสารพวก flavonols ซึ่งจะพบในกระบวนการที่เกิดขึ้นที่เมล็ดองุ่น แต่ไม่ได้หมายความว่าสารสกัดเมล็ดองุ่นคือสาร OPCs นั่นคือไม่ใช่ทั้งหมดของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่จะเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ จากการใช้วิธีการสกัดที่ถูกต้องแม่นยำของ Dr.Masquelier ซึ่งสารที่ได้นั้นจะผ่านการตรวจสอบและรับรองโดย French Ministry of Health พบว่าสาร OPCs สามารถอธิบายเรื่อง ' French paradox ' ได้ และพบว่าสารนี้ เกี่ยวข้องกับโปรตีนอย่างใกล้ชิด ปัจจุบันสารสกัดเมล็ดองุ่นยังไม่ได้ทดสอบเกี่ยวกับ ผลกระทบที่มีต่อสุขภาพยังจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารนี้ต่อไปเกี่ยวกับ เรื่องการเป็นสารป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน , การเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับ collagen , การคืนความสมบูรณ์ให้กับเนื้อเยื่อต่างๆ และในเรื่องของประโยชน์ต่อสุขภาพด้านต่างๆ อย่างไรก็ตามสาร OPCs ก็จัดเป็นสารที่มีความารถทางชีวภาพและไม่เป็นพิษ ในขณะที่สาร polyphenol ชนิดอื่นนั้นไม่มีความสามารถทางชีวภาพที่มีประโยชน์เช่นสารนี้และยังเป็นพิษอีกด้วย

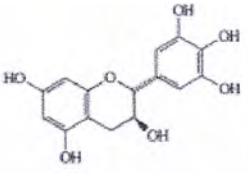
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



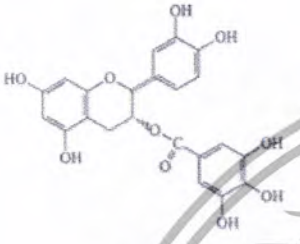
1



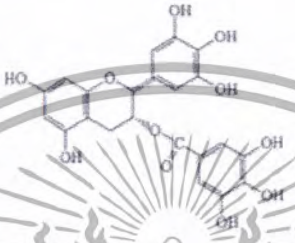
2



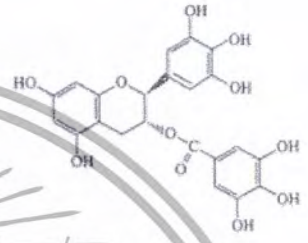
3



4



5



6

รูปที่ 2 โครงสร้างของ catechin 6 ชนิดจากชาเขียว (1) ( + ) – catechin , (2) (2)-epicatechin , (3) (2)-epigallocatechin , (4) (2)-epicatechin gallate , (5) (2)-epigallocatechin gallate , (6) (2)-gallocatechin gallate

2.1.2 การสังเคราะห์สารโปรแอนโทรไซยานิดิน

Flavonoid Pathway ของพืชชั้นสูงเป็นระบบพันธุศาสตร์ชีวเคมี ( biochemical genetic system ) ที่มีประโยชน์สำหรับการศึกษาการควบคุมเมตาบอลิซึม flavonoid เป็นสารเมตาโบไลท์ทุติยภูมที่สังเคราะห์จาก phenylalanine และ acetyl CoA flavonoid มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช , การขยายพันธุ์ และการอยู่รอด อีกทั้งยังเป็น micronutrient ที่สำคัญของมนุษย์และสัตว์การสังเคราะห์ทางชีวภาพเกิดขึ้นในไซโตซอลทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายและส่งต่อมายัง vacuole ผ่าน ATP – dependent glutathione pump ( ในบาง species ) เนื่องจากสารประกอบนี้ไม่จำเป็นภายใต้สภาวะของการทดลองจึงมีการแยก flavonoid และโปรตีนควบคุมถูกโคลนและศึกษาคุณสมบัติจากพืชหลายชนิด และพบที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นทั้งจากภายนอกและภายใน ใน Arabidopsis มีการแยกยีนเอ็นไซม์สำหรับ flavonoid 7 ชนิด คือ CHS , CHI , F3H , DFR flavonoid synthase และ leucoanthocyanidin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

dioxygenase flavonol synthase ซึ่งกำหนดรหัสโดยยีนที่มีซ้ำเดียว การให้ null alleles ที่รบกวนการสังเคราะห์ flavonoid ของพืชเพื่อ identified CHS , CHI , F3H , F3'H และ DFR

รูปที่ 3 วิถีการสังเคราะห์สารโปรแอนโทรไซยานิดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 คุณสมบัติของสารโปรแอนโทรไซยานิดิน

คุณสมบัติทางเคมีของสาร OPCs คือ ไม่มีสีแต่สามารถจะเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำเงินหรือสีแดงได้โดยอาศัยกระบวนการทางเอนไซม์ เมื่อสาร OPCs กลายเป็น red pigment anthocyanin และกลายมาเป็นสีแดงมันจะเสียลักษณะที่เป็นสาร OPCs ไป

Proanthocyanidin เป็นที่แพร่หลายมากกว่า Hydrolyses Tannin สาร ทั้งสองนี้จะเป็น oligomer หรือ polymer ของ flavonoid ( เช่น Flavan-3-ol ) เชื่อมกัน โดยพันธะระหว่างคาร์บอน กับ คาร์บอน ซึ่งไม่ถูกย่อยด้วยน้ำ

Proanthocyanidin ส่วนใหญ่จะเรียกว่า Condensed Tannins เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีมีการรวมตัวกันของสาร อย่างไรก็ตาม Hydrolyses Tannin ก็ผ่านปฏิกิริยาการรวมตัวกันของสารเหมือนกัน

ในส่วน Proanthocyanidin จะได้มาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของกรด ซึ่งจะผลิต Red anthocyanidins เมื่อมีการให้ความร้อน Proanthocyanidin ในสารละลายกรดแอกอฮอล์

โดยทั่วไป antrocyanidin จะผลิตเป็น Cyanidin ( Flavan –3-ol จาก procyanidin ) และ delphindin ( จาก prodelphindin )

Proanthocyanidin จะประกอบจาก Flavonoid ขนาดใหญ่ 2 – 50 หน่วย

Proanthocyanidin Polymer มี โครงสร้างที่ซับซ้อน เนื่องจากว่า Flavonoid มีความสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีและมีการเปลี่ยนแปลงขนาดของพันธะระหว่าง Flavan

รงควัตถุ Antrocyanidin จะมีแถบสีที่สามารถมองเห็นได้ คือ สีชมพู, สีแดงสด, สีแดง, สีม่วงอมน้ำเงิน, สีม่วง และ สีน้ำเงิน จะพบเห็นได้ตาม ดอกไม้, ใบ, ผลไม้, น้ำผลไม้ และ ไวน์

พันธะคาร์บอนที่เชื่อม Proanthocyanidin จะไม่ถูกทำลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยน้ำ

Proanthocyanidin สามารละลายได้หรือไม่ได้ในสารละลายน้ำ ขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีและระดับของ polymerization

2.1.4 ประวัติการถูกค้นพบของสารโปรแอนโทรไซยานิดิน

นักสำรวจชาวฝรั่งเศสชื่อ Jacques Cartier ได้เขียนเรื่องราวการเดินทางในปี 1534 ถึงปี 1535 ในQuebec การเดินทางของ Cartier ได้มีการค้นพบถึงตัวที่เป็นตัวช่วยในการรักษาโรคลักปิดลักเปิด เกี่ยวกับการขาดวิตามิน ซี จากชาวบ้านที่อยู่แถบนี้ ได้แนะนำ Cartier ได้รู้จักต้นไม้ขนาดใหญ่ ที่เหมือนเป็นสัญลักษณ์ของที่นี่ ซึ่ง ต้นไม้ที่ว่า มีใบสีเขียวสด เปลือกไม้หลุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลอกออกได้ง่าย ชาวบ้านที่นี่ได้นำใบไม้มาสกัดเป็นเครื่องดื่ม ทำการเก็บรักษาเปลือกไม้ให้มีอายุนาน และ นำลูกไม้มาช่วยในการบรรเทาอาการข้อต่อบวม

Cartier ยังไม่รู้ว่า ลูกไม้มีส่วนประกอบของวิตามินซี จำนวนเล็กน้อย และในเปลือกไม้มีสาร Flavonol ซึ่งเป็นตัวสำคัญต่อผลของวิตามินซี

ปี 1932 วิตามินซี ถูกค้นพบในน้ำมะนาว ปีต่อมาได้มีการสังเคราะห์วิตามินซี ขึ้นมาซึ่งเรียกว่า Ascorbic acid

ปี 1936 ได้มีการค้นพบ วิตามินพี ที่ผนังชั้น Vascular แต่ไม่เป็นที่ยอมรับในฐานะของวิตามิน วิตามินพี เป็นสารเคมีที่มีชื่อว่า polyphenol ซึ่งจะประกอบไปด้วย benzene-pyran-phenolic acid หรือ ก็คือ Flavan นิวเคลียสของ Flavan จะรวมตัวเป็นสารพื้นฐานมากมายกว่า 100 โมเลกุลในพืชทุกชนิด ซึ่งจะเรียกว่า bioflavanoids หรือ Flavanoids

Prof. Masquelier ได้ทำการจำแนกวิตามิน พี และได้มีการจดลิขสิทธิ์ในการสกัดหาสารนี้จากผิวของ ถั่วลิสง และเปลือกสน

Prof. Masquelier ได้กำหนดคำว่า Pycnogenol คล้ายกับ bioflavanol เป็นส่วนพิเศษในกลุ่มของ flavonoid ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ OPCs ซึ่ง OPCs จะช่วยในการส่งเสริมกับวิตามินซี ให้มีฤทธิ์มากขึ้น

ในประเทศฝรั่งเศส ปี 1982 Prof. Masquelier ได้จดลิขสิทธิ์กรรมวิธีการสกัดสารที่มีประสิทธิภาพสูงและ flavonol ที่ไม่เป็นพิษ สำหรับใช้เป็นส่วนประกอบ สำหรับการป้องกันและต่อต้านอันตรายที่เกิดจากผลทางชีววิทยาของอนุมูลอิสระ

ปี 1987 Prof. Masquelier ได้มีการยื่นยอมให้ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำการจัดระเบียบเรียบเรียงเกี่ยวกับ OPC ให้เป็นแบบแผน

คำอ้างอิงจากบทคัดย่อ “ สิ่งที่ได้สร้างขึ้นมานี้ได้จัดการวิธีในการป้องกันและต่อต้านอันตราย อันเกิดจากอนุมูลอิสระ ในสิ่งมีชีวิตพวกสัตว์เลือดอุ่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งมนุษย์ เริ่มจาก สมอง , หลอดเลือด , หัวใจ , การเกิดเนื้อตายเนื่องจากโลหิตอุดตันที่สมอง , การส่งเสริมการเกิดเนื้องอก , การอักเสบ ,เส้นเลือดอุดตัน ,การสลายคลอโรเจน และอื่น ๆ

ต่อมาได้มีการประยุกต์เพื่อหาวัตถุดิบที่เป็นแหล่ง OPCs ซึ่งแหล่งวัตถุดิบดังกล่าวจะต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ มี Proanthocyanidin เป็นองค์ประกอบ Prof. Masquelier ได้ค้นคว้าหาแหล่ง OPC ที่สำคัญก็คือ สารสกัดเมล็ดองุ่น

2.1.5 แหล่งที่พบสารโปรแอนโทรไซยานิดินในธรรมชาติ

สารโปรแอนโทรไซยานิดินจัดเป็น Biological Active Flavonoids ที่พบในอาณาจักรพืช และเป็นสาร Antioxidant ที่พบในธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพสูงอีกด้วย พบทั่วไปใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลือกของต้นไม้และเปลือกนอกของเมล็ด สารนี้ทำหน้าที่ป้องกันพืชจากการเกิดออกซิเดชัน เนื่องจากออกซิเจนและแสงแดด ในความเป็นจริงมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ยืนยันว่า Proanthocyanidin มีประสิทธิภาพในการเป็นสาร Antioxidant ที่สูงกว่าวิตามินซี, วิตามินอี หรือ เบต้า-แคโรทีน

เมล็ดองุ่นเป็นอีกแหล่งหนึ่งของธรรมชาติที่อุดมไปด้วย Proanthocyanidins เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาทั้งในมนุษย์และในสัตว์ทดลองพบว่า สาร proanthocyanidins ที่สกัดได้จากเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระและต่อต้านการเกิดออกซิเดชัน บางรายงานได้กล่าวว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นทำให้เกิดการสร้างตัวของ Collagen , ทำให้สุขภาพหัวใจดีขึ้น, พัฒนาการระบบการหมุนเวียนของระบบหมุนเวียนขนาดเล็กในร่างกาย , ป้องกันสาเหตุต่าง ๆ ทำให้แก่ก่อนวัย , ยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งชนิดต่าง ๆ , ทำให้เซลล์ต้านทานต่อยา, สารเคมีและมลภาวะที่เป็นพิษต่าง ๆ ได้ จากการที่สารประกอบดังกล่าวมีสรรพคุณมากมายทางด้านชีวภาพ จึงมีผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวกับสารสกัดเมล็ดองุ่นออกมาวางจำหน่ายในท้องตลาดเป็นจำนวนมาก

ในทางการค้าเมล็ดองุ่นที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรม สารสกัดเมล็ดองุ่นนั้นจะถูกส่งมาจากองุ่นที่ใช้ในการทำไวน์ นั่นก็คือ พันธุ์ *Vitis vinifera* องุ่นชนิดนี้มีมากกว่า 12 ครั้ง ที่พบใน Thomson , Flame และ Black seedless varieties

ในธรรมชาติองุ่นที่ใช้ในการทำไวน์ชนิดนี้มีในเมล็ดจะมี โมโนเมอร์50-1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ( น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ) , มีโอลิโกเมอร์ 120-1400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีพอลิเมอร์หรือแทนนินที่มีมวลโมเลกุลสูง 1,250-1,700 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนผิวองุ่นมีโมโนเมอร์ 14-66 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม , มีโอลิโกเมอร์ 35-200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีพอลิเมอร์ 20-750 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความหลากหลายขององุ่นทำไวน์ที่นำเมล็ดมาใช้ในอุตสาหกรรม สารสกัดจากเมล็ดองุ่นจะมีผลต่อองค์ประกอบของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่ได้ Bourzeix et al. ได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณสาร Proanthocyanidin ที่เป็นองค์ประกอบของเมล็ดองุ่นที่มาจากองุ่นที่ต่างกัน พบว่าปริมาณโมโนเมอร์ของ Catechin และ Epicatechin ในเมล็ดองุ่น Carignan มีค่าอยู่ที่ 51 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม , เมล็ดองุ่น Pinot Noir มีปริมาณ 1,100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเมล็ดองุ่น Cbernet Sauvignon มี 285 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนสารโอลิโกเมอริก โปรแอนโทรไซยานิดิน ในเมล็ดองุ่น Carignan มี 114 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในเมล็ดองุ่น Pinot Noir มี 1275 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขณะที่เมล็ดองุ่น Cabernet Sauvignon มี 371 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนพอลิเมอร์ก็จะมีค่าอยู่ที่ 6-73 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอุตสาหกรรมผลิตสารสกัดจากเมล็ดองุ่นจะใช้เมล็ดองุ่นแดงขาวในการทำ เมล็ดองุ่นแดงจะมีปริมาณพอลีฟีนอลทั้งหมดมากกว่าเมล็ดขององุ่นขาว คือ เมล็ดองุ่นขาวมีปริมาณสารนี้เฉลี่ยเป็น 3,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนเมล็ดองุ่นขาวมีปริมาณเฉลี่ยอยู่ที่ 2,800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมล็ดองุ่นที่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตสารสกัดจากเมล็ดองุ่นนั้นอาจได้มาจากกระบวนการผลิตน้ำองุ่นและจากอุตสาหกรรมไวน์ก็ได้ ซึ่งเมล็ดองุ่นจะถูกขับออกมาในกระบวนการผลิต เมล็ดองุ่นที่ได้รับมาจากอุตสาหกรรมพวกนี้จะถูกนำไปผ่านการหมักทำให้สารพอลิฟีโนลิกเกิดการสูญเสียไป 30-50 เปอร์เซ็นต์ซึ่งก็เป็นองุ่นแดงที่ให้คุณภาพ“ Puckery” สำหรับเมล็ดองุ่นขาวที่ได้จากการทำน้ำองุ่น ถ้าแยกเมล็ดออกมาก่อนที่จะเกิดการหมักก็จะทำให้สามารถรักษาปริมาณสารพอลิฟีนอลไว้ได้เป็นจำนวนมาก

อีกปัจจัยที่มีผลกระทบต่อปริมาณสารพอลิฟีโนลิกในเมล็ดองุ่นที่ได้จากการทำไวน์คือขั้นตอนที่เรียกว่า “ Vinification ” ปกติไวน์ก็จะทำตามวิธีธรรมดาทั่วไปแต่มีไวน์บางชนิดเช่น “ Noivcau ” ที่ใช้ Carbonic Maccration การทำ Thermovinification จะใช้ในพื้นที่ที่ไวน์แดงทำจากองุ่นที่สีไม่สวย เช่น พื้นที่ที่อากาศเย็นจะยากมากในการหาองุ่นที่สุกในปริมาณมาก โดยเฉลี่ยแล้ว Vinification จะทำให้สูญเสียสารพอลิฟีโนลิกไป 30 เปอร์เซนต์ซึ่งมากกว่าการทำ Thermovinifiction หรือ การทำ Carbonic Maceration

สิ่งสำคัญที่สุดของวิธีการจัดการกับเมล็ดองุ่นก็คือ การทำแห้ง , การแยก และการเก็บรักษา ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อประสิทธิภาพและความสามารถของสารในผลิตภัณฑ์สารสกัดจากเมล็ดองุ่น ในความเป็นจริงแล้ววิธีที่จะทำให้ได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพและปริมาณสูงสุดจะต้องมีกระบวนการดังต่อไปนี้ คือ แยกจาก maccrated skin และ เข้าสู่กระบวนการสกัดในทันที แต่ในความเป็นจริงแล้วกระบวนการนี้เป็นไปไม่ได้เลย

ขั้นแรกนั้นเราต้องคำนึงว่าองุ่นที่ใช้ทำไวน์นั้นเป็นพืชผลทางการเกษตรที่ออกเป็นฤดู ดังนั้นเมล็ดและผิวองุ่นปริมาณมากที่แช่น้ำให้เปื่อยยุ่ยอยู่จะต้องทำในเวลาอันรวดเร็ว ( เรียกว่า “Pomace”) ช่วงเวลาจากเดือนสิงหาคมไปจนถึงเดือนพฤษจิกายนทางซีกเหนือของโลกและจากเดือนมกราคมถึงเดือนเมษายนทางตอนใต้ของโลกเป็นช่วงหนึ่งในการทำไวน์เรียกว่า“ Crush ”

กากองุ่นที่คั้นน้ำออกไปแล้วมีความชื้นสูงมากอาจทำให้สูญเสียสารที่ต้องการไปหมด ดังนั้นเมล็ดจึงนำเมล็ดมาสกัดให้เร็วที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ส่วนวิธีการทำให้แห้งนั้นก็ใช้วิธีธรรมดาทั่วไปรวมทั้งการใช้วิธีธรรมชาติ คือ ตากแดดให้แห้ง , ใช้เตาอบ หรือ ใช้เตาทำให้แห้งทั่ว ๆ ไป อีกวิธีในการเก็บรักษาเมล็ดองุ่นให้ยาวนานขึ้นคือการแยกเมล็ดออกมาจากผิวองุ่นที่เปียกจากนั้นนำไปแช่แข็งทันที ที่สำคัญก็คือเมล็ดองุ่นจะต้องถูกเก็บในสภาวะที่ปราศจากโรคที่เกิดจากเชื้อรา ( Mildew ) และไม่เกิดการออกซิเดชันระหว่างการเก็บ วิธีการเก็บรักษาเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องุ่นที่ไม่เหมาะสมจะทำให้เมล็ดองุ่นสูญเสียคุณสมบัติที่ต้องการไป ดังนั้นจึงไม่มีประโยชน์ที่จะนำเมล็ดองุ่นนั้นมาสกัด

ในธรรมชาติพบสาร OPCs ที่เปลือกชั้นนอกของเมล็ดองุ่น สารนี้ทำหน้าที่ปกป้องเมล็ดองุ่นและช่วยในการขยายพันธุ์องุ่น หลังจากเมล็ดร่วงจากต้นสาร OPCs ก็เป็นด่านแรกในการป้องกันเมล็ดองุ่นจากการเกิดปฏิกิริยาแอนติออกซิแดนซ์อันเนื่องมาจาก แสงอาทิตย์ ( แสงอัลตราไวโอเลต ) และ อากาศ ( ออกซิเจน ) ซึ่งสองสิ่งนี้จะไปทำลายเยื่อหุ้มเมล็ดองุ่นและเป็นอันตรายต่อดีเอ็นเอ ในทางเดียวกันมันก็เป็นสาเหตุให้เซลล์เกิดอันตรายได้ในมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตามในขณะที่สาร OPCs ทำหน้าที่ในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันมันจะออกซิไดซ์ตัวมันเอง เมื่อเอาน้ำส่วนเกินออกไปจากเมล็ดองุ่นและป้องกันมันจากปัจจัยที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้แล้ว เมล็ดองุ่นก็จะมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้นในขณะที่ยังคงรักษาประสิทธิภาพของสาร OPCs ไว้ได้

จะพบ OPCs ( Oligomeric Proanthocyanidins ) ใน woody plant แต่จะพบมากในเมล็ดองุ่น ( *Vitis vinifera* ) และ white pine ( *Pinus maritime* , *P. pinaster* ) ที่ขึ้นอยู่ในยุโรปตอนใต้ ในเมล็ดองุ่นอาจมี OPCs มากกว่าในเปลือกสน 7 – 15 % และยังมีประสิทธิภาพมากกว่าอีกด้วย ทำให้ประหยัดในการใช้งาน สาร OPCs นั้นอุดมสมบูรณ์ในพืชเหล่านี้เช่นกัน คือ blackjack oak ( *Quercus marilandica* ) , horse chestnut ( *Aesculus hippocastanum* ), witch hazel ( *Hamamelis Virginiana* ) และ hawthorn ( *Crataegus oxyacantha* ) พอ ๆ กับที่พบในแอปเปิ้ล , berries , ข้าวบาร์เลย์ , bean hulls , ช็อคโกแลต , rose hips และ ข้างฟ่าง

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบสารสกัดเมล็ดองุ่นกับสารสกัดเปลือกสน

| คุณสมบัติ | ก้านองุ่น/เมล็ดสกัด | เปลือกสนสกัด |
|---|---|---|
| % Polyphenols | 92% | 84% |
| % Monomers (flavan-3-ol) | 32% | 38% |
| % Oligomers (Proanthocyanidins) | 68% | 62% |
| Oligomer/Monomer ratio | 2.1 | 1.6 |
| Polyphenol/Monomer ratio | 3.1 | 2.6 |
| Polyphenol/Oligomer ratio | 1.5 | 1.6 |

2.1.6 ประโยชน์ของสารโปรแอนโทรไซยานิดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดจากเมล็ดองุ่นจะมีปริมาณสารโอพีซีสูง ซึ่งจะช่วยเพิ่มความแข็งแรงและต่อต้านความเสื่อมสภาพของหลอดเลือด โดยสารโอพีซีจะมีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถจับตัวได้ดีกับสารที่มีหน้าที่เพิ่มความแข็งแรง และยืดหยุ่นให้เส้นเลือดจำพวกอีลาสติกไฟเบอร์(Elastic fiber) ได้แก่ คอลลาเจน (Collagen)และอีลาสติน (Elastin)ซึ่งจะช่วยให้เลือดมีคุณสมบัติทางชีวเคมีได้ดีขึ้น และเอื้อประโยชน์ต่อการบำบัดรักษาโรคเกี่ยวกับความผิดปกติของเส้นเลือดหลายชนิด เช่น เส้นเลือดฝอยเปราะ การขาดเลือดมาเลี้ยงเส้นเลือดส่วนปลาย เช่น ตามแขนขา ชนิดเรื้อรัง นอกจากนี้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่มีโอพีซีปริมาณสูง ยังมีคุณสมบัติเป็นแอนตี้ออกซิแดนนท์หรือสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก ซึ่งจะช่วยกำจัดอนุมูลอิสระไม่ให้ไปส่งผลต่อกระบวนการเร่งการแก่ก่อนวัย จึงทำให้เมล็ดองุ่นสกัดถูกนำมาประยุกต์ใช้ในวงการเครื่องสำอาง เมล็ดองุ่นสกัดใช้เป็นสารอาหารเสริมสำหรับ

- เส้นเลือดขอด
- เส้นเลือดฝอยเปราะ
- ความผิดปกติที่จอรับภาพในตา(เรตินา) ในผู้ป่วยเบาหวานที่มีการเสื่อมของเส้นประสาทและกล้ามเนื้อถูกตา
- ลดคอเลสเตอรอลในกระแสโลหิต และลดขนาดของคอเลสเตอรอล ที่เกาะอยู่ตามผนังหลอดเลือด
- ต้อกระจก
- การแก่ก่อนวัย

และยังมีรายงานพบอีกว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นช่วยป้องกันและบรรเทาโรคหัวใจและโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือดในสมอง

สารโปรแอนโทรไซยานิดินมีชื่อเสียงในเรื่องการเป็นสาร antioxidant ซึ่งจะต่อต้านอนุมูลอิสระและต่อต้านการเกิดปฏิกิริยา antioxidant จากการศึกษาในหลอดทดลอง OPCs ที่สกัดจากเปลือกสน พบว่าทำให้วิตามินซีมีอายุยาวนานขึ้นร้อยละ40 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าสาร OPCs ที่สกัดจากเปลือกสน สามารถส่งเสริมการทำงาน ของวิตามินอีถึงร้อยละ 15 OPCs ที่สกัดจากเมล็ดองุ่นก็มีคุณสมบัติในการนำกลับมาใช้ใหม่และมีประสิทธิภาพเช่นกัน มีการทำการทดลองในหลอดทดลองในระบบของเยื่อหุ้มเซลล์จำลอง พบว่าสาร OPCs จากเมล็ดองุ่นสามารถส่งเสริมการทำงานของวิตามินอีได้

เมื่อไม่นานมานี้ Debasis Bagchi ,Ph.D. , และ ผู้ร่วมงานที่ Creighton University School of Pharmacy ใน Omaha , Neb. ได้ทำการศึกษากับหนูทดลอง ก็พบเช่นกันว่าสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากเมล็ดองุ่นสามารถปกป้องเนื้อเยื่อจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าสารantioxidant อื่น เช่น วิตามินซี , วิตามินอี หรือ เบต้าแคโรทีน

ในการศึกษาของ bagchi จะใช้หนูในการทดลอง โดยแบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัด OPCs จากเมล็ดองุ่นปริมาณ 25 – 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นทำการ expose ด้วยสาร oxidant และสารที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง ( 12 – o – tetradecanoylphorbol – 13 – acitate ( TPA ) ) ซึ่งสารนี้เป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดแดง , ตับ และ การเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน และทำให้เกิดการขาดของดีเอ็นเอเป็นชิ้น ๆ หนูที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าสามารถป้องกันการเกิดอานุมูลอิสระได้ร้อยละ 70 ในขณะที่หนูที่ได้รับสาร antioxidant ชนิดอื่นสามารถลดการเกิดอานมูลอิสระได้เพียงร้อยละ 15 – 47 เมื่อให้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นกับหนูทดลองจะสามารถป้องกันการขาดเป็นชิ้นของดีเอ็นเอได้ถึงร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับสาร antioxidant ชนิดอื่นที่ป้องกันได้เพียงร้อยละ 10 – 13

เมื่อทำการทดลองในหลอดทดลองผลการทดลองจากการที่เนื้อเยื่อละภายในปากของมนุษย์ที่ถูกทำลาย โดยอนุมูลอิสระที่เกิดจากยาสูบชนิดนี้ไม่มีกว้น พบว่าสาร OPCs ที่สกัดจากเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ในการเป็นสาร antioxidant รุนแรงกว่าวิตามินซีและอีเมื่อทำการเปรียบเทียบกัน

มีการศึกษาโดยนำสาร OPCs ที่สกัดจากเมล็ดองุ่นมาผสมกับ phosphotidylcholine ซึ่งสารที่ได้จะมีลักษณะคล้ายกับ liposome ของพืช จากนั้นนำไปทดลองให้กับคนไข้ 20 คนเพื่อจะดูว่ามีคุณสมบัติการเป็นสาร antioxidant อยู่ในเลือดมากขึ้นหรือไม่ นักวิจัยที่ University of Birmingham Department of Midicine in Great Britain พบว่าเมื่อให้สาร OPCs ปริมาณ 300 มิลลิกรัมกับคนไข้จะแสดงคุณสมบัติการเป็นสาร antioxidant สูงสุด ในเลือดหลัง 30 นาทีจากการให้สารนั้น ต่อมาหลังจากเวลาผ่านไป 2 – 3 ชั่วโมงพบว่ายังคงมีคุณสมบัติการเป็นสาร antioxidant อยู่ แต่เมื่อผ่านไป 5 วันหลังจากการให้สาร OPCs พบว่าไม่เหลือคุณสมบัติการเป็นสาร antioxidant อยู่แล้ว ดังนั้นจึงควรพยายามที่จะให้สาร OPCs ทุกวันเพื่อให้ผลของการเป็น antioxidant ยังคงเอยู่ในเลือดของผู้ป่วย

<u>สาร OPCs มีฤทธิ์ในการยับยั้งโรค Atherosclerosis ( โรคหลอดเลือดแข็งตัวและ ตีบ-ตัน )</u>

ปัจจุบันเราทราบแน่ชัดแล้วว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันมีบทบาทในการเกิดการแข็งตัว ของเส้นโลหิตแดง ( atherosclerosis ) ได้อย่างไร กล่าวคือ LDL ( low density lipoproteins ) ที่ถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



ออกซิไดซ์แล้วนั้น มันจะไปทำอันตรายต่อเซลล์ที่เป็นผนังของหลอดเลือด โดยกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ , กล้ามเนื้อเรียบเกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์และจับกันเป็นก้อน ซึ่งเล่านี้ล้วนเป็นสาเหตุของการเกิดโรค athcrosclerosis ทั้งสิ้น

สารโปรแอนโทรไซยานิดินเป็นความหวังในการรักษาโรคนี้ ได้มีการทำการทดลองในหลอดทดลองพบว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นซึ่งมีสารO PCs ร้อยละ 50 และมีกรด phenolic อีกร้อยละ 50 สามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยา oxidation ใน LDL ของหมูได้ นอกจากนี้สาร OPCs ยังสามารถป้องกันการเกิดโรค antherosclerosis ได้อีกวิธี เช่น มีรายงานการศึกษา 2 รายงานกล่าวว่าสารสกัดจากเปลือกสนทำให้เกิดการปลดปล่อยพวก nitric oxide ออกไป ผลก็คือทำให้หลอดเลือดเกิดการขยายตัว

นักวิจัยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของการใช้สาร OPCs จากสารสกัดเปลือกสนกับแอสไพริน เพื่อดูการยับยั้งการตกตะกอนของเกล็ดเลือดในผู้ที่สูบบุหรี่ 3 กลุ่ม ผลการศึกษาพบว่าใช้สารสกัดจากเปลือกสนปริมาณ 100 – 125 มิลลิกรัม จะให้ผลเท่ากับใช้แอสไพรินถึง 500 มิลลิกรัม ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากแอสไพรินจะต้องใช้เวลามากในการให้ผล ดังนั้นนักวิจัยจึงสรุปออกมาว่า สารสกัดจากเปลือกสนลดความเสี่ยงจากการเป็นอันตรายเนื่องจากการสูบบุหรี่ได้

จากรายงานการศึกษาต่าง ๆ ได้แสดงให้เห็นว่าสาร OPCs มีความสามารถในการยับยั้งปัจจัยที่ช่วยให้เกิดโรค athcrosclerosis ได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยเมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการทำการทดลองกับกระต่าย โดยนักวิจัยใน soy sauce manufacturing plant ในเมือง NODA ที่ประเทศญี่ปุ่น ในการทดลองแบ่งกระต่ายออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง โดยจะให้อาหารที่ทำให้มี cholesterol ในกระแสเลือดสูงซึ่งเป็นสาเหตุของโรค antherosclerosis ทำให้ระดับ peroxide ในเลือดเพิ่มขึ้น 10 เท่า ( ระดับของ Peroxide จะบอกระดับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ) ส่วนกระต่ายกลุ่มทดลองได้รับอาหารชนิดเดียวกันกับกลุ่มควบคุมแต่มีการเติมสารสกัดจากเมล็ดองุ่นลงไปร้อยละ 0.1 – 1 ของปริมาณอาหาร พบว่าในเลือดของกระต่ายกลุ่มทดลองนี้ก็ยังคงมีระดับ cholesterol สูงอยู่ แต่กลับตรวจไม่พบสารเปอร์ออกไซด์ในกระแสเลือดของกระต่ายกลุ่มนี้เลย ที่น่าประหลาดใจไปกว่านั้นคือไม่พบอาการของโรค athcrosclerosis เลย การทดลองนี้จึงเป็นอีกรายงานที่สนับสนุนประโยชน์ของสารสกัดจากเปลือกสนและเมล็ดองุ่น

ถึงแม้จะมีรายงานการศึกษาออกมาบอกว่าสาร OPCs ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดปัจจัยพื้นฐานที่ทำให้เกิดโรค atherosclerosis ได้ แต่การทดลองเหล่านั้นก็ได้มาจากการทำการทดลองในหลอดทดลองหรือ ในสัตว์ทดลองเท่านั้นไม่ได้ศึกษากับร่างกายมนุษย์จริง ๆ แต่เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
58506

มีการศึกษาโดยใช้ epidermiological ( การศึกษาที่หนังชั้นนอกสุดของมนุษย์ ) ทำให้เราเชื่อได้มากขึ้นว่าสาร OPCs จะมีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์จริง ๆ กรณีที่เห็นได้ชัดเกี่ยวกันประโยชน์ของสาร OPCs ก็ได้แก่ การที่สามารถใช้สาร proanthocyanidins มาอธิบายคำว่า 'French Paradox' ได้ หรือก็คืออธิบายได้ว่าทำไมประชาชนชาวฝรั่งเศสจึงมีอัตราการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจต่ำ ทั้ง ๆ ที่มีการบริโภคอาหารไขมันสูงและไวน์แดง ก่อนอื่นเราต้องทราบว่าไวน์แดงนั้นเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีสาร flavonoid ซึ่งรวมถึงพวก proanthocyanidins ด้วย เนื่องจากในองุ่นแดงที่ใช้หมักไวน์แดงมีสารนี้อยู่ จึงเป็นกรณีศึกษาประโยชน์ของสาร proanthocyanidins ในมนุษย์ที่น่าสนใจ Fulvio Ursini , M.D. จากมหาวิทยาลัย Padova ประเทศอิตาลีได้ทำการศึกษาทดลอง โดยแบ่งอาสาสมัครออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ทั้ง 2 กลุ่มจะได้อาหารที่มีไขมันสูงเหมือนกัน โดยกลุ่มควบคุมจะไม่ให้ไวน์แดง แต่จะให้กลุ่มทดลองดื่มไวน์แดงทุกมื้อของอาหาร ผลการทดลองที่ได้พบว่าหลังจากการรับประทานอาหารอาสาสมัครในกลุ่มทดลองจะมีระดับ plasma peroxide ในร่างกายต่ำลงอย่างมาก

อีกแนวทางหนึ่งที่สาร OPCs สามารถป้องกันอันตรายจากโรค atherosclerosis คือ การป้องกัน ischemic reperfusion injury โรค atherosclerosis นั้นจะทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อนในเส้นเลือดทำให้จำกัดการไหลของเลือดไปสู่หัวใจ ถ้าก้อนดังกล่าวแตก เลือดจะไหลกลับไปสู่เนื้อเยื่อ กระบวนการนี้เป็นผลมาจากอันตรายของอนุมูลอิสระ M. Sato, M.D. ของ University of Connecticut School of Medicine ใน Farmington ได้ทำการศึกษาการหดและขยายตัวของหัวใจเพื่อทำให้เกิดการไหลเวียนของโลหิตในสัตว์ทดลอง เปรียบเทียบกับสัตว์กลุ่มควบคุม สัตว์กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดองุ่น ( 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว ) จะลดการเป็นอันตรายของหัวใจได้ร้อยละ 38 และลดการหลั่งเอนไซม์ creatine kinase ได้ร้อยละ 50 ซึ่งเอนไซม์นี้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการที่เนื้อเยื่อถูกทำลายลง

การป้องกันโรคมะเร็ง

จากการศึกษาในหลอดทดลองสามารถกล่าวได้ว่าสาร OPCs สามารถป้องกันโรคมะเร็งได้ พบว่าสาร OPCs ในพืชพวก berries ตระกูล *Vaccinium* รวมถึงพวก bluberry, lingonberry สามารถยับยั้งการเจริญของเนื้องอกได้ โดยการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่เนื้องอกนั้น ๆ จึงทำให้มันหยุดการเพิ่มจำนวน นอกจากนี้มีการศึกษาในห้องทดลองพบว่าสาร OPCs จากรำข้าวบาร์เลย์สามารถทำให้เซลล์ myeloid leukemia ของมนุษย์กลายเป็นเซลล์ที่เพิ่งเป็นมะเร็งได้ไม่นาน และก็ยังมีการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ ( มะเร็งเต้านม , มะเร็งปอด , มะเร็งกระเพาะอาหาร และ เซลล์ myelogenous leukemia ) มากถึงร้อยละ 70 และยังเป็นประโยชน์ต่อเซลล์ปกติอีกด้วย

เมื่อคนได้รับควันจากใบยาสูบเข้าสู่ร่างกายจะทำให้เกิดสารก่อมะเร็งพวก nitrosamine แต่จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้ระบุได้ว่าสาร OPCs จากเปลือกของ witch hazel ( *Hamamelis virginiana* ) จะป้องกันการเกิด nitrosamines และการเกิด mutation ของดีเอ็นเอ เนื่องมาจากสารนี้ได้อีกด้วย

คนเอเชียนับล้านคนเคี้ยวพืชที่เรียกว่า Betel nut ( หมาก ) ( *Areca catechu* ) ซึ่งพืชชนิดนี้ก็มีสารO PCs เช่นกัน มีการทำการทดลองขนาดเล็ก โดยให้สารsodium nitrate และ L-proline อย่างละ 300 mg ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นสังเคราะห์ nitrosamine กับคน 2 คน หลังจากนั้นตรวจพบว่าในยูรีนของ 2 คนนั้นมีสาร N-nitroso-L-proline อยู่ 14.5 และ 10.9 mg ต่อมาทำการทดลองที่ 2 โดยให้สาร sodium nitrate และ L-proline เช่นเดิม แต่ครั้งนี้จะให้เคี้ยว ¼ ของ betel nut ด้วย จากนั้นจึงนำยูรีนมาตรวจจะไม่พบสาร nitrosamine เลย นักวิจัยจึงคาดว่าสาร OPCs จะมีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคมะเร็ง

<u>ประโยชน์ต่อสุขภาพในด้านอื่น ๆ</u>

สาร proanthocyanidins สามารถต่อต้านไวรัสได้ กล่าวคือมีการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าสาร OPCs จากพืชที่ชื่อ gawthorn ( *Crataegus oxyacantha* ) สามารถฆ่าไวรัสโรคเริม ( HSV-1 ) และ ไวรัสโรคเอดส์ ( HIV ) ได้

การขาดเลือดมาเลี้ยงที่เส้นเลือดส่วนปลายของเส้นเลือดดำและกล้ามเนื้อนั้นเป็นโรคที่เกิดขึ้นได้ และโดยทั่วไปก็มักเกิดขึ้นที่ขา ทำให้ไม่สามารถส่งเลือดกลับไปยังหัวใจได้ จนการเดินกลายเป็นเรื่องที่สร้างความเจ็บปวดให้แก่ร่างกาย และกลายเป็นเรื่องที่ก่อความยากลำบากให้กับผู้ป่วยโรคนี้ มีรายงานการศึกษาของชาวอิตาลีที่แสดงว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นสามารถช่วยบรรเทาอาการข้างต้นได้ ทำการทดลองโดยให้ผู้ป่วยโรคขาดเลือดมาเลี้ยงที่เส้นเลือดส่วนปลายชนิดเรื้อรังจำนวน 24 คนรับสารสกัดจากเมล็ดองุ่น 100 mg ทุกคน ผลการทดลองจะเห็นได้ใน 10 วัน พบว่าคนไข้ร้อยละ 70 เป็นโรคน้ำคาเนื้อ ( edema ) น้อยลงและสารพวก bioflavonoids ชนิดอื่น ๆ มาช่วยแก้ปัญหาของคนโรคนี้เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดดำ ซึ่งสารเหล่านี้จะมีกลไกการทำงานคล้ายกันและอาจมีสาร OPCs เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย

สาร proanthocyanidins สามารถปกป้องร่างกายจากสารพิษได้ กรณีสาร acetaminophen ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญของสาร Tylenol ซึ่ง Tylenol เป็นสารที่เป็นพิษต่อตับอย่างรุนแรง ทุก ๆ ปีในสหรัฐอเมริกาจะมีผู้เข้ารับการรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเป็นพิษของสาร Tylenol จำนวน 75,000 ราย ได้มีการทำการทดลองกับสัตว์ทดลอง โดยให้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต่อมาอีกหนึ่งสัปดาห์จึงให้สาร acetaminophen กับสัตว์ทดลอง การให้สารสกัดเมล็ดองุ่นก่อนให้สาร acetaminophen เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก็เนื่องจากต้องการให้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นไปปกป้องตับจากการถูกทำลายด้วยสาร acetaminophen ดังกล่าว การตรวจดูว่าตับได้รับอันตรายหรือไม่ทำได้โดยการนำเซลล์ตับมาศึกษา และตรวจสอบสุขภาพของสัตว์ทดลอง

สาร proanthocyanidins

นอกจากสาร proanthocyanidins จะป้องกันโรคต่าง ๆ ได้แล้วมันยังมีสรรพคุณทำให้ดูอ่อนกว่าวัยอีกด้วย อันตรายปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นสิ่งที่ทำให้เกิดการแก่ก่อนวัยของผิวหนังมนุษย์ ถ้าเราสามารถป้องกันสาเหตุดังกล่าวได้ ผิวของเราก็จะดูอ่อนเยาว์ได้ยาวนานขึ้น ทางหนึ่งที่จะบรรลุเป้าหมายได้ก็คือการลดอันตรายที่เกิดจากแสงอัลตราไวโอเลต ผลิตภัณฑ์กันแดดถ้าทำงานร่วมกับสาร antioxidant ก็จะสามารถปกป้องผิวจากอันตรายของแสงแดดได้ มีรายงานการศึกษาหนึ่งได้ใช้สาร OPCs จากสารสกัดเมล็ดองุ่นเพียงอย่างเดียวแล้วดูประสิทธิภาพการเป็น antioxidant โดยร่วมกับวิตามินอี โดยสารนี้จะปกป้องกรดไขมันไม่อิ่มตัวจากแสงอัลตราไวโอเลตซึ่งแสงอัลตราไวโอเลตอาจทำให้ไขมันเกิดปฏิกิริยา peroxidation ได้ ในการศึกษาเดียวกันนี้จะให้สาร OPCs จากสารสกัดเมล็ดองุ่นทำงานร่วมกับวิตามินอี เพื่อเปลี่ยนวิตามินอีจากรูปที่ทำงานไม่ได้ให้มาอยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ ดังนั้นสาร OPCs จึงทำหน้าที่เหมือนกับเป็นตัวส่งเสริมการทำงานของวิตามินอี

ส่วนหนึ่งของกระบวนการที่ทำให้แก่คือ การเสื่อมสลายของผิวหนังอันเนื่องมาจากเอนไซม์อีลาสเตส ( elastase ) ซึ่งเอนไซม์นี้จะถูกปล่อยออกมาเมื่อเกิดการอักเสบ สาร OPCs จะมีความจำเพาะในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ ดังนั้นจึงยังคงรักษาความสมบูรณ์ของอีลาสตินไว้ได้

ถ้าสามารถนำผลการทดลองที่ได้จากสัตว์ทดลองมาประยุกต์ใช้กับมนุษย์ได้ เราก็จะพบว่า OPCs สามารถช่วยให้เรามีผมที่หนาขึ้นได้ โดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่นได้ทำการทดลองโกนขนของหนูทดลองออกไป จากนั้นพบว่าขนจะงอกขึ้นใหม่เองร้อยละ 40 ตามธรรมชาติ แต่เมื่อใช้สารละลาย proanthctanidins ร้อยละ 1 ให้ผิวหนังของหนูทดลองได้รับสารนี้เข้าไปพบว่าขนของหนูจะงอกขึ้นมาร้อยละ 70 – 80 จกการทดลองในหลอดทดลองสามารถยืนยันได้ว่าสาร OPCs สามารถกระตุ้น hair keratinocytes ให้ผลิตผมออกมามากกว่าไม่ได้ใช้สาร OPCs ถึง 3 สามเท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ของสาร proanthocyanidins มีมากมายไม่ว่าจะเป็นป้องกันโรค atherosclerosis มะเร็งและป้องกันสารพิษจากสิ่งแวดล้อม ขณะเดียวกันก็ยังช่วยชะลอความแก่ชราได้อีกด้วย นอกจากนี้สาร proanthocyanidins ยังมีรสหวานอีกด้วย พบว่า rhizome ของ Indonisian fern ( *Selliguea feei* ) มีสาร proanthocyanidins selligueain A ซึ่งให้ความหวานถึง 35 เท่าพอ ๆ กับน้ำตาล

เนื่องจากประโยชน์ที่มากมายของสาร OPCs จึงกระตุ้นให้นักวิจัยต้องออกมาแนะนำปริมาณที่ควรได้รับในแต่ละวัน Bagchi ได้ระบุไว้ว่าสำหรับสัตว์ทดลองเราใช้ปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว ซึ่งถ้านำมาปรับใช้ในคนก็จะอยู่ที่ 50 และ 200 มิลลิกรัมสำหรับผู้ใหญ่โดยทั่วไปปริมาณการรับเข้าร่างกายที่เป็นที่ยอมรับจาก Gernam National Food Consumption Survey คือ เฉลี่ย 3.7 มิลลิกรัมต่อวัน Bagchi ระบุว่าไวน์แดง 1 แก้วมีสาร OPCs 45 มิลลิกรัม ในขณะที่ไวน์ขาวมีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

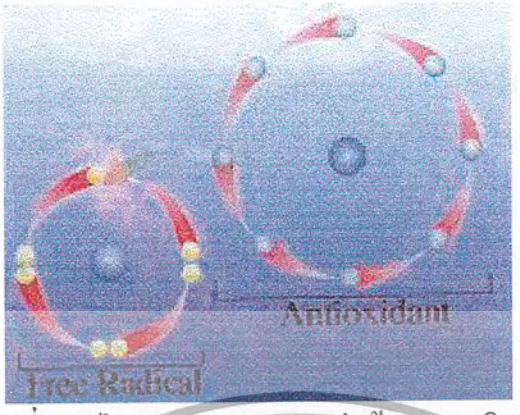
2.1.7 กลไกการต่อต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจัยต่างๆ มากมายที่ก่อให้เกิดความเสื่อมของเซลล์ หรืออวัยวะ นอกจากจะเกิดจากคำสั่งของยีนส์ (Gene) บนโครโมโซมของเราแล้วสารตกค้างที่อยู่ในเซลล์ที่เรียกว่า "สารอนุมูลอิสระ" (Free Radicals) ก็ถือเป็นปัจจัยที่สำคัญเช่นกัน

รูปที่ 4 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free Radicals) นี้ถ้าอธิบายง่าย แบบวิทยาศาสตร์ก็คือ โมเลกุลของสารใด ๆ ก็ตามที่ล่องลอยอยู่ ในเซลล์ของเรา โดยโมเลกุลเหล่านี้มีที่มาได้มากมาย ไม่ว่าจะมาจากการที่ร่างกายตั้งใจรับเข้ามาเพื่อเอามาใช้ประโยชน์ เช่น พวกออกซิเจน แต่ออกซิเจนที่จะกลายเป็นอนุมูลอิสระก็จะเป็นโมเลกุลออกซิเจนที่เหลือจากการใช้ประโยชน์ของเซลล์ต่างๆ แล้ว ส่วนพวกที่ร่างกายไม่ได้ตั้งใจนำมันเข้ามา แต่เข้ามาพร้อมอาหาร หรือการหายใจปกติ ก็ได้แก่ พวกโลหะหนัก ตะกั่ว ปรอท ฯลฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 5 กลไกการทำงานของสารต่อต้านอนุมูลอิสระ

โมเลกุลของสารเหล่านี้เมื่อล่องลอยอยู่ในร่างกายนานๆ ก็จะมีการชนกันกับโมเลกุลของสารต่างๆ ที่มีอยู่มากมายในเซลล์ ทำให้เกิดการหลุดออกของอิเล็กตรอน (Electron) จากโมเลกุลของมัน เอง ทำให้โมเลกุลของสารดังกล่าวเกิดประจุไฟฟ้าขึ้น และมีสถานะที่พร้อมจะทำปฏิกิริยากับ โมเลกุลของสารใด ๆ ก็ตามที่อยู่ในเซลล์ได้ตลอดเวลา ถ้าอนุมูลอิสระดังกล่าวนี้ไปทำปฏิกิริยา กับไลโปโปรตีน (Lipoprotein) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell Membrane) ก็จะส่ง ผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการฉีกขาดมีการไหลของสารต่าง ๆ ออกนอกเซลล์ เซลล์นั้นก็จะตาย หรือ โดนทำลายไป

รูปที่ 6 ปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ

ถ้าเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวนี้ที่เซลล์บริเวณเดียวกันหลาย ๆ เซลล์ ก็จะส่งผล ให้เกิดการเสื่อมของอวัยวะที่เซลล์เหล่านั้นอยู่นั่นเอง นอกจากอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยาได้กับ เยื่อหุ้มเซลล์แล้ว ถ้าหากไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของอาร์เอ็นเอ (RNA) ในนิวเคลียส (Nucieus) ของเซลล์ก็อาจทำให้เกิดความผิดปกติในขบวนการแบ่งตัวและเจริญเติบโตของ เซลล์ ก่อให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาวะมะเร็ง (Cancer) ที่อวัยวะต่าง ๆ ได้เช่นกัน และถ้าหากอนุมูลอิสระ ดังกล่าวทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของไลปิดเปอร์ออกไซด์ (Lipidperoxide) หรือไลโปฟุสชิน (Lipofuchin) ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เกิดฝ้าหรือกระแก่ ดังนั้น จึงไม่แปลกใจเลยที่เราพบว่า เมื่อ มนุษย์มีอายุมากขึ้นเรามักจะพบความผิดปกติของอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายอันเป็นผลสืบ เนื่องจากความเสื่อมของเซลล์และอวัยวะต่าง ๆ ดังกล่าวนั้นนั่นเอง

**2.2 การสกัดสาร**

2.2.1 หลักการสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นวิธีการแยกสารทางพื้นฐาน เพื่อจะนำไปสู่ความเข้าใจการแยกสารทางเทคนิคโครมาโตกราฟี ( chromatography ) เพราะอาศัยหลักเดียวกันคือการกระจาย ( distribution ) ของตัวถูกละลายในระหว่างวัฏภาค 2 วัฏภาค ( phase ) ของตัวทำละลายที่ไม่ละลายซึ่งกันและกัน

ถ้านำตัวถูกละลายมาเขย่าในตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่ละลายซึ่งกันและกัน ตัวถูกละลายจะละลายในตัวทำละลายทั้งสองชนิดมากน้อยต่างกัน ขึ้นอยู่กับการละลายในตัวทำละลายนั้น เมื่อปล่อยทิ้งไว้จนเกิดภาวะสมดุลตัวทำละลายทั้งสองจะแยกเป็นสองชั้น เมื่อนำชั้นของตัวละลายทั้งสองมาหาความเข้มข้นของตัวถูกละลาย จะพบว่าไม่ว่าปริมาณเริ่มแรกของตัวถูกละลายจะเป็นเท่าไรก็ตาม อัตราส่วนของความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลายทั้งสองชนิดนั้นจะมีค่าคงที่เสมอถ้าอุณหภูมิในการทดลองคงที่ตลอด

สารอินทรีย์ที่เป็นของเหลว ส่วนมากจะไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำ เมื่อสารอินทรีย์ที่เป็นของเหลวถูกเติมลงไปในน้ำจะเกิดการแยกเป็นสองชั้น ส่วนสารอินทรีย์ที่เป็นของเหลวอาจจะอยู่ตอนบนหรือตอนล่างของน้ำขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของสารอินทรีย์ที่เป็นของเหลวว่าจะมีค่ามากกว่าหรือน้อยกว่าความหนาแน่นของน้ำ

สมมติว่า สารละลายมีตัวถูกละลาย A และ B ละลายอยู่ นำไปเขย่ากับสารอินทรีย์ที่เป็นของเหลวซึ่งไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย จากนั้นตั้งของผสมดังกล่าวให้นิ่งจนกระทั่งตัวทำละลายสองชนิดแยกออกเป็นสองชั้น ถ้าสารละลายอินทีย์มีความสามารถที่จะละลายตัวถูกละลายตัวหนึ่งได้มากกว่าน้ำ แสดงว่าตัวถูกละลายจะผ่านจากวัฏภาคของน้ำมากกว่า ไปยังวัฏภาคของสารอินทรีย์ เรากล่าวว่า ตัวถูกละลายถูกสกัด ส่วนตัวถูกละลายจะผ่านจากวัฏภาคของน้ำไปยังวัฏภาคของสารอินทรีย์ เรากล่าวว่า ตัวถูกละลายไม่ถูกสกัด การสกัดสารด้วยตัวทำละลายจะทำในกรวยแยก ( separatory funnel or separating funnel ) ของเหลวที่อยู่ตอนล่างของกรวยแยกสามารถไขออกมาได้ จากนั้นตัวถูกละลายสองชนิด A และ B ก็จะนำมาแยกทางกายภาพต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารอินทรีย์ที่เป็นของเหลวที่นำมาใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับการสกัดนั้น ควรจะมีคุณสมบัติดังนี้

1. ควรจะละลายสาร ที่ต้องการสกัดได้ดี คือมีค่า Partition coefficient หรือ Distribution ratio หรือ Distribution coefficient สูง
2. ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายของของผสมที่จะสกัด
3. ไม่ควรละลายสิ่งเจือปน หรือสารที่ไม่ต้องการ
4. ควรจะแยกจากสารที่สกัดได้ง่าย ภายหลังสกัดแล้ว
5. ควรเป็นตัวทำละลายที่มีราคาถูก

สารอินทรีย์ที่เป็นของเหลวที่นำมาใช้เป็นตัวทำละลายที่รู้จักกันดี ได้แก่ คลอโรฟอร์ม ( $CHCl_2$) มีความถ่วงจำเพาะ 1.49 เป็นตัวทำละลายที่หนักกว่าน้ำ ใช้อย่างกว้างขวางสำหรับสกัดสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบเชิงซ้อน ( metal co-ordination complexs ) จากสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายได้ดีกว่า คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ( $CCl_2$ ) สำหรับเบนซิน ( Benzene , $C_6H_6$ ) มีความถ่วงจำเพาะ 0.88 และ เอธิล อีเทอร์ ( $C_2H_5OC_2H_5$ ) มีความถ่วงจำเพาะ 0.71 ใช้เป็นตัวทำละลายสกัดที่เบากว่าน้ำแล ไตรบิวธิล ฟอสเฟต ( $(C_4H_9)_3PO_4$ ) ความถ่วงจำเพาะ 0.98 มีความหนาแน่นใกล้เคียงกับน้ำ จึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง ( extensively ) โดยเฉพาะสกัดพวก metal association complexes ได้ดีกว่าตัวทำละลายอื่น ๆ และบางครั้งอาจจะนำ $(C_4H_9)_3PO_4$ ผสมกับ $C_6H_6$ หรือ ketone เพื่อทำเป็นตัวทำละลายสำหรับสกัดสารและช่วยเพิ่ม selectivity สำหรับการสกัด

เมื่อตัวถูกละลายละลายในตัวทำละลายเช่นน้ำ นำมาเขย่ากับตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ละลายซึ่งกันและกัน ก็จะเกิดการแข่งขัน ( competition ) ระหว่างตัวทำละลายทั้งสองสำหรับตัวถูกละลายที่เราต้องการจะทราบว่า ตัวถูกละลายจะไปอยู่ในวัฏภาคใดมากกว่าก็อาศัยหลัก " like dissolved like " นั่นเอง

2.2.2 การสกัดด้วยน้ำและเอธิลแอลกอฮอล์

วิธีการสกัดในอุตสาหกรรมที่ผลิตสารสกัดจากเมล็ดองุ่นส่วนใหญ่ จะใช้อุณหภูมิสูงและใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษสูง กระบวนการเช่นนี้จะไปลดประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นได้ 3 ทาง คือ

1. การใช้ความร้อนในกระบวนการสกัดเป็นสาเหตุให้เกิดการ Deactivate ของ Polymerization และ Crosslinkagds ในโมเลกุลของ Triphenol ซึ่งเป็น Polyphenol รูปที่ปรากฏในธรรมชาติ ทำให้คุณสมบัติในการเป็น Antioxidant ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิธีการสกัดดังกล่าวจะไปทำให้ไดเมอร์และไตรเมอร์ ( 2 หน่วยโครงสร้างของ Diphenol ต่อ 1 โมเลกุล ) เกิดการรวมตัวกันส่งผลให้ไปลดคุณสมบัติในการเป็น Antioxidant

1. ปริมารตัวทำละลายเพียงเล็กน้อยที่เหลือตกค้างมาจากการสกัดในการผลิตขั้นสุดท้าย จะไปลดคุณสมบัติการเป็น Antioxidant และถ้าเข้าไปในร่างกายมนุษย์ก็จะทำให้เกิดความยุ่งเหยิงของระบบ Metabolism ทั่ว ๆ ไปได้

วิธีการสกัดสารจากเมล็ดองุ่นด้วยวิธีการใช้น้ำสกัดที่อุณหภูมิต่ำ ไม่มีตัวทำละลายที่เป็นอันตรายและไม่มีการใส่สีลงไป การใช้ความสามารถในการละลายน้ำของสารมาใช้นั้นเป็นการใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติทางชีวภาพของสารนั่นเอง การใช้น้ำเป็นตัวสกัดนี้ทำให้ง่านต่อการที่สารจะซึมเข้ากระแสเลือดและมันยังแสดงให้เห็นถึงการ Cross The Blood-brain Barrier ดังนั้นมันจึงพิสูจน์ได้ว่ามันสามารถที่จะช่วยปกป้องสมอง , ระบบเส้นเลือดของสมองและมันยังเข้าไปถึงเรื่องระบบประสาทส่วนกลางได้อีกด้วย

**2.3 โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง**

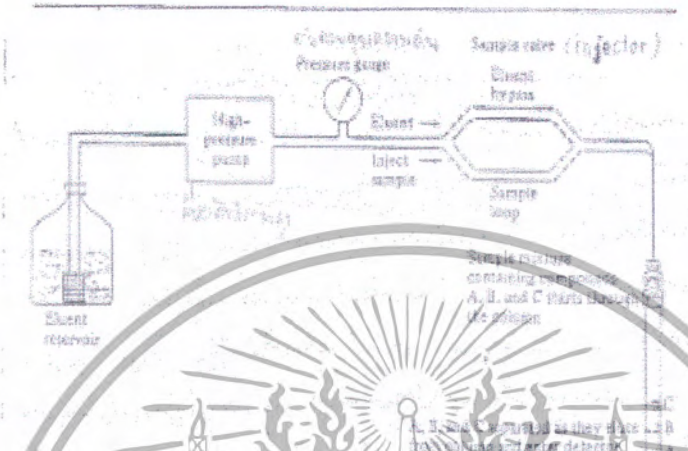
**( High Performance Liquid Chromatography , HPLC )**

HPLC ได้มีการพัฒนามาจากระบบโครมาโทกราฟีของเหลวแบบธรรมดาให้มีประสิทธิภาพในการแยกสารผสมออกจากกันให้เร็วขึ้นเหมือนกับเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี โดยการใช้ลูกสูบ (pump) คุณภาพสูงอัดเฟสที่เคลื่อนที่ด้วยความดันสูง เพื่อช่วยให้ของเหลวไหลเร็วขึ้น และได้ใช้ขนาดเฟสที่อยู่กับที่ให้มีขนาดเล็กลงสำหรับบรรจุลงในคอลัมน์ เพื่อให้พื้นที่ผิวสัมผัสของเฟสที่อยู่กับที่ เกิดแรงกระทำต่อสารผสมที่ต้องการแยกให้มากขึ้น ภายใต้ภาวะดังกล่าวทำให้โครมาโทกราฟีของเหลวมีสมรรถนะสูง จึงเรียกว่าโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) หรือบางทีเรียกว่า โครมาโทกราฟีของเหลวแบบความดันสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงจัดเป็นเทคนิคการแยกและวิเคราะห์สารที่อาศัยหลักการเดียวกับแก๊สโครมาโทกราฟี เพียงแต่ต่างกันที่เฟสที่เคลื่อนที่ โดย HPLC นั้นใช้เฟสที่เคลื่อนที่เป็นของเหลว

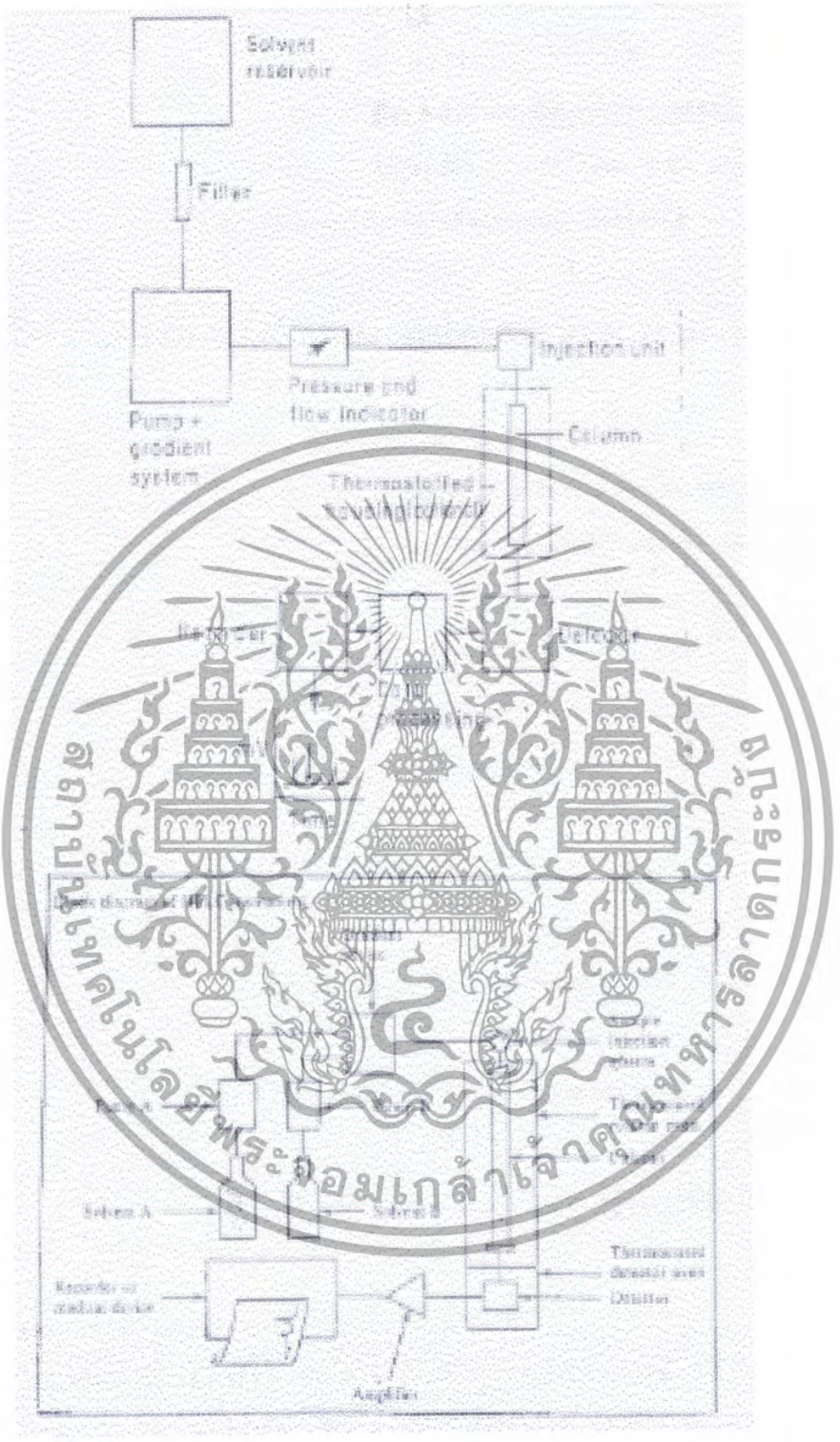
ในการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค HPLC เฟสที่เคลื่อนที่ (เฟสของเหลว) จะถูกอัดด้วยลูกสูบคุณภาพสูงเข้าสู่คอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 1-5 ลบ.ซม.ต่อนาที ถ้าองค์ประกอบของเฟสที่เคลื่อนที่มีเพียงองค์ประกอบเดียวและคงที่ จะเรียวขบวนการนี้ว่า ไอโซคราติก อีลูชัน (isocratic elution) ในทางกลับกันถ้าองค์ประกอบของเฟสที่เคลื่อนที่มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบขณะที่แยกสาร จะเรียกขบวนการนี้ว่า เกรเดียนต์ อีลูชัน (gradient elution)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**เครื่องมือพื้นฐานของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง**




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 7 เครื่องมือพื้นฐานของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

เครื่องมือ HPLC โดยทั่ว ๆ ไปมีส่วนประกอบดังนี้

1. ภาชนะใส่เฟสที่เคลื่อนที่ (solvent reservoir)
2. ปั๊มที่มีความดันสูง (high-pressure pumb) ใช้สำหรับอัดของเหลวที่เป็นเฟสที่เคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ด้วยความดันสูง พร้อมกับอุปกรณ์วัดความดัน (pressure gauge) เพื่อวัดความดันของปั๊มก่อนเข้าสู่คอลัมน์
3. บริเวณที่ฉีดสารตัวอย่าง (sample injection system)
4. คอลัมน์สำหรับแยกสาร (column)
5. ตัววัดสัญญาณ (detector)
6. เครื่องบันทึกข้อมูล (recorder)

ส่วนประกอบต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นพอจะกล่าวรายละเอียดได้ดังนี้

ภาชนะใส่เฟสที่เคลื่อนที่ (The Mobile Phase Reservoir)

ในเทคนิค HPLC นั้นเฟสที่เคลื่อนที่อาจจะเป็นของผสมระหว่างตัวทำละลายกับสารละลาย (an aqueous-organic mixture) หรือเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution) หรือของผสมระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ (a mixture of organic solvents) ขึ้นอยู่กับที่ว่าจะใช้ตัววัดสัญญาณเป็นชนิดใด

โดยทั่ว ๆ ไปภาชนะที่ใส่เฟสที่เคลื่อนที่จะทำด้วยแก้ว หรือโลหะสเตนเลส (stainless steel) และมีขนาด 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร จะมีท่อเล็ก ๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1/8 นิ้วที่ต่อจากภาชนะใส่เฟสที่เคลื่อนที่เพื่อนำของเหลวเข้าสู่ตัวปั๊ม ของเหลวแขวนลอยต่าง ๆ ออกเสียก่อน เพราะว่าอนุภาคแขวนลอยต่าง ๆ จะทำให้เกิดการแทรกสอดการทำงานของตัวปั๊ม และอาจทำลายลิ้นปิด-เปิด (valve) ของตัวปั๊มได้ และแก๊สออกซิเจนและแก๊สไนโตรเจน ถ้าไม่กำจัดทิ้งจะทำให้เกิดฟองแก๊สภายในคอลัมน์ หรืออาจจะเข้าไปรบกวนตัววัดสัญญาณหรือไปทำให้การทำงานของปั๊มเสียไป หรือไปทำปฏิกิริยากับเฟสที่เคลื่อนที่ ดังนั้นจึงต้องกำจัดแก๊สที่ละลายอยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่ก่อนด้วยระบบทำลายแก๊ส (degassing system) การทำลายแก๊สอาจทำได้โดยการเก็บเฟสที่เคลื่อนที่ไว้ภายใต้สุญญากาศ หรือโดยการให้ความร้อนและคนเฟสที่เคลื่อนที่ด้วยระบบอุลตราโซนิก (Ultrasomic stirring) หรืออาจจะผ่านแก๊สฮีเลียมอย่างช้า ๆ และต่อเนื่อง

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้มีเกรดอยู่หลาย ๆ ชนิดซึ่งจะมีสิ่งเจือปนรวมถึงสารที่เติมลงในตัวทำละลาย เช่น แอนติออกซิไดส์ (antioxidants) และ stavilizer ต่าง ๆ ดังนั้นควรจะใช้ตัวทำละลายสำหรับ HPLC (HPLC grade) ตัวทำละลายเหล่านี้มีความบริสุทธิ์สูง สำหรับน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถูกใช้เป็นองค์ประกอบของเฟสที่เคลื่อนที่ของ HPLC อีกด้วย จึงควรใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากสารอินทรีย์และแบคทีเรียต่าง ๆ เนื่องจากว่าสารอินทรีย์ในน้ำกลั่นจะมีผลต่อเฟสผันกลับ (reverse phase mode) เพราะเฟสที่อยู่กับที่ชนิดไม่มีขั้วจะจับสารอินทรีย์ในน้ำกลั่นได้ และจะให้พีกออกปนมากับพีกของสาร ดังนั้นน้ำกลั่นที่จะนำมาใช้จึงควรทำให้บริสุทธิ์สูง เช่น กลั่นน้ำจากสารละลายเปอร์แมงกาเนต หรือผ่านโมเลกุลาซีฟและผ่านผงถ่าน (carbon filtersa) (รายละเอียดของเฟสที่เคลื่อนที่จะได้กล่าวอีกหนหนึ่งในตอนหลัง)

<u>ความดัน อัตราการไหล และอุณหภูมิ</u> (Pressure, Flow and Temperature)

ความดันที่ใช้อัดเฟสที่เคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ในเทคนิค HPLC นั้นจะใช้ได้ถึง 200 เท่าของความดับบรรยากาศ หน่วยเอสไอนั้น ความดันจะมีหน่วยเป็นพาสคัล (pascal, Pa) โดยกำหนดว่า 1 Pa = 1 นิตตันต่อตารางเมตร ($Na^{-2}$) ความดันบรรยากาศปกติจะมีค่าประมาณ $10^5$ Pa โดยทั่ว ๆ ไปความดันอาจจะบอกในหน่วย กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ($kg\ cm^{-2}$) , บาร์ (bar) หรือปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) โดยกำหนดว่า 1 บาร์ = $10^5$ Pa การเปลี่ยนหน่วยระหว่างหน่วยบาร์ และหน่วยปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยจะต้องทราบว่า

1 ปอนด์ = 0.4536

1 นิ้ว = 2.54 ซม

1 กรัม = 9.81 เมตรต่อ (วินาที)$^2$

1 psi = แรงขนาด 0.4536 x 9.81 นิวตันต่อพื้นที่ $(0.0254)^2$ ตารางเมตร

= 0.4536 x 9.81 / $(0.0254)^2$ = 6897 Pa

1 บาร์ = $10^5$/6897 = 14.5 spi และจะได้

1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร = 0.981 บาร์ = 14.2 psi

ความดันภายในคอลัมน์ที่ได้กล่าวไว้ตอนต้นคือประมาณ 200 บาร์ ดังนั้นงานวิเคราะห์ที่ใช้ในเทคนิค HPLC จะใช้ความดันอยู่ระหว่าง 25 และ 100 บาร์ ความดันที่จะใช้ขึ้นอยู่กับความยาวของคอลัมน์ ขนาดของเฟสที่อยู่กับที่ ความหนืดและอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ เนื่องจากว่าของเหลวไม่ถูกอัดได้มากนัก จึงทำให้ไม่มีพลังงานสะสมไว้ในของเหลว เมื่อให้ความดันมาก ๆ ต่อของเหลว ดังนั้นความดันที่ใช้ HPLC จึงไม่ค่อยจะอันตรายมากนัก แต่จะต้องระมัดระวังมากเกี่ยวกับการบรรจุคอลัมน์เมื่อใช้ความดันสูง ความดันระหว่าง 25 และ 100 บาร์จะพอดีกับอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ประมาณ 1-5 $cm^3$/min ตลอดคอลัมน์

เครื่อง HPLC ที่นำมาขายในท้องตลาดจะมีเตาสำหรับควบคุมอุณหภูมิให้คงที่โดยมีความคลาดเคลื่อน +1 °C ในช่วงอุณหภูมิห้องจนถึงอุณหภูมิ 100 °C เนื่องจากว่าตัวทำละลายที่ใช้นั้นจะไวไฟ (flammable solvents) จึงต้องคำนึงถึงความปลอดภัยในการใช้เครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นเตาที่ใช้จึงออกแบบให้มีแก๊สไนโตรเจนพ่นอยู่รอบๆเตา และยังออกแบบการป้องกันไม่ให้เกิดการรั่วของไอของตัวทำละลาย ถ้าการควบคุมอุณหภูมิได้ถูกนำมาใช้จะทำให้มีการทิ้งสารตัวอย่างและเฟสที่เคลื่อนที่อยู่ ณ อุณหภูมิที่ถูกต้องก่อนที่จะถูกผ่านเข้าสู่คอลัมน์ และเฟสที่เคลื่อนที่จะถูกผ่านไปยังท่อที่ถูกให้ความร้อนก่อนที่จะเข้าสู่บริเวณที่ฉีดสารตัวอย่าง

การควบคุมอุณหภูมิจัดว่าสำคัญมากสำหรับการวัดความถูกต้องของข้อมูล การลงไว้ (retention data) การเพิ่มอุณหภูมิเป็นการเพิ่มอุณหภูมิเป็นการเพิ่มอัตราการแยกโดยเฉพาะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของคอลัมน์

อัตราการไหลของตัวทำลายนั้นอาจควบคุมโดยการเพิ่มความยาวคอลัมน์หรือลดขนาดของเฟสที่อยู่กับที่หรือเพิ่มความดันก็ได้ ผลของอัตราการไหลและเวลาที่ใช้ในการแยกสารดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลของอัตราการไหลและความดันที่มีต่อเวลาการแยกสาร

| อัตราการไหลแยกสาร (ลบ.ซม./ชั่วโมง) | ความดัน (psi) | เวลาที่ใช้ในการแยก (นาที) |
|---|---|---|
| 5 | 550 | 37.6 |
| 10 | 950 | 18.9 |
| 15 | 1500 | 12.1 |
| 20 | 2000 | 9.0 |
| 25 | 2500 | 7.3 |
| 30 | 3400 | 5.9 |
| 35 | 4300 | 5.1 |
| 40 | 4800 | 4.6 |

<u>เครื่องปั๊มที่มีความดันสูง</u> (Pumps)

ปั๊มจะทำหน้าที่ปั๊มเฟสที่เคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ด้วยความดันที่เหมาะสมประมาณ 4,000 -6,000 psi จะทำให้อัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่เท่ากับ 3 ลบ.ซม.ต่อวินาที การพัฒนาระบบปั๊มที่มีประสิทธิภาพเป็นฟคเตอร์ที่สำคัญมากต่อการพัฒนาระบบ HPLC ดังนั้นปั๊มที่จะนำมาใช้นั้น จึงควรมีคุณสมบัติดังนี้ :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. ให้ความดันสูง

ข. เฉื่อยต่อสารเคมี

ค. การไหลของตัวทำละลายจะไม่ทำให้เกิดพัสส์ (non-pulsing)

ง. มีความจุความดันสูง (high pressure capacity) เพื่อจะให้เกิดการแยกได้อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพและมีการแยกออกที่ดีขึ้น (high resolution)

จ. ช่วงอัตราการไหล (range of flow rate) ควรเปลี่ยนแปลงได้และจะต้องง่ายต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลด้วย

ฉ. ปั๊มควรจะมีลักษณะง่ายต่อการรื้อได้เพื่อสะดวกต่อการซ่อมแซม (The pump should be easy to dismantle and repair)

ระบบปั๊ม (Pumping System) ที่ใช้ในเครื่อง HPLC มีด้วยกัน 2 ระบบคือ

1. ปั๊มชนิดความดันคงที่ (Constant Pressure Pumps)
2. ปั๊มชนิดอัตราการไหลคงที่ (Constant Flow Pumps)

<u>ปั๊มชนิดความดันคงที่</u> (Constant Pressure Pumps)

ระบบปั๊มชนิดนี้จะอาศัยแก๊สจากถังบรรจุแก๊ส (gas supply) เพื่อช่วยให้มีความดัน ดันไดอะแฟรมหรือตัวถ่ายโอนมวล (diaphragms or mass transfer inhibitor) หรือลูกสูบ เพื่อดันเฟสที่เคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ ตัวไดอะแฟรมหรือตัวถ่ายโอนมวลจะป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่ของแก๊สภายในของเหลว จึงจะเห็นว่าระบบปั๊มชนิดความดันคงที่จะต้องใช้ความดันสูงจากถังบรรจุแก๊ส ความดันที่ใช้จะประมาณ 1000 psi หรือต่ำกว่า

เมื่อนำระบบปั๊มชนิดความดันคงที่มาใช้ ในระบบจะต้องให้แก๊สละลายในตัวทำละลายน้อยที่สุด เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศ จะทำให้เกิดการรบกวนต่อระบบตรวจวัดสัญญาณ การเกิดฟองอากาศ เกิดเนื่องมาจากการละลายของแก๊สเมื่อความดันลดลงตรงด้านทางออกของคอลัมน์ (outlet of the column)

ปั๊มชนิดความดันคงที่ที่ใช้กันอยู่ในเครื่อง HPLC ได้แก่ pneumatic amplifier pump หลักการทำงานของ Pneumatic amplifier pump : ให้ความดันอากาศประมาณ 10 บาร์ (150 psi) กับลูกสูบแก๊ส (gas piston) ที่มีพื้นที่ผิวมากลูกสูแก๊สจะต่ออยู่กับสูบสูบไฮดรอลิก (hydraulic piston) ที่มีพื้นที่ผิวน้อยกว่า ดังนั้น

ความดันที่ดันของเหลว = (ความดันของแก๊ส) (พื้นที่ผิวของลูกสูบแก๊ส/พื้นที่ผิวของลูกสูบไฮดรอลิก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้าความดันเข้าเท่ากับ 10 บาร์ และอัตราส่วนของพื้นที่ผิวเป็น 50:1 จะทำให้ความดันตรงลูกสูบ ไฮดรอลิกมีค่าเท่ากับ 500 บาร์ หรือ 7500 psi จะเห็นว่าความดันของแก๊ส 10 บาร์ จะทำให้ความดันของเฟสที่เคลื่อนที่เท่ากับ 500 บาร์

เมื่อเกิดจังหวะดันเข้าของลูกสูบเกิดขึ้น (drive stroke) จะทำลิ้น (valve) ด้านทางออกของปั๊มเปิดออก และเฟสที่เคลื่อนที่จะถูกดันเข้าสู่คอลัมน์และลิ้นด้านทางเข้าของปั๊มจะถูกปิดจากทางด้านที่ติดอยู่กับภาชนะใส่เฟสที่เคลื่อนที่ (mobile phase reservoir) จากนั้นจะเกิดจังหวะดันออกของลูกสูบ (return stroke) ลิ้นด้านทางออกของปั๊มจะปิดและลิ้นด้านทางเข้าของปั๊มจะเปิดออกและเฟสที่เคลื่อนที่จะเข้าสู่ตัวปั๊ม ระบบปั๊มทั้งหมดจะถูกควบคุมด้วยลิ้นปิดเปิดที่ต่ออยู่ระหว่างตัวควบคุม (regulator) กับตัวปั๊ม

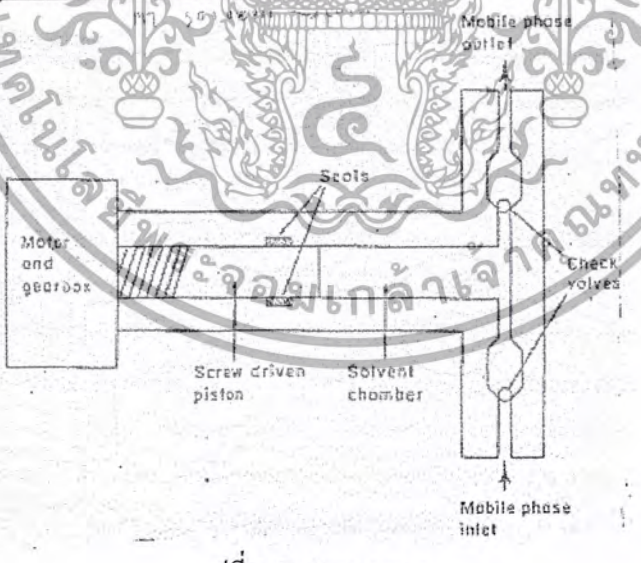
Pneumatic amplifier pumps มีราคาถูก เมื่อเสียหรือชำรุดแล้วยากต่อการซ่อมแซม ขณะที่ปั๊มทำงานจะมีเสียงรบกวน (noisy in operation) เนื่องจากว่าปั๊มชนิดนี้มีอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ไม่คงที่จึง ไม่ค่อยถูกนำมาใช้มากนักในเครื่อง HPLC

ปั๊มชนิดอัตราการไหลคงที่ (Constant Flow Pumps)

ปั๊มชนิดอัตราการไหลคงที่ที่ถูกนำมาใช้ในเครื่อง HPLC จะมีด้วยกัน 2 ชนิด ดังนี้

- Syring type pump
- Reciprocating pump

Syringe type pump หรือ Motor-driven syring pump



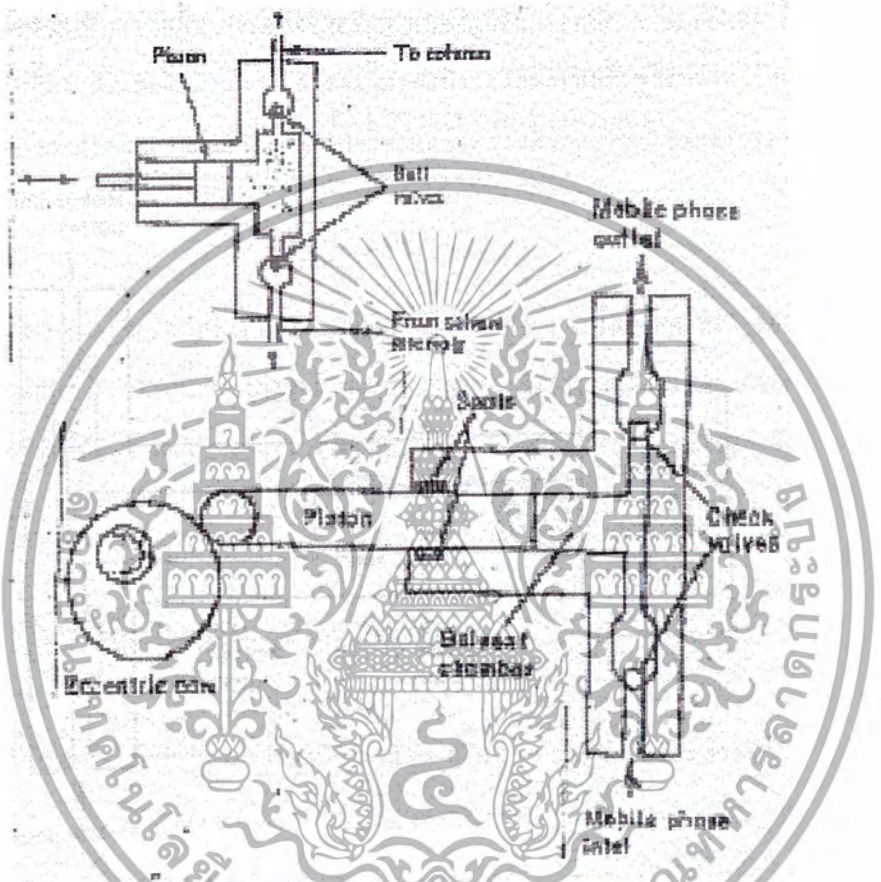

รูปที่ 8 *Syringe pump*

ปั๊มชนิดนี้ประกอบด้วยแชมเบอร์ (chamber) ขนาดความจุ 200-500 ลบ.ซม. ที่มีมอเตอร์อยู่จะค่อย ๆ ดันลูกสูบด้วยอัตราเร็วคงที่ การไหลจะไม่มีพัลส์ (pulseless) และความเร็วที่ให้กับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มอเตอร์สามารถเปลี่ยนแปลงได้ สำหรับความจุของเฟสที่เคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์จะขึ้นอยู่กับขนาดของแชมเบอร์

Reciprocating pump




รูปที่ 9 Reciprocating pump

ปั๊มชนิดนี้ลูกสูบจุถูกดันเข้า และดันออกจากแชมเบอร์ด้วยเกียร์ (eccentric cam or gear) เมื่อดันลูกสูบ เข้าลิ้นตรงทางด้านเข้าของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase inlet) จะปิดและลิ้นตรงทางด้านทางออก (outlet) จะเปิด ทำให้เฟสที่เคลื่อนที่ถูกปั๊มเข้าสู่คอลัมน์ในทางกลับกัน เมื่อดันลูกสูบออกลิ้นด้านทางออกจะปิดและเฟสที่เคลื่อนที่จะเข้าสู่ตัวปั๊ม

ปั๊มชนิดนี้ต่างจาก syring type pump ตรงที่ว่าความจุของตัวทำละลายมีไม่จำกัด (unlimited capacity) และปริมาตรภายในของแชมเบอร์มีขนาดน้อยมาก ๆ ประมาณ 10-100 µl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการไหลจะเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงความยาวของคานที่ดันลูกสูบหรืออัตราเร็วของมอเตอร์

ถ้าใช้ Reciprocating pump เพียง 1 ตัว (single-headed reciprocating pump) จะได้ว่าเฟสที่เคลื่อนที่จะถูกปั๊มเข้าสู่คอลัมน์เพียงครึ่งหนึ่งเมื่อปั๊มทำงานครบ 1 รอบ (ด้านเข้า-ด้านออก) เพราะว่าในขณะที่ดันลูกสูบเข้าอัตราการไหลจุไม่คงที่เนื่องจากว่าอัตราเร็วของลูกสูบเปลี่ยนแปลงตามเวลา ดังนั้น เอ้าท์พุทของ Reciprocating pump แต่เมื่อใช้ Reciprocating pump 1 ตัว แต่มีหัวปั๊ม 2 หัว (twin-headed pump) ที่มีทิศทางทำงานตรงข้ามกัน โดยหัวปั๊มตัวหนึ่งจะปั๊มเฟสที่เคลื่อนที่เข้าคอลัมน์ อีกหัวปั๊มหนึ่งจะปั๊มเฟสที่เคลื่อนที่จากภาชนะใส่เข้าสู่ปั๊ม

ปั๊มชนิดสองหัวปั๊มที่นำมาใช้ในปัจจุบันนี้จะใช้ลูกสูบ 2 ลูกเป็นตัวดันที่มีอัตราเร็วค่อนข้างคงที่ ถ้าปั๊มชนิดสองหัวปั๊มหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตามการทำงานของหัวปั๊มทั้งสองจะมีทิศทางตรงกันข้าม จึงไม่ทำให้พัลส์ในขณะที่มีการไหลของของเหลว (pulseless flow) ในทางปฏิบัติแล้ว เมื่อแต่ละหัวปั๊มเกิดจังหวะต้นเข้าจะมีการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหล ซึ่งจะต้องหายไป ชั่วขณะใดขณะหนึ่ง เพื่อจะไม่ให้เกิดปัญหาดังกล่าวจึงควรให้ลูกสูบในจังหวะดันออกเร็วกว่าจังหวะดันเข้า จะได้เอ้าท์พุท ผลรวมของอัตราการไหลจะเท่ากับเอ้าท์พุทของสองหัวปั๊มซึ่งมีค่าคงที่

เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลใน Reciprocating pump ตัววัดสัญญาณจะไวต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลทำให้ตรงเบสไลน์มีลักษณะเป็นฟันเลื่อย (sawtooth) เราบอกว่าตอนนี้เกิดพัลส์ขึ้น (pulsations) เพื่อลดปัญหาดังกล่าวจึงต้องต่อพัลส์แดมเปอร์ (pulse damper) ให้กับตัวปั๊มซึ่งอาจจะต่อโดยตรงระหว่างปั๊มกับคอลัมน์ (in-line type) หรือต่อเป็นรูปตัวที ระหว่างปั๊มกับคอลัมน์ แต่ในกรณีที่ปั๊มให้ความดันช่วงกว้าง พัลส์แดมเปอร์ คงใช้ไม่ได้ผลในกรณีที่มีการใช้ความดันสูงและความดันต่ำจึงต้องใช้พัลส์แดมเปอร์ที่มีความดันสูง ๆ เข้าไปต่อระหว่างปั๊มและคอลัมน์ การใช้พัลส์แดมเปอร์ก็จะมีปัญหาเหมือนกัน เมื่อทำเกรเดียนต์- อีลูชัน (gradient elution) เพราะทำให้เกิดปริมาตรตาย (dead volume) ขึ้น เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของตัวทำละลาย

<u>อุปกรณ์สำหรับทำเกรเดียนต์อีลูชัน</u> (Gradient Elution Apparatus)

การอีลูทสารออกจากคอลัมน์โดยใช้เฟสที่เคลื่อนที่เพียงหนึ่งชนิด จะเรียกว่าภาวะไอโซคราติกอีลูชัน (isocratic elution) จะใช้เวลานานในการแยกสารโดยเฉพาะสารที่ถูกอีลูทออกมาหลังสุดจะมีลักษณะเป็นหาง (tailing peak)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำแกรเดียนต์อีลูชันจะมีการผสมตัวทำละลายสองชนิดหรือมากกว่าที่มีสภาพการมีขั้ว (polarity) ที่แตกต่างกันจะทำให้มีการเปลี่ยนแหลงสภาพการมีขั้วของตัวทำละลายผสมเกิดขึ้นและจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการแยกสาร เช่น ตอนเริ่มแรกนั้นเราปั๊มตัวทำละลายชนิดที่ 1 ที่มีสภาพการมีขั้วต่ำ (low polarity) เข้าสู่คอลัมน์ จากนั้นก็ปั๊มตัวทำละลายชนิดที่ 2 ที่มีสภาพการมีขั้วสูง (high polarity) เข้าสู่คอลัมน์ด้วยปริมาณที่มากหลังจาก 10 หรือ 15 นาที เฟสที่เคลื่อนที่จะเป็นของตัวทำละลายชนิดที่ 2 เท่านั้น ด้วยวิธีการนี้จะทำให้องค์ประกอบที่มีสภาพการมีขั้วต่ำถูกอีลูทออกมาเร็ว และตอนท้ายจะทำให้องค์ประกอบที่มีสภาพการมีขั้วสูงถูกอีลูทออกมา

นอกจากการทำโปรแกรมตัวทำละลายแล้ว เราอาจจะทำโปรแกรมการไหล (flow programming) ซึ่งเป็นการเพิ่มอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ ระหว่างทำการแยกสาร พบว่าถ้าอัตราการไหลเพิ่มเป็นสองเท่าจะให้ค่าเวลาการคงไว้ลดจากเดิมครึ่งหนึ่ง

รูปที่ 10 แสดงไดอะแกรมของอุปกรณ์สำหรับทำแกรเดียนต์อีลูชัน

รูปที่ 10 แสดงไดอะแกรมของอุปกรณ์สำหรับทำแกรเดียนต์อีลูชัน 3 แบบดังนี้ รูปที่ 10(i) ผ่านตัวทำละลาย A และ B โดยใช้ตัวควบคุมเข้าไปผสมกันในแชมเบอร์สำหรับผสมตัวทำละลาย (mixing chamber) ก่อนที่จะใช้ความดันสูงปั๊มตัวทำละลายผสมเข้าสู่คอลัมน์

รูปที่ 10 (ii) ผ่านตัวทำละลาย A และ B ให้มีสัดส่วนต่าง ๆ กันโดยใช้ลิ้นควบคุมสัดส่วนการผสมด้วยไมโครคอมพิวเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 10 (iii) ใช้ปั๊มที่ให้ความดันสูง 2 ตัว แต่ละปั๊มจะปั๊มตัวทำละลายแต่ละชนิด (A และ B) เข้าสู่แชมเบอร์สำหรับผสมตัวทำละลายเพื่อจะปรับอัตราส่วน 100% ของตัวทำละลาย A กับ 100% ของตัวทำละลาย B อย่างเป็นโปรแกรมเพื่อจะเปลี่ยนสภาพการมีขั้วของตัวทำละลายผสม

สรุปเกี่ยวกับการทำโปรแกรมตัวทำละลาย ก็เพื่อ

ก. เวลาสำหรับใช้ในการแยกสารจะลดลง

ข. ความสามารถในการแยกสารจะเพิ่มขึ้น

ค. พีกมีความคมมากขึ้น ขจัดพีกที่เป็นหาง

<u>บริเวณที่ฉีดสาร</u> (Sample Injection)

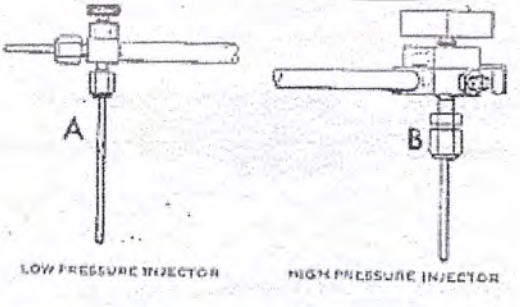
ถึงแม้ว่าจะใช้คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพในการแยกสารชนิดที่ดีที่สุดก็ตาม ถ้าการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง HPLC นั้นไม่ระมัดระวังก็จะทำให้การแยกสารนั้นไม่ได้ผลดี ตามหลักทฤษฎีแล้วควรจะฉีดสารด้วยปริมาณที่น้อย ๆ ตรงบริเวณกึ่งกลางของหัวคอลัมน์ และต้องคอยระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศในขณะที่ฉีดสารเพื่อจะให้เกิดประสิทธิภาพการแยกเกิดขึ้นสมบูรณ์

การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ในเทคนิค HPLC มีด้วยกัน 4 วิธี

1. ฉีดผ่านเซปตัม (septum injection)
2. ฉีดผ่านระบบที่ไม่มีเซปตัม (septumless injection system)
3. ฉีดผ่านลูพวาล์ว (loop valve)
4. ฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ด้วยระบบอัตโนมัติ (autoinjector)

<u>การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยการผ่านเซปตัม</u>

เหมือนกับการฉีดในเทคนิค GC แต่เข็มฉีดที่ใช้ใน GC จะใช้กับความดันเพียง 100 บาร์ ในกรณีที่ความดันสูง ๆ จะนำมาใช้ฉีดสารไม่ได้ จึงได้มีการสร้างเข็มฉีดที่ใช้กับความดันสูง ๆ ถึง 600 บาร์ขึ้นมา




รูปที่ 11 เข็มฉีดสารในเทคนิค HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อดีของการฉีดสารผ่านเซบตัม

- ฉีดปริมาตรตามต้องการ
- ปริมาตรน้อย ๆ ก็สามารถจะฉีดได้
- เป็นการฉีดเข้าสู่คอลัมน์โดยตรง จึงทำให้สัมผัสกับเฟสที่อยู่กับที่ได้โดยตรง
- วิธีการฉีดง่ายและราคาถูก

การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยผ่านระบบที่ไม่มีเซบตัม

เมื่อใช้เข็มฉีดผ่าน PTFF (Polytetrafloroethylene, Teflon) ที่เชื่อมอยู่ระหว่างบริเวณที่ฉีดสารกับคอลัมน์ ตอนนี้จะไม่มีความดันย้อนกลับ เมื่อปรับเข็มฉีดไปจากตำแหน่งเดิม 90 องศา ก็จะสามารถฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ได้

การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยผ่านระบบไม่มีเซบตัมนี้จะทำให้สารที่ฉีดไม่ถูกสัมผัสกับเฟสที่เคลื่อนที่

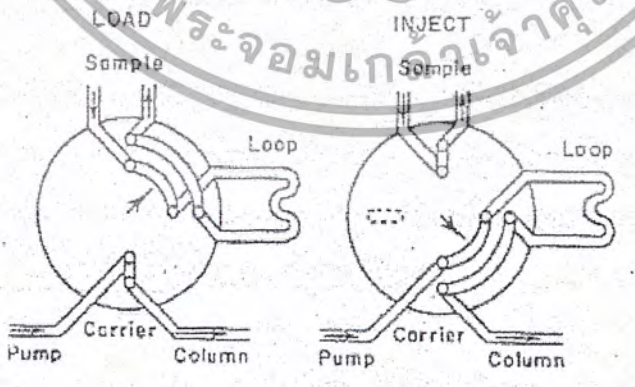
การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ลูพวาล์ว (loop valve)

ในปัจจุบันนี้เครื่อง HPLC ที่นำมาขายในท้องตลาดจะทำระบบฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์เป็นชนิดผ่านลูพวาล์ว ทำให้ราคาของเครื่อง HPLC มีราคาแพงมากขึ้น แต่จะง่ายต่อการใช้และให้ความแม่นยำสูง และยังสามารถจะฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์แบบอัตโนมัติได้อีกด้วย

การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ผ่านลูพวาล์วจะมีใช้กันอยู่ 2 แบบคือ

1. ลูพของการฉีดสารตัวอย่างชนิดมีลูพวาล์วอยู่ภายนอก (Extemal Loop Vaive)

ลูพวาล์วชนิดนี้จะมีวาล์วอยู่ 6 แห่ง (six port valves) ประกอบด้วยลูพที่รับตัวอย่างและสำหรับให้สารตัวอย่างออก 2 แห่งที่สามารถจำกัดปริมาตรได้




รูปที่ 12 Extemal Loop Valve

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนวาล์วอีก 4 แห่งจะใช้สำหรับการนำเฟสที่เคลื่อนที่และสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์และออกจากคอลัมน์ เมื่อเริ่มแรกจะบรรจุสารตัวอย่างด้วยเข็มฉีดขนาดไมโคร (microsyringe) โดยฉีดเข้าตรงลูพที่รับตัวอย่าง ก่อนการฉีดสารตัวอย่างจะต้องผ่านเฟสที่เคลื่อนที่เข้าไปคอลัมน์เพื่อให้ระบบอิ่มตัวเสียก่อน ตอนนี้จะเรียกว่าการโหลดสารตัวอย่าง (load sample) จากนั้นก็ปรับวาล์วโดยการหมุนด้วยตัวหมุนไปอยู่ในตำแหน่งอินเจค จะทำให้เฟสที่เคลื่อนที่พาสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ ดังแสดงในรูป 12 (i) และ (ii) ปริมาตรที่ใช้กับ external loop valves ประมาณ 10 µl

2. ลูพของการฉีดสารตัวอย่างชนิดมีลูพวาล์วอยู่ภายใน (Internal Loop Vaive)

ในกรณีที่ฉีดปริมาตรสารตัวอย่างน้อยกว่า10 µl จะใช้ลูพวาล์วชนิดที่มีวาล์วอยู่ 4 แห่ง (four-port valves) เมื่อโหลดสารตัวอย่างแล้วก็หมุนจากตำแหน่งโหลดไปยังตำแหน่งอินเจคด้วยมุม 270 องศา จะทำให้สารตัวอย่างถูกปั๊มเข้าสู่คอลัมน์ ด้วยการใช้ลูพวาล์วทั้งสองชนิดดังกล่าวสามารถจะทำให้ปริมาตรของสารตัวอย่างถูกฟลัชเข้าและออกจากลูพเป็นประมาณสิบเท่าของปริมาตรของลูพ

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่า ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าสู่คอลัมน์ควรจะมีปริมาตรน้อยๆ ถ้าใช้ปริมาตรมากจะเกิดโอเวอร์โหลดตรงบริเวณที่ทำการฉีดสารและจะมีผลทำให้พีกในโครมาโทแกรมมีความกว้างมาก เราจึงจะต้องทราบว่าปริมาตรที่ใช้ฉีดสารตัวอย่างมากที่สุดเท่าใดแล้วไม่ทำให้เกิดโอเวอร์โหลด

ถ้าให้ $v_i$ เป็นปริมาตรมากที่สุดที่ใช้ฉีดสารตัวอย่าง แล้วทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนเพียง 1% ค่า $v_i$ คำนวณจากสูตร

$$v_i = 0.2\, t_R F/\sqrt{N} \qquad (1)$$

เมื่อ $t_R$ = เวลาการคงไว้, F เป็นอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่, N เป็นจำนวนเพลททางทฤษฎี

คอลัมน์ (Column)

คอลัมน์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในเครื่อง HPLC จะทำมาจากเหล็กกล้าป่อดสนิม (stainless steel) มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 6.35 มิลลิเมตร (1/4 นิ้ว) และมีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ความยาวของคอลัมน์อาจยาวถึง 25 เซนติเมตร ผู้ผลิตมักจำให้ความยาวของคอลัมน์และเส้นผ่าศูนย์กลางภายในเปลี่ยนแปลงได้ เช่น ความยาวของคอลัมน์อาจเป็น 10, 10.5, หรือ 15 เซนติเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลางภายในอาจเป็น 3, 6.2 หรือ 9 มิลลิเมตร คอลัมน์ดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถจะบรรจุด้วยอนุภาคที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 10, 5 หรือ 3 ไมโครเมตร ตรงปลายของคอลัมน์จะมีที่สำหรับสวมหรือสอดเข้ากับตัววัดสัญญาณ ส่วนที่สำหรับสวมหรือสอดเข้ากับตัววัดสัญญาณเรียกว่า "frit" ทำจากเหล็กกล้าปลอดสนิมเหมือนกัน เช่น คอลัมน์ขนาด 4.6 มิลลิเมตร จะมีตัวสวมหรือตัวสอดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1/4 ถึง1/6 นิ้ว และมีความยาว 0.25 มิลลิเมตร (0.01 นิ้ว) เป็นต้น การมีตัวสอดหรือตัวสวม (frit) จะช่วยลดปริมาตรตาย (dead volume) โดยไม่มีปริมาตรตาย เรียกว่า zero dead volume (zdv) หรือมีปริมาตรตายน้อยมาก (low dead volume, ldv)

การเกิดปริมาตรตายจะทำให้ประสิทธิภาพในการแยกสารลดลงดังนั้นจึงควรจะให้เกิดปริมาตรตายให้น้อยที่สุด นั้นคือ จะต้องหาตัวสวม (frit) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในสั้นมาก ๆ ลักษณะเป็นหลอดคาปิลารี่มาเชื่อมระหว่างคอลัมน์กับตัววัดสัญญาณ ขนาดของหลอดคาปิลารี่ที่ใช้ควรมีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.25 หรือ 0.18 มิลลิเมตร เราสามารถจะคำนวณความยาวของหลอดคาปิลารี่ที่ใช้ดังสมการ

$$l = 7.64 \times 10^{10} (V_R^2)(D_m)Fd_c^4N \qquad (2)$$

เมื่อ $V_R$ เป็นปริมาตรการคงไว้ (ลบ.ซม.)

$D_m$ ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของสารตัวอย่าง (เมตร) / วินาที

$F$ อัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ (ลบ.ซม./นาที)

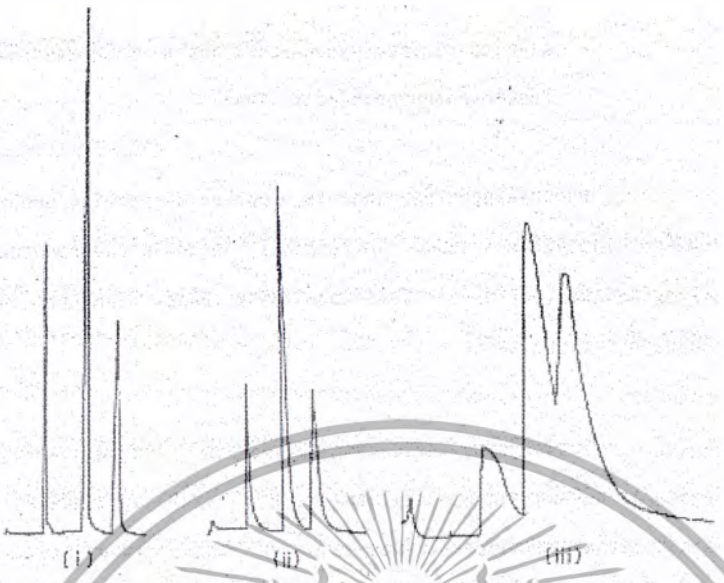
$D_c$ เส้นผ่าศูนย์กลางภายในของคอลัมน์ (มิลลิเมตร)

$N$ จำนวนเพลททางทฤษฎี

มีหลาย ๆ เหตุผลที่ว่าทำไมคอลัมน์ที่ใช้ในเทคนิค HPLC จึงควรมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร เหตุผลประการหนึ่งก็คือ การเกิดปริมาตรตาย การลดเส้นผ่าศูนย์กลางจะช่วยลดปริมาตรตายได้ ในปัจจุบันคอลัมน์ที่นำมาใช้ในเครื่อง HPLC จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 2 มิลลิเมตร เราเรียกว่า small bore column หรือ microbore column สำหรับจำนวนเพลททางทฤษฎีของคอลัมน์ HPLC ควรจะเป็น 50,000 เพลทต่อเมตรถ้าบรรจุด้วยอนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร หรือควรจะเป็น 25,000 เพลทต่อเมตร ถ้าบรรจุด้วยอนุภาคขนาด 10 ไมโครเมตร ดังนั้นถ้าคอลัมน์มีความยาว 12.5 ซม. และมีการบรรจุอนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร จะทำให้มีจำนวนเพลททางทฤษฎีถึง 6,500 เพลทต่อเมตร

การเกิดปริมาตรตายตรงรอยต่อระหว่างคอลัมน์ และตัววัดสัญญาณอันเนื่องมาจากการกระจาย (dispersion) หรือการเกิดปริมาตรตายตรงรอยต่อระหว่างบริเวณที่ฉีดสารกับคอลัมน์รวม ๆ เรียกว่า Extra-column dispersion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 13 แสดงโครมาโทแกรม

(i) โครมาโทแกรมปกติ

(ii) โครมาโทแกรมที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากการใช้ตัวสวมหรือตัวสอดที่มีความยาว 15 เซนติเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.8 มม. เชื่อมต่อระหว่างคอลัมน์กับตัววัดสัญญาณ

(iii) โครมาโทแกรมที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากการใช้ตัวสวมหรือตัวสอดที่มีความยาว 12.5 เซนติเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 มม. เชื่อมต่อระหว่าง คอลัมน์กับตัววัดสัญญาณ

Extra-column volume ไม่เฉพาะจะทำให้เกิดความกว้างของพีกแล้วยังทำให้เกิดพีกที่เป็นหางอีกด้วย สังเกตได้ดังนี้

- พีกที่มีลักษณะเป็นหางจะถูกอีลูทออกมาก่อน ซึ่งจริง ๆ แล้วพีกที่มีลักษณะเป็นหางควรจะออกมาตัวที่ช้าสุด
- ถ้าอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่นั้นเร็วมากจะทำให้เกิดพีกที่มีลักษณะเป็นหางเกิดขึ้นมากกว่าอัตราการไหลที่ช้า

สำหรับกลไกการเกิดการกระจาย ( column dispersion mechanism ) อันได้แก่ การแพร่วน (Eddy Diffusion) การแพร่ตามความยาวของคอลัมน์ (Longitudinal Diffusion) และการถ่ายโอนมวล (Mass Transfer)

ในทางปฏิบัติของเหลวมีอัตราการแพร่นี้ช้ามาก จะทำให้การแพร่ตามความยาวของคอลัมน์นั้นมีความสำคัญมากขึ้นในเทคนิค HPLC เมื่อความเร็วนั้นมีค่าต่ำ เนื่องจากว่าการเกิดการกระจายจะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ เมื่อมีการเพิ่มความเร็วของเฟสที่เคลื่อนที่ โดยทั่ว ๆ ไปอัตรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ควรจะเร็วมากพอเพื่อจะเกิดการกระจายน้อยที่สุด ทำให้การแยกสารเกิดเร็วพอที่จะไม่สูญเสียประสิทธิภาพของการแยกมากนัก และอีกประการหนึ่งการเกิดการกระจายของสารตัวอย่างจะเป็นลักษณะครึ่งวงกลม และเกิดขึ้นช้า จึงทำให้ไปสัมผัสกับขอบของคอลัมน์ได้น้อย เมื่อมีการเคลื่อนผ่านคอลัมน์ตามแนวดิ่ง เรียกการเกิดในลักษณะนี้ว่า คอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเป็นอนันต์ (infinite diameter column) ซึ่งจะสัมพันธ์กับความยาวของคอลัมน์ (L), เส้นผ่าศูนย์กลางภายในของคอลัมน์ ($d_c$) และเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาค ($d_D$)ดังนี้

$$d^2_c/(d_D \times L) \rangle 2.4 \qquad (3)$$

สมการที่ (3) จะเป็นไปได้เมื่อให้เกิดการกระจายตรงขอบของคอลัมน์เพียง 5% และการฉีดสารจะฉีดตรงกึ่งกลางของคอลัมน์ สมการที่ (3) จึงพอจะบอกเราว่า ถ้าใช้ความยาวของคอลัมน์เท่ากับ 25 เซนติเมตร หรือน้อยกว่า และฉีดสารประมาณ 10 ไมโครลิตรหรือน้อยกว่าจะแสดงถึงการเกิดพฤติกรรมเป็นแบบ infinite diameter column โดย $d_c \rangle 4$ มิลลิเมตร

<u>Small Born Columns</u>

คอลัมน์ชนิดนี้ถูกนำมาใช้กับเครื่อง HPLC ตั้งแต่ปี 1967 เพื่อช่วยแก้ปัญหาเกี่ยวกับ Extra-column volume พบว่าอัตราการไหลภายในคอลัมน์จะน้อยกว่าคอลัมน์ชนิดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ทำให้ช่วยลดปริมาตรของเฟสที่เคลื่อนที่ที่ใช้ลง และยังช่วยประหยัดการซื้อเฟสที่เคลื่อนที่ลงอีกด้วย ประสิทธิภาพกับความเร็วของเฟสที่เคลื่อนที่ภายในคอลัมน์อีกด้วย ดังนั้นความเร็วของเฟสที่เคลื่อนที่ที่ใช้จะพอดีกับอัตราการไหลของคอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในขนาด (4.6 มม.) ถ้าให้ F (ลบ.ซม.ต่อนาที) เป็นอัตราการไหลภายในคอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ d เซนติเมตร และความเร็วของเฟสที่เคลื่อนที่เท่ากับ V (เซนติเมตรต่อนาที) ค่า F และ V จะสัมพันธ์กันดังนี้

$$F = \pi d^2 V/4 \qquad (4)$$

ดังนั้น ถ้าคอลัมน์ชนิดที่ 1 มีเส้นผ่าศูนย์กลาง $d_1$ และมีอัตราการไหลเท่ากับ $f_1$ โดยที่เราต้องการเปรียบเทียบหา $f_2$ ของคอลัมน์ชนิดที่ 2 ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง $d_2$ เมื่อความเร็วของเฟสที่เคลื่อนที่นั้นใช้เหมือนกัน จะได้ว่า

$$F_2 = F_1 d^2_2/d^2_1 \qquad (5)$$

สมการที่ (5) ได้จาก $F_1 = \pi d^2_1 V/4$ และ $F_2 = \pi d^2_2 V/4$

$$F_2/F_1 = d^2_2/d^2_1$$

<u>คอลัมน์ชนิดสามคูณสาม</u> (3x3 Column)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HPLC คอลัมน์ที่ใช้กันทั่ว ๆ ไปจะเป็นชนิด 25 cm x 4.6 mm และบรรจุเฟสที่อยู่กับที่ชนิดบอนด์ซิลิกาขนาด 5 μm จะมีจำนวนเพลททางทฤษฎีเท่ากับ 10,000-15,000 เพลท คอลัมน์ชนิดนี้เป็นความจำเป็นที่จะใช้ในการแยกสาร เพราะว่าถ้าจำนวนเพลททางทฤษฎีเท่ากับ 3,000-5,000 เพลทก็เพียงพอต่อการแยกสารแล้ว ถ้าใช้คอลัมน์ดังกล่าวมาแยกสารจะทำให้สูญเสียเวลาและตัวทำละลาย

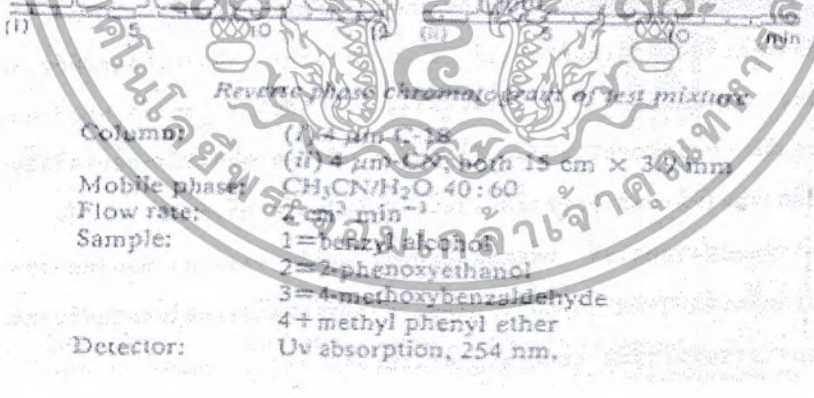
คอลัมน์ชนิดสั้น (short column) ขนาด 3.3 cm x 4.6 mm และบรรจุเฟสที่อยู่กับที่ชนิดบอนด์ซิลิกาขนาด 3 μm จะเพียงพอต่อการแยกสารจำนวนมากมายและเร็วด้วย จึงเรียกชื่อคอลัมน์ดังกล่าวว่าคอลัมน์สามคูณสาม เมื่อเปรียบเทียบกับคอลัมน์ที่ใช้กันทั่ว ๆ ไป จะได้ข้อเปรียบเทียบดังนี้

ก. ใช้เวลาในการในการแยกสารน้อยลง และช่วยประหยัดในการใช้เฟสที่เคลื่อนที่

ข. ภาวะสมดุลเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว

ค. พีกที่ได้มีความคมชัด

ง. ราคาถูก




รูปที่ 14 แสดงโครมาโทแกรมการแยกสารผสมของวัตถุระเบิด 6 ชนิด ด้วยคอลัมน์ชนิดสามคูณสาม (i) และคอลัมน์ที่ใช้กันทั่ว ๆ ไป (ii) จะเห็นว่าคอลัมน์ชนิดสามคูณสาม ใช้เวลาในการแยกน้อยกว่าคอลัมน์ HPLC ชนิด 1.5 cm x 4.6 mm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

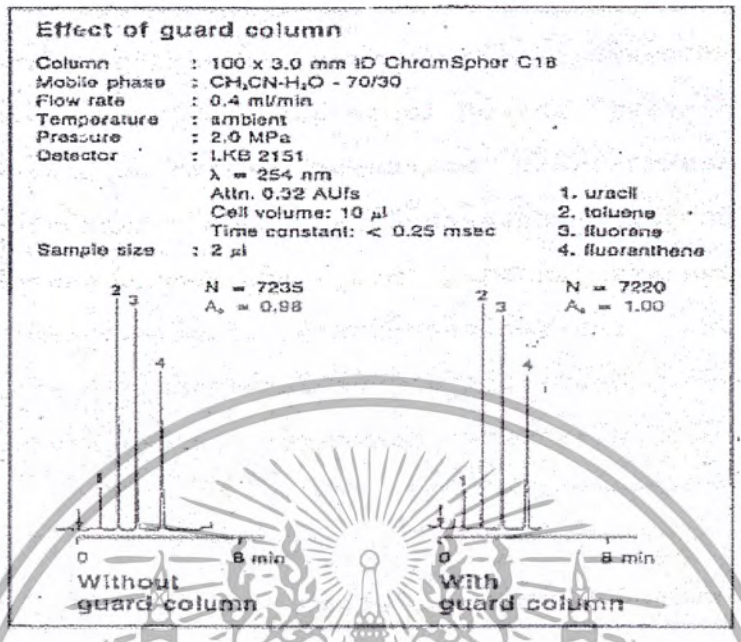
Pre-columns (พรี-คอลัมน์)

พรี-คอลัมน์ถูกนำมาใช้ในกรณีที่ต้องการปรับภาวะของเฟสที่เคลื่อนที่ โดยนำมาต่ออยู่ระหว่างปั๊มกับบริเวณที่ฉีดสาร ภายในคอลัมน์จะบรรจุเฟสที่อยู่กับที่เหมือนกับคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร (working or analytical column) เพียงแต่ว่าอนุภาคของเฟสที่อยู่กับที่มีขนาดใหญ่กว่า เราพบว่าตัวทำละลายบางชนิดสามารถจุละลายซิลิกา (เฟสที่อยู่กับที่) ได้กลายเป็นกรด ซิลิซิก (silicic acid) เป็นผลทำให้เฟสที่เคลื่อนที่มีการเพิ่มสภาพการมีขั้ว (polarity) และเพิ่ม ionic strength รวมถึงการเพิ่ม pH อีกด้วยจะทำให้มีผลต่อการแยกสารได้ดีขึ้น Scavenger column จัดเป็นพรี-คอลัมน์ชนิดหนึ่งที่นำมาใช้ในการปรับภาวะของเฟสที่เคลื่อนที่ดังกล่าว ข้างต้น โดยภายใน Scavenger column จะบรรจุอนุภาคซิลิกาขนาดใหญ่ (หยาบ) หรือ bonded-phase silica ที่ทำหน้าที่เป็นเฟสที่อยู่กับที่ เมื่อเฟสที่เคลื่อนที่ผ่านเข้าคอลัมน์ดัง กล่าวจะทำให้เฟสที่เคลื่อนที่อิ่มตัวไปด้วยกรดซิลิซิก ก่อนที่จะเข้าสู่คอลัมน์ที่ใช้แยกสารต่อไป อย่างไรก็ตามเฟสที่เคลื่อนที่ที่มี pH 10.7 หลังจากผ่าน Scavenger column ก็จะ ไม่มีผลต่อการแยกสารมากนัก

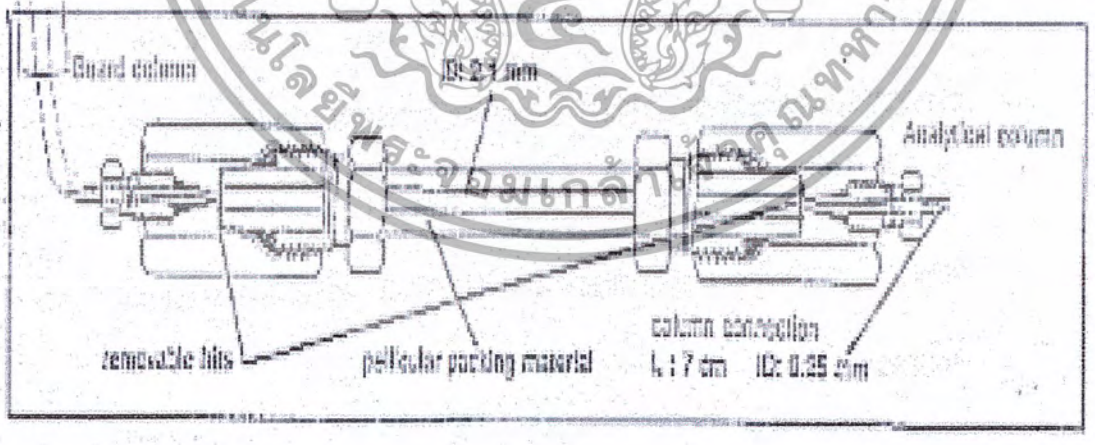
สำหรับพรี-คอลัมน์ขนาดสั้น (short pre-column) ซึ่งมีความยาวเพียง 10 มิลลิเมตรและเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.1 มิลลิเมตร ทำจากเหล็กกล้าไอดสนิม เราจะมีชื่อเรียกเฉพาะว่า Guard column

เราจะพบว่าเมื่อใช้คอลัมน์แยกสารจำพวกชีวเคมี (เลือด, โปรตีน) หรือสารมลพิษจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของคอลัมน์ได้ ทำให้อายุการทำงานของคอลัมน์สั้นลงหรือเสื่อมคุณภาพเร็ว ปัญหาดังกล่าวจะแก้ไขได้ก็โดยการใช้ Guard column ที่ภายในบรรจุอนุภาคเหมือนกับคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร จะสวมอยู่กับส่วนบนของคอลัมน์ที่ใช้แยกสารแล้วนำไปเชื่อมกับส่วนล่างของอินเจคเตอร์ (บริเวณที่ฉีดสาร) การเกิดปริมาตรจะน้อยมาก และประสิทธิภาพของการแยกจะลดลงประมาณ 5% หรือไม่มีการสูญเสียประสิทธิภาพของการแยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 15 ผลของ Guard column ในการแยกสาร




รูปที่ 16 แสดงการเชื่อมต่อระหว่างGuard columnกับคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร (Analytical column)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลือกใช้ Guard column นั้น จะต้องพิจารณาถึงเฟสที่อยู่กับที่ที่ถูกบรรจุไว้ให้เหมือนกับคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร

ข้อควรระวังในการใช้คอลัมน์

การใช้คอลัมน์อย่างถูกวิธีจะช่วยให้คอลัมน์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงต้องมีการระวังในการใช้ดังนี้

1. อย่าใช้คอลัมน์ที่ความดันสูงเกินกว่าค่าความดันสูงสุดที่กำหนด โดยบริษัทผู้ผลิต
2. เพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ไม่ควรใช้เฟสที่เคลื่อนที่ที่มี pH สูงหรือต่ำเกินไป ควรใช้เฟสที่เคลื่อนที่ที่มี pH อยู่ในช่วง 3.5-6.5
3. ควรกรองเฟสที่เคลื่อนที่เสมอ โดยเฉพาะเฟสที่เคลื่อนที่ที่ประกอบด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ และไม่ควรใช้เฟสที่เคลื่อนที่ทุ่นหรือมีตะกอน
4. ไม่ควรนำคอลัมน์ไปเคาะ หรือต้องระวังไม่ให้คอลัมน์ถูกกระแทก
5. ใช้ Guard column ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตติดตั้งหน้าคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร
6. ถ้าคอลัมน์ใกล้เสื่อมสภาพหรือเริ่มอุดตัน ให้ล้างด้วย 1% กรดอะซีติก
7. ห้ามเก็บคอลัมน์ไว้ในน้ำบริสุทธิ์ เพราะอาจมีเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตภายในคอลัมน์ได้ การเก็บคอลัมน์ควรเก็บไว้ใน 90% isopropanal หรือ 100% methanol จะช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้
8. ห้ามเก็บคอลัมน์ไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ หรือสารละลายที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบ เพราะอาจจะทำให้มีตะกอนเกิดขึ้นได้
9. ไม่เก็บคอลัมน์ไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิสูง

ตัววัดสัญญาณ (Detector)

การทำงานของตัววัดสัญญาณในเทคนิค HPLC นั้น มีหลักการดังนี้ เมื่อเฟสที่เคลื่อนที่ผ่านสารตัวอย่าง หรือชะสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ก็จะเข้าสู่ตัววัดสัญญาณเอ๊าท์พุท ที่อ่านได้จากตัววัดสัญญาณจะเปลี่ยนเป็นสัญญาณไฟฟ้า (electrical signal) ซึ่งจะแปรตามคุณสมบัติบางประการของเฟสที่เคลื่อนที่หรือของสารตัวอย่างได้ โดยที่

- ถ้าตัววัดสัญญาณใดสามารถตอบสนองได้ทั้งสารตัวอย่างและเฟสที่เคลื่อนที่จะเรียกว่า bulk property detector
- ถ้าตัววัดสัญญาณใดสามารถตอบสนองต่อสารตัวอย่างเท่านั้น จะเรียกว่า solute property detector

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติของตัววัดสัญญาณที่ใช้ใน HPLC มีดังนี้

1. ตัววัดสัญญาณแบบอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล (UV and Visible Light Detector)

จัดเป็นตัววัดสัญญาณที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง มีความไวต่อการตอบสนองสูงมีช่วงเส้นตรงกว้าง (a wide linear range) ความแปรปรวนของอุณหภูมิ (temperature fluctuations) ไม่มีผลต่อการตอบสนองและเหมาะกับการทำเกรเดียนต์อีลูชัน

การตอบสนองจะอาศัยหลักการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลต หรือช่วงวิสิเบิล สารที่ดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตส่วนมากจะเป็นพวกที่มีอิเล็กตรอนที่พันธะไพ (π-bonding electrons) และพวกที่มีอิเล็กตรอนไม่ได้ร่วมพันธะ (unshaired electron) เช่น โอลิฟีน (olefin), สารประกอบอะโรมาติก (aromatic compuounds) และสารประกอบที่มี c = 0, c = s, -N = 0 และ –N = N- อยู่ในโมเลกุล สำหรับเฟสที่เคลื่อนที่นั้นไม่ควรจะดูดกลืนแสงหรือดูดกลืนแสงน้อยที่ความยาวคลื่นที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

การดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่นหนึ่งจะเป็นฟังก์ชันกับความเข้มข้น, C ตามกฎของแลมเบิร์ตและเบียร์ (The Lambert-Beer law) : A = bC

ตามสมการที่ (6) จะได้ว่าความสูงของพีกจะเป็นฟังก์ชันกับ molar absorptivity และความเข้มข้นของสารที่ผ่านเซลที่บรรจุสาร หน่วยของ A นั้นปกติจะแทนด้วย หน่วยของการดูดกลืน (Abdorption Unit ,AU) โดยนิยามเป็น 1 a.u.f.s. หรือ 1 avsorpion unit full scaie หมายความว่า การบันทึกค่าแอบซอร์แบนซ์ได้เท่ากับหนึ่งที่พอดีกับเครื่องบันทึกสัญญาณอ่านได้เต็มสเกล (an bsorbance of 1 at full scaledeflection) ตัววัดสัญญาณแบบ UV/visible ที่ใช้อยู่ในเครื่อง HPLC จะมี 2 แบบ คือแบบที่ตรึง (fixed) ความยาวคลื่นและแบบที่ปรับความยาวคลื่นได้

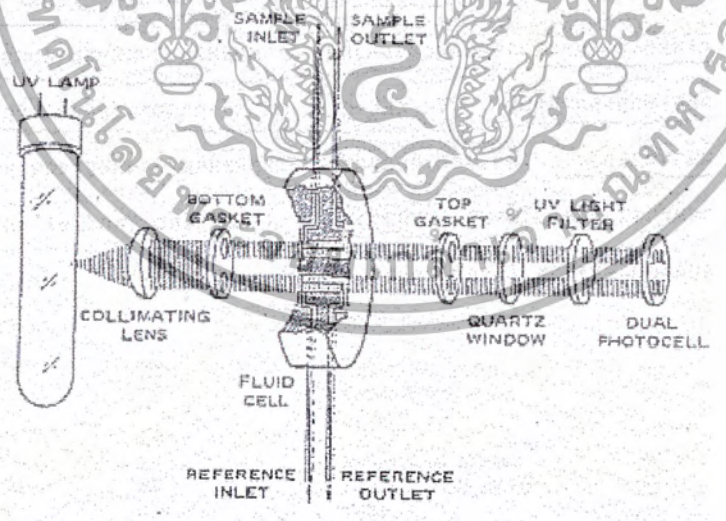
- แบบตรึงความยาวคลื่นไว้ที่ 254 และ 280 นาโนเมตร์ ซึ่งเป็นความยาวคลื่นมากสุดที่ วงแหวนเบนซีน (benzing ring) ดูดกลืนแสงไว้ ดังนั้นสารประกอบอะโรมาติกจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตร อย่างเห็นได้ชัด และที่ความยาวคลื่น 254 และ 280 นาโนเมตรนี้เป็นความยาวคลื่นแสงที่ไอปรอทคายออกมาจึงใช้หลอดไปของปรอท (mercury vapour lamps) เป็นแหล่งกำเนิดคลื่นแสงดังกล่าว ข้อเสียของตัววัดสัญญาณชนิดนี้ ก็คือสารตัวอย่างบางชนิดที่เราจะวิเคราะห์ไม่ดูดกลืนแสงที่254 และ 280 นาโนเมตร และเฟสที่เคลื่อนที่ที่ใช้จะต้องไม่ดูดกลืนแสงที่ 254 และ 280 นาโนเมตร ด้วย

- แบบที่ปรับความยาวคลื่นได้ จะใช้หลอดดิวเทอเรียม (deuterium lamps) และ/หรือ หลอดที่ใช้ไส้ทังสเตน (tungsten filament lamps) เป็นแหล่งกำเนิดคลื่นแสงที่สามารถปรับค่าความยาวคลื่นได้ตั้งแต่ 190-700 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ตัววัดสัญญาณที่ปรับความยาวคลื่นได้

| | แหล่งกำเนิดคลื่นแสง | ช่วงความยาวคลื่น |
|---|---|---|
| Phillips 4025 | Deuterium lamp | 190-380 |
| | Tungsten lamp | 190-600 |
| Uvikon 735 | Deuterium lamp | 195-350 |




รูปที่ 17 ตัววัดสัญญาณชนิดวัดคลื่นแสงอัลตราไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อใช้ตัววัดสัญญาณชนิดวัดคลื่นแสงอับตราไวโดเลต สิ่งสำคัญที่จะต้องพิจารณาก็คือ สภาพไว (sensitivity) จะต้องให้มีค่าสูงสุด (อัตราส่วน สัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise) หรือความสูงของพีกต่อเบสไลน์มีค่าสูง) นั้นก็คือจะต้องเลือกเฟสที่เคลื่อนที่ให้เหมาะสมโดยไม่เลือกเฟสที่เคลื่อนที่ที่สามารถดูดกลืนแสงตรงความยาวคลื่นที่ใช้เลือกในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

โดยทั่ว ๆ ไปแล้ว ช่วงการดูดกลืนแสงของเฟสที่เคลื่อนที่จะต่ำกว่าความยาวคลื่น 230 nm ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดกลืนแสงของเฟสที่เคลื่อนที่คือ

ก. ความเข้มข้นขององค์ประกอบในเฟสที่เคลื่อนที

ข. พีเอช

ค. แก๊สที่อยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่

สิ่งที่เราจะต้องพิจารณาก็คือค่า UV cut-off ของเฟสที่เคลื่อนที่ (เป็นค่าของความยาวคลื่นที่เฟสที่เคลื่อนที่มีการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 หน่วยของค่าแอบซอร์แบนซ์) ดังนั้นจึงควรเลือกเฟสที่เคลื่อนที่ที่มี UV cut-off ต่ำกว่าความยาวคลื่นที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง ถ้าเฟสที่เคลื่อนที่สามารถดูดกลืนแสงตรงกับช่วงความยาวคลื่นที่ใช้วิเคราะห์สารจะมีผลทำให้เบสไลน์มีการรบกวน (baselinge noise) มากจะเกิดแอบซอร์แบนซ์แบลคกราวน์ (background absorbance) สูง

2. ตัววัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence Detectors)

ส่วนประกอบบางชนิดสามารถจะเกิดการวาวแสงได้ หรือการเรืองแสง (phosphtrescence) ได้ ได้แก่สารประกอบที่มีวงแหวนของเบนซีนที่อยู่ติดกัน (fused ring) ที่เราเรียกว่า polynuclear aromatic hydrocarbon (เราอาจทำให้สารประกอบที่ไม่เกิดการวาวแสงเปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์ที่เกิดการวาวแสงได้ด้วยสารที่เหมาะสม) ดังนั้นจึงควรมีตัววัดสัญญาณสำหรับวัดการวาวแสง

3. ตัววัดสัญญาณโดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Detector, EC Detector)

ตัววัดสัญญาณชนิดนี้จะอาศัยการวัดคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical properties) ของสารที่แยกได้ ได้แก่ เทคนิคโพลาโรกราฟี (polarography), แอมเปโรเมตรี (ampermetry), คูลอมเมตรี (coulometry) และการวัดสภาพนำไฟฟ้า (conductometry) เหล่านี้สามารถจะใช้เป็นพื้นฐานของตัววัดสัญญาณของเทคนิค HPLC ในปัจจุบันนิยมใช้ตัววัดสัญญาณชนิดแอมเปอโรเมตริก หรือคุลอมเมตริก สำหรับตรวจวัดสารประกอบอินทรีย์หลาย ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิด เช่น สารประเภทอะโรเมติก เอมีน (aromatic amines), กรดอินทรีย์ (organic acids), วิตามิน และสารแอลคาลอยด์ หรือสารประกอบที่ถูกออกซิไดส์ได้ง่ายนั้นเอง

หลักการทำงานคือ ผ่านกระแสไฟฟ้าไปยังสารละลาย จะทำให้เกิดปฏิกิริยาขึ้นที่ขั้วอิเล็กโทรดและมีการถ่าเทอิเล็กตรอนระหว่างขั้ว และระหว่างสารละลาย ขั้วคาโธดเกิดปฏิกิริยารีดักชันและขั้วอาโนดเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (สารใดสามารถถูกรีดิวซ์หรือถูกออกซิไดส์ได้เรียกสารนั้นว่า electroactive) การบันทึกสัญญาณนั้นจะอาศัยแกน x แทนค่าศักย์ไฟฟ้า (potential, E) ที่เทียบกับศักย์ไฟฟ้าอ้างอิง (reterence electrode) และแกน Y เป็นปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ผ่านเข้าไปในสารละลาย (กระแสไฟฟ้าไหลตรงกันข้ามกับกระแสอิเล็กตรอน)

ขั้วอาโนด : เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ให้ $e^-$) กระแสไฟฟ้าจะไหลเข้าทางขั้วอาโนด เรียกว่ากระแสออกซิเดชัน (oxsidation current) หรือ anodic current

ขั้วคาโธด : เกิดปฏิกิริยารีดักชัน (รับ $e^-$) กระแสไฟฟ้าจะไหลออกจากขั้วคาโธด เรียกว่ากระแสรีดักชัน (reduction current) หรือ cathodic current ราฟที่ได้จะเรียกว่า current-potential curve

ปัญหาที่พบในกรณีใช้ EC Detector ก็คือ แก๊สออกซิเจน เพราะว่าแก๊สออกซิเจนถูกรีดิวซ์ได้ง่ายมาก (ในกรณีที่แก๊สออกซิเจนปนอยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่) จะเป็นผลทำให้เกิด background current เกิดขึ้นเป็น 1000 เท่าของกระแสไฟฟ้าที่เกิดจากสารที่ต้องการวิเคราะห์ การแก้ปัญหานี้ทำได้โดยการกำจัดแก๊สออกซิเจนออกจากเฟสที่เคลื่อนที่ และเฟสที่เคลื่อนที่ที่ใช้ควรมีสภาพการนำไฟฟ้าต่ำด้วย (ถ้าใช้เฟสที่เคลื่อนที่ที่มีสภาพการนำไฟฟ้าสูงจะต้องเติมเกลือลงไปเพื่อช่วยลดสภาพการนำไฟฟ้าได้บ้าง ตัววัดสัญญาณแอมเปอโรเมตริกนั้นใช้สารเพียงปริมาณเล็กน้อย กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นเป็นนาโนแอมแปร์ที่สามารถจะวัดได้จึงทำให้ตัววัดสัญญาณนี้มีสภาพไวสูง (a high sensitivity) มากกว่า UV/visible detector แต่สภาพไวสู้ตัววัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ไม่ได้ พบว่าตัววัดสัญญาณชนิดนี้สามารถตรวจวัดได้ถึง $10^{-10}$ กรัม/ลบ.ซม.

4. <u>ตัววัดสัญญาณชนิดวัดดรรชนีหักเหของสาร</u> (Refractive Index Detector, RI Detector)

ตัววัดสัญญาณชนิดนี้จะอาศัยความแตกต่างของค่าดรรชนีหักเหของสารที่ออกมาจากคอลัมน์เทียบกับเฟสที่เคลื่อนที่ (หลักการที่สำคัญก็คือ ถ้ามีผลต่างของค่าดรรชนีหักเหสามารถตรวจวัดได้ จึงจัดตัววัดสัญญาณนี้เป็นชนิดยูนิเวซัล (universal detector) เราลองมาพิจารณา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4 แสดงค่าดรรชนี หักเหของสารบางชนิด

| สาร | ค่าดรรชนีหักเห |
|---|---|
| Hexane | 1.375 |
| Octane | 1.397 |
| Nonane | 1.405 |
| Decane | 1.410 |
| Tridecane | 1.425 |
| Benzene | 1.501 |
| Tetrahydrofuran | 1.405 |

- จากตารางที่ 4 เมื่อใช้ tetrahydrofuran เป็นเฟสที่เคลื่อนที่ในการแยกสารประกอบของอัลเคนนั้น พบว่า nonane ไม่สามารถจะตรวจวัดได้ด้วย RI detector เนื่องจากผลต่าง RI ระหว่าง nonane กับ tetrahydrofuran มีค่าเป็นศูนย์

- Hexaneและ Octane มีค่า RI น้อยมากเมื่อเทียบกับ tetrahydrofuran พีคของโครมาโทแกรมจะชี้ลงจากเส้นเบสไลน์ ในขณะที่ decane และtridecane มีค่า RI มากกว่าของ tetrahydrofuran พีกโครมาโทแกรมจะชี้ขึ้นจากแนวเส้นเบสไลน์เหมือนกับในกรณีของเบนซีนด้วย

- Benzene จะมีสภาพไวสูงสุดในการตรวจวัดด้วย RI detector

RI detector นั้นมีสภาพไวไม่ดีเท่ากับ UV detector โดยพบว่าระดับรบกวน (noise levels) จะมีค่าประมาณ $10^{-7}$ หน่วยดรรชนีหักเห (RIU = Refractive Index Units) ที่สามารถจะตรวจหาปริมาณความเข้มข้นได้ถึง $10^{-6}$ กรัม/ลบ.ซม. (ช่วงเชิงเส้น (linear range) ของ RI detector ประมาณ $10^{4}$) ถ้าต้องการให้มีการเพิ่มสภาพไวให้มากขึ้นก็โดยการควบคุมอุณหภูมิของเฟสที่เคลื่อนที่ และเครื่องมือให้มีอุณหภูมิที่เหมาะสม

5. Multipurpose Detectors

ในปัจจุบันได้มีบริษัทผลิตตัววัดสัญญาณที่นำเอาตัววัดสัญญาณหลาย ๆ ชนิดมารวมกันเป็นตัววัดสัญญาณหนึ่งเครื่อง (single unit)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเภทของโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (Modes of HPLC)

ปัจจุบันนี้การวิเคราะห์สารโดยเทคนิค HPLC ได้นำ microparticular column packing (แพคกิงคอลัมน์ที่มีอนุภาพขนาดเล็ก ๆ บรรจุอยู่) อนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์จะเป็นอนุภาพที่มีรูพรุนขนาดเล็ก ๆ (small porous particles) มีลักษณะเป็นทรงกลมหรือทรงกลมในลักษณะที่ไม่สม่ำเสมอกันเป็นสารจำพวกซิลิกา (spherical or irregular silica) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3, 5 หรือ 10 μm ที่นิยมกันอย่างแพร่หลายมีด้วยกัน 2 ชนิด โดยชนิดแรกเป็นอนุภาคซิลิกาที่ยังไม่ดัดแปลง (unmodified silica) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5μm ชนิดที่สองเป็นซิลิกาที่ถูกดัดแปลง (modified silica) โดยขบวนทางเคมีกับ octadecylsilane (ODS, C-18) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 μm ดังตารางแสดงคุณสมบัติของทั้งสองชนิดดังนี้

ตารางที่ 5 คุณสมบัติของ microparticular packings

| | | Spherisorb SSW | Spherisorb S3 ODS 2 |
|---|---|---|---|
| Type | | silica | silica, ODS bonded, fully end-capped |
| Shape | | spherical | spherical |
| Surface area, $m^2\ g^{-1}$ | | 220 | 220 |
| Average pore diameter, nm | | 8 | 8 |
| Range of pore diameter, nm | | 5.4–11 | 5.4–11 |
| Pressure drop, bar | | 27 (*i*) | 212 (*ii*) |
| Efficiency, plates $m^{-1}$ | | 60 000–80 000 | 110 000–150 000 |
| Cost (1986) | £/10 g | 41.80 | 71.50 |

วัดความดันที่ลดลง (pressure drop) ด้วยคอลัมน์ขนาด 25 cm x 4.6 mm โดยมีอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ 1 $cm^3$/min เมื่อเฟสที่เคลื่อนที่เป็น

(i) hexane/acetonitrile 99:1

(ii) methanol/water 80:20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้นึกไว้เสมอว่าการวิเคราะห์ทางเทคนิค HPLC นั้นนิยมใช้แพคกิงที่เป็นอนุภาคซิลิกา ที่ถูกดัดแปลงโดยขบวนการเคมี (chemically modified silicas) ที่เราเรียกทั่ว ๆ ไปว่า "บอนด์เฟส, bonded phases" นั้นเอง (จะได้กล่าวถึงต่อไป)

ประเภทของโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูงนั้นประยุกต์มาจากโครมาโทกราฟีของเหลวแบบใช้คอลัมน์ ดังนั้นประเภทของ HPLC จึงคล้ายกับโครมาโทกราฟีของเหลวแบบใช้คอลัมน์ดังนี้

1. HPLC ประเภทการดูดซับ (Adsorption Chromatography)
2. HPLC ประเภทพาร์ติชัน (Partition Chromatography)
3. HPLC ประเภทการแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-Exchange Chromatography)
4. HPLC ประเภทการเกิดไอออนคู่ (Ion-pair Chromatography)
5. HPLC ประเภทแยกขนาดจำเพาะ (Size Exclusion Chromatography)
6. HPLC ประเภทบอนด์เฟส (Bonded Phase Chromatography)

จากการสำรวจงานวิจัยทางเทคนิค HPLC จำนวน 369 เรื่องจากวารสาร 10 เล่ม (10 different journals) ในการเลือกใช้ประเภทของ HPLC ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเลือกใช้ประเภทของ HPLC ในงานวิจัยจาก Analytical Chemistry Reviews, Aprill 1984

| | % column usage, 1982-3 |
|---|---|
| Bonded Phases | 78 |
| reverse phase, C-18 | (54) |
| reverse phase, other | (18) |
| normal phase | (6) |
| Adsorption | 10 |
| Ion-exchange | 6 |
| Exclusion | 6 |

จากตารางที่ 6 จะเห็นว่า บอนด์เฟสถูกสำมาใช้ถึง80% โดยเฉพาะ C-18 บอนด์เฟสใช้มากกว่าครึ่งหนึ่ง (ของ 80%) จะเห็นว่า C-18 บอนด์เฟสนั้นได้ถูกนำมาใช้มากขึ้นเรื่อย ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>บอนด์เฟสโครมาโทกราฟี</u> (Bonded Phase Chromatography)

การเตรียมบอนด์เฟสจากอนุภาคซิลิกานั้นจะอาศัยปฏิกิริยาระหว่างซิลิกากับ dimethylchlorosilane ชนิดของบอนด์เฟสนั้นจะขึ้นอยู่กับหมู่อัลคิล (R) ใน silylating agent เช่น ถ้าเป็นบอนด์เฟสของ cation exchanger จะใช้ R เป็นหมู่ Phenyl หลังจากเกิดปฏิกิริยาแล้ว หมู่ phenyl จะถูก sulphonated ด้วยกรด chlorosulphonic ถ้าเป็นบอนด์เฟสของ anion exchanger จะใช้ R เป็นหมู่ chlorinated alkyl แล้วให้เกิดเป็น quaternary salt ด้วยปฏิกิริยากับ tertiary amine

ขบวนการเตรียมบอนด์เฟสมีหลายวิธี เช่น อาศัยปฏิกิริยาแอสเทริซิเคชันตรงผิวซิลิกาที่มีหมู่ silanol ด้วยอัลกอฮอลล์ หรือการเปลี่ยน (conversion) หมู่ silanol (Si-OH) ไปเป็น Si-Cl โดยใช้ thionyl chloride แล้วทำปฏิกิริยากับสารประกอบ organometallic

สิ่งที่ควรทราบ : มันเป็นไปไม่ได้ที่จะเกิดบอนด์เฟสตรงผิวของซิลิกาเจลได้หมด ส่วนของหมู่ Silanol (Si-OH) ที่ไม่เกิดบอนด์เฟสสามารถจะดูดซับโมเลกุลที่มีขั้วได้จะมีผลต่อเทคนิคประเภทบอนด์เฟสโครมาโทกราฟีคือ จะไปทำให้เกิด tailing peak และเพิ่มค่าปริมาณการคงไว้ในการแยกแบบผันกลับ (reverse phase separations) เราอาจจะทำให้หมู่ silanol บนผิวของซิลิกาเจลที่ไม่เกิดเป็นบอนด์เฟสนั้นให้อยู่ในสภาพที่ไม่มีขั้วก็ได้ หรือให้ลดน้อยลง โดยขบวนการ "end-capping" โดยนำมาทำปฏิกิริยากับ Silylating agent เช่น trimethylchlorosilane การทำบอนด์เฟสบนซิลิกาเจลเป็นการเปลี่ยน normal phase เป็น reverse phase สิ่งที่ควรจะทราบเกี่ยวกับบอนด์เฟสมีดังนี้

1. สำหรับซิลิกาบอนด์ เฟสนั้นพบว่ามีความอยู่ตัวมากในช่วง pH 3-8 ถ้า pH ต่ำกว่า 3 บอนด์ เฟสจะหลุดออกจากผิวของซิลิกาเจล และถ้า pH มากกว่า 8 ซิลิกาเจล จะละลายในเฟสที่เคลื่อนที่ แต่ถ้าต้องการใช้งานในช่วง pH สูงอาจทำได้โดยใช้เวลาสั้น ๆ ก็โดยการนำซิลิกาบอนด์เฟสไปละลายให้อิ่มตัวในเฟสที่เคลื่อนที่ อย่างไรก็ตาม พยายามใช้ในช่วง pH ที่กำหนดไว้จะดีที่สุด

2. ถ้ามีหมู่ silanol ที่ไม่เกิดบอนด์เฟสนั้นจะทำให้พีกที่ได้ไม่คมชัด

3. ค่าการคงไว้ที่ได้จากการใช้ reverse phase นั้นมีกลไกอย่างไรไม่ทราบชัดเจน แต่พอจะอธิบายง่าย ๆ ได้ดังนี้ ผิวของบอนด์เฟสนั้นไม่ชอบน้ำ (hydrophobic surface of the bonded phase ) มีสภาพขั้วน้อยกว่าเฟสที่เคลื่อนที่จึงทำให้เกิดชั้น (layer) ระหว่างผิวของซิลิกา จะทำให้สารเกิดพาร์ติชันระหว่างชั้นกับเฟสที่เคลื่อนที่นั้นเอง

เมื่อใช้การแยกสารด้วย reverse phase สารจะอีลูทออกมาตามลำดับของสภาพขั้ว (in order of polarity) ยิ่งมีสภาพขั้วมากจะถูกอีลูทออกมาก่อนพยายามคิดไว้ว่า การแยกสารด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

reverse phase เป็นการเกิดพาร์ติชันระหว่างสารที่กระจายอยู่ระหว่างเฟสที่อยู่กับที่ชนิดไม่มีขั้ว (non-polar stationary phase) กับเฟสที่เคลื่อนที่ชนิดมีขั้ว (polar mobile phase) ทำให้สารที่ไม่มีขั้วจะละลาย(หรือถูกยึด) กับเฟสที่อยู่กับที่แล้วค่อย ๆ ถูกอีลูทออกมาหลังสารที่มีขั้ว เราอาจจะเปลี่ยนความสามารถในการกระจายของสารในสองเฟสได้ ด้วยการเปลี่ยนสภาพขั้วของเฟสที่เคลื่อนที่เช่น ทำให้เฟสที่เคลื่อนที่มีสภาพขั้วลดลง (เพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำ) ทำให้ค่าการคงไว้ของสารที่ไม่มีขั้วลดลง แต่เราอาจจะเปลี่ยนสภาพขั้วของเฟสที่อยู่กับที่ก็ได้ เช่น ทำบอนด์เฟสที่มี nonpolar groups ที่ต่างกัน

สำหรับแยกของผสม เราพบว่า –CN bonded phase ใช้เป็นได้ทั้ง normal หรือ reverse phase จะเห็นว่าอัลกอฮอล์นั้นมีสภาพขั้วมากสุดจะถูกอีลูทก่อนและอีเทอร์มีสภาพขั้วต่ำสุดจะอีลูทออกทีหลัง การเปลี่ยนบอนด์เฟสจาก C-18 เป็น –CN ทำให้เวลาการคงไว้ลดลง

รูปที่ 18 Reverse phase chromatogram ของสารผสม

รูปที่ 18 แสดงการใช้ reverse phase ในการแยกยา tricyclic antidepressant (ยาบรรเทาความเจ็บปวด) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทเบสอ่อน (จะให้โปรตอนได้ดี) ทำให้เป็นสารที่สภาพขั้วสูงมากที่จะถูกดูดซับด้วยหมู่ silanol ที่ไม่เกิดบอนด์เฟส (unreacted silanol groups) ได้ดีมาก ทำให้ค่าเวลาการคงไว้นั้นมาก พีกที่ได้จะเป็นลักษณะหาง (peak tailing) ดังรูปที่ 18(i) จึงได้ใช้ end-capped bonded phase มาช่วยในการแยก และใช้เฟสที่เคลื่อนที่ที่มีความเข้มข้นมากกว่าของสารที่จะแยก (จะทำให้หมู่ silanol ที่ไม่เกิดบอนด์เฟสดูดซับกับเฟสที่เคลื่อนที่แทน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chiral Stationary Phases (เฟสที่อยู่กับที่ชนิดไครัล)

ปัจจุบันนี้เทคนิค HPLC ได้ถูกใช้ในการแยกสารจำพวก ออปติกัลป์ไอโซเมอริซึม (optical isomerism, โมเลกุลสองโมเลกุลที่มีสูตรโมเลกุลเหมือนกัน มีโครงสร้างเป็นเงากระจกซึ่งกันและกัน แต่โครงสร้างทั้งสองไม่สามารถวางทับกันได้อย่างสนิท) ที่มีคาร์บอนอะตอมไม่สมมาตรกัน เรียกว่า อะซิมเมตริกคาร์บอนอะตอม (asymmetric carbon atom) หรือไครัล (chiral center) เราจึงเรียกเป็นสารประกอบไครัลสารประกอบไครัลที่สามารถเกิดเป็นคู่ออปติกกับไอโซเมอร์ที่เป็นเงากระจกซึ่งกันและกันได้จะถูกเรียกว่า อิเนนทิโอเมอร์ สามารถเกิดออปติกัลป์เอกติวิตี และสามารถจะเกิดการดูดซับ ได้บ้าง เมื่อสังเคราะห์สารประกอบไครัลขึ้นมาในห้องปฏิบัติการจะได้อิเนนทิโอเมอร์ทั้งสองชนิดผสมกันในปริมาณที่เท่าๆกัน จะไม่ปรากฏการหมุนแสงโพลาไรซ์ หรือแสดงออปติกัลป์เอกติวิตี เพราะการหมุนไปทางขวาหรือทางซ้ายเกิดขึ้นเท่า ๆ กัน จึงกักล้างกันหมด สารที่มีอิเนนทิโอเมอร์ผสมในปริมาณเท่า ๆ กัน เรียกว่า สารผสมเรซีมิก (recemic mixture)

ความต้องการที่จะแยกสารผสมเรซีมิกให้ออกจากกันก็ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยเทคนิค HPLC โดยการใช้เฟสที่อยู่กับที่ชนิดพิเศษที่เรียกว่า เฟสที่อยู่กับที่ชนิด ไครัล (CSPs) ที่มีโมเลกุลของไครัลไปเกิดบอนด์เฟสกับ microparticular silica คลไกการทำงานนั้นก็คือตัว CSPs จะดัดจับ (discriminate) สารที่เป็นอิเนนทิโอเมอร์ไว้คอลัมน์ที่แพค CSPs ไว้นั้นมีขายในท้องตลาดซึ่งมีราคาแพงเป็นสามถึงห้าเท่าของแพคคอลัมน์ทั่ว ๆ ไป CSPs ที่ควรรู้จักมีดังนี้

a) "Pirkle" CSPs เป็นสารจำพวก Chiral phenyl glycine หรืออนุพันธ์ของ leucine (leucine derivative) ที่เกิดบอนด์เฟสกับซิลิกาเจลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาย 5 μm บอนด์เฟสดังกล่าวจะอยู่ในรูปไอออนิก หรือในรูปโควาเลนต์ดังรูปที่ 19 (i)
โดยทั่ว ๆ ไปชนิดไอออนิดจะตรึง สารประกอบไครัลได้ดีกว่าชนิดโคเวเลนต์ แต่จะต้องใช้เฟสที่เคลื่อนที่ที่เป็น nonaquwous และมีสภาพขั้วค่อนข้างต่ำ (ในกรณีชนิดโคเวเลนต์ใช้เฟสที่เคลื่อนที่ที่เป็น aqueous หรือ nonaqueous ก็ได้)

b) โปรตีนบางชนิดสามารถจะเลือกเกิดปฏิกิริยากับสารประกอบไครัลได้ เช่น CSPs จำพวก bovine serum albunin ที่เกิดเป็นบอนด์เฟสกับ microparticulate silica โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตที่มีปริมาณของ 1-propanol ปนอยู่เล็กน้อยเป็นเฟสที่เคลื่อนที่

c) CSPs ที่อาศัยการแลกเปลี่ยนลิแกนด์ (ligand exchange) โดยการเกิดพันธะระหว่างสารประกอบไครัลประเภทกรดอะมิโนกับ $Cu^{2+}$ ไอออน โดยมีสารละลายเกลือของ $Cu^{2+}$ ไอออน (เข้มข้น $10^{-3}$ โมล/ลิตร) กับตัวทำละลายอินทรีย์ใช้เป็นเฟสที่เคลื่อนที่ หลักการนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ใช้แยก α-amino acid กับสารประกอบไครัลบางชนิดโดยการเกิดเป็นสารประกอบคีเลตกับ $Cu^{2+}$ ไอออน

d) Cyclodextrin bonded phases

Cycloextrins จัดเป็นสารจำพวก cyclic chiral carbohydrate ที่ประกอบด้วยหน่วยของกลูโคส 6 ถึง 12 หน่วย ส่วนที่นำมาทำเป็น CSPs ได้แก่ α, β และ γ cyclodextrin (มีหน่วยกลูโคส 7, 8 และ9 หน่วยตามลำดับ) นำมาทำบอนด์เฟสกับอนุภาคซิลิกาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5μm รูปร่างของ cyclodextrin จะมีลักษณะคล้ายกับกระบอกตวงเปิด ภายในจะกลวง ดังนั้นกลไกการทำงานของมันคือ สารที่มีความแตกต่างกันทางด้านโครงสร้าง) โดยเฉพาะสารจำพวกอิแนนทิโอเมอร์ ดังแสดงในรูป 19 (ii)

รูปที่ 19 เฟสที่อยู่กับที่ชนิดไครัล

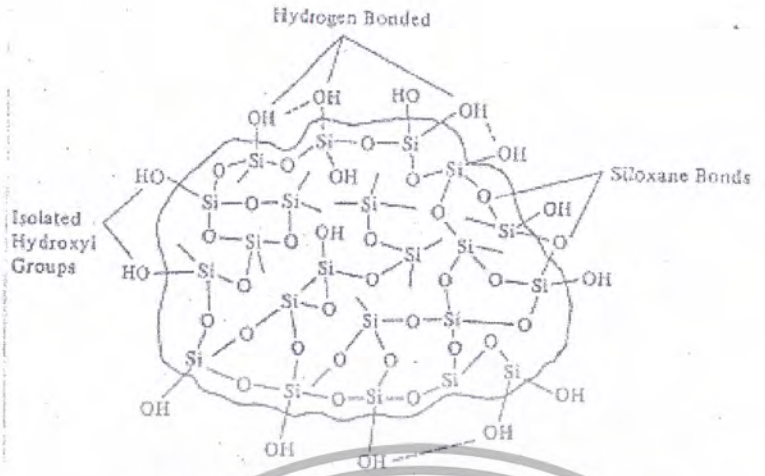
เฟสที่เคลื่อนที่ที่ใช้กับ cyclodextrin CSPs ก็เหมือนกับที่ใช้ใน reverse phase chromatography เช่น น้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเอธานอลหรือ acetonitrile ปนอยู่เล็กน้อย

HPLC ประเภทการดูดซับ (Adsorption Chromatography)

เทคนิคนี้จะใช้ซิลิกาเจลที่ไม่ได้ผ่านขบวนการทำบอนด์เฟส เป็นเฟสที่อยู่กับที่ และใช้ส่วนของหมู่ silanol (So-OH) บนผิวของซิลิกาเป็นตัวดูดซับ (แรงที่เกิดขึ้นในระหว่างการดูดซับอาจเป็นแรงไดโพล-ไดโพล แรงเหนี่ยวนำไดโพล และพันธะไฮโดรเจนอย่างใดอย่างหนึ่ง)

หมู่ silanol บนผิวของซิลิกามี 2 แบบคือ isolated silanol group กับ hydrogen bond group ดังแสดงในรูปที่ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

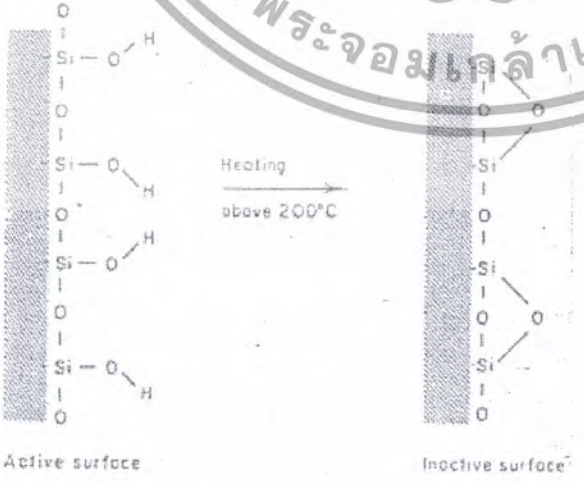



รูปที่ 20 โครงสร้างบนผิวของซิลิกา

การที่ผิวของซิลิกาจะมีหมู่ silanol เป็นแบบใดขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียม ทั้ง 2 แบบมีความสามารถในการดูดซับต่างกัน ทั้งสองแบบมีความไว (active) หรือเป็นแหล่งกัมมันต์ (active site) ได้ดี แต่จะไม่มีความไวในการดูดซับเมื่อหมู่ silanol ทั้ง 2 แบบถูกกับความชื้นหรือเฟสที่เคลื่อนที่มีสภาพขั้วมาก เมื่อให้ความร้อนกับซิลิกาประมาณ 200°C หมู่ silanol จะเปลี่ยนไปเป็นหมู่ Siloxane (Si-O-Si) ดังรูปที่ 20 ทำให้มีความสามารถในการที่จะตรึงสารที่มีขั้วลดลง

เมื่อผ่านโมเลกุลของสารที่ต้องการแยก , X กับเฟสที่เคลื่อนที่ , S ลงไปยังเฟสที่อยู่กับที่ (ซิลิกา) จะทำให้เกิดการแย่งกันในการดูดซับบนผิวซิลิกา

$$X_m + nS_{ads} \rightleftharpoons X_{ads} + nS_m$$




รูปที่ 21 การเปลี่ยนหมู่ Si-OH ไปเป็น Si-O-Si โดยการให้ความร้อนกับซิลิกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$X_m$ และ $X_{ads}$ แทนโมเลกุลของสาร X ที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่ และถูกดูดซับไว้ที่ผิวของซิลกา $S_{ads}$ แทนเฟสที่เคลื่อนที่ถูกดูดซับบนผิวซิลิกา และ $S_m$ แทนโมเลกุลของเฟสที่เคลื่อนที่ในเฟสที่เคลื่อนที่ n แทนจำนวนโมเลกุลของตัวทำละลายที่ถูกดูดซับดังนั้นที่ภาวะสมดุลเขียนได้ว่า

$$K = [X_{ads}][S_m]^n / [X_m][S_{ads}]^n$$

จะแสดงให้เห็นว่าเฟสที่เคลื่อนที่ถูกดูดซับบนผิวซิลิกาได้มาก จึงทำให้โมเลกุลของสารที่จะแยกถูกดูดซับได้น้อยลง เพื่อต้องการจะให้โมเลกุลของสารถูกดูดซับได้มากขึ้น จึงลดสภาพขั้วของเฟสที่เคลื่อนที่ลง ทำให้โมเลกุลของสารมีขั้วถูกตรึงไว้บนซิลิกาได้มากจะได้พีกที่หาง ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเหมาะกับการแยกสารที่มีสภาพขั้นต่ำ หรือมีสภาพขั้วปานกลาง (low or medium polarity)

ลำดับของการดูดซับบนผิวของซิลิกามีดังนี้ :

saturated hydrocarbons 〈 olefins 〈 aromatics organic halogen compounds 〈 sulfides 〈 ether 〈 nitro compounds 〈 esters aldehydes ketones 〈 alcohols amines 〈 sulphones 〈 sulphoxides 〈 amides 〈 carboxylic acids

รูปที่ 22 การใช้เทคนิค HPLC ประเภทการดูดซับแยกสารประกอบอะโรเมติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 22 เมื่อดูลำดับการดูดซับแล้ว $C_6H_5Br$ จะถูกอีลูทออกมาก่อน $C_6H_5COOCH_3$ แล้วตัวที่อีลูทท้ายสุดคือ $C_6H_5CH_2OH$

HPLC ประเภทแยกขนาดจำเพาะ : (Size Exclusion Chromatography)

HPLC ประเภทนี้จะแยกสารโดยอาศัยขนาดจำเพาะ (ขนาดโมเลกุลและรูปร่างของโมเลกุล) บางทีเรียกเทคนิคนี้ว่า gel permeation chromatography เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) และอาจเรียกเทคนิคนี้ว่า gel filtration chromatography เมื่อใช้สารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย (aqueous solvents) หลักการแยกโดยเทคนิคนี้อาศัยหลักการที่ว่าองค์ประกอบต่าง ๆ จะซึมผ่านรูพรุนของวัสดุที่ใช้บรรจุคอลัมน์ได้มากน้อยต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุลชนิดนั้นในสารละลายทำให้ถูกชะออกมาในเวลาต่างกัน และเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลขนาดเล็กออกจากโมเลกุลขนาดใหญ่

เฟสที่อยู่กับที่ที่ใช้เป็นอนุภาคที่มีรูพรุน (porous particles) ที่มีที่ควบคุมขนาดของรูพรุน การแยกสารโดยเทคนิคนี้จะต้องไม่มีแรงกระทำระหว่างสารที่จะแยกกับผิวของเฟสที่อยู่กับที่ โมเลกุลที่มีขนาดเล็กจะสามารถเข้าไปสู่รูพรุนของเฟสที่อยู่กับที่และโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนก็จะถูกเฟสที่เคลื่อนที่พาออกจากคอลัมน์ โมเลกุลยิ่งมีขนาดเล็กจะใช้เวลานานที่จะถูกตรึงไว้ในเฟสที่อยู่กับที่

ในเทคนิคการแยกขนาดจำเพาะนั้น ปริมาตรทั้งหมดของเฟสที่เคลื่อนที่เท่ากับผลบวกปริมาตรช่องว่างของเฟสที่อยู่กับที่ (การแพคคอลัมน์จะแพคไม่แน่นจะเกินไปย่อมมีช่องว่างเรียกว่า void volume, $V_0$) กับปริมาตรของรูพรุนของเฟสที่อยู่กับที่เรียกว่า interstitial volume, $V_i$)

$$V = V_0 + V_i$$

ดังนั้นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ จะถูกกีดกันจากรูพรุน ($V_i = 0$) จึงมีปริมาตรการคงไว้เท่ากับ $V_0$ สำหรับโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก จะเข้าไปอยู่ในรูพรุน จึงมีปริมาตรการคงไว้เท่ากับ $(V_0 + V_i)$ ในกรณีโมเลกุลขนาดปานกลางอาจจะเข้าไปในรูพรุนได้บ้าง หรือไม่ได้เลย จึงมีปริมาตรคงไว้อยู่ระหว่าง $V_0$ กับ $(V_0 + V_i)$ (จำไว้ว่าการแยกสารด้วยขนาดจำเพาะนั้นเป็นกลไกของการแยก ไม่เกิดขบวนการดูดซับ, การพาร์ติชันหรือขบวนการแลกเปลี่ยนไอออน) สารตัวอย่างที่แยกโดยวิธีนี้จะถูกอีลูทออกมาในระหว่างปริมาตร $V_0$ และ $(V_0 + V_i)$

สมัยก่อนนิยมใช้เฟสที่อยู่กับที่เป็นเจลของสารที่มีพันธะข้าม (gels of cross-linked) ของ dextran (สารคาร์บอไฮเดรตชนิดหนึ่ง) หรือ polyacrylamide สารทั้งสองไม่ทนต่อการถูกอัดด้วยความดันสูง (ถูกเลิกใช้ไป)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันได้ใช้เฟสที่อยู่กับที่ที่เป็นวัสดุ microparticulate ที่ประกอบด้วย styrenedivinylbenzene copolymers หรือของซิลิกาเจล หรือของแก้วที่มีรูพรุน (porous glass) จะมีขนาดของรูพรุนหรือโพลงขนาดต่าง ๆ กันที่สามารถจะใช้แยก Mr ที่ต่าง ๆ กันได้ ชนิด styrene-divinylbenzene นี้จะใช้รวมกับตัวทำละลายอินทรีย์ (เพราะถ้าเป็น aqueous solvents เกิดการหดตัว (shrinkage) ของเฟสที่อยู่กับที่ทำให้เกิด void (ช่องว่าง) และร่องมากทำให้ประสิทธิภาพในการแยกลดลง

ตารางที่ 7 การใช้เฟสที่อยู่กับที่ชนิด styrene-divinyl benzene ในการแยกขนาดของโมเลกุล

| Pore size, A (ขนาดของรูพรุน) | Mr range ช่วงของมวลโมเลกุลของสาร |
|---|---|
| 100 | 50-1500 |
| 500 | 100-$10^4$ |
| $10^3$ | 200-3 x $10^4$ |
| $10^4$ | 5 x $10^3$ -6 x $10^5$ |
| $10^5$ | 5 x $10^4$ -4 x $10^6$ |
| $10^6$ | 2 x $10^5$ -1 x $10^7$ |

เฟสที่อยู่กับที่ชนิด styrene-divinyl benzene ที่ใช้ในตารางที่ 7 มีชื่อการค้าว่า "Ultrastyragel" ผลิตโดยบริษัท Water มีขนาดอนุภาค 10 µm มีความสูงของเพลททางทฤษฎีเท่ากับ 46,000 เพลท / เมตร มีขนาดของรูพรุนตั้งแต่ 100 $A^{\circ}$ ขึ้นไปและสามารถใช้ได้ในอุณหภูมิถึง 145 $^{\circ}C$

ในกรณีใช้ซิลิกาเป็นเฟสที่อยู่กับที่สามารถจะใช้เฟสที่เคลื่อนที่ที่เป็นทั้งตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) และ aqueous solvent

การเลือกเฟสที่เคลื่อนที่สำหรับเทคนิคนี้ค่อนข้างจะง่ายกว่า HPLC ประเภทอื่น ๆ คือใช้ตัวทำละลายเพียงตัวเดียว (ไม่ต้องผสมกับตัวทำละลายอื่น ๆ ) เช่น ถ้าสารเป็นจำพวกโพลีเมอร์ เราจะใช้ tetrahydrofuran หรือ chlorinated hydrocarbon (สามารถละลายโพลีเมอร์ได้ ณ อุณหภูมิห้อง) โพลีเมอร์บางชนิด เช่น polyethene ต้องการอุณหภูมิ 150 $^{\circ}C$ ในการละลาย และนอกจากนี้ยังใช้ di หรือ trichlorobenzene เป็นเฟสเคลื่อนที่

เทคนิคการแยกขนาดจำเพาะนั้นถูกนำมาใช้แยกสารจำพวกโพลีเมอร์ หรือโพลีเมอร์สังเคราะห์ที่มีมวลโมเลกุล (Mr) ต่าง ๆ กัน รวมถึงยาฆ่าแมลงที่ตกค้าง (pesticide residues)

<u>สรุปเกี่ยวกับเทคนิคการแยกจำเพาะ</u>

1. ใช้แยกโมเลกุลขนาดเล็กออกจากโมเลกุลขนาดใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ใช้แยก macromolecular species ที่มีมวลโมเลกุลตั้งแต่ 400 ถึง $10^{10}$

3. ใช้แยกโพลีเมอร์ธรรมชาติ และโพลีเมอร์สังเคราะห์ เช่น polysaccharides, โปรตีน , เรซิน (resins), polyesters และสารยึดติด (adhesives)

HPLC ประเภทประเภทการแลกเปลี่ยนไอออน (Ion Exchange Chromatography)

เรซินแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange resins) ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ละลายน้ำ แข็ง และจับกันเป็นโครงสร้างสามมิติ ตรงผิวของเรซินจะมีประจุบวกหรือประจุลบที่สามารถจะแลกเปลี่ยนไอออนที่มีประจุตรงข้ามกับผิวของเรซิน เพื่อให้เกิดความเป็นกลางขึ้น (ประจุบนผิวของเรซินเรียกว่า ionisable site ประจุไอออนที่ใช้แลกเปลี่ยนกับไอออนอื่น ๆ บน ionisable site เรียกว่า counter ion)

สมมติว่า ionization site เป็นประจุบวกดังนั้น counter ion จะเป็นประจุลบ เรซินดังกล่าวจะสามารถแลกเปลี่ยนไอออนลบจากสารละลายได้

$$R^+Y^- \text{ (resin)} + X^- \text{ (solution)} \rightleftharpoons R^+X^- \text{ (resin)} + Y^- \text{ (solution)}$$

จะเห็นว่า $Y^-$ ไอออนเป็น counter ion ที่จับกัน ionisable site, $R^+$ ของเรซินทำให้เรซินดังกล่าวแลกเปลี่ยนแลกเปลี่ยนกับไอออนลบ, $X^-$ จากสารละลายได้ แต่ถ้าต้องการแลกเปลี่ยนไอออนบวก, $X^+$ จากสารละลาย counter ion บนเรซินควรมีประจุบวก โดย ionisable site ของเรซินจะมีประจุลบ, R

$$R^-Y^+ \text{ (resin)} + X^+ \text{ (solution)} \rightleftharpoons R^-X^+ \text{ (resin)} + Y^+ \text{ (solution)}$$

HPLC ประเภทแลกเปลี่ยนไอออนจึงเป็นการแยกโดยการเกิดแรงกระทำระหว่าง ไอออนในเฟสที่เคลื่อนที่กับหมู่แลกเปลี่ยนไอออนบนเฟสที่อยู่กับที่

วัสดุที่นิยมนำมาทำเป็นเรซินแลกเปลี่ยนไอออนก็ได้แก่ สารโพลีเมอร์ คือ polystyrene และ polymethy-methacrylate (pmma) ทั้งสองชนิดนี้จะมีร้อยละของสารที่ทำให้เกิดพันธะข้าม (a cross-linking agent) ได้แก่ divinylbenzene (dvb) (การเติม dvb ลงไปจัดเป็นขบวนการ polymerization) ร้อยละของพันธะข้ามหรือองศาของพันธะข้ามจะมีผลต่อโครงสร้างทางกายภาพของเรซิน ถ้าร้อยละของพันธะข้ามมากเรซินจะบวมน้ำได้มาก โครงสร้างจะอ่อนและนุ่ม

อย่างไรก็ตาม ถ้าร้อยละของพันธะข้ามมากจะลดความพรุน (porosity) ของเรซินทำให้ลดอัตราการแลกเปลี่ยนไอออนลง จะมีผลต่อความจุรวมของเรซิน (total capacity) (ค่าความจุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมของเรซินในทางฟฤษฎีนั้นเป็นความสามารถและเปลี่ยนไอออนได้สมบูรณ์ หรือ sample loading นั้นเอง

ขบวนการโพลีเมอร์ไรเซชันจะทำให้เกิดรูพรุน และการเกิดเป็นอนุภาคทรงกลมของเรซิน (spherical particles of the resin) H อะตอมสามารถจะถูกแทนที่ด้วยไอออนบวก (แคตไอออน) ได้ สำหรับ polystyrene resins นั้นไม่มีหมู่ไอออนิก (ionic groups) อยู่เลย ดังนั้นเราจะเติมหมู่ไอออนิกลงไปหลังขบวนการโพลีเมอร์ไรเซชัน หมู่ไอออนิกที่จะเติมลงไปนั้น จะทำให้เกิด เรซินแลกเปลี่ยนไอออนได้ 2 ชนิด (4 แบบ) ดังนี้

1. เรซินแลกเปลี่ยนแคตไอออน : strongly acidic sulphonic acid
   (Cation-exchangers) $-SO_3^-$
   weakly acidic carboxylate
   $-COO^-$
2. เรซินแลกเปลี่ยนแอนไอออน : strongly basic quaternary
   (Anion-exchanger) $-N^+R_3$
   weakly basic tertiary ammonium
   $-N^+R_2H$

การบอกถึงเรซินแลกเปลี่ยนไอออนที่แรง (strong ion-exchange resin) หรือเรซินแลกเปลี่ยนไอออนที่อ่อน (weak ion-exchange resin) นั้นจะทำให้ทราบถึงคุณสมบัติในการแลกเปลี่ยนไอออนกับการเปลี่ยนแปลงช่วง pH พบว่า

ก. เรซินแลกเปลี่ยนไอออนที่แรงที่มีหมู่กรดแก่ หรือหมู่เบสแก่อยู่จะทำให้เกิดการไอออนไนซ์ได้ในช่วง pH กว้าง ๆ เช่น เรซินแลกเปลี่ยนแคตไอออนที่แรงที่มี sulphonic acid อยู่จะเกิดการแตกตัวได้หมดที่ pH มากกว่า 2 สำหรับเรซินแลกเปลี่ยนแอนไอออนที่แรงมี quanternary ammonium อยู่จะแตกตัวได้หมดจนถึง pH เท่ากับ 10

ข. เรซินและเปลียนไอออนที่อ่อน เช่น เรซินและเปลี่ยนแคตไอออนที่อ่อนที่มี carboxylic acid อยู่ และเรซินแลกเปลี่ยนแอนไอออนที่อ่อนที่มี tertiary ammonium อยู่ จะมีความจุในการแลกเปลี่ยนสูงกว่าพวกเรซินแลกเปลี่ยนไอออนที่แรง แต่แตกตัวได้ไม่หมด (อยู่ในช่วง pH จำกัด)

<u>หมายเหตุ</u> ความจุของเรซินสำหรับไอออน (capacity of resin for ions) เป็นค่าที่บอกถึงความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนต่อหน่วยปริมาตรของเรซินที่ชื้น (wet volumn

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

capacity) หรือต่อหนึ่งหน่วยน้ำหนักของ เรซินที่แห้ง (dry weight capacity) โดยปกติจะใช้หน่วยเป็น milliequixalents per g of dry resin หรือโมลต่อกรัมของเรซินที่แห้ง พบว่า เรซินของกรดอ่อนมีความจุ $10^{-2}$ โมล/กรัม เรซินของกรดแก่มีความจุ $5 \times 10^{-3}$ โมล/กรัม และเรซินของเบสแก่มีความจุ $4 \times 10^{-3}$ โมล/กรัม

ตารางที่ 8 วัสดุที่ใช้เป็นเรซินแลกเปลี่ยนไอออนที่ใช้ในเทคนิค HPLC

| | Styrene-dvb | porous layer beads | bonded silica |
|---|---|---|---|
| Particle size, μm | 5-20 | 30-50 | 5-10 |
| Capacity | high | low | high |
| Sample loading | large | small | moderate |
| Usable pH range | 2-14 | 2-9 | 2-8 |
| Packing method | slurry | dry | slurry |
| Efficiency | low | → | high |

เรซินชนิด styrene-dvb มีความอยู่ตัวมากกว่าอีก 2 ชนิด ในตาราง

ในเทคนิค ion-exchange chromatography เฟสที่เคลื่อนที่นิยมใช้สารละลายบัฟเฟอร์หรือสารละลายเกลือชนิดต่าง ๆ ในการหาปริมาณของไอออนต่าง ๆ ด้วยเทคนิคนี้จะใช้คอลัมน์ 2 คอลัมน์ เราจะเรียกว่า Dual-column ion chromatography โดยคอลัมน์อันแรกเรียกว่า separating column ภายในจะบรรจุเรซินของแคตไอออนหรือเรซินของแอนไอออนที่มีความจุต่ำ (low capacity) คอลัมน์อันสองเรียกว่า suppressor column ที่ต่อกับตัวตรวจวัดสัญญาณสภาพการนำไฟฟ้า (conductivity detector) ภายในจะประกอบด้วยเรซินที่มีประจุตรงข้ามกับในseparaing column ที่มีความจุของเรซินสูงด้วย เมื่อใช้ conductivity detector แล้ว เฟสที่เคลื่อนที่ควรจะมี ionic strength ต่ำ ($10^{-3}$ - $10^{-4}$ โมล/ลิตร)

Suppressor column จะช่วยลดสภาพการนำไฟฟ้าของเฟสที่เคลื่อนที่ลง นิยมใช้ NaOH หรือ HCl เป็นเฟสที่เคลื่อนที่ในการแยกพวก โลหะอัลคาไล, โลหะอัลคาไลน์เอริท, ammonium และพวก amine ต่าง ๆ หรือใช้แยกพวกแคตไอออนนั้นเอง ส่วน $Na_2CO_3$/$NaHCO_3$ เป็นเฟสที่เคลื่อนที่สำหรับพวกแอนไอออน เช่น แอนไอออนของสาร อนินทรีย์ต่าง ๆ กรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ และสารอินทรีย์พวกฟอสเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HPLC ประเภทการเกิดไอออนคู่ (Ion-Pair Chromatography)

หลักการมีดังนี้ หาไอออนที่เหมาะสมมาจับเป็นไอออนคู่กับไอออนที่เราจะแยก ไอออนที่เหมาะสม จะเรียกว่า pairing agent จากนั้นก็ผ่านลงใน reverse phase ของ C-18 โดยมีตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเฟสที่เคลื่อนที

สมมติว่ามีไอออน $A^+$ อยู่ในสารละลาย ($A^+_{(a0)}$) จากนั้นเอา paring agent $B^+_{(a0)}$ ไปทำให้เกิดเป็นไอออนคู่

$$A^+_{(a0)} + B^+_{(a0)} = (A^+B^-)_{org}$$

($A^+B^-$) นั้นดูเหมือนว่าไม่เป็นสารประเภทไอออนิก จัดเป็น nonionic polar molecule ที่สามารถระบายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ ในทำนองเดียวกันไอออนลบในสารละลายเราจะทำให้เกิดเป็นไอออนคู่กับ paring agent ที่เป็นแคตไอออน

สรุปว่าเทคนิค ion-pair chromatography จะใช้ reverse phase (C-18) ในการแยกโดยผ่าน ion-pair reagent (สารที่ทำให้เกิดไอออนคู่) ปนไปกับเฟสที่เคลื่อนที่ ไอออนคู่ที่แยกได้จะเป็นโมเลกุลที่เป็นกลาง

สารที่ทำให้เกิดไอออนคู่กับแคตไอออนได้แก่ alkyl sulphonic acid หมู่อัลคิลอาจเป็น pentyl, hexyl, heptyl หรือ octyl สำหรับเกิดเป็นไอออนคู่กับแอนไอออนได้แก่ tetrabutylammonium หรือ dibutylamine ammonium salts

ค่าปริมาณการคงไว้ในเทคนิค ion-pairing chromatography มีดังนี้

1. เปลี่ยนความยาวสายโซ่ของหมู่อัลคิลใน ion-pair reagent จะทำให้เพิ่มค่าปริมาณการคงไว้

2. เปลี่ยนความเข้มข้นของ pairing agent จะทำให้เพิ่มค่าปริมาณการคงไว้

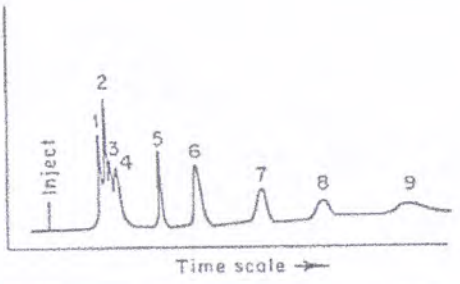
3. ปรับ pH ของสารละลาย และปรับความเข้มข้นของ pairing agent และเลือกคอลัมน์ที่ใช้ให้เหมาะสม (จะไม่มีผลต่อปริมาณการคงไว้)

4. เปลี่ยนความเข้มข้นของเฟสที่เคลื่อนที่ (ใน reverse phase เรามีหลักอยู่ว่า ถ้าปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้น สภาขั้วของเฟสที่เคลื่อนที่จะลดลง ทำให้ปริมาณการคงไว้ลดลง

การทำอีลูชันแกรเดียนต์ในเทคนิค HPLC (Gradient Elution)

*เหตุผลว่าทำไมจึงต้องทำอีลูชันแกรเดียนต์* ก็เพราะว่าสารตัวอย่างที่จะนำมาแยกนั้นมีปนกันอยู่หลาย ๆ ชนิด ถ้าเราทำการแยกโดยขบวนการ isocratic elution นั้นคงเป็นไปไม่ได้ เนื่องจากการหาเฟสที่เคลื่อนที่ให้เหมาะสมกับค่า k' นั้นทำได้ยาก

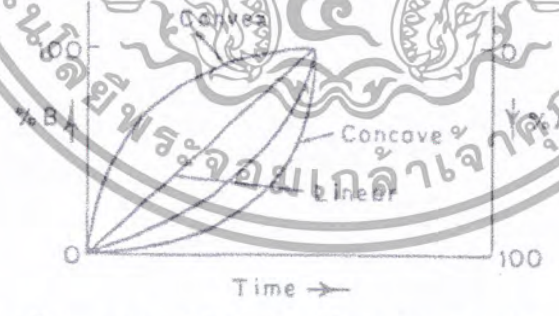
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 23 การแยกด้วยภาวะ isocratic elution

จากรูปที 23 จะเห็นว่าพีกแรก ๆ จะมีค่า k' อยู่ระหว่าง 0 และ 1 ยากที่จะแยกออกจากกันได้ พีกที่ 5 และ 6 แยกออกจากกันได้ชัด แต่พีกที่ 7, 8 และ 9 เริ่มจะหายไปหรือกลายเป็น tailing peak เมื่อใช้เวลานานในการอีลูท เพื่อจะให้พีกแรกถูกแยกออจากกัน (เพิ่มค่า k') โดยใช้เฟสที่เคลื่อนที่มีกำลังในอีลูทต่ำ ๆ ซึ่งจะทำให้สารใช้เวลานานอยู่ในเฟสที่อยู่กับที่ และเราจะต้องลดค่า k' ลงสำหรับพีกที่ 7-9 โดยให้เฟสที่เคลื่อนที่มีกำลังในการอีลูทสูง ๆ (greater eluting power)

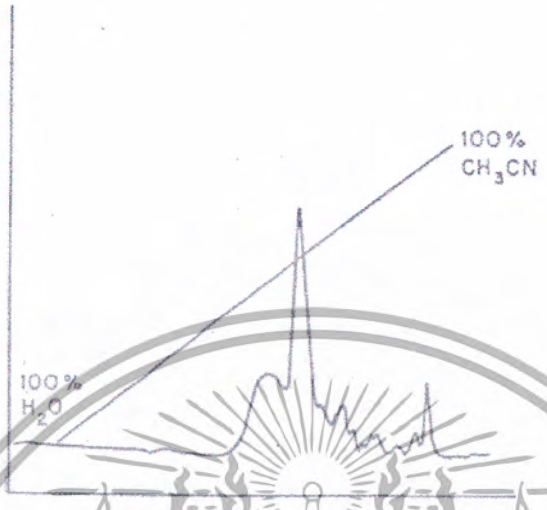
ด้วยเหตุผลข้างต้นจึงได้นำวิธีอีลูชันเกรเดียนต์ โดยการเปลี่ยนแปลงสภาพขั้วของเฟสที่เคลื่อนที่ในขณะที่แยกสาร โดยใช้ตัวทำละลายสองชนิด (อย่างน้อย) ที่มีกำลังในการอีลูทต่างกันมาทำเปลี่ยนแปลงสัดส่วนในการผสมกัน รูปร่างของการเกิดเกรเดียนต์อาจเป็นเส้นตรง (linear), เป็นรูปเว้า (concave) หรือรูปนูน (convex) ดังรูปที่ 24




รูปที่ 24 เกรเดียนต์โลโพถ์ระหว่างตัวทำละลาย Bและ A

การทำอีลูชันเกรเดียนต์ควรบันทึกแบลงค์เกรเดียนต์ (blank gradient) ด้วย ดังรูปที่ 25จะเห็นเส้นตรง (เรียกว่า blank gradient) จาก 100% ของน้ำถึง 100% acetonitrile บน C-18 คอลัมน์ พีกจะเริ่มจากน้ำแล้วค่อย ๆ เพิ่มสัดส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์เกิดการเกรเดียนต์ขึ้นแล้วสารก็จะเริ่มถูกอีลูทออกมา ถ้าไม่ทำ blank gradient เราจะไม่ทราบว่าพีกนั้นมาจากสารตัวอย่างหรือมาจากเฟสที่เคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



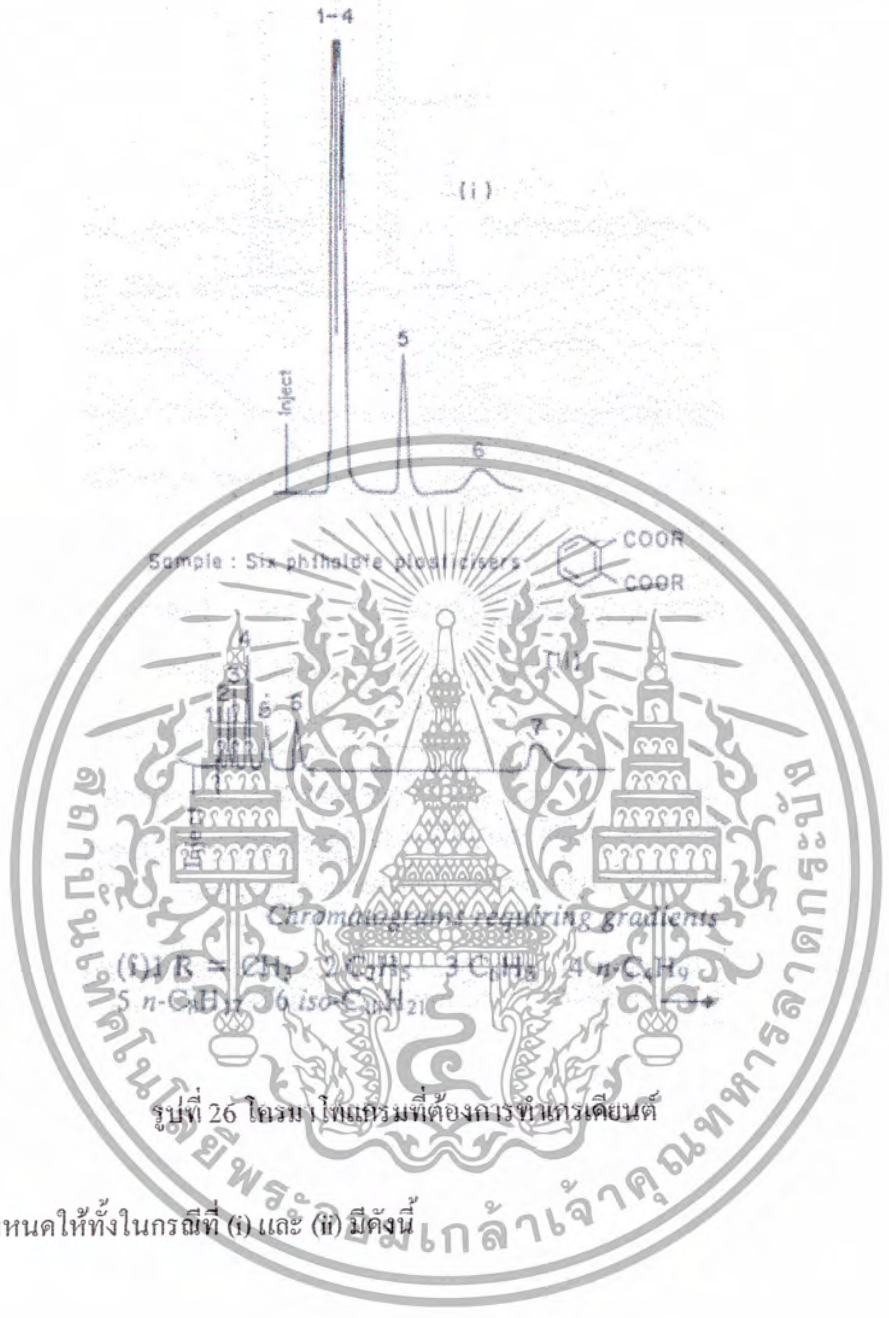

รูปที่ 25 การบันทึก blank gradient

Column: 10 μm C-18 bonded phase, 30 cm × 4 mm
Mobile phase: methanol/water 90:10. Flow rate 2 $cm^3$ $min^{-1}$
Detector: Uv absorption, 254 nm

(ii)

Sample: 1 benzene 2 diphenyl ether
3 ethyl benzoate 4 carbazole
5 nitrobenzene
6 diphenyl ketone
7 benzyl alcohol
Column: 5 μm C-18 bonded phase. 30 cm × 1.8 mm
Mobile phase: dichloromethane/hexane 40:60. Flow rate 2 $cm^3$ $min^{-1}$
Detector: Uv absorption, 254 nm.

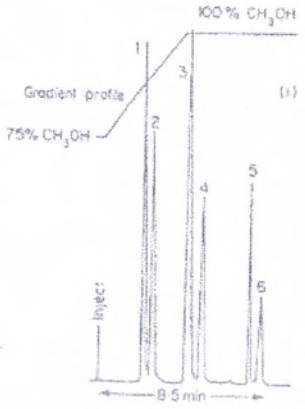
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

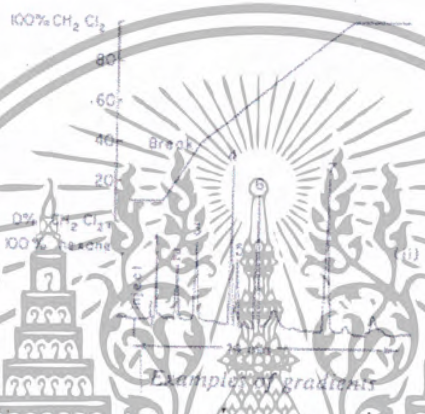



รูปที่ 26 โครมาโทแกรมที่ต้องการทำแกรเดียนต์

ภาวะที่กำหนดให้ทั้งในกรณีที่ (i) และ (ii) มีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 27 โครมาโทแกรมที่ทำเกรเดียนต์ในรูปที่ 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3

# วิธีดำเนินการวิจัย

**3.1 การเตรียมวัตถุดิบเพื่อใช้ในการสกัด**

1. นำเมล็ดองุ่นมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น หรือน้ำ de-ionize ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. นำไปทำให้แห้ง โดยใช้ตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ประมาณ 72 ชั่วโมง
3. นำเมล็ดองุ่นแห้งที่ได้มาบดให้เป็นผง
4. เก็บผงเมล็ดองุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**3.2 การสกัดเมล็ดองุ่น**

1. การสกัดด้วยน้ำ
   1.1 นำผงเมล็ดองุ่นมาชั่งให้ได้ 3 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นหรือน้ำ de-ionize อยู่ 15 มิลลิลิตร
   1.2 ทำการแช่ที่อุณหภูมิ 60 , 70 , 80 และ 90องศาเซลเซียส
   1.3 เมื่อครบ 1 ชั่วโมง ให้นำออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น
   1.4 นำสารสกัดเมล็ดองุ่นที่ได้มาใส่ appendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน
   1.5 นำส่วนใส ( supernatant ) มาทำการเจือจางที่ความเข้มข้น $10$ , $10^{-2}$ ,$10^{-3}$ และ $10^{-4}$ เท่า
   1.6 ทำการกรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง Cellulose nitrateขนาด0.45μm โดยใช้syringe เป็นตัวในการถ่ายสารผ่านกระดาษกรอง
   1.7 นำเก็บใส่ appendrof อันใหม่ที่มีการหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
   1.8 เปลี่ยนเวลาในการสกัดเป็น 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ
2. การสกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์
   2.1 นำผงเมล็ดองุ่นมาชั่งให้ได้ 3 กรัม ใส่ลงในฟลาสขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีเอธิลแอกอฮอล์อยู่ 15 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ทำการเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส , อุณหภูมิห้อง และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.3 นำสารสกัดเมล็ดองุ่นที่ได้มาใส่ appendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน

2.4 นำส่วนใส ( supernatant ) มาทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 10 , $10^{-2}$ ,$10^{-3}$ และ $10^{-4}$ เท่า

2.5 ทำการกรองสารละลายผ่านกระดาษกรองCellulose nitrate0.45 μm โดยใช้syringe เป็นตัวในการถ่ายสารผ่านกระดาษกรอง

2.6 นำเก็บใส่ appendrof อันใหม่ที่มีการหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.7 เปลี่ยนเวลาในการสกัดเป็น 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

**3.3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC**

1. การเตรียมสาร standard

1. นำสารสกัดเมล็ดองุ่นในรูปแคปซูลที่ขายตามท้องตลาด ชื่อสินค้าคือ โปรวิน บรรจุ 20 มิลลิกรัมต่อแคปซูล
2. นำมาจำนวน 3 กรัม มาทำการละลายด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำ de-ionizeที่มีปริมาตร 15 มิลลิลิตร หรือละลายด้วยเอธิลแอลกอฮอล์มีปริมาตร 15 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็น Standard ในการสกัดด้วยน้ำและเอธิลแอกอฮอล์
3. เมื่อได้สารละลายจะทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 10 , $10^{-2}$ ,$10^{-3}$ และ$10^{-4}$ เท่า
4. ทำการกรองสารละลาย ผ่านกระดาษกรอง Cellulose nitrate 0.45 μm แล้วเก็บใน appendrof ที่หุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ มีปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม mobile phase

mobile phase A : 2% acetictic acid

mobile phase B : acetonitrile

การกรอง mobile phase จะผ่านการกรอง 0.45 μm Cellulose acetate filter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

- ใช้คอลัมน์ alpha bond $C_{18}$ 125 A ( 4.6 x 250 mm )
- detect ด้วยแสง UV ความยาวคลื่น 280 nm
- ปริมาณตัวอย่างที่ฉีด คือ 20 ไมโครลิตร
- เฟสเคลื่อนที่มี 2 ตัว คือ

  Mobile Phase A : 2 % Acetic Acid

  Mobile Phase B : Acetonitrile

- อัตราการไหลของ Mobile Phase เป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที
- การวิเคราะห์ด้วยความเข้มข้นของ Mobile Phase จะเป็น Linear gradient ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณMobile Phase B ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ

| เวลา ( นาที ) | mobile phase B |
|---|---|
| 0 - 20 | 5% - 75% |
| 20 - 25 | 75% - 100% |
| 25 - 30 | 100% (isocratic) |
| 30 - 35 | 100% - 25% |
| 35 - 40 | 25% - 5% |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4

# ผลการทดลองและอภิปรายผล

## 4.1 การสกัดเมล็ดองุ่นด้วยน้ำ

ในการทดลองนำเมล็ดองุ่นที่ผ่านการอบแห้งมาบดให้ละเอียด จากนั้นทำการสกัดโดยแช่น้ำและเขย่าที่อุณหภูมิ 60 , 70 , 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 , 2 และ 3 ชั่วโมงในทุกอุณหภูมิที่สกัด นำสารสกัดเมล็ดองุ่นที่ได้และสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐานยี่ห้อโปรวินมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ได้โครมาโทรแกรมดังรูปที่ 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 และ 40 นำโครมาแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่ได้และสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐานมาเปรียบเทียบกัน เพื่อหาพีคที่มี retention time ตรงกัน จากการพิจารณาพบว่ามีพีคที่ retention time ตรงกันอยู่ 8 พีคดังตารางที่ 10 และ รูปที่ 41 ซึ่งพื้นที่ใต้กราฟของพีคทั้ง 8 แสดงดังตารางที่ 11 จากนั้นวิเคราะห์หาสภาวะการสกัดที่ดีที่สุดของการสกัดด้วยน้ำ โดยการเปรียบเทียบปริมาณสารที่ได้จากการสกัดจากพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละพีค เพื่อหาว่าในแต่ละพีคสภาวะการสกัดใดให้พื้นที่ใต้กราฟมากที่สุด โดยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ที่ระดับความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซนต์ ดังตารางที่ 11 ในการวิเคราะห์จะได้สภาวะการสกัดที่มีพื้นที่ใต้กราฟมากที่สุดของแต่ละพีค จากตารางที่ 11 พบว่าที่สภาวะการสกัดด้วยอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมงให้พื้นที่ใต้กราฟมากที่สุด 5 พีค คือ พีคที่ 3 , 5 , 6 , 7 และ 8 จากทั้งหมด 9 พีคดังตารางที่ 12 จึงสรุปได้ว่าที่สภาวะการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เป็นสภาวะการสกัดที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่น ๆ เนื่องจากอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารที่ออกมาจากเมล็ดองุ่น สำหรับที่อุณหภูมิต่ำกว่า 90 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ต่ำเกินไปจึงสกัดสารจากเมล็ดองุ่นได้ในปริมาณที่น้อยกว่า ส่วนที่อุณหภูมิสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้จากเมล็ดองุ่นอาจไม่คงตัวหรือเสียสภาพไป นอกจากนี้เวลาที่ใช้ในการสกัดก็มีผลต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากเมล็ดองุ่นเช่นกัน กล่าวคือ เวลาที่ใช้ในการสกัดจะต้องสัมพันธ์กับอุณหภูมิของการสกัดด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 28 โครมาโทรของสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐาน ( ยี่ห้อโปรวิน ) สำหรับการสกัดด้วยน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 29 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 30 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 31 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 32 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 33 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดคองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 34 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 35 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดคองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

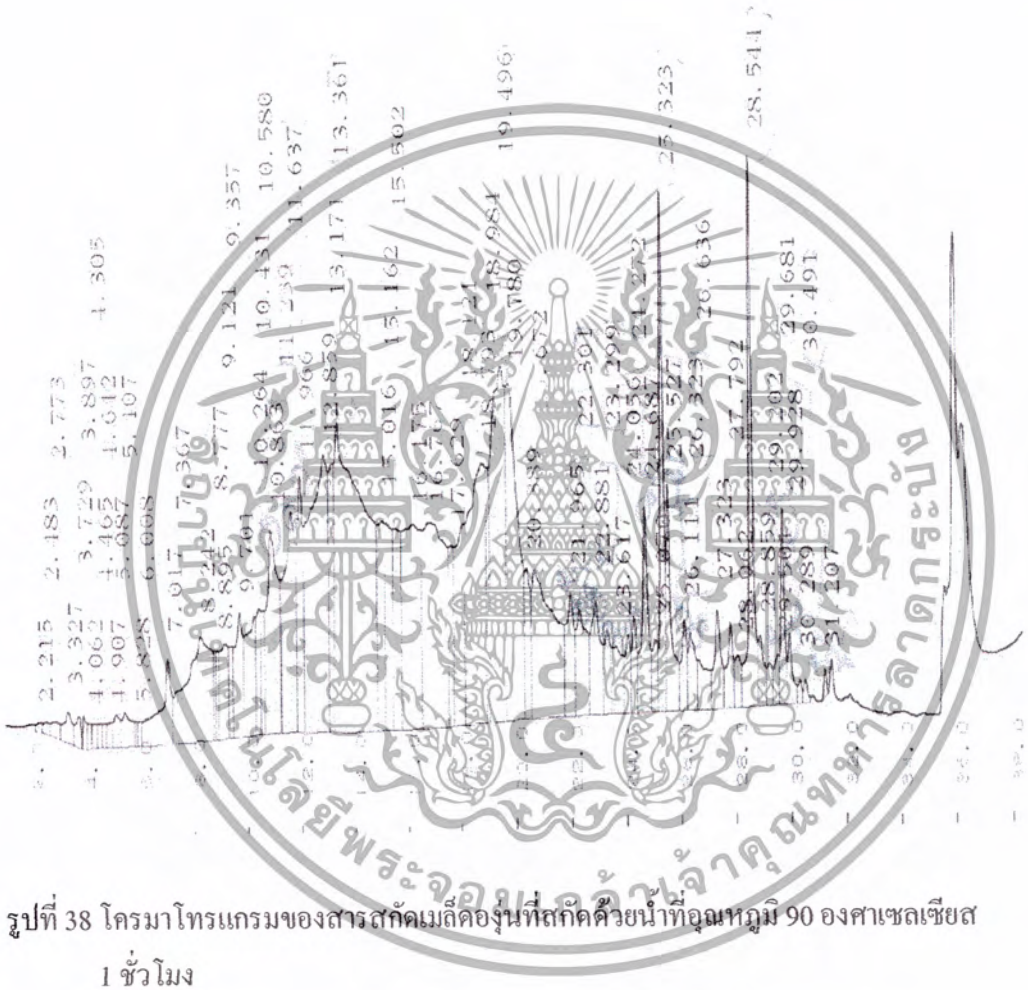
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 36 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 37 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 38 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 39 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 40 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดคองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 พีคของโครมาโทแกรมที่ retention time เดียวกันระหว่างสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐานกับสารสกัดเมล็ดองุ่นตัวอย่างที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ

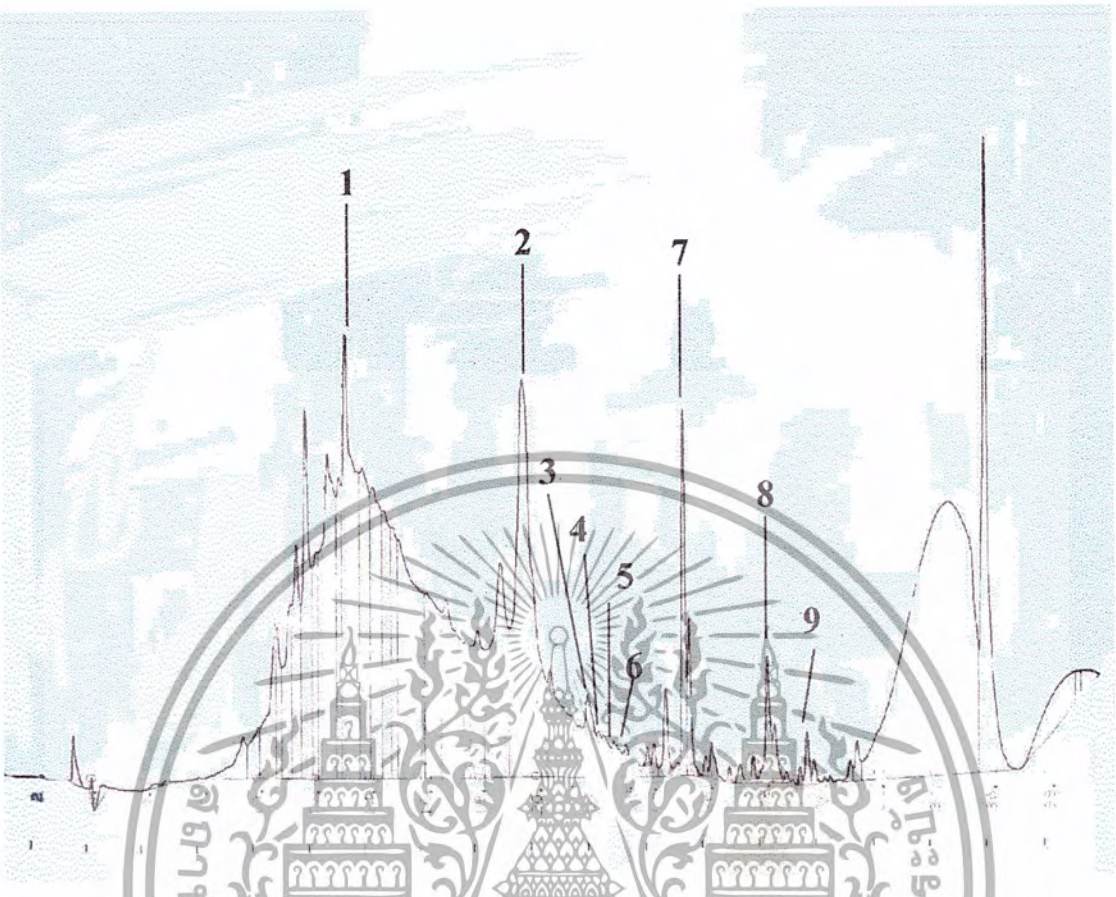
| สารสกัดเมล็ดองุ่น | retention time ( min ) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| สารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐาน | 13.332 | 19.711 | 21.979 | 22.331 | 22.922 | 23.306 | 25.339 | 29.675 |
| อุณหภูมิ 60 ° C เวลา 1 hr | 13.108 | 19.572 | 21.856 | 22.291 | 22.902 | 23.301 | 25.331 | 29.672 |
| อุณหภูมิ 60 ° C เวลา 2 hr | 13.084 | 19.587 | 21.882 | 22.312 | 22.889 | 23.294 | 25.338 | 29.674 |
| อุณหภูมิ 60 ° C เวลา 3 hr | 13.326 | 19.507 | 21.960 | 22.323 | 22.855 | 23.212 | 25.302 | 29.600 |
| อุณหภูมิ 70 ° C เวลา 1 hr | 13.169 | 19.632 | 21.918 | 22.313 | 22.894 | 23.281 | 25.334 | 29.600 |
| อุณหภูมิ 70 ° C เวลา 2 hr | 13.309 | 19.765 | 21.959 | 22.317 | 22.839 | 23.173 | 25.297 | 29.606 |
| อุณหภูมิ 70 ° C เวลา 3 hr | 13.322 | 19.770 | 21.967 | 22.319 | 22.804 | 23.135 | 25.264 | 29.600 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ( ต่อ )

| สารสกัดเมล็ดองุ่น | retention time ( min ) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| อุณหภูมิ 80 ° C เวลา 1 hr | 13.283 | 19.692 | 21.947 | 22.306 | 22.878 | 23.267 | 25.319 | 29.600 |
| อุณหภูมิ 80 ° C เวลา 2 hr | 13.313 | 19.442 | 21.919 | 22.305 | 22.859 | 23.222 | 25.305 | 29.626 |
| อุณหภูมิ 80 ° C เวลา 3 hr | 13.321 | 19.559 | 21.909 | 22.378 | 22.849 | 23.210 | 25.316 | 29.692 |
| อุณหภูมิ 90 ° C เวลา 1 hr | 13.361 | 19.496 | 21.965 | 22.301 | 22.881 | 23.299 | 25.323 | 29.681 |
| อุณหภูมิ 90 ° C เวลา 2 hr | 13.300 | 19.658 | 21.908 | 22.300 | 22.846 | 23.195 | 25.322 | 29.637 |
| อุณหภูมิ 90 ° C เวลา 3 hr | 13.348 | 19.492 | 21.958 | 22.313 | 22.891 | 23.293 | 25.331 | 29.701 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 41 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐาน ( ยี่ห้อโปรวิน ) สำหรับการสกัดด้วยน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ของพื้นที่ใต้กราฟของพีคหมายเลข 1 ถึง 7 ของโครมาโทแกรมที่ได้จากการสกัดด้วย น้ำในแต่ละอุณหภูมิ

| สภาวะในการสกัด | พื้นที่ใต้กราฟของพีท | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Peak 1 | Peak 2 | Peak 3 | Peak 4 | Peak 5 | Peak 6 | Peak 7 | Peak 8 | Peak 9 |
| 60 °C 1 hr | 46,822f | 106,509j | 9,307j | 8,402l | 8,371j | 7,677j | 45,386f | 28,855l | 34755c |
| 60 °C 2 hr | 45,466g | 107,036i | 11,537i | 10,034k | 9,942i | 10,295h | 28,722k | 33,679j | 11208k |
| 60 °C 3 hr | 26,525i | 75,165l | 9,302j | 12,034j | 6,856k | 5,848k | 36,162g | 37,025h | 26999e |
| 70 °C 1 hr | 17,526j | 132,682e | 11,661i | 15,474i | 10,761i h | 9,306i | 34,419i | 35,224i | 14655i |
| 70 °C 2 hr | 59,452d | 154,445d | 17,798g | 16,554g | 11,606h | 15,159e | 28,786k | 31,896k | 82771 |
| 70 °C 3 hr | 43,855h | 156,563c | 20,494e | 18,281f | 13,080g | 12,996f | 33,851j | 37,911g | 12333j |
| 80 °C 1 hr | 76,407c | 171,561a | 14,992h | 15,825h | 15,655f | 12,850g | 35,189h | 55,458f | 20597h |
| 80 °C 2 hr | 11,285k | 124,628g | 20,998d | 25,133d | 22,558e | 18,801c | 52,812e | 57,545e | 21354g |
| 80 °C 3 hr | 11,059k | 105,697k | 18,402f | 23,459e | 26,788d | 18,897c | 54,641d | 59,121d | 55797a |
| 90 °C 1 hr | 311,710b | 159,690b | 321,083c | 370,704c | 35,897c | 17,357d | 61,146c | 75,862b | 24036f |
| 90 °C 2 hr | 55,707e | 128,831f | 45,153a | 47,892b | 60,366a | 40,510a | 205,594a | 142,357a | 49927b |
| 90 °C 3 hr | 903,362a | 107,986h | 43,228b | 52,846a | 42,954b | 32,778b | 83,987b | 67,484c | 28207d |

หมายเหตุ ตัวอักษรไม่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์แสดงว่าแตกต่างกันทางสถิติระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 12 สภาวะการสกัดที่มีพื้นที่ใต้กราฟมากที่สุดในแต่ละพืค โดยการสกัดด้วยน้ำ

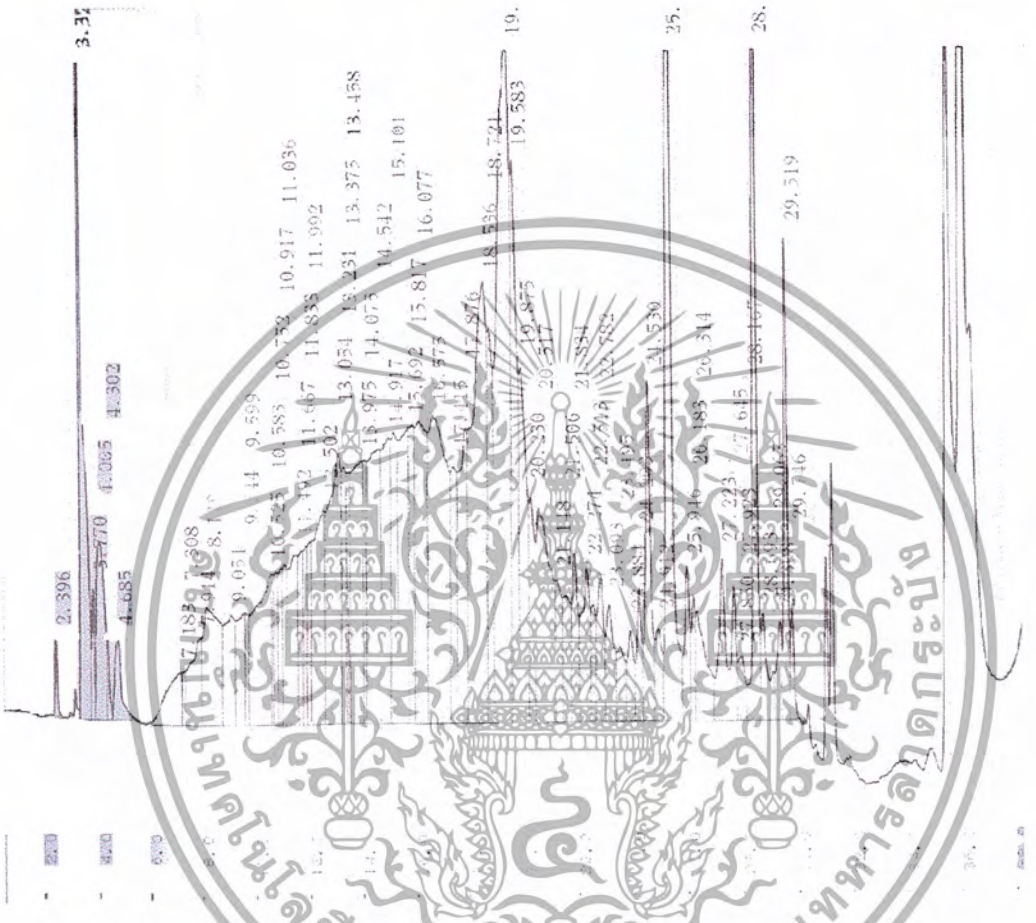
| หมายเลขพืค | สภาวะที่มีพื้นที่ใต้กราฟมากที่สุด |
|---|---|
| 1 | 90 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง |
| 2 | 80 องศาเซลเซียส 1ชั่วโมง |
| 3 | 90 องศาเซลเซียส 2ชั่วโมง |
| 4 | 90 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง |
| 5 | 90 องศาเซลเซียส 2ชั่วโมง |
| 6 | 90 องศาเซลเซียส 2ชั่วโมง |
| 7 | 90 องศาเซลเซียส 2ชั่วโมง |
| 8 | 90 องศาเซลเซียส 2ชั่วโมง |
| 9 | 80องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.2 การสกัดเมล็ดองุ่นด้วยเอธิลแอลกอฮอล์**

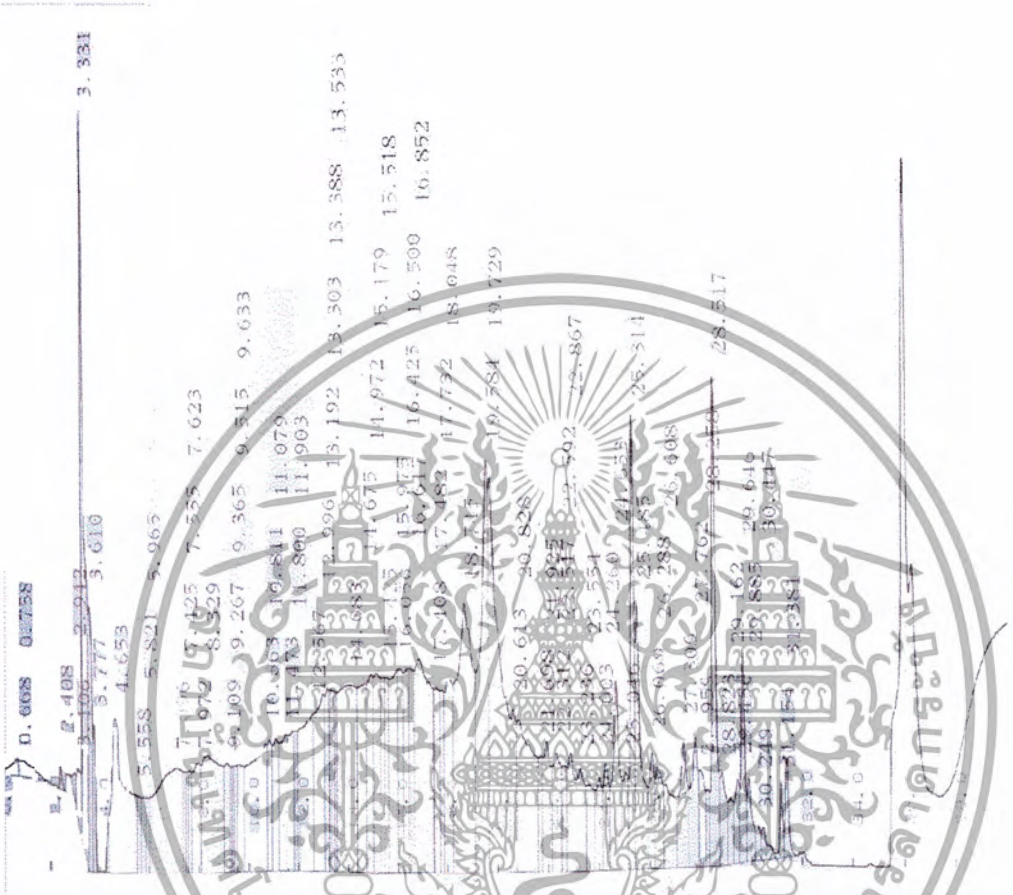
ในการทดลองนำเมล็ดองุ่นที่ผ่านการอบแห้งมาบดให้ละเอียด จากนั้นทำการสกัดโดยแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 99.8 เปอร์เซ็นต์ และเขย่าที่อุณหภูมิ 25 , 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 , 24 และ 48 ชั่วโมง ในทุกอุณหภูมิที่สกัดนำสารสกัดเมล็ดองุ่นที่ได้และสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐานยี่ห้อโปรวินมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ได้โครมาโทรแกรมดังรูปที่ 42 , 43 , 44 , 45 , 46 , 47 , 48 , 49 , 50 และ 51 นำโครมาแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่ได้และสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐานมาเปรียบเทียบกัน เพื่อหาพีคที่มี retention time ตรงกัน จากการพิจารณาพบว่ามีพีคที่ retention time ตรงกันอยู่ 8 พีคดังตารางที่ 13 ซึ่งพื้นที่ใต้กราฟของพีคทั้ง 7 แสดงดังตารางที่ 14 จากนั้นวิเคราะห์หาสภาวะการสกัดที่ดีที่สุดของการสกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ โดยการเปรียบเทียบปริมาณสารที่ได้จากการสกัดจากพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละพีค เพื่อหาว่าในแต่ละพีคสภาวะการสกัดใดให้พื้นที่ใต้กราฟมากที่สุด โดยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ที่ระดับความน่าเชื่อถือ 95 เปอร์เซนต์ ดังตารางที่ 15 ในการวิเคราะห์จะได้สภาวะการสกัดที่มีพื้นที่ใต้กราฟมากที่สุดของแต่ละพีค จากตารางที่ 15 พบว่าที่สภาวะการสกัดด้วยอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงให้พื้นที่ใต้กราฟมากที่สุด 5 พีค คือ พีคที่ 1, 2 , 3 , 5 และ 7 จากทั้งหมด 7 พีคดังตารางที่ 16 จึงสรุปได้ว่าที่สภาวะการสกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เป็นสภาวะการสกัดที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่น ๆ เนื่องจากอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารที่ออกมาจากเมล็ดองุ่น สำหรับที่อุณหภูมิต่ำกว่า 24 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ต่ำเกินไปจึงสกัดสารจากเมล็ดองุ่นได้ในปริมาณที่น้อยกว่า ส่วนที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้จากเมล็ดองุ่นอาจไม่คงตัวหรือเสียสภาพไป นอกจากนี้เวลาที่ใช้ในการสกัดก็มีผลต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากเมล็ดองุ่นเช่นกัน กล่าวคือเวลาที่ใช้ในการสกัดจะต้องสัมพันธ์กับอุณหภูมิของการสกัดด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



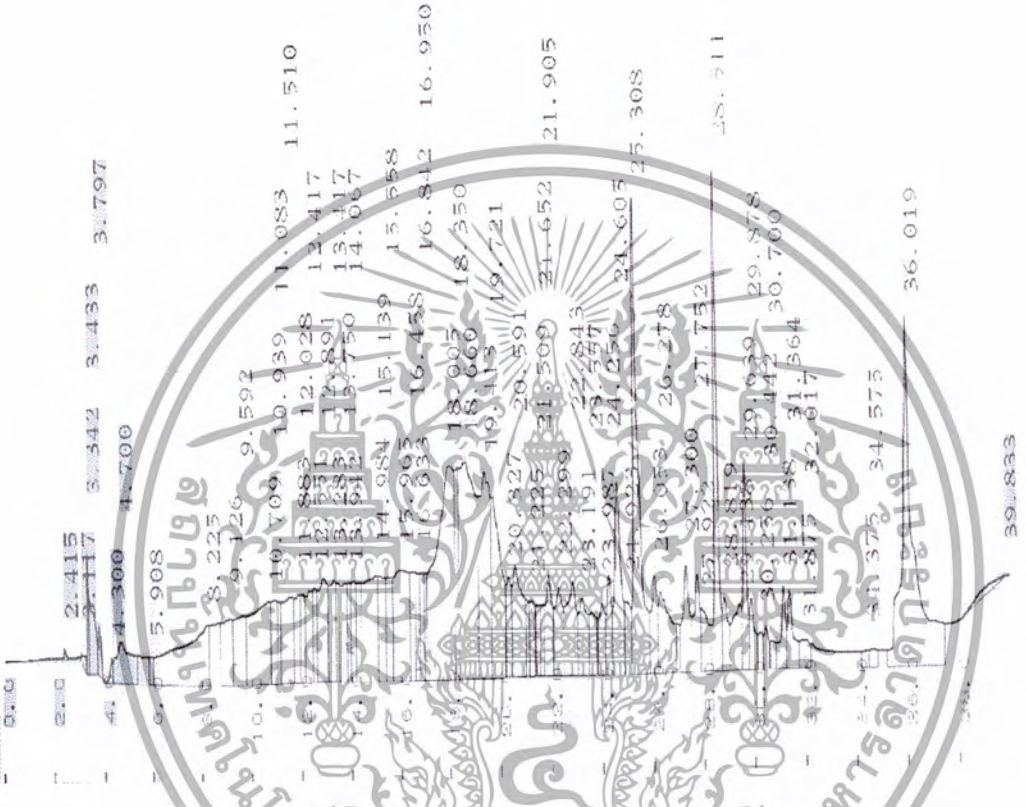
รูปที่ 42 โครมาโทรของสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐาน ( ยี่ห้อโปรวิน ) สำหรับการสกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



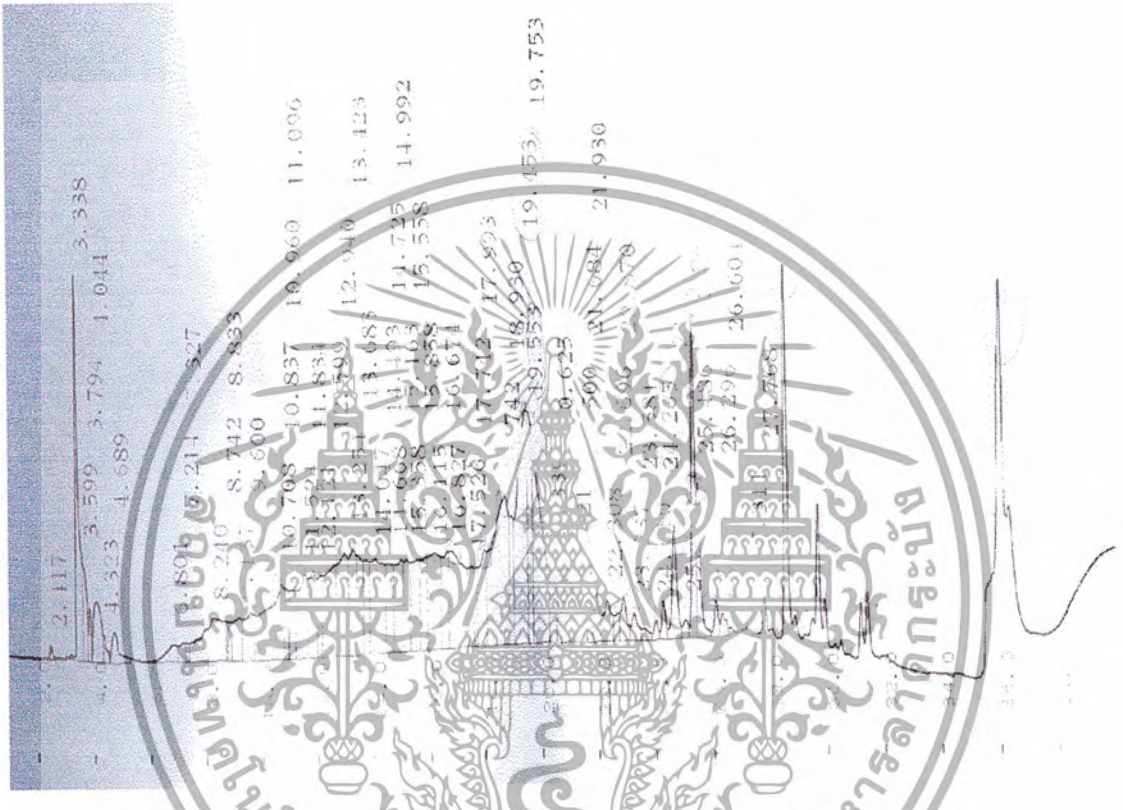
รูปที่ 43 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดคองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 44** โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

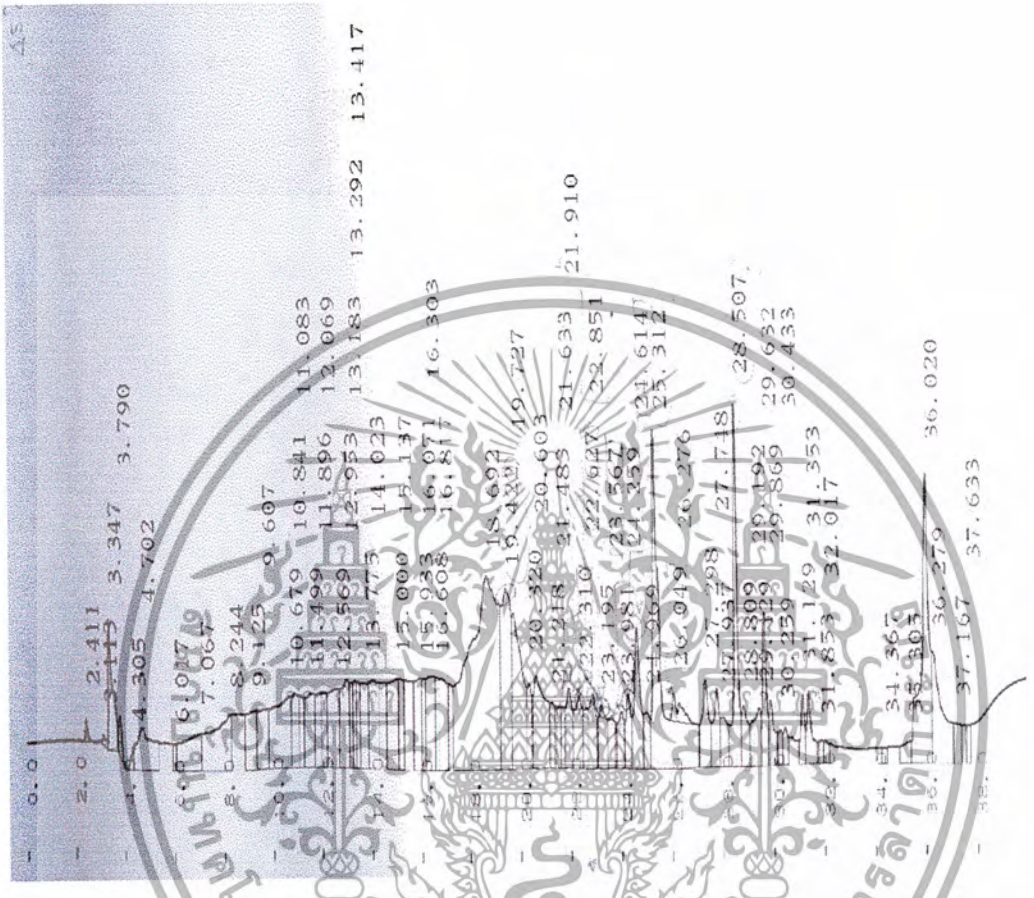


รูปที่ 45 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

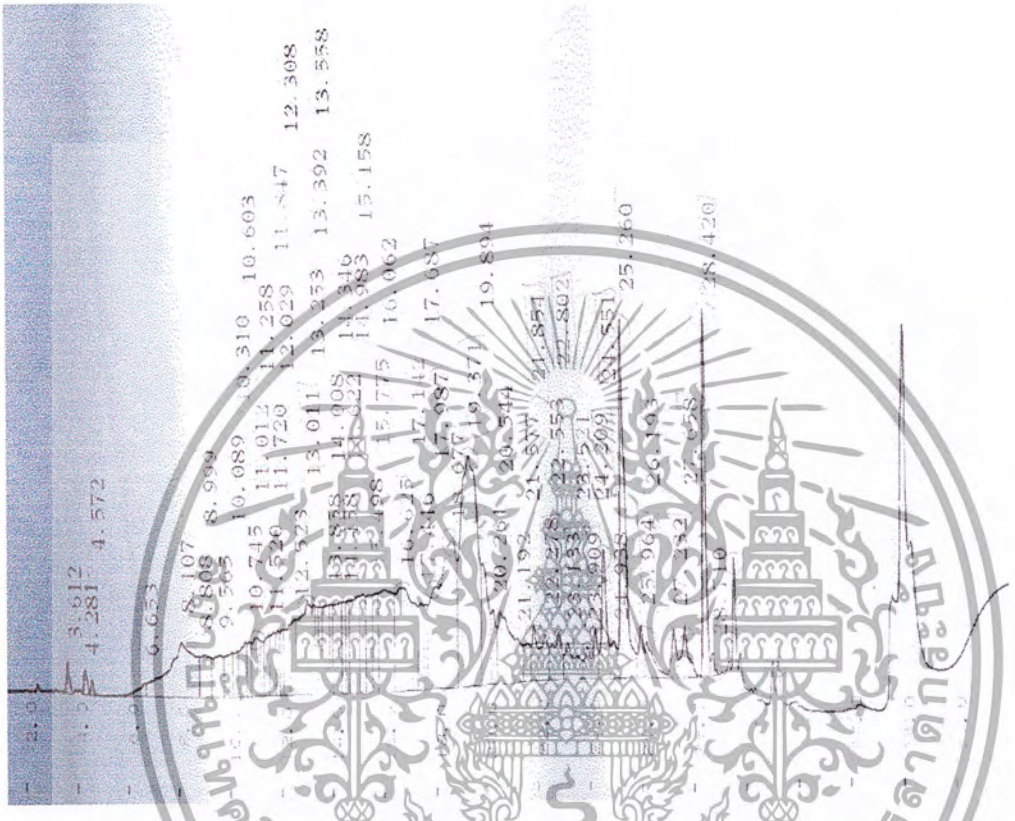
รูปที่ 46 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



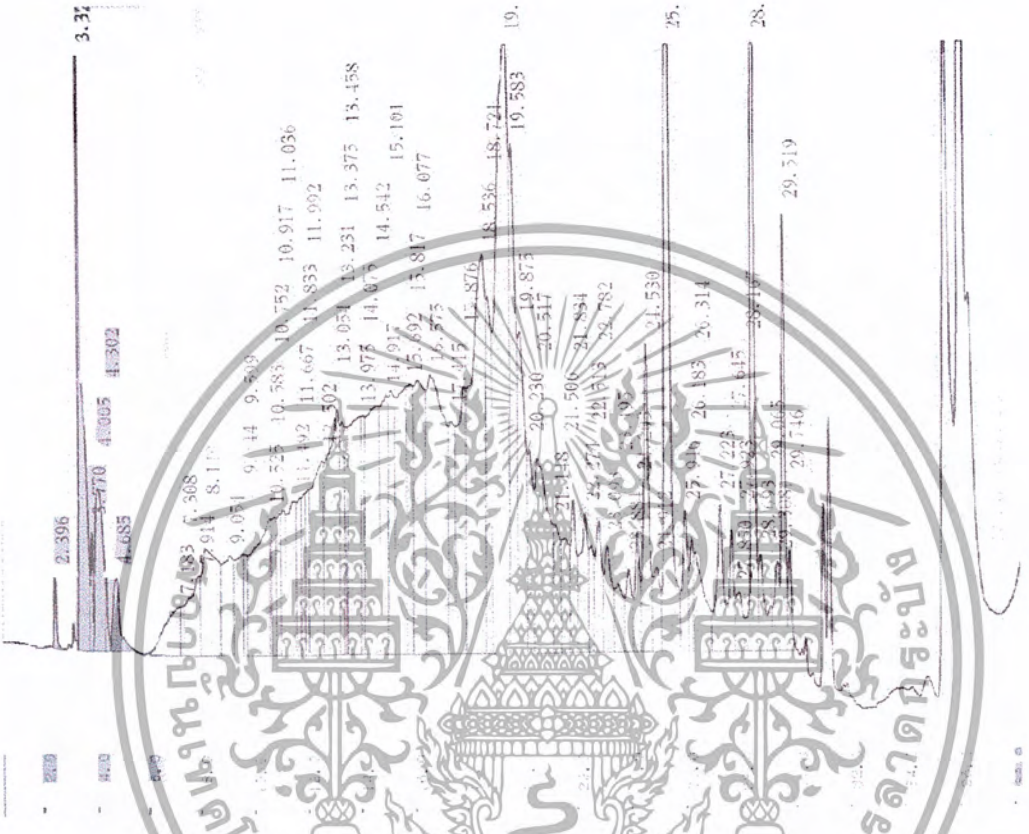
รูปที่ 47 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดคองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



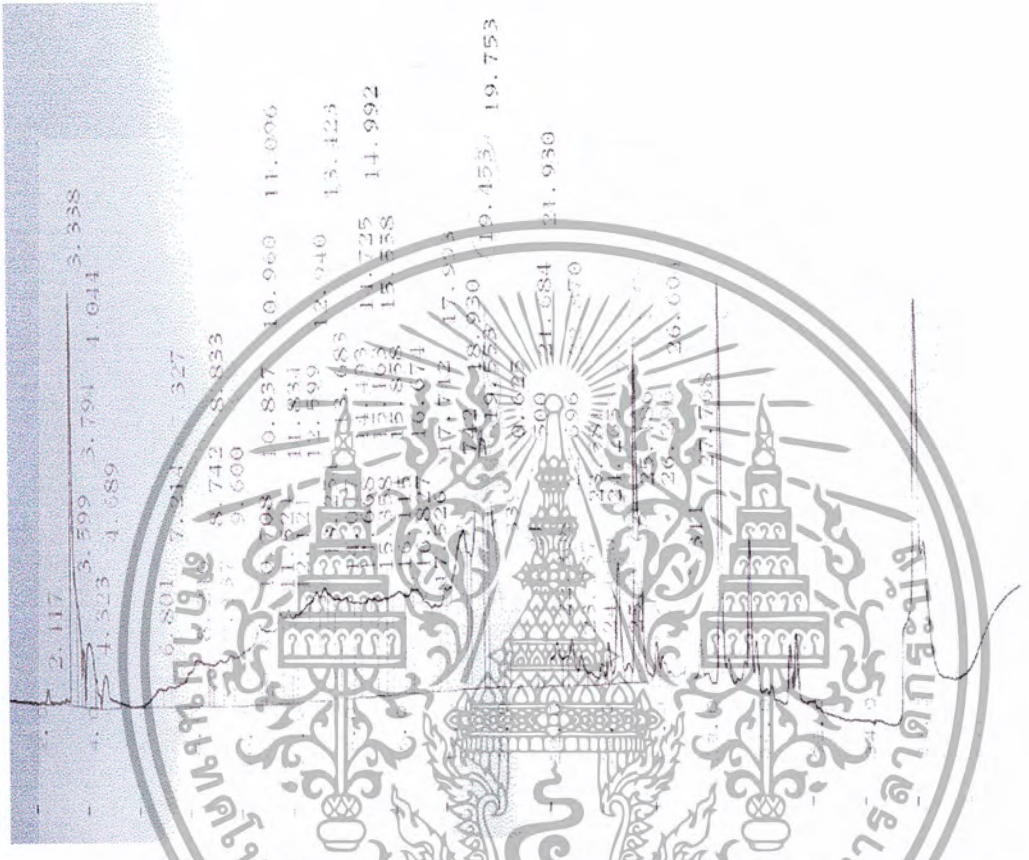
รูปที่ 48 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



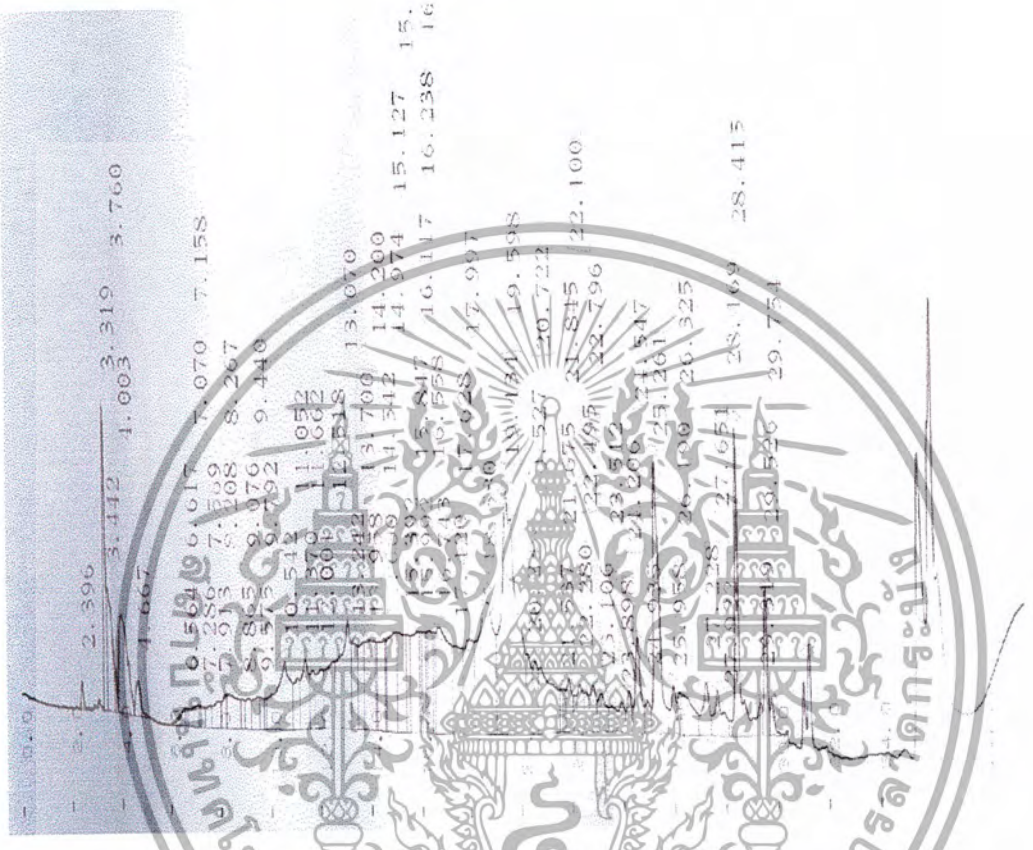
รูปที่ 49 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 50 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 51 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 พีคของโครมาโทแกรมที่ retention time เดียวกันระหว่างสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐานกับสารสกัดเมล็ดองุ่นตัวอย่างที่ได้จากการสกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์

| สารสกัดเมล็ดองุ่น | retention time ( min ) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| สารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐาน | 19.489 | 21.979 | 22.331 | 22.922 | 22.488 | 25.339 | 28.552 |
| อุณหภูมิ 25 ° C 12 hr | 19.581 | 21.925 | 22.312 | 22.867 | 24.260 | 25.314 | 28.517 |
| อุณหภูมิ 25° C 24 hr | 19.413 | 21.905 | 22.299 | 22.843 | 24.256 | 25.308 | 28.511 |
| อุณหภูมิ 25 ° C 48 hr | 19.577 | 21.915 | 22.328 | 22.878 | 24.270 | 25.325 | 28.519 |
| อุณหภูมิห้อง 12 hr | 19.531 | 21.886 | 22.288 | 22.833 | 24.288 | 25.280 | 28.456 |
| อุณหภูมิห้อง 2 hr | 19.422 | 21.910 | 22.310 | 22.851 | 24.259 | 25.312 | 28.507 |
| อุณหภูมิห้อง 3 hr | 19.371 | 21.824 | 22.278 | 22.802 | 24.209 | 25.260 | 28.420 |
| อุณหภูมิ 45 ° C 12 hr | 19.371 | 21.854 | 22.278 | 22.802 | 24.209 | 25.260 | 28.420 |
| อุณหภูมิ 45 ° C 24 hr | 19.364 | 21.834 | 22.274 | 22.782 | 24.203 | 25.261 | 28.410 |
| อุณหภูมิ 45 ° C 48 hr | 19.453 | 21.930 | 22.208 | 22.870 | 24.265 | 25.310 | 28.500 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 52 โครมาโทรแกรมของสารสกัดเมล็ดองุ่นมาตรฐาน (ยี่ห้อโปรวิน) สำหรับการสกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของพื้นที่ใต้กราฟของพีคหมายเลข 1 ถึง 7 ของโครมาโท - แกรม ที่ได้จากการสกัดด้วย เอธิลแอลกฮอล์ในแต่ละอุณหภูมิ

| สภาวะใน การสกัด | พื้นที่ใต้กราฟของพีท | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Peak 1 | Peak 2 | Peak 3 | Peak 4 | Peak 5 | Peak 6 | Peak 7 |
| 25 °C 12 hr | 78532g | 25144a | 22349d | 22934d | 47975a | 37388h | 20314i |
| 25 °C 24 hr | 166608a | 41732a | 47117a | 63559b | 32768ba | 188873c | 124505a |
| 25 °C 48 hr | 160548cb | 26435a | 25496c | 47021c | 28133ba | 190047b | 62281c |
| RT 12 hr | 161445b | 12747a | 12141g | 13284e | 9719b | 37908g | 35586g |
| RT 24 hr | 154690d | 25387a | 38205b | 377677a | 27580ba | 239265a | 98883b |
| RT 48 hr | 158163c | 10803a | 13502f | 11411g | 8536b | 31498i | 37791f |
| 45 °C 12 hr | 113569e | 12177a | 16131e | 12208f | 8324b | 71084d | 47457e |
| 45 °C 24 hr | 86246f | 37817a | 11803h | 9065I | 5194b | 43149f | 29707h |
| 45 °C 48 hr | 65190h | 10511a | 9570h | 9510h | 6600b | 53932e | 48997d |

หมายเหตุ ตัวอักษรไม่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์แสดงว่าแตกต่างกันทางสถิติระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 15 สภาวะการสกัดที่มีพื้นที่ใต้กราฟมากที่สุดในแต่ละพืด โดยการสกัดด้วยเอธิล - แอลกอฮอล์

| หมายเลขพืด | สภาวะที่มีพื้นที่ใต้กราฟมากที่สุด |
|---|---|
| 1 | 25 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง |
| 2 | 25 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง |
| 3 | 25 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง |
| 4 | อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง |
| 5 | 25 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง |
| 6 | อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง |
| 7 | 25 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า

1. จากผลการทดลองพบว่า โครมาโทแกรมที่ได้จากสารมาตรฐาน (ยี่ห้อโปรวิน) และสารสกัดเมล็ดคองุ่นที่สภาวะต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการขึ้นลงของกราฟพบว่ามีลักษณะเดียวกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารที่อยู่ในสารสกัดเมล็ดคองุ่นมาตรฐาน (ยี่ห้อโปรวิน) และสารสกัดเมล็ดคองุ่นที่ทำการทดลองมีแนวโน้มว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน

2. ทำการเปรียบเทียบความสูงของพีคที่ retention time เดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดเมล็ดคองุ่นตัวอย่างที่สกัดได้พีคที่มีพื้นที่ใต้กราฟมากจะมีปริมาณสารสกัดมาก ดังนั้นการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 $^{\circ}C$ 2 ชั่วโมง จะให้ปริมาณสารสกัดจากเมล็ดคองุ่นออกมามากที่สุดเพราะมีพื้นที่ใต้กราฟมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิอื่น ในทำนองเดียวกัน การสกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 25$^{\circ}C$ เวลา 24 ชั่วโมง จะให้ปริมาณสารออกมามากที่สุดเช่นกัน

จากวิธีดำเนินการวิจัยมีข้อเสนอแนะ ดังนี้

ในกรณีที่เปลี่ยนสารตัวอย่างที่วิเคราะห์ปรือปิดเครื่องนานกว่า 1 ชั่วโมง ต้องทำการล้างคอลัมน์เพื่อให้ base-line นิ่งก่อนทำการวิเคราะห์ต่อ เนื่องจากอาจมีสารตกค้างอยู่ในเครื่องหรือคอลัมน์ เราจึงต้องล้างคอลัมน์ด้วย mobile phase ที่ใช้วิเคราะห์หรือล้างเพื่อไล่อากาศที่ตกค้างอยู่ในเครื่อง เพราะฟองอากาศจำทำให้ retention time เพิ่มขึ้นและลดลงอย่างไม่คงที่ นอกจากนี้ mobile phase ที่ใช้ควรผ่านการไล่อากาศด้วยเครื่อง sonicator เพื่อไล่ฟองอากาศขนาดเล็กออกไป ทั้งนี้ระยะเวลาในการไล่อากาศไม่ควรนานจนเกินไป เพราะจะเกิดความร้อนที่ทำให้ mobile phase ระเหยออกไปทำให้ความเข้มข้นเปลี่ยนแปลง จะทำให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ได้

ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC มีหลักสำคัญที่ต้องคำนึงถึงอย่างหนึ่ง คือ mobile phase ต้องบริสุทธิ์ตั้งแต่การเลือกใช้สารที่เป็น HPLC grade การกรอง และการ degas ในกรณีที่ mobile phase ประกอบด้วยสารมากกว่า 1 ชนิด ต้องศึกษาวิธีการผสมอย่างละเอียด เนื่องจากอาจเกิดการแยกชั้นหรือตกตะกอนทำให้อัตราส่วนของสารเปลี่ยนแปลงไป ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้และในการกรอง กระดาษกรองที่ใช้ต้องเป็นชนิดที่ไม่ถูกทำลายได้ด้วย mobile phase นอกจากนี้ อุณหภูมิยังมีผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้าอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ base-line ซึ่งอาจทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาด ดังนั้นควรรักษาอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการทดลองด้วยเครื่องอุ่นคอลัมน์

ในการศึกษาการสกัดสารจากเมล็ดองุ่นเบื้องต้นเป็นเพียงแต่การเปรียบเทียบสารที่สกัดได้กับสารมาตรฐานที่ขายทางการค้า เราจึงไม่อาจรุบุได้ว่าพีคที่เกิดขึ้นเป็นสารชนิดใดได้ ในการศึกษาขึ้นต่อไป ถ้าต้องการทราบปริมาณที่แน่นอนของสาร สามารถใช้สารมาตรฐานที่ทราบชนิด ปริมาณและretention time ที่แน่นอน เช่น catechin, epicatechin หรือ gallic acid เป็นต้น จะทำให้สามารถระบุได้ว่าพีคนั้นเป็นสารชนิดใดและหาปริมาณที่แน่นนอนของสารได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง


1. คณิตา ตังคณานุรักษ์. 2542. เทคนิคการแยกสารทางเคมี. กรุงเทพฯ: โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบัน-เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2. Duke J.A., du Cellier J.L., "CRC Handbook of Alternative Cash Crops", CRC Press, Inc., 1993, pp 460-464.

3. John Shi, Jianmei Yu, Joseph Pohorly, J. Christopher Young, Mike Bryan and Ying Wu. 2003. Science and Technology. Canada: WFL Publisher

4. Joslyn M.A., Dittmar H.F.K., Mitt.Rebe Wein, Obstbau Fruechteverwert., 17, 92, 1967; C.A. 67, 97657p

5. Masqueh'er, J., Michaud, J., Laparra, J., and Dumon M.C. (1979).Int. J. Vitamin Nutrition Research Vol. 9 : 307-311.

6. Mitcherva M, et.al. Biochemical and morphological studies on the effects of anthocyans and vitamin E on carbon tetrachloride induced liver injury. Cell Mol. Bio 1993 ; 39(4) : 43-448.

7. Robert L., Godeau G., Gavignet-Jeannin G., Groult N., Six C., Robert A.M., Path Biol. 38, 608, (1990).

8. http://ecsoc2.hcc.ru/dp_top3/dp178 .htm

9. http://fshn.ifl.edu/faculty/sttalcott/www/biochem/20F&V/class%20Handouts/Phytochemical%20review_online.doc

10. http://www.activin.com/executive.htm

11. http://www.activin.com/testing%20white%20paper_.htm

12. http://www.aims.gov.au/.../pages/ mb-sp07-01.html

13. http://www.alternateinfo.com/Alternateth/heth/grapeseed th.htm

14. http:/www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/chemical.html

15. http://www.chiro.org/nutrition/FULL/Proanthocyanidin.html

16. http://www.enerex.bc.ca/products/grape seed green tea.htm

17. http://www.exn.ca/Stories/ 2003/02/14/52.asp

18. http://www.gpo.or.th/rdi/html/antioxidants.html



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

19. http://www.healthchecksystems.com/antioxd.htm

20. http://www.hillspet.com.tw/pet_care/ petcare_content....

21. http:// www.interhealthusa.com/waseda/morehairin/forum1to 20.htm

22. http://www.medscape.com/viewarticle/ 450151_print

23. http://www.mercola.com/2002/jan/9/grapes.htm

24. http://www.newhope.com/nutrition sciencenews/NSN backs/Jan OO/proantho.cfm

25. http://www.ped1.com/directory/Health/drugs

26. http://www.pharmcast.com/patents/yr2002/april2002/041602/631226dysmenorrhea 941602.htm

27. http://www.rice.edu/jcuky/sports/antiox.htm

28. http://www.rmbarry.com/mel/grapeseed.html

29. http://www.stanford.edu/group/hopes/treaturts/antiox/1html

30. http://www.school.net.th/library/ snet4/feb18/health.htm

31. http://www.users.bigpond.com/toyourhealth/antioxidants

32. http://www.vitaminwoman.com/cgi_bin/search.cgiID=44action=display

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

ขั้นตอนการเปิดเครื่อง HPLC

1. Power เครื่องทุกเครื่องของ HPLC
2. ยก Sinker ใส่ในขวดของ Mobile phase
3. เปิด Drain ของ Pump แล้วกดปุ่ม Purge ที่ Pump
4. ให้สังเกตว่าในสายของ Sinker มีฟองอากาศอยู่หรือเปล่า ถ้ายังมีอยู่ให้กด Purge ให้ Pump ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
5. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอจน Pump หยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ Pump หยุดทำงาน
6. ปิด Drain valve ที่ Pump
7. ตั้ง Flow rate , P max และ P min ที่ต้องการในการวิเคราะห์ให้กับ Pump ( P max ดูจาก Pressure maximum ของ column )
8. ตั้งอุณหภูมิที่ต้องการที่ CTO ( ถ้ามี )
9. ตั้ง Parameter ให้กับ Detector
10. สั่งให้ Pump ทำงานตาม Condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ขั้นตอนการเปลี่ยน MOBILE PHASE

1. เปิด Pump HPLC
2. เท Mobile phase ใหม่ใส่ในบีกเกอร์
3. เปิด Drain ของ Pump แล้วกดปุ่ม Purge ที่ Pump
4. ยก Sinker ออกจาก Mobile phase แล้วจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มี Mobile phase ใหม่อยู่
5. รอจน Pump ดูด Mobile phase ใหม่ในบีกเกอร์ประมาณ 20-30 มิลลิลิตร
6. ยก Sinker ออกจากบีกเกอร์ แล้วเช็ดสายของ Sinker ด้วยกระดาษทิชชูที่สะอาดแล้วนำ Sinker จุ่มลงในขวดของ Mobile phase ใหม่
7. ในระหว่างขั้นตอน 1-6 ถ้า Pump หยุดทำงาน ให้กดปุ่ม Purge อีกครั้ง
8. ให้สังเกตว่าในสายของ Sinker มีฟองอากาศอยู่หรือเปล่า ถ้ายังมีอยู่ให้กด Purge ให้ Pump ทำงานจนกว่าฟองอากาศจะหมด
9. เมื่อฟองอากาศในสายของ Sinker ไม่มีแล้วให้รอจน Pump หยุดทำงานเอง หรือให้กด Purge เพื่อให้ Pump หยุดทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. สั่งให้ Pump ทำงานตาม Condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์

<u>ขั้นตอนการ INJECT ตัวอย่าง</u>

1. ตรวจดูให้แน่ใจว่า LC อยู่ในสถานะ Ready
2. ตรวจดูให้แน่ใจว่า Detector และ Autosampler อยู่ในสถานะ Ready
3. รอจน Baseline ค่อนข้างนิ่ง
4. ถ้าต้องการให้เครื่องคำนวณ Slope ให้เลือกกด S
5. ถ้า Baseline นิ่งอยู่ที่ตำแหน่งสูงกว่าศูนย์เล็กน้อย สามารถตั้งศูนย์อัตโนมัติกด Z
6. ทำการ Inject Sample

   6.1 Rheodyne Manaul Injector

   1. ล้าง Syringe ให้สะอาดด้วย Solvent 5 ครั้ง
   2. ล้าง Syringe ด้วย Sample ที่ Inject 3 ครั้ง
   3. ดูด Sample โดยไม่ให้มีฟองอากาศ ใน Syringe แล้ว Set ปริมาตร ให้ได้ตามที่จะฉีดเข้าระบบ HPLC
   4. แทงเข็มเข้าไปใน injector ให้สุด โดย inject ต้องอยู่ที่ตำแหน่ง INJECT
   5. ปิด injector ไปที่ตำแหน่ง LOAD
   6. ฉีด sample เข้าไปใน sample loop ของ injector ( ถ้าต้องการ fill sample ให้เต็ม loop ต้องฉีด sample มากกว่า valumn ของ loop $\geq$ 5 เท่า)
   7. เมื่อ HPLC system พร้อม ให้ปิด injector มาตำแหน่ง INJECT ( กรณีไม่มี Auto-start ให้กดปุ่ม START ที่ C-R7)
   8. รอประมาณ 5 - 10 วินาที แล้วดึง syringe ออกจาก injector
   9. ล้าง needle port ด้วยน้ำกลั่น 5 - 10 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยอากาศ 10-20 มิลลิลิตร โดยใช้ syringe พลาสติก ขนาด 5 - 25 มิลลิลิตร ที่ต่อด้วย needle port cleaner
   10. ล้างด้วย syringe ที่ใช้ฉีด sample ด้วย solvent 20 - 30 ครั้ง

<u>ขั้นตอนการปิดเครื่อง</u>

1. หลังจาก Inject sample สุดท้ายเสร็จแล้ว ให้ Run mobile phase ต่ออีกประมาณ 30 นาที
2. สั่ง OFF pump
3. ปิด Power ของ HPLC units แล้วยก Sinker ให้พ้น Mobile phase

<u>ขั้นตอนการล้างเครื่อง ( กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องไม่เกิน 1 เดือน )</u>

1. Run Mobile Phase ที่ใช้งาน 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Run Mobile Phase ที่ใช้เก็บ Column 30 นาที
3. ปิดเครื่องตามขั้นตอนการปิดเครื่อง

<u>ขั้นตอนการล้างเครื่องมือ (กรณีที่จะหยุดใช้เครื่องมากกว่า 1 เดือน )</u>

1. Run Mobile Phase ที่ใช้งาน 30 นาที
2. Run Mobile Phase ที่ใช้เก็บ Column 60 นาที
3. หยุด Pump แล้วถอด column ออกจากระบบแล้วต่อ pipe เปล่าแทนที่ และปิด column ด้วย plug ให้แน่น
4. เปลี่ยน mobile phase เป็นเมธานอล 70 % แล้ว run เข้าระบบเป็นเวลา 30 นาที ถึง 60 นาที
5. off pump แล้วปิดเครื่องทุก unit
6. ยก sinker ออกจากขวด mobile phase แล้วห่อด้วยวัสดุที่สะอาดเพื่อป้องกันฝุ่น

ในระบบของ HPLC ปัญหาสามารถเกิดจากหลาย ๆ สาเหตุ ในขั้นแรกเราต้องหาส่วนที่เป็นปัญหาจากนั้นให้ทำการแยกแยะเพื่อหาสาเหตุของปัญหา ใช้ ตารางที่ 1 เพื่อกำหนดส่วนประกอบที่อาจเป็นสาเหตุของปัญหาจากนั้นใช้ขั้นตอนการกำจัดส่วนที่เป็นปกติ เพื่อชี้เฉพาะสาเหตุและปัญหาที่ถูกต้อง

น้ำเป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนในการวิเคราะห์แบบ reversed phase ควรจะเลือกใช้เฉพาะน้ำกลั่นที่มีความบริสุทธิ์สูงๆ หรือน้ำ deionize ในการเตรียม mobile phase อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปน้ำ Deionized มักจะมีการปนเปื้อนของสาร organic อยู่ซึ่งสามารถกำจัดโดยการนำน้ำผ่าน Activated Charcoal และ C 18 Cartridge ก่อนการใช้งาน พยายามใช้ solvent , เกลือ ion pair Reagents และสารเคมีอื่น ๆ เฉพาะที่เป็น HPLC Grade การใช้สารละลายในการทำความสะอาดที่มีคุณภาพต่ำ จะเป็นสาเหตุของการตกค้างของสารปนเปื้อนเล็ก ๆ น้อย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของปัญหาเมื่อใช้ High Sensitivity Ultraviolet หรือ Fluorescence Detector

เพื่อช่วยป้องกันการเกิดฟองในระบบควรนำ Mobile phase มา degas ก่อนการใช้งาน หรือ sparge ด้วย Helium 3-5 Psi ระหว่างการใช้งาน การกรอง mobile phase ผ่าน 0.2 หรือ 0.45 Micron Filter สามารถกำจัด gas ได้รวมไปถึงการกำจัดฝุ่นละอองที่อาจเป็นสาเหตุของ Noise ที่ baseline หรืออุดตันที่ column

หลีกเลี่ยงการผสม solvent ที่แตกต่างกันหรือไม่สามารถละลายกันได้ จะต้องมีการ Flush ระบบที่สมบูรณ์เมื่อต้องการเปลี่ยนชนิดของ Mobile Phase และพยายามใช้ solvent ที่เป็น Intermediate Polarity เสมอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพราะว่าสารละลาย Aqueous Buffer จำนวนมากสามารถทำให้เกิดการเจริญเติบโตของ Algae หรือ Actria ดังนั้นควรทิ้ง Buffer ที่ขุ่นและเตรียมใหม่ในการใช้งาน สามารถป้องกันการเจริญเติบโตของ Microorganism โดยการเติม 100 Ppm ของ Sodium Azide ในสารละลาย Aqueous Buffer หรืออาจจะผสม Buffer กับ Organic solvent อย่างเช่น Acetonitrile ใช้ Ion Pair Reagents อย่างระมัดระวังในแต่ละการวิเคราะห์ทั้ง Optimum Chain Length และความเข้มข้นของ Reagent โดยทั่วไปการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นหรือ Chain Length จะเพิ่ม Retention time เราแนะนำให้ใช้ความเข้มข้นที่ 0.2 – 10 Mm ที่ Acetonitrile ความเข้มข้นสูง (>50% ) และ Organic Solvent บางตัวสามารถทำให้เกิดการตกตะกอนของ Ion Pair Reagents ถ้าต้องการสารสกัดที่ได้จากการวิเคราะห์การใช้สารพวก Volatile Modifiers เช่น Triethylamine จะทำการสกัดทำได้ง่าย นอกจากนั้นสารพวก Modifiers สามารถใช้ในการหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกี่ยวข้องกับ Ion Pair Reagents โดยการเติม 0.1 – 1 % ลงใน Buffer การเพิ่มความเข้มข้นของ Modifier จะทำให้ Peak Shape ดีขึ้นสำหรับสารที่เราสนใจแต่จะมีการเปลี่ยนแปลงของ Retention Time

เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการศึกษาให้มีการนำ Mobile Phase กลับมาใช้ใหม่สำหรับการแยกแบบ Isocratic Separations Prolongs Column Life และการลดค่าใช้จ่ายของ solvent อย่างไรก็ตามต้องมีการปรับ Recorder หรือ Integrator เพื่อทดการเพิ่มขึ้นของ Gradual Baseline ที่เกิดขึ้นและระลึกไว้เสมอว่า Volatile Components สามารถระเหยได้ โดยเฉพาะเมื่อมีการนำ Mobile phase กลับมาใช้ใหม่หรือมีการ Degas อย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบใน Mobile phase

การแยกปัญหาของ Pump

Pump ต้องรักษาอัตราการไหลของ solvent เข้าสู่ column ให้คงที่ตลอด ช่วงของการวิเคราะห์ Pump ของ HPLC รุ่นใหม่ ๆ ได้ถูกออกแบบขึ้นทั้ง Syrings , Diaphragm , Piston หรือ Combinations

ปัญหาของระบบ Pump สามารถชี้ได้ง่ายและชัดเจน ปัญหาที่พบโดยทั่วไปคือการผิดพลาดของ Retention Times และการมี Noise ของ baseline หรือเกิด spikes ที่ Chromatogram การรั่วที่ข้อต่อหรือรอยต่อของ Pump เป็นสาเหตุของการวิเคราะห์ที่ไม่ดี สัญลักษณ์ที่เห็นได้ชัดเจนของการรั่วคือการเกิดคราบเกลือตามรอยต่อของ Pump

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Injector และ Injection Solvent

Injector เป็นส่วนที่นำตัวอย่างเข้าสู่ระบบโดยจะให้มีการรบกวนการไหลของ solvent ให้น้อยที่สุด ปัญหาของเครื่องเกี่ยวกับ injector (เช่น การรั่ว , การอุดตัน , การสึกของ Seals ) เป็นปัญหาที่ชี้ได้ว่ายปละชัดเจน ส่วนปัญหาอื่น ๆ อย่างเช่น Irreproducible Injections เป็นปัญหาที่แก้ได้ยากซึ่งบางทีก็เป็นการเกี่ยวดองกับ Injector

การเกิดการเปลี่ยนแปลงความสูงของ Peak เกิด Split Peaks และ Broad Peak อาจมีสาเหตุจากการ Inject ที่มีตัวอย่างไม่เต็ม Loops หรือการเลือกใช้ solvent ในการ injection ไม่เหมาะสมกับ Mobile Phase หรือตัวอย่างมีการละลายที่ไม่ดี ถ้าเป็นไปได้ทำการละลายและ inject ตัวอย่างใน Mobile Phase หรือ injection Solvent ที่มี Eluting Strength ที่ต่ำกว่า Mobile Phase

การป้องกันปัญหาของMobile Phase

ปัญหาของการได้ sensitivity ต่ำและการยกตัวของ baseline , noise หรือการเกิด Spikes บน Chromatogram มักจะมีปัญหามาจาก Mobile phase การปนเปื้อนใน Mobile phase จะสร้างปัญหาในระบบโดยเฉพาะในระบบ Gradient อาจจะทำให้เกิดการยกตัวของ base และเกิด peak ของสารปนเปื้อนเพิ่มขึ้น

น้ำเป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนในการวิเคราะห์แบบ reversed phase ควรจะเลือกใช้เฉพาะน้ำกลั่นที่มีความบริสุทธิ์สูงๆ หรือน้ำ deionize ในการเตรียม mobile phase อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปน้ำ Deionized มักจะมีการปนเปื้อนของสาร organic อยู่ซึ่งสามารถกำจัดโดยการนำน้ำผ่าน Activated Charcoal และ C 18 Cartridge ก่อนการใช้งาน

พยายามใช้ solvent , เกลือ ion pair Reagents และสารเคมีอื่น ๆ เฉพาะที่เป็น HPLC Grade การใช้สารละลายในการทำความสะอาดที่มีคุณภาพต่ำ จะเป็นสาเหตุของการตกค้างของสารปนเปื้อนเล็ก ๆ น้อย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของปัญหาเมื่อใช้ High Sensitivity Ultraviolet หรือ Fluorescence Detector เพื่อช่วยป้องกันการเกิดฟองในระบบควรนำ Mobile phase มา degas ก่อนการใช้งาน หรือ sparge ด้วย Helium 3-5 Psi ระหว่างการใช้งาน การกรอง mobile phase ผ่าน 0.2 หรือ 0.45 Micron Filter สามารถกำจัด gas ได้รวมไปถึงการกำจัดฝุ่นละอองที่อาจเป็นสาเหตุของ Noise ที่ baseline หรืออุดตันที่ column หลีกเลี่ยงการผสม solvent ที่แตกต่างกันหรือไม่สามารถละลายกันได้ จะต้องมีการ Flush ระบบที่สมบูรณ์เมื่อต้องการเปลี่ยนชนิดของ Mobile Phase และพยายามใช้ solvent ที่เป็น Intermediate Polarity เสมอเพราะว่าสารละลาย Aqueous Buffer จำนวนมากสามารถทำให้เกิดการเจริญเติบโตของ Algae ดังนั้นควรทิ้ง Buffer ที่ขุ่นและเตรียมใหม่ในการใช้งาน สามารถป้องกันการเจริญเติบโตของ Microorganism โดยการเติม 100 Ppm ของ Sodium Azide ในสารละลาย Aqueous Buffer หรืออาจจะผสม Buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับ Organic solvent อย่างเช่น Acetonitrileใช้ Ion Pair Reagents อย่างระมัดระวังในแต่ละการวิเคราะห์ทั้ง Optimum Chain Length และความเข้มข้นของ Reagent โดยทั่วไปการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นหรือ Chain Length จะเพิ่ม Retention time เราแนะนำให้ใช้ความเข้มข้นที่ 0.2 – 10 Mm ที่ Acetonitrile ความเข้มข้นสูง (> 50% ) และ Organic Solvent บางตัวสามารถทำให้เกิดการตกตะกอนของ Ion Pair Reagents ถ้าต้องการสารสกัดที่ได้จากการวิเคราะห์การใช้สารพวก Volatile Modifiers เช่น Triethylamine จะทำการสกัดทำได้ง่าย นอกจากนั้นสารพวก Modifiers สามารถใช้ในการหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกี่ยวข้องกับ Ion Pair Reagents โดยการเติม 0.1 – 1 % ลงใน Buffer การเพิ่มความเข้มข้นของ Modifier จะทำให้ Peak Shape ดีขึ้นสำหรับสารที่เราสนใจแต่จะมีการเปลี่ยนแปลงของ Retention Time

เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการศึกษาให้มีการนำ Mobile Phase กลับมาใช้ใหม่สำหรับการแยกแบบ Isocratic Separations Prolongs Column Life และการลดค่าใช้จ่ายของ solvent อย่างไรก็ตามต้องมีการปรับ Recorder หรือ Integrator เพื่อหดการเพิ่มขึ้นของ Gradual Baseline ที่เกิดขึ้นและระลึกไว้เสมอว่า Volatile Components สามารถระเหยได้ โดยเฉพาะเมื่อมีการนำ Mobile phase กลับมาใช้ใหม่หรือมีการ Degas อย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบใน Mobile phase

การแยกปัญหาของ Pump

Pump ต้องรักษาอัตราการไหลของ solvent เข้าสู่ column ให้คงที่ตลอด ช่วงของการวิเคราะห์ Pump ของ HPLC รุ่นใหม่ ๆ ได้ถูกออกแบบขึ้นทั้ง Syrings , Diaphragm , Piston หรือ Combinations

ปัญหาของระบบ Pump สามารถชี้ได้ง่ายและชัดเจน ปัญหาที่พบโดยทั่วไปคือการผิดพลาดของ Retention Times และการมี Noise ของ baseline หรือเกิด spikes ที่ Chromatogram การรั่วที่ข้อต่อหรือรอยต่อของ Pump เป็นสาเหตุของการวิเคราะห์ที่ไม่ดี สัญลักษณ์ที่เห็นได้ชัดเจนของการรั่วคือการเกิดคราบเกลือตามรอยต่อของ Pump

Injector และ Injection Solvent

Injector เป็นส่วนที่นำตัวอย่างเข้าสู่ระบบโดยจะให้มีการรบกวนการไหลของ solvent ให้น้อยที่สุด ปัญหาของเครื่องเกี่ยวกับ injector ( เช่น การรั่ว , การอุดตัน , การสึกของ Seals ) เป็นปัญหาที่ชี้ได้ว่ายปละชัดเจน ส่วนปัญหาอื่น ๆ อย่างเช่น Irreproducible Injections เป็นปัญหาที่แก้ได้ยากซึ่งบางทีก็เป็นการเกี่ยวดองกับ Injector

การเกิดการเปลี่ยนแปลงความสูงของ Peak เกิด Split Peaks และ Broad Peak อาจมีสาเหตุจากการ Inject ที่มีตัวอย่างไม่เต็ม Loops หรือการเลือกใช้ solvent ในการ injection ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสมกับ Mobile Phase หรือตัวอย่างมีการละลายที่ไม่ดี ถ้าเป็นไปได้ทำการละลายและ inject ตัวอย่างใน Mobile Phase หรือ injection Solvent ที่มี Eluting Strength ที่ต่ำกว่า Mobile Phase

<u>การป้องกัน Column</u>

มีอุปกรณ์หลายอย่างที่ใช้ในการช่วยลดปัญหาที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันในขณะที่ทำการแยกได้แก่ Mobile phase Filters, In-Line Filter, Saturator Column และ Guard Column Filter และ Guard Column ป้องกัน column จากการอุดตันของพวก Particles และสารตกค้างที่จะสะสมอยู่ Silica ใน Saturator Column ละลายใน Basic Mobile Phase ช่วยป้องกันส่วนของ Packing ที่เป็น silica based ใน column

อายุการใช้งานของส่วนต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยรวมทั้งส่วนประกอบของ mobile Phase ความบริสุทธิ์ของตัวอย่าง, pH และอื่น ๆ เมื่อมีการอุดตันหรือปนเปื้อนความดันจะสูงขึ้นและเกิด Broad Peak หรือ Split Peak

<u>การใช้ประโยชน์สูงสุดจาก Column ที่ใช้ในการวิเคราะห์</u>

Column มีมากมายหลายขนาดและหลายแบบ มี Packing ให้เลือกมากมาย แต่เพื่อจุดประสงค์เหมือนกันเพื่อทำให้เกิดการแยก ปัญหาโดยทั่วไปที่เกิดกับ Column คือการถูกทำลายไปไม่ว่า Column จะเป็น Reversed Phase หรือ Normal Phase, Ion Exchange, Size Exclusion หรือ Resin Based Packing

สัญลักษณ์ที่แสดงถึงการถูกทำลายคือ รูปร่างของ Peak ผิดปกติ, เกิด Split Peak, Shoulder ไม่สามารถแยกได้, Retention Time ลดลง และมี Back Pressure สูงสัญลักษณ์ดังกล่าวชี้ถึงการมีสารปนเปื้อนซึ่งสะสมที่ Frit หรือ Column Inlet หรือมี Voids , Channels หรือมีความดันต่ำที่ Packing Bed

การถูกทำลายจะเห็นได้ชัดกับ column ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวอย่างเช่น Packing ขนาด 3 Micron ที่ยึดด้วย 0.5 Micron Frits จะอุดตันง่ายกว่า Packing ขนาด 5 หรือ 10 Micron ที่ยึดด้วย Frits 2 Micron หรือ ใหญ่กว่า การป้องกัน Column ที่ถูกต้องและการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมจำเป็นสำหรับทุก Column

การ Load ตัวอย่างมากเกินไปสู่ Column เป็นสาเหตุของการที่ Peak มีรูปร่างไม่ดี และปัญหาอื่น ๆ ความสามารถของ Column ในการ Load ตัวอย่างขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยแต่โดยทั่วไปค่าที่เหมาะสมจะอยู่ที่

Analytical column ( 25 cm x 4.6 mm ) < 500 μg

Semi-preparative column < 100 mg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Preparative column $< 500$ mg

การแก้ปัญหาของ Detector

มี Detector มากกว่า 20 แบบที่ใช้ใน HPLC ส่วนใหญ่ที่นิยมเป็นแบบ Fixed หรือ Variable wave length ultraviolet photometer และ Refractive index detector ส่วน Electrochemical และ Conductivity detector เป็นพวก Current ที่นิยม การปรับปรุง Detector cell technology เพื่อความทนทานและง่ายต่อการใช้งาน

ปัญหาของ Detector แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ Electrochemical และ Mechanical / optical สำหรับ Electrical problem ควรติดต่อกับผู้ผลิตเครื่องมือ ส่วนปัญหาด้าน Mechanical หรือ Optical โดยทั่วไปมีความสัมพันธ์กับ flow cell ปัญหาของ Detector เกี่ยวข้องกับการรั่ว มีฟองอากาศ และการปนเปื้อนใน cell ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิด Spilkes หรือ Baseline noise ที่ Chromatograms

วัสดุที่ใช้ทำ cell โดยเฉพาะที่ใช้กับ Refractive index detectors จะไม่ทนกับความดันสูง ๆ Flow rate หรือ Black pressure ที่สูงกว่าที่ทางโรงงานกำหนดจะทำให้เกิดการแตกร้าวที่ cell window หลอดที่มีอายุมากหรือมีข้อบกพร่อง และการติดตั้ง Detector rise time , gain หรือ attenuation ที่ไม่ถูกต้องจะต้องลด Sensitivity และความสูงของ peak การต่อสายกลับหรือผิดก็สามารถเป็นสาเหตุของปัญหา

ตารางที่ 16 สาเหตุและการแก้ไขปัญหาของการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

| ปัญหา | สาเหตุของปัญหา | คำแนะนำและการแก้ไข |
|---|---|---|
| 1. ไม่มี Peak / Peak มีขนาดเล็กมาก | 1. lamp Detector ปิดอยู่<br>2. มีการหักหรือขาดของสายไฟระหว่าง Detector และ Integrator หรือ Detector<br>3. ไม่มีการไหลของ Mobile Phase<br>4. ไม่มีตัวอย่างหรือตัวอย่างถูกทำลาย<br>5. ตั้งค่าที่ Detector หรือ Recorder | 1. ทำการเปิด Lamp<br>2. ตรวจสอบการต่อสายไฟ<br>3. ดูหัวข้อเรื่อง " ไม่มีการไหลของ Mobile phase "<br>4. ตรวจดูให้แน่ใจว่าหลอด Automatic sampler มีตัวอย่างเพียงพอ ทำการตรวจระบบด้วย standard ที่เตรียมใหม่เพื่อยืนยันว่าปัญหาเกิดจากตัวอย่าง |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| | สูงเกินไป | 5. ตรวจสอบค่า Attenuation หรือ gain ที่ตั้งไว้ |
| 2. ไม่มีการไหลของ Mobile Phase | 1. Pump ปิดอยู่<br>2. มีการอุดตันหรือมีสิ่งกีดขวางการไหล<br>3. มีการรั่ว<br>4. มีอากาศค้างใน Pump Head ( สังเกตุจากความดันจะไม่คงที่ ) | 1. ทำการเปิด Pump<br>2. ตรวจสอบระดับของ mobile phase ในภาชนะ ทำการตรวจสอบอัตราการไหลผ่านระบบ ทำการตรวจสอบว่ามีการอุดตันที่ sample loop หรือมีฟองอากาศขวางอยู่ ตรวจสอบให้แน่ใจว่า Filter ที่กรอง Mobile Phase ขาเข้า สะอาด ส่วนประกอบต่าง ๆใน Mobile Phase ละลายหมดและได้ผ่าน Degassed<br>3. ตรวจสอบดูตามรอยต่อต่าง ๆ ของระบบตรวจสอบว่า Pump ไม่มีการรั่ว , คราบเกลือ ,เสียงที่ปกติ ทำการเปลี่ยน Pump seals ถ้าจำเป็น<br>4. ปลดท่อที่ต่อเข้า Guard column ( ถ้ามี ) หรือขาเข้าของ column ที่ทำการวิเคราะห์ ตรวจสอบอัตราการไหล ทำการ Purge pump ที่อัตราการไหลสูง ( 10 ml/min ) ทำการแยกระบบถ้าจำเป็น ( แยกตัวทีละ Pump Head ) ถ้าระบบมี Check valve ให้ทำการคลาย valve เพื่อให้อากาศออก ถ้าปัญหายังคงอยู่ให้ทำการไล่ระบบด้วย 100% Methanol |
| 3. ไม่มีความดัน / ความดันต่ำกว่าปกติ | 1. มีการรั่ว<br>2. มีการอุดตันที่ขัดขวางการเคลื่อนที่ของ Mobile phase<br>3. มีอากาศค้างใน Pump head | 1. ตรวจสอบดูตามรอยต่อต่าง ๆ ของระบบตรวจสอบว่า Pump ไม่มีการรั่ว , คราบเกลือ ,เสียงที่ปกติ ทำการเปลี่ยน Pump seals ถ้าจำเป็น |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| | สังเกตจากความดันไม่คงที่<br>4. มีการรั่วที่ด้าน Inlet ของ column<br>5. มีฟองอากาศค้างอยู่ในระบบส่วนใดส่วนหนึ่ง<br>6. Seal ของ pump เสื่อมคุณภาพเป็นสาเหตุของการรั่วบริเวณ pump head | 2. ตรวจสอบระดับของ mobile phase ในภาชนะ ทำการตรวจสอบอัตราการไหลผ่านระบบ ทำการตรวจสอบว่ามีการอุดตันที่ sample loop หรือมีฟองอากาศขวางอยู่ ตรวจสอบให้แน่ใจว่า Filter ที่กรอง Mobile Phase ขาเข้า สะอาด ส่วนประกอบต่าง ๆใน Mobile Phase ละลายหมดและได้ผ่าน Degassed<br>3. ปลดท่อที่ต่อเข้า Guard column ( ถ้ามี ) หรือขาเข้าของ column ที่ทำการวิเคราะห์ ตรวจสอบอัตราการไหล ทำการ Purge pump ที่อัตราการไหลสูง ( 10 ml/min ) ทำการแยกระบบถ้าจำเป็น ( แยกตัวทีละ Pump Head ) ถ้าระบบมี Check valve ให้ทำการคลาย valve เพื่อให้อากาศออก ถ้าปัญหายังคงอยู่ให้ทำการไล่ระบบด้วย 100% Methanol<br>4. ทำการต่อ column ใหม่ และ pump สารผ่านที่อัตราเร็ว 1 – 2 ml/min ถ้าความดันยังคงต่ำอยู่ให้ทำการ check leak ที่ปลาย column ทั้งสองด้าน<br>5. ทำการถอดเอา Guard column และ column ที่ทำการวิเคราะห์ออกและทำการไล่ระบบด้วย Mobile phase ทำการต่อ column ใหม่ ถ้าปัญหายังคงอยู่ให้ไล่ระบบด้วย 100% MeOH<br>6. ทำการเปลี่ยน seal ใหม่ |
| 4. ความดันสูงกว่า | 1. มีปัญหาที่ Pump , Injector หรือ | 1. ทำการถอด Guard Column และ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| ปกติ | ท่อต่าง ๆ<br>2. มีการอุดตันที่ Guard Column หรือ Column ที่ใช้มนการวิเคราะห์ | Column ออก และทำการ Pump สารผ่านที่ 2 - 5 ml/min ถ้าความดันไม่ลดลงสาเหตุมาจากระบบ ให้ทำการแยกสาเหตุจากทีละส่วนโดยเริ่มจากการถอด Detector ไล่มาถึง Pump<br>2. ทำการถอด Guard Column ออกและทำการตรวจสอบความความดันทำการเปลี่ยน Guard Column ใหม่ถ้าจำเป็น ถ้า Column ที่ใช้ในการวิเคราะห์อุดตันทำการกลับด้านและ Flush ถ้าปัญหายังคงอยู่แสดงว่า Column อาจจะอุดตันด้วยสารที่แข็งแรงมากให้ทำการ Restoration |
| 5. มีการเปลี่ยนแปลงของ Retention time | 1. มีการรั่ว<br>2. มีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบใน Mobile Phase ( การเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยสามารถนำไปสู่การเปลี่ยนแปลง Retention time อย่างมาก<br>3. มีอากาศค้างอยู่ใน Pump (Retention time จะเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างไม่คงที่ )<br>4. มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของ Column ( โดยเฉพาะในระบบที่เป็น ion exchange )<br>5. ปริมาณตัวอย่างมากเกินไปสำหรับ column ( Retention time ปกติจะลดลงตามมวลของ Solute ที่ Inject สู่ Column ในปริมาณมากเกินความสามารถของ | 1. ตรวจสอบดูตามรอยต่อต่าง ๆ ของระบบตรวจสอบว่า Pump ไม่มีการรั่ว , คราบเกลือ ,เสียงที่ปกติ ทำการเปลี่ยน Pump seals ถ้าจำเป็น<br>2. ตรวจสอบวิธีการเตรียม Mobile phase ถ้า Mobile phase ถูกเตรียมโดยการผสมโดยเครื่องมือหรือด้วยมือและให้ได้มาจากต้นกำเนิดเดียวกัน<br>3. ไล่อากาศออกจาก pump head หรือ Check valves ทำการเปลี่ยน Pump seals ถ้าจำเป็นต้องแน่ใจว่า Mobile phase ถูก degassed<br>4. ใช้ column oven ที่เหมาะสมหรือ Insulate column ( ถ้าอุณหภูมิ column สูงกว่าจะเพิ่มประสิทธิภาพของ Column สำหรับผลการวิเคราะห์ที่ดีที่สุดให้ความร้อนกับสาร Eluant ก่อน |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| | Column )<br>6. ตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายตัวอย่างไม่เข้ากับ Mobile Phase<br>7. Column มีปัญหา ( ไม่ใช่สาเหตุปกติที่ทำให้เกิดการไม่แน่นอนของ Retention time เมื่ออายุของ Column มากขึ้น Retention time จะลดลง ) | ผ่านเข้าสู่ column )<br>5. ทำการ inject ที่ปริมาณน้อยลง ( เช่น 10 µl จาก 100 µl ) หรือทำการเจือจางตัวอย่างลง 1 : 10 และ 1 : 100<br>6. ทำการเปลี่ยน Solvent ให้เหมาะสม ถ้าทำได้ให้ฉีดตัวอย่างที่ละลายใน Mobile phase<br>7. ทำการเปลี่ยน column ใหม่ที่เป็นชนิดเดียวกันเพื่อตรวจสอบ Column ว่าเป็นสาเหตุของปัญหา |
| 6.สูญเสียความสามารถในการแยก | 1. มีการปนเปื้อนใน Mobile Phase หรือ Mobile Phase ถูกทำลาย ( เป็นสาเหตุให้ Retention time เปลี่ยน )<br>2. มีการปนเปื้อนใน Guard Column หรือColumn ที่ใช้ในการวิเคราะห์ | 1. ตรวจสอบวิธีการเตรียม Mobile Phase<br>2. ทำการถอด Guard Column ออกและทำการตรวจสอบความความดันทำการเปลี่ยน Guard Column ใหม่ถ้าจำเป็น ถ้า Column ที่ใช้ในการวิเคราะห์อุดตันทำการกลับด้านและ Flush ถ้าปัญหายังคงอยู่แสดงว่า Column อาจจะอุดตันด้วยสารที่แข็งแรงมากให้ทำการ Restoration |
| 7.Split Peak | 1. มีการปนเปื้อนใน Guard Column หรือ หรือColumn ที่ใช้ในการวิเคราะห์<br>2. ตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายตัวอย่างไม่เข้ากับ Mobile phase | 1. ทำการถอด Guard Column ออกและทำการตรวจสอบความความดันทำการเปลี่ยน Guard Column ใหม่ถ้าจำเป็น ถ้า Column ที่ใช้ในการวิเคราะห์อุดตันทำการกลับด้านและ Flush ถ้าปัญหายังคงอยู่แสดงว่า Column อาจจะอุดตันด้วยสารที่แข็งแรงมากให้ทำการ Restoration<br>2. ทำการเปลี่ยน Solvent ให้เหมาะสมถ้าทำได้ให้ฉีดตัวอย่างที่ละลายใน Mobile Phase |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| 8. Peak Tailing ที่เริ่มต้นและการ Inject ครั้งต่อมา | 1. มีการปนเปื้อนในตัวอย่าง<br>2. ใช้ Column ผิดชนิด<br>3. pH ของ Mobile phase ผิด<br>4. สารตัวอย่างจับกับ Active sites ของ Stationary phase | 1. ตรวจสอบ Column ด้วยสาร Standard<br>2. ทดลองใช้ Column ชนิดอื่น ( เช่น Deactivated column สำหรับ Basic compound )<br>3. ปรับ pH สำหรับสารทั่วๆไป pH ต่ำจะให้ Peak ที่มีลักษณะสมมาตรมากกว่า<br>4. เตรียม Ion pair reagent หรือ Volatile basic modifier |
| 9. Peak ที่มีลักษณะสมมาตรเปลี่ยนเป็น Tailing peak | 1. มีการปนเปื้อนในตัวอย่าง<br>2. มีการรั่ว<br>3. Guard Column หรือ Column ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีการปนเปื้อนหรือผิดปกติ | 1. ตรวจสอบ Column ด้วยสาร Standard<br>2. ตรวจสอบดูตามรอยต่อต่าง ๆ ของระบบตรวจสอบว่า Pump ไม่มีการรั่ว , คราบเกลือ ,เสียงที่ปกติ ทำการเปลี่ยน Pump seals ถ้าจำเป็น<br>3. ถอด Guard Column ออก ( ถ้าสามารถทำได้ ) และตรวจสอบการวิเคราะห์ทำการเปลี่ยน Guard Column |
| 10. Fronting peaks | 1. มีการปนเปื้อนในตัวอย่าง<br>2. Peak มี shoulder หรือมีการยกตัวของ Baseline ก่อน Peak หลัก อาจเกิดจากส่วนประกอบอื่นๆ ในตัวอย่าง<br>3. ปริมาณตัวอย่างมากเกินไปสำหรับ Column<br>11. ตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายตัวอย่างไม่เข้ากับ Mobile phase | 1. ตรวจสอบ Column ด้วยสาร Standard<br>2. เพิ่มประสิทธิภาพเปลี่ยนบางส่วนของระบบเพื่อปรับปรุงการแยก พยายามเปลี่ยนไปใช้ Column อื่นถ้าจำเป็น ( เช่นเปลี่ยนจาก non polas C18 เป็น polar cyano phase )<br>3. ทำการ inject ที่ปริมาณน้อยลง ( เช่น 10 µl จาก 100 µl ) หรือทำการเจือจางตัวอย่างลง 1 : 10 และ 1 : 100<br>4. ทำการเปลี่ยน Solvent ให้เหมาะสมถ้าทำได้ให้ฉีดตัวอย่างที่ละลายใน Mobile Phase ล้าง Polar Bonded Phase Column ด้วย 200 ml Ethylacetate ( HPLC grade ) 2.5 ml/min จากนั้น |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| | | เปลี่ยนมาใช้ Intermediate polarity solvent ก่อนทำการวิเคราะห์ |
| 11.Rounded Peaks | 1. การวัดของ Detector ทำงานนอกขอบเขตของ Liner Dynamic Range<br>2. Gain ของ Recorder ตั้งไว้ต่ำเกินไป<br>3. Column Overload<br>4. เกิดปฏิกิริยาระหว่าง Sample กับ Column<br>5. Detector และ/หรือ Recorder Time Constants ถูกตั้งไว้สูงเกินไป | 1. ลดปริมาณตัวอย่างและ/หรือลดความเข้มข้น<br>2. ปรับ Gain ใหม่<br>3. ทำการ inject ที่ปริมาณน้อยลง ( เช่น 10 µl จาก 100 µl ) หรือทำการเจือจางตัวอย่างลง 1 : 10 และ 1 : 100<br>4. เปลี่ยน Buffer , Strength , pH หรือส่วนประกอบของ Mobile Phase ถ้าจำเป็นให้เพิ่มอุณหภูมิของ Column หรือเปลี่ยนชนิดของ Column ( โครงสร้างของ Solute อาจจะช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยา )<br>5. ลดค่าที่ตั้งไว้ให้ต่ำลงหรือตั้งค่าที่ช่วยให้ชัดขึ้น |
| 12. baseline Drift | 1. อุณหภูมิของ Column ไม่คงที่ ( แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยอาจมีผลต่อการขึ้นลงของ Baseline โดยปกติจะเกิดมากกับ Refractive index และ Conductivity detector UV-detector ที่ Sensitivity สูงหรือ Indirect Photometric Mode )<br>2. Mobile Phase ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ( การยกตัวสูงขึ้นมากกว่า Cyclic pattern จากความไม่คงที่ของอุณหภูมิ<br>3. มีการปนเปื้อนหรือเกิดฟองใน | 1. ควบคุมอุณหภูมิของ Column และ Mobile Phase .ใช้ Heat Exchanger ก่อนถึง Detector<br>2. ใช้ Solvent ที่เป็น HPLC grade ไม่มีเกลือและ additive เจือปนและทำการ Degas mobile phase ก่อนการใช้งานและ Sparge helium ระหว่างการใช้งาน<br>3. ล้าง cell ด้วย methanol หรือ Strong solvent ถ้าจำเป็นให้ทำความสะอาด cell ด้วย 1 N $HNO_3$ ( อย่าใช้ HCl )<br>4. เอาสิ่งอุดตันออกหรือเปลี่ยน line.ใหม่และทำการเปลี่ยน cell ใหม่ตามคู่มือการใช้งาน |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| | Detector cell<br>4. มีการอุดตันทางด้านออกหลังจาก Detector ( ความดันสูงทำให้เกิดรอยร้าวที่ Cell เป็นสาเหตุของ Noise ที่ Baseline )<br>5. มีปัญหาของการผสม Mobile Phase หรือมีการเปลี่ยน Flow Rate<br>6. Column เข้าสู่ Equilibrium ช้า โดยเฉพาะเมื่อมีการเปลี่ยน Mobile Phase<br>7. Mobile Phase มีการปนเปื้อน เสื่อมสลาย หรือเตรียมจากวัตถุดิบคุณภาพต่ำ<br>8. มีสารตกค้าง ( high k' )ปนอยู่ในตัวอย่างการ elute จะได้ peak ที่ broadมากและปรากฏการณ์เหมือนการยกตัวของ Baseline ( การวิเคราะห์แบบ Gradient สามารถเป็นสาเหตุด้วย )<br>9. มีการ Recycled mobile phase แต่ไม่มีการปรับ Detector<br>10. Detector UV ไม่ได้ set ที่ Maximum absorbance แต่เป็นที่ slope ของ curve | 5. เตรียมส่วนประกอบให้ถูกต้องและใช้ Flow rate ที่ถูกต้อง เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาให้ทำการตรวจสอบส่วนประกอบและ Flow rate เป็นประจำ<br>6. ไล่ Column ด้วย Intermediate strength solvent โดยให้ Run 10 –20 เท่าของ column volume ด้วย Mobile phase ตัวใหม่ก่อนทำการวิเคราะห์<br>7. ตรวจสอบขั้นตอนในการเตรียม Mobile phase<br>8. ใช้ Guard Column ถ้าจำเป็นให้ไล่ Column ด้วยStrong solvent ระหว่างการ Injection หรือระหว่างการวิเคราะห์<br>9. ปรับ Baseline ใหม่ ใช้สารใหม่เมื่อ Dyanamic range ของ Detector เกิน<br>10. เปลี่ยนไปใช้ Wavelength ที่ให้ Maximum absorbance |
| 13.Baseline noise ( สม่ำเสมอ ) | 1. มีอากาศใน mobile phase , detector cell หรือ pump<br>2. รั่ว<br>3. Mobile Phase มีการผสมกันที่ไม่สมบูรณ์ | 1. Degas mobile phase ไล่ระบบเพื่อกำจัดอากาศออกจาก Detector cell หรือ pump<br>2. ตรวจสอบดูตามรอยต่อต่าง ๆ ของระบบตรวจสอบว่า Pump ไม่มีการรั่ว , |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| | 4. ผลกระทบจากอุณหภูมิ ( column ที่อุณหภูมิสูง , detector ไม่มีการให้ความร้อน )<br>5. มีเครื่อง Electronic อื่นอยู่ที่ line เดียวกัน<br>6. การทำงานของ pump ไม่สม่ำเสมอ | ดราบเกลือ ,เสียงที่ปกติ ทำการเปลี่ยน Pump seals ถ้าจำเป็น<br>3. ทำการผสม Mobile phase ด้วยมือ หรือใช้ Solvent ที่มีความหนืดน้อย<br>4. ลดความแตกต่างหรือเติม Heat Exchanger<br>5. แยก LC , detector , recorder เพื่อหาส่วนที่เป็นสาเหตุ ถ้าต้นเหตุมาจากนอกระบบให้ทำการจัดการใหม่ให้ถูกต้องถ้าจำเป็น<br>6. จัดการกับสาเหตุที่ทำให้เกิดความไม่สม่ำเสมอในระบบ |
| 14. Baseline noise ( ไม่สม่ำเสมอ ) | 1. รั่ว<br>2. Mobile Phase มีการปนเปื้อน เสื่อมสลาย หรือเตรียมจากวัตถุดิบคุณภาพต่ำ<br>3. ระบบ Electronic ของ Detector หรือ Recorder<br>4. มีอากาศค้างในระบบ<br>5. มีฟองอากาศใน Detector<br>6. มีการปนเปื้อนที่ detector cell (ถึงแม้มีการปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยก็สามารถเป็นสาเหตุของ noise)<br>7. หลอดของ detector หมดอายุการใช้งาน<br>8. มีการรั่วออกของ silica หรือ packing material | 1. ตรวจสอบดูตามรอยต่อต่าง ๆ ของระบบตรวจสอบว่า Pump ไม่มีการรั่ว , ดราบเกลือ ,เสียงที่ปกติ ทำการเปลี่ยน Pump seals ถ้าจำเป็น<br>2. ตรวจสอบขั้นตอนการเตรียม Mobile phase<br>3. ทำการตรวจสอบระบบ Electronic ของ Detector และ Recorder ตามคู่มือการใช้งาน<br>4. ไล่ระบบด้วย Strong solvent<br>5. ทำการ ไล่ฟองอากาศจาก Detector ติดตั้ง Back Pressure Device หลังจาก Detector<br>6. ทำความสะอาด cell<br>7. ทำการเปลี่ยนใหม่<br>8. เปลี่ยน column ใหม่ |
| 15 Broad peak | 1. องค์ประกอบของ Mobile phase | 7. เตรียม Mobile Phase ใหม่ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| | เปลี่ยน<br>2. อัตราการไหลของ Mobile Phase ต่ำเกินไป<br>3. มีการรั่ว ( โดยเฉพาะระหว่าง Column กับ Detector )<br>4. การตั้ง Detector ไม่ถูกต้อง<br>5. ผลกระทบจากภายนอก Column<br>A. Column Overload<br>B. Detector response time หรือ Cell volume ใหญ่เกินไป<br>C. ท่อที่อยู่ระหว่าง Column และ Detector ยาวเกินไป หรือ ID ใหญ่เกินไป<br>D. Recorder Response Time สูงเกินไป<br>6. ความเข้มข้นของ Buffer ต่ำเกินไป<br>7. Guard Column มีการปนเปื้อนหรือเสื่อม<br>8. column มีการปนเปื้อนหรือเสื่อม<br>9. เกิด Void ที่ Column inlet<br>10. มีสารสองสารปนกันอยู่ใน Peak หรือมีสารที่แยกไม่สมบูรณ์<br>11. อุณหภูมิของ Column ต่ำเกินไป | 8. ปรับ Flow Rate ใหม่<br>9. ตรวจสอบดูตามรอยต่อต่าง ๆ ของระบบตรวจสอบว่า Pump ไม่มีการรั่ว , คราบเกลือ ,เสียงที่ปกติ ทำการเปลี่ยน Pump seals ถ้าจำเป็น<br>10. ทำการตั้งใหม่<br>11. A. inject ตัวอย่าง ที่ปริมาณน้อยลง ( เช่น 10 µl จาก 100 µl ) หรือทำการเจือจางตัวอย่างลง 1 : 10 และ 1 : 100<br>B. ลด Response Time หรือใช้ cell ที่เล็กลง<br>C. ใช้ท่อขนาดสั้นที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.007 –0.010 นิ้ว<br>D. ลด Response Time<br>12. เพิ่มความเข้มข้น<br>13. เปลี่ยน Guard column ใหม่<br>14. เปลี่ยน Column ใหม่ที่เป็นชนิดเดิม ถ้า column ใหม่ให้ Peak ที่ปกติให้ทำการล้าง column เก่าและนำไปทดสอบใหม่<br>15. เปิดปลาย Inlet และ Fill void หรือเปลี่ยน column<br>16. เปลี่ยนชนิดของ column เพื่อปรับปรุงการแยก<br>17. เพิ่มอุณหภูมิ ( ไม่ควรเกิน 75 องศาเซลเซียส หรือน้อยกว่าอุณหภูมิสูงสุดที่ใช้ได้กับ Column ) |
| 16. มีการเปลี่ยนความสูงของ Peak ( หนึ่งหรือหลาย Peak ) | 1. มีองค์ประกอบหนึ่งหรือหลายองค์ประกอบในตัวอย่างถูกทำลาย หรือประสิทธิภาพของ | 1. ใช้ตัวอย่างใหม่หรือสารมาตรฐานเพื่อเช็คว่าตัวอย่างเป็นสาเหตุของปัญหา ถ้ามีบาง Peak หรือ ทุก Peak มีขนาดเล็กกว่าที่ควร ให้ทดลองเปลี่ยน Column |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| | column เปลี่ยน<br>2. รั่วโดยเฉพาะระหว่าง Injection Port กับ column inlet ( Retention Time ควรจะเปลี่ยนด้วย )<br>3. ปริมาณตัวอย่างไม่คงที่ที่ไม่สมบูรณ์<br>4. มีการตั้งค่าที่ Detector หรือ Recorder เปลี่ยนไป<br>5. หลอดของ Detector มีพลังงานต่ำ<br>6. มีการปนเปื้อนใน Detector cell | ใหม่<br>2. ตรวจสอบดูตามรอยต่อต่าง ๆ ของระบบตรวจสอบว่า Pump ไม่มีการรั่ว , คราบเกลือ ,เสียงที่ปกติ ทำการเปลี่ยน Pump seals ถ้าจำเป็น<br>3. ต้องแน่ใจว่าได้ว่าสารตัวอย่างถูกต้อง สำหรับ Fix Volume Sample Loop ให้ใช้ปริมาณ 2-3 เท่าของปริมาตร Loop เพื่อให้แน่ใจว่ามีสารตัวอย่างอยู่เต็ม Loop ต้องแน่ใจว่า automatic Sample Vials มีปริมาณตัวอย่างอยู่เพียงพอ ถ้าใช้ Syringe Type Injector ตรวจสอบว่าไม่มีอากาศอยู่ ในระบบที่มีการล้างหรือ Flush ต้องแน่ใจว่าสารที่ใช้ทำความสะอาดไม่ทำให้ส่วนประกอบในตัวอย่างตกตะกอน<br>4. ตรวจสอบการตั้งค่า<br>5. เปลี่ยนหลอดใหม่<br>6. ทำความสะอาด cell |
| 17. มีการเปลี่ยนการแยก | 1. มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของ Ionic strength , pH หรือความเข้มข้นของ Additive ใน solvent ( โดยเฉพาะในสารที่เป็น Ionic solutes )<br>2. เปลี่ยน column ใหม่แล้ว column ให้ผลการแยกที่แตกต่างจาก column เดิม<br>3. ตัวอย่างถูกละลายใน solvent ผิดชนิด หรือมีปริมาณ Solvent มากเกินไป ( 100-200 µL ) | 1. ตรวจสอบขั้นตอนการเตรียม Mobile phase<br>2. ตรวจสอบว่าใช้ Column Packing ที่ถูกต้องสำหรับการวิเคราะห์เดียวกัน ( column ชนิดเดียวกันแต่จากคนละบริษัทควรจะให้ผลการแยกที่เหมือนกัน แต่บางครั้งก็จะมีคุณสมบัติเฉพาะ )<br>3. เปลี่ยน solvent ถ้าเป็นไปได้ให้ inject ตัวอย่างที่ละลายใน Mobile Phase<br>4. ปรับอุณหภูมิใหม่ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | |
|---|---|---|
| | 4. อุณหภูมิของ Column เปลี่ยน<br>5. Column เสื่อม | 5. เปลี่ยน column ใหม่ |
| 18. Negative Peak | 1. ต่อ Recorder กลับขั้ว<br>2. Refractive Index ของ solvent น้อย\กว่าของ Mobile phase ( สำหรับ RI Detector )<br>3. Solvent ที่ใช้ละลายตัวอย่างและ Mobile Phase มีองค์ประกอบที่มีความแตกต่างกันมาก ( UV Detector )<br>4. Mobile Phase ดูดกลืนแสง UV มากกว่าองค์ประกอบของตัวอย่าง ( Vacancy peak ) | 1. ตรวจสอบ Polarity<br>2. ใช้ Mobile Phase ที่มีค่า Refractive Index ต่ำกว่าหรือกลับขั้วของ Recorder<br>3. ปรับหรือเปลี่ยน solvent ที่ละลายตัวอย่าง ถ้าเป็นไปได้ให้เจือจางตัวอย่างด้วย Mobile Phase<br>4. เปลี่ยน UV wavelength หรือใช้ Mobile Phase ที่ไม่ดูดกลืนใน Wavelength ที่ใช้งาน |
| 19. Ghost Peak (Carry over peak) | 1. มีการปนเปื้อน ใน Injector หรือ column | 1. ล้าง injector ระหว่างการวิเคราะห์แต่ละตัว ถ้าจำเป็นให้ Run Strong solvent ผ่าน column เพื่อไล่สารที่ออกตัวสุดท้ายใน Gradient analysis เพื่อไล่สารที่มีการตกค้างสูง |

**การป้องกันและการจัดการปัญหาของ Column End Fitting**

การป้องกันการรั่ว

การรั่วเป็นปัญหาที่ปกติสำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อลดปัญหาการรั่วในระบบ ควรหลีกเลี่ยงการใช้เครื่องมือและข้อต่อ ที่ไม่เข้ากันพอดีถึงจะสามารถต่อเข้ากันได้ดีในตอนแรก แต่จะเกิดการรั่วเมื่อมีการต่อใหม่ในครั้งต่อมา ถ้าไม่สามารถหาข้อต่อที่พอดีกันได้ให้ใช้ Adapter และทำการตรวจทุกข้อต่อว่ามีการรั่วหรือไม่ก่อนทำการทดลอง

สารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ( >0.2M) และ Caustic Mobile Phase สามารถลดประสิทธิภาพของ Pump seal ในบางกรณีการใช้ Ion Pair reagent เป็นเวลานานจะทำให้เกิดเมือกที่ Pump Pistons ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการรั่วเล็ก ๆ ที่ seal และ Seal บางชนิดไม่ทนต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

solvent ก่อนใช้ Pump ใน condition ต่าง ๆให้อ่านข้อจำกัดจากคู่มือการใช้เครื่องมือ ควรมีการเปลี่ยน Seal ตามคู่มือการบำรุงรักษาเครื่องมือ

การป้องกันไม่ให้เกิดการอุดตันที่ column inlet

การอุดตันที่ column inlet เป็นอีกปัญหาที่มักพบในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อลดปัญหานี้ตั้งแต่เริ่มต้นควรที่จะใช้ Guard Column การทำความละอาดด้าน Inlet ในขั้นแรกต้องถอด column ออกและทำการกลับด้าน Column ต่อเข้ากับ Pump ( แต่ไม่ต้องต่อด้าน Detector ) และทำการ Pump solvent ผ่านที่ 1.2 ml/min ใช้ solvent ประมาณ 100 ml จะสามารถไล่อนุภาคเล็ก ๆ ที่ inlet fit ได้ ทำการตรวจสอบผลการทำความสะอาดโดยใช้ Test Mixture Supplied

Filling a void / การเปลี่ยน Frit ที่ Column Inlet

บางครั้งการใช้ solvent flushing หรือ ถึ Retoration ตามขั้นตอน ในการแก้ปัญหาของ column ไม่ได้ผล และถ้าแน่ใจว่าปัญหานั้นมาจาก Column และใช้ขั้นตอนต่าง ๆ ในการ Restorative ไม่ได้ผล สาเหตุอาจจะมาจากมี void ใน Packing หรือมีการอุดตันที่ Inlet Frit

**คำศัพท์ที่เกี่ยวข้องกับการใช้ HPLC**

| | |
|---|---|
| base-line | คือเส้นตรงแนวนอนที่เป็นฐานของกราฟ |
| base-line drift | คือ base-line ที่มีลักษณะที่ขึ้นลง ไม่คงที่ เกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย |
| chromatogram | คือแผ่นกราฟที่แสดงชนิดของสารที่ retention time ต่าง ๆ กัน |
| column | มีลักษณะเป็นแท่งภายในบรรจุด้วย stationary phase ที่ pack ติดอยู่กับ column ซึ่งชนิดของ stationary phase ความยาว และความกว้างของ column มีหลายชนิด ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของการใช้งาน ชนิดของ column ได้แก่ C18 , C 8, CN, ODS, Amino, Phenyl และ Silica เป็นต้น |
| gradient | คือการใช้ mobile phase ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป โดยที่มีอัตราส่วนแปรผันกันเช่น mobile phase A และ B ที่เวลา 1-5 นาที A 20% B 80% ที่เวลา 5-10 นาที A 50% B 50% และที่เวลา 15-20 นาที A 0% B 100% เป็นต้น |
| HPLC | High Performance Liquids Chromatography คือโครมาโตกราฟีที่มีประสิทธิภาพสูง มีหลักการดังนี้ คือภายใน column บรรจุสารที่ทำหน้าที่เป็น stationary phase pack อยู่กับ column และมี mobile phase |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| | เป็นตัวพาสารที่ฉีดผ่านไปยัง column สารที่ดูดซับได้น้อยจะเคลื่อนที่ผ่านได้ง่าย ทำให้มี retention time ต่ำกว่าสารที่ดูดซับได้มาก |
| HPLC grade | คืออุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้เฉพาะกับเครื่อง HPLC เท่านั้น |
| injector | คือบริเวณที่ใช้ฉีดสารเข้าไป การฉีดสารจะใช้อุปกรณ์คล้ายเข็มฉีดยาที่บรรจุสารที่ต้องการทดสอบฉีดเข้าบริเวณ injector |
| mobile phase | คือสารละลายที่ทำหน้าที่เป็นตัวนำสารตัวอย่างผ่านเข้าไปใน column อาจมี 1 ชนิดหรือมากกว่า 1 ชนิดก็ได้ |
| pump | ภายในเครื่อง HPLC จะมี pump สำหรับดูดสารต่าง ๆ เข้าไปภายในเครื่อง |
| retention time | คือเวลาที่สารผ่านออกมาจาก column และแปลสัญญาณออกมาในรูป chromatogram ค่านี้สามารถใช้บอกชนิดของสารได้เมื่อรู้เวลาที่สารชนิดนั้น ๆ ออกมาแน่นอน |
| stationary phase | คือ phase ที่อยู่กับที่เชื่อมต่อกับ column ทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับสารที่ทดสอบ |
| สารตัวอย่าง | คือสารที่ต้องการทราบว่าประกอบด้วยสารใดบ้าง |
| สารมาตรฐาน | เป็นสารบริสุทธิ์ที่รู้ส่วนประกอบและ retention time แน่นอน |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้