ปริมาณวิเคราะห์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* โดยคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส

สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวธนวรรณ ฉายวิริยกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4872304523

QUANTITATIVE ANALYSIS OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN *Pueraria mirifica* BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Miss Thanawan Chayviriyakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2008
Copyright of Chulalongkorn University

512131

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ปริมาณวิเคราะห์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* โดยคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส
โดย	นางสาวธนวรรณ ฉายวิริยกุล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนูญ หนูจักร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ก๊กผล)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนูญ หนูจักร)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

ธนวรรณ ฉายวิริยกุล : ปริมาณวิเคราะห์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* โดยคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (QUANTITATIVE ANALYSIS OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN *Pueraria mirifica* BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. ธรรมนูญ หนูจักร, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, 77 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสสำหรับแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สนใจ เช่น ดาอิดซิน พิวราริน กวาวคูริน ดาอิดเซอิน และจีนิสเตอินในตัวอย่างหัวกวาวเครือขาว โดยศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารโดยการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของบอเรต ชนิดและปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์และศักย์ไฟฟ้า พบว่าการแยกสารที่สมบูรณ์ที่ฐานพีกของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สนใจทั้งหมดภายในเวลา 30 นาที เมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 60 mM $Na_2B_4O_7$ และ 15% v/v เมทานอล ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยกสาร 25 kV จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการที่พัฒนาขึ้นพบว่ามีความแม่นและความเที่ยงในระดับที่ยอมรับได้ ขีดจำกัดของการตรวจวัดของดาอิดซิน พิวราริน กวาวคูริน ดาอิดเซอินและจีนิสเตอินมีค่า 0.7, 0.2, 0.2, 0.1 และ 0.2 ppm ตามลำดับ เมื่อนำคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสที่พัฒนาขึ้นนี้ไปวิเคราะห์ตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวเปรียบเทียบกับไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี พบว่าปริมาณวิเคราะห์ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต..........ธนวรรณ ฉายวิริยกุล..........

ปีการศึกษา...........2551................. ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..........

ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..........

4872304523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: CAPILLARY ELECTROPHORESIS / *Pueraria mirifica*

THANAWAN CHAYVIRIYAKUL : QUANTITATIVE ANALYSIS OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN *Pueraria mirifica* BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. THUMNOON NHUJAK , Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. CHAIYO CHAICHANTIPYUTH, Ph.D., 77 pp.

Capillary electrophoresis (CE) was developed for the separation and quantitative determination of bioactive compounds of interest, such as daidzin (DZ), puerarin (P), kwakhurin (K), daidzein (D) and genistein (G), in *Pueraria mirifica* samples. The separation was optimized by varying borate concentration, type and concentration of organic solvent and applied voltage. The baseline separation of bioactive compounds of interest was achieved within 30 min using a running buffer containing 60 mM $Na_2B_4O_7$ at pH 9.2, 15% (v/v) methanol and applied voltage of 25 kV. The validated method was found to give acceptable accuracy and precision. The limits of detection for DZ, P, K, D and G were obtain to be 0.7, 0.2, 0.2, 0.1 and 0.2 ppm, respectively. The amount of bioactive compounds of interest in *Pueraria mirifica* samples determined by CE was found to be in good agreement with that by high performance liquid chromatography.

Field of Study ......Biotechnology....... Student's Signature..Thanawan Chayviriyakul....

Academic Year ....2008.............. Advisor's Signature....Thumnoon Nhujak.........

Co-Advisor's Signature..Chaiyo Chaichantipyuth....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนูญ หนูจักร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ ข้อคิดเห็น คำแนะนำและคำปรึกษาต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ก๊กผล รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม และ รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่กรุณารับเป็นประธาน และคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ดร. จรัญ ดิษฐไชยวงศ์ และศูนย์วิจัยพืชสวน จังหวัดพิจิตร ที่ได้อนุเคราะห์ตัวอย่างหัวกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica*

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้เงินทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้ และขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ดูแล ให้คำแนะนำและให้ความสะดวกในเรื่องต่างๆ

ขอขอบคุณ นางสาววสุรา สุนทรตันติกุล ที่ช่วยให้คำแนะนำและคำปรึกษาต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณแม่ปาริชาติ และคุณพ่อวีระศักดิ์ ฉายวิริยกุล ที่ให้การสนับสนุนการศึกษา และเป็นกำลังใจให้ด้วยดีตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย..	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..	จ
กิตติกรรมประกาศ..	ฉ
สารบัญ..	ช
สารบัญตาราง..	ญ
สารบัญภาพ..	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..	ฒ
บทที่	
1. บทนำ..	1
1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีสำคัญ หรือสมมติฐาน.................................	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกวาวเครือขาว.....	3
1.3 วัตถุประสงค์ในการทดลอง..	4
1.4 ขอบเขตการวิจัย...	4
1.5 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย..	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..	5
2. ทฤษฎี..	6
2.1 คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอเรซิส (capillary electrophoresis, CE)........................	6
2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง CE...	6
2.3 ทฤษฎีเบื้องต้นของ CE...	7
2.3.1 ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility, μ).......	7
2.3.2 การไหลของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic flow, EOF)..............	9
2.3.3 ลักษณะการเคลื่อนที่ใน CE...	11
2.3.4 พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารภายใต้ภาวะที่มี EOF มาก....................	12
2.3.5 อิเล็กโทรฟีโรแกรมและไมเกรชันไทม์ (electropherogram and migration time)..	13
2.4 ประเภทของ CE..	14

บทที่ หน้า

2.5 คุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE (Quanlitative and Quantitative Analysis in CE)..... 18
3. การทดลอง..... 20
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์..... 20
3.2 สารเคมี..... 20
3.3 การเตรียมสารละลายสำหรับบัฟเฟอร์..... 21
3.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน..... 21
3.5 การเตรียมสารละลายของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาว..... 22
3.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างสำหรับ CZE..... 22
3.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างสำหรับ MEKC..... 22
3.8 ภาวะของ CE สำหรับการทดลอง..... 23
3.9 การหาภาวะของ CZE..... 23
3.10 การหาภาวะของ MEKC..... 24
3.11 การวิเคราะห์ด้วย HPLC..... 24
3.12 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)..... 25
3.13 กราฟมาตรฐาน..... 25
3.14 ความแม่นและความเที่ยง..... 26
3.15 การหาปริมาณดาอิดซิน พิวราริน กวาวคูริน ดาอิดเซอิน และจีนิสเตอินในตัวอย่างกวาวเครือขาวด้วย CZE และ HPLC..... 26
4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 27
4.1 การเลือกภาวะของ CE..... 27
4.1.1 ขนาดและความยาวของคะพิลลารี..... 27
4.1.2 ความยาวคลื่นของการตรวจวัด..... 27
4.1.3 องค์ประกอบของบัฟเฟอร์..... 27
4.2 การหาภาวะของ CZE..... 29
4.2.1 ผลของความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ ($Na_2B_4O_7$)..... 29
4.2.2 ผลของชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์..... 32
4.2.3 ผลของความเข้มข้นทั้งบอเรตและตัวทำละลายอินทรีย์..... 35

บทที่ หน้า

4.2.4 ผลของศักย์ไฟฟ้า.. 41
4.3 การหาภาวะของ MEKC.. 44
4.3.1 ผลของความเข้มข้น SDS.. 44
4.3.2 ผลของความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ ($Na_2B_4O_7$).. 47
4.3.3 ผลของชนิดและปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์.. 50
4.4 การตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์สำหรับ CZE.. 54
4.4.1 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์.. 54
4.4.2 กราฟมาตรฐาน.. 55
4.4.3 ความเที่ยงและความแม่นของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ.. 57
4.5 การวิเคราะห์ด้วย HPLC.. 60
4.5.1 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์.. 60
4.5.2 กราฟมาตรฐาน.. 61
4.6 การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในหัวกวาวเครือขาวด้วย CZE และ HPLC 62
5. สรุปผลการทดลอง.. 66
รายการอ้างอิง.. 68
ภาคผนวก.. 73
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.. 77

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวแบ่งตามแหล่งเพาะปลูกและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 8 ตัวอย่าง	21
4.1	ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ด้วย CZE	55
4.2	ความเที่ยงของไมเกรชันไทม์สำหรับ CZE	58
4.3	ความเที่ยงของพื้นที่ ($A_{corr,\ สารมาตรฐาน}$ / $A_{corr,\ PP}$) สำหรับ CZE	59
4.4	ความแม่นของวิธีการวิเคราะห์สำหรับ CZE	60
4.5	ขีดจำกัดของการวิเคราะห์สำหรับ HPLC	60
4.6	ปริมาณวิเคราะห์ของสารสำคัญทั้ง 5 ชนิดในแต่ละตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวด้วย CZE และ HPLC	65
ผ.1	เปรียบเทียบปริมาณของดาอิดซิน (DZ) ที่วิเคราะห์ได้จาก CZE และ HPLC	74
ผ.2	เปรียบเทียบปริมาณของพิวรารีน (P) ที่วิเคราะห์ได้จาก CZE และ HPLC	74
ผ.3	เปรียบเทียบปริมาณของกวาวคูริน (K) ที่วิเคราะห์ได้จาก CZE และ HPLC	75
ผ.4	เปรียบเทียบปริมาณของดาอิดเซอิน (D) ที่วิเคราะห์ได้จาก CZE และ HPLC	75
ผ.5	เปรียบเทียบปริมาณของจีนิสเตอิน (G) ที่วิเคราะห์ได้จาก CZE และ HPLC	76

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1.1	สูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆ ในหัวกวาวเครือขาว.........	2
2.1	ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE..	6
2.2	แรงไฟฟ้า แรงต้านการเคลื่อนที่และทิศทางการเคลื่อนที่ของสารภายใต้สนามไฟฟ้า..	7
2.3	การไหลของอิเล็กโทรออสโมซิสในคะพิลลารี..	11
2.4	เปรียบเทียบลักษณะการไหลของสารและพีกของสารใน CE (a) และ HPLC (b)......	12
2.5	พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารภายใต้ภาวะที่มี EOF มาก และกรณีที่ผิวของคะพิลลารีเป็นประจุลบและใช้ขั้วไฟฟ้าปกติ...	12
2.6	กลไกการแยกสารใน CZE (a) และ MEKC (b)..	14
2.7	โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวและไมเซลล์...	15
4.1	อิเล็กโทรฟีโรแกรมของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วยกวาวคูรินและจีนิสเตอินอย่างละ 50 ppm) โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ: (a) 10, (b) 30, (c) 40, (d) 50, (e) 60, (f) 70, (g) 90 และ (h) 100 mM, พีก DZ = ดาอิดเซอิน, P = พิวรารินิ, K = กวาวคูริน, D = ดาอิดซิน, G = จีนิสเตอิน, ภาวะอื่นๆ ของ CE: uncoated fused silica capillary ขนาด 75 μm × 60.2 cm (50 cm ถึงเครื่องตรวจวัด), อุณหภูมิของคะพิลลารี 25 °C, ความต่างศักย์ที่ใช้แยกสาร 20 kV, บรรจุสารตัวอย่างด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 5 s, ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm..	30
4.2	ผลของความเข้มข้นบอเรตต่อพฤติกรรมการเคลื่อนที่และการแยกของสาร a) ไมเกรชันไทม์ b) ค่า μ_{eo} c) ค่า μ ของสารทั้ง 5 ชนิด: ภาวะการทดลองดังรูป 4.1............	31
4.3	อิเล็กโทรฟีโรแกรมของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วยกวาวคูรินและจีนิสเตอินอย่างละ 50 ppm) โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 ที่ความเข้มข้น 50 mM $Na_2B_4O_7$ (a) ไม่เติมตัวทำละลายอินทรีย์ (b-d) มีเมทานอล (MeOH) และ (e-g) มีอะซิโตไนไทรล์ (ACN), และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1..................	33
4.4	ไมเกรชันไทม์ของสารที่ความเข้มข้นต่างๆ ของตัวทำละลายอินทรีย์: a) เมทานอล (MeOH) และ b) อะซิโตไนไทรล์ (ACN): ภาวะการทดลองดังรูป 4.3....................	34
4.5	ค่า μ_{eo} ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของตัวทำละลายอินทรีย์: (♦) เมทานอล (MeOH), (■) อะซิโตไนไทรล์ (ACN): ภาวะการทดลองดังรูป 4.3..	34

รูปที่ หน้า

4.6 ค่า μ ของสารที่ความเข้มข้นต่างๆ ของตัวทำละลายอินทรีย์: a) เมทานอล (MeOH) และ b) อะซิโตไนไทรล์ (ACN): ภาวะการทดลองดังรูป 4.3.......................... 35

4.7 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วยกวาวคูรินและจีนิสเตอินอย่างละ 50 ppm) โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 20% v/v เมทานอล โดยมีความเข้มข้นต่างๆกัน: ความเข้มข้นของ $Na_2B_4O_7$ (a) 30, (b) 40, (c) 50, (d) 60 และ (e) 70 mM และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1..... 37

4.8 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วยกวาวคูรินและจีนิสเตอินอย่างละ 50 ppm) โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 20% v/v อะซิโตไนไทล์ โดยมีความเข้มข้นต่างๆกัน: ความเข้มข้นของ $Na_2B_4O_7$ (a) 30, (b) 40, (c) 50, (d) 60 และ (e) 70 mM และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1 38

4.9 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วยกวาวคูรินและจีนิสเตอินอย่างละ 50 ppm) โดยใช้ความเข้มข้นบอเรตต่างๆ ที่ประกอบด้วย 15% v/v ของตัวทำละลายอินทรีย์: (a) เมทานอล และ (b) อะซิโตไนไทรล์: ความเข้มข้นของ $Na_2B_4O_7$ (1) 40, (2) 50, (3) 60 และ (4) 70 mM และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1.. 39

4.10 ไมเกรชันไทม์ของสารโดยใช้บอเรตความเข้มข้นต่างๆ ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ของเมทานอล (MeOH) หรืออะซิโตไนไทรล์ (ACN): (a) 15% v/v MeOH, (b) 15% v/v ACN, (c) 20% v/v MeOH และ (d) 20% v/v ACN: ภาวะการทดลองดังรูป 4.7 ถึง 4.9.. 40

4.11 ค่า μ_{eo} ที่บอเรตความเข้มข้นต่างๆ ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์: (a) 15% v/v และ (b) 20% v/v: (♦) เมทานอล (MeOH), (■) อะซิโตไนไทรล์ (ACN): ภาวะการทดลองดังรูป 4.7 ถึง 4.9.. 40

4.12 ค่า μ ของสารที่บอเรตความเข้มข้นต่างๆ ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ของเมทานอล (MeOH) หรืออะซิโตไนไทรล์ (ACN): (a) 15% v/v MeOH, (b) 15% v/v ACN, (c) 20% v/v MeOH และ (d) 20% v/v ACN: ภาวะการทดลองดังรูป 4.7 ถึง 4.9.. 41

4.13 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย โดยใช้ 60 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ประกอบด้วย 15% v/v ของเมทานอล, ใช้ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ กัน และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1.. 42

รูปที่ หน้า

4.14 ผลของศักย์ไฟฟ้าต่อพฤติกรรมการเคลื่อนที่และการแยกของสาร a) ไมเกรชันไทม์ b) ค่า μ_{eo} c) ค่า μ ของสารทั้ง 5 ชนิด : ภาวะการทดลองดังรูป 4.13.................... 43

4.15 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของส่วนสกัดกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วยกวาวคูรินและจีนิสเตอินอย่างละ 50 ppm) โดยใช้ 30 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ pH 9.2 ที่ประกอบด้วย SDS ปริมาณต่างๆ กัน: (a) 0, (b) 30, (c) 50, (d) 60, (e) 70 และ (f) 80 mM SDS และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1.. 45

4.16 ผลของความเข้มข้น SDS a) ไมเกรชันไทม์ b) ค่า μ_{eo} c) ค่า μ ของสารทั้ง 5 ชนิด: ภาวะการทดลองดังรูป 4.15.. 46

4.17 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วยกวาวคูรินและจีนิสเตอินอย่างละ 50 ppm) โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS: ความเข้มข้นของ $Na_2B_4O_7$ (a) 10, (b) 20, (c) 25, (d) 30, (e) 35, (f) 40, (g) 45 และ (h) 50 mM และภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1.. 48

4.18 ผลของความเข้มข้นบอเรต a) ไมเกรชันไทม์ b) ค่า μ_{eo} c) ค่า μ ของสารทั้ง 5 ชนิด: ภาวะการทดลองดังรูป 4.17.. 49

4.19 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของส่วนสกัดหัวกวาวเครือขาวที่เติมสารที่มีอยู่น้อย (ประกอบด้วยกวาวคูรินและจีนิสเตอินอย่างละ 50 ppm) โดยใช้ 30 mM $Na_2B_4O_7$ pH 9.2 ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS: (a) ไม่เติมตัวทำละลายอินทรีย์, (b-d) มีเมทานอล (MeOH) และ (e-g) มีอะซิโตไนไทรล์ (ACN): M = เมทริกซ์อื่นในส่วนสกัดกวาวและภาวะอื่นดังรูปที่ 4.1.. 51

4.20 ไมเกรชันไทม์ของสารโดยใช้ 30 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS และตัวทำละลายอินทรีย์: a) เมทานอล (MeOH) และ b) อะซิโตไนไทรล์ (ACN): ภาวะการทดลองดังรูป 4.19.. 52

4.21 ค่า μ_{eo} ที่ใช้ 30 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS และตัวทำละลายอินทรีย์: (♦) เมทานอล (MeOH), (■) อะซิโตไนไทรล์ (ACN): ภาวะการทดลองดังรูป 4.19.. 52

4.22 ค่า μ ของสารที่ใช้ 30 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ประกอบด้วย 60 mM SDS และตัวทำละลายอินทรีย์: a) เมทานอล (MeOH) และ b) อะซิโตไนไทรล์ (ACN): ภาวะการทดลองดังรูป 4.19.. 53

รูปที่ หน้า

4.23 กราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ a) ดาอิดซิน b) พิวราริน c) กวาวคูริน d) ดาอิดเซอิน และ e) จีนิสเตอิน ด้วย CZE.. 56

4.24 กราฟมาตรฐานสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ a) ดาอิดซิน b) พิวราริน c) กวาวคูริน d) ดาอิดเซอิน และ e) จีนิสเตอิน ด้วย HPLC... 61

4.25 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวด้วย CZE โดยใช้ 60 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ประกอบด้วย 15% v/v เมทานอล ที่ pH 9.2 เป็น BGE: ภาวะอื่นๆ ของ CEดังรูปที่ 4.1 โดยมีการเตรียมสารละลายตัวอย่างกวาวเครือขาวดังหัวข้อ 3.5 แล้วนำไปเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 60 mM $Na_2B_4O_7$ และ 15% v/v เมทานอล ซึ่งมี dilution factor เป็น 2 สำหรับตัวอย่าง P2 ถึง P8 และ dilution factor เป็น 8 สำหรับตัวอย่าง P1.. 63

4.26 โครมาโทแกรมของตัวอย่างหัวกวาวเครือขาว P1 ด้วย HPLC โดยใช้ ACN/ 2% acetic acid เป็นเฟสเคลื่อนที่: ภาวะอื่นๆ ของ HPLC ดังหัวข้อที่ 3.12 โดยมีการเตรียมสารละลายตัวอย่างกวาวเครือขาวดังหัวข้อ 3.5 แล้วนำไปเจือจางด้วยเมทานอลซึ่งมี dilution factor เป็น 10 สำหรับตัวอย่าง P1.................................... 64

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

e	ค่าประจุของอิเล็กตรอน (1.6 x 10^{-19} คูลอมบ์)
z	ค่าประจุของสาร
r_h	Hydrodynamic radius of an ion เป็นรัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน ซึ่งเป็นรัศมีของไอออนที่มีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบขณะที่ไอออนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า
η	ความหนืดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์
E	ความเข้มศักย์ไฟฟ้า
I	ความแรงไอออนิก (ionic strength)
d	ขนาดของคะพิลลารี
ζ	ศักย์ไฟฟ้าซีต้า (zeta potential)
ε	permittivity ของตัวกลาง
μ	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility)
μ_A	ค่า μ ของสารตัวอย่าง A
μ_{eo}	ความสามารถในการเคลื่อนที่เนื่องจากอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic mobility)
μ°	ความสามารถในการเคลื่อนที่สัมบูรณ์ (absolute mobility)
μ_{net}	ผลรวมของความสามารถในการเคลื่อนที่ของสาร
μ_{mc}	ความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างในไมเซลล์เฟส
μ_{aq}	ความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างในเอเควียสเฟส
v_{ep}	ความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic velocity)
v_{eo}	ความเร็วอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic velocity)
v_{net}	ผลรวมของความเร็วของสาร (v_{ep}+ v_{eo})
V	ความต่างศักย์ที่ใช้ในการแยกสาร
V_F	volume flow ของสารตัวอย่างที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด
t_m	ไมเกรชันไทม์ของสาร
t_{inj}	เวลาที่ใช้บรรจุสาร
t_{eo}	ไมเกรชันไทม์ของสารที่ไม่มีประจุ หรือ EOF marker
t_R	รีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่าง
t_o	รีเทนชันไทม์ของสารที่ไม่เกิดอันตรกิริยากับเฟสอยู่กับที่
t_{mc}	ไมเกรชันไทม์ของไมเซลล์ที่รวมการเคลื่อนที่เนื่องจาก μ_{mc} และ μ_{eo}
L	ความยาวทั้งหมดของคะพิลลารี

l	ความยาวจากปลายคะพิลลารีด้านบรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด
k	อัตราส่วนของจำนวนโมลของสารในเฟสอยู่กับที่กับเฟสเคลื่อนที่
K	distribution constant ของสารระหว่างไมเซลล์เฟสและเอเควียสเฟส
C_{mc}	ความเข้มข้นของสารตัวอย่างในไมเซลล์เฟส
C_{aq}	ความเข้มข้นของสารตัวอย่างในเอเควียสเฟส
n_{mc}	จำนวนโมลของสารในไมเซลล์เฟส
n_{aq}	ของจำนวนโมลของสารในเอเควียสเฟส
ϕ	อัตราส่วนของปริมาตรของไมเซลล์เฟสและเอเควียสเฟส
x_{aq}	เศษส่วนโมลของสารตัวอย่างในไมเซลล์เฟส
x_{mc}	เศษส่วนโมลของสารตัวอย่างในเอเควียสเฟส
Q	ปริมาณของสารที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจ
A_{corr}	corrected peak area (พื้นที่ใต้พีกหารด้วยไมเกรชันไทม์)
$A_{corr.\ สารมาตรฐาน}$	corrected peak area ของสารมาตรฐาน
$A_{corr.\ PP}$	corrected peak area ของโพรพิลพาราเบน
BGE	background electrolyte
CE	capillary electrophoresis
CZE	capillary zone electrophoresis
EOF	electroosmotic flow
HPLC	high performance liquid chromatography
ISTD	internal standard
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantitation
SDL	sample detection limit
SQL	sample quantitation limit
MEKC	micellar electrokinetic chromatography
PP	โพรพิลพาราเบน
P	พิวราริน
DZ	ดาอิดซิน
K	กวาวคูริน
D	ดาอิดเซอิน
G	จีนิสเตอิน

UV	ultraviolet
ppm	part per million
i.d.	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน
SDS	sodium dodecyl sulfate
RSD	relative standard deviation