

Thesis Title	Optimization of High Performance Liquid Chromatographic System for the Determination of 20-Hydroxyecdysone and Ecdysone from Some Plants in Thailand
Author	Miss Chonlada Dechakiatkrai
Degree	Master of Science (Chemistry)
Thesis Advisory Committee	Lecturer Dr. Urai Tengjaroenkul Chairperson Lecturer Dr. Somporn Chantara Member

ABSTRACT

Conditions of high performance liquid chromatography (HPLC) have been optimized for the analysis of two ecdysteroids compounds including 20-hydroxyecdysone and ecdysone. These ecdysteroid compounds were separated by using a reversed-phase C_{18} column of 150 x 4.60 mm and 5 μ m particle diameters equipped with HPLC-UV detection. Type of mobile phase, mobile phase composition and flow rate were explored. It was found that for methanol/water system, the detection wavelength was 242 nm, the optimum mobile phase composition was 45% methanol in water and the flow rate was 1.0 mL/min. For acetonitrile/ water system, the detection wavelength was 241 nm, the optimum mobile phase composition was 25% acetonitrile in water and the flow rate was 0.8 mL/min. The analysis time of methanol/water and acetonitrile/water systems were 15 minutes and 9 minutes,

respectively. It was found that the flow rate for acetonitrile/water system needed to be adjusted from 0.8 mL/min to 0.5 mL/min due to some matrices in samples.

For methanol/water system, limits of detection of 20-hydroxyecdysone and ecdysone were 0.073 and 0.052 ppm, respectively. For acetonitrile/water system at the flow rate of 0.8 mL/min, limits of detection of 20-hydroxyecdysone and ecdysone were 0.026 and 0.049 ppm, respectively; whereas at the flow rate of 0.5 mL/min, limits of detection of both compounds were 0.048 and 0.045 ppm, respectively. Limits of quantification of those ecdysteroid compounds of all systems were in a range of 0.086-0.042 ppm.

Solid phase extraction (SPE) was used to preconcentrate ecdysteroid compounds. The optimum conditions of SPE for extraction of selected ecdysteroids were done by 60% methanol in water as eluting solvent. The analyte compounds were eluted and then an aliquot of 1.0 mL was collected before subjected into HPLC system. Percent recoveries of 20-hydroxyecdysone and ecdysone obtained from spiked mixed standard were 101 and 103%, respectively.

Plant samples were extracted using solvent extraction followed by C₁₈ SPE and then analyzed by HPLC system. By spiking various concentrations of mixed standard into real samples, the percent recoveries of both analyte compounds were obtained in a range of 80-111%. The detected 20-hydroxyecdysone was found in a range of ND-9.40 ppm. The analyte peaks obtained were confirmed by liquid chromatography mass/mass spectrometry (LC/MS/MS) under suitable conditions and then analyzed according to their mass-to-charge ratio (m/z) and retention time (t_R).

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	
	สำหรับการหาปริมาณ 20-ไฮดรอกซีเอ็กไดโซนและเอ็กไดโซนจากพืชบางชนิดในประเทศไทย	
ผู้เขียน	นางสาวชลดา เดชาเกียรติไกร	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อาจารย์ ดร.อุไร เต็งเจริญกุล	ประธานกรรมการ
	อาจารย์ ดร.สมพร จันทระ	กรรมการ

บทคัดย่อ

ในการวิเคราะห์สารประกอบเอ็กไดสเตอรอยด์ ได้แก่ 20-ไฮดรอกซีเอ็กไดโซนและเอ็กไดโซน โดยทำการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สารประกอบเอ็กไดสเตอรอยด์ถูกแยกโดยระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งตรวจวัดการดูดกลืนแสงในช่วงยูวี โดยใช้คอลัมน์คาร์บอน 18 ซึ่งมีความยาว 150 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร และมีขนาดอนุภาคของเท่ากับ 5 ไมโครเมตร สภาวะที่ทำการปรับเปลี่ยนได้แก่ ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ สัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ และอัตราการไหล พบว่าระบบของเมทานอลและน้ำมีความยาวคลื่นในการตรวจวัดเท่ากับ 242 นาโนเมตร สัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์เมทานอลในน้ำ และอัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับระบบของอะซิโตนไตรคลอไรด์และน้ำ มีความยาวคลื่นในการตรวจวัดเท่ากับ 241 นาโนเมตร สัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์อะซิโตนไตรคลอไรด์ในน้ำ และอัตราการไหลเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ทั้งระบบของเมทานอลในน้ำและระบบของอะซิโตนไตรคลอไรด์ในน้ำใช้เวลาในการวิเคราะห์เท่ากับ 15 และ 9

นาที่ ตามลำดับ เมื่อศึกษาตัวอย่างจริงต้องปรับเปลี่ยนอัตราการไหลสำหรับระบบอะซิโตน ไตรล์ในน้ำจาก 0.8 มิลลิลิตรต่อนาทีเป็น 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากเมตริกซ์ที่มีในตัวอย่าง

สำหรับระบบของเมทานอลและน้ำ พบว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดสำหรับสารประกอบ 20-ไฮดรอกซีเอ็กไดโชนและเอ็กไดโชน คือ 0.073 และ 0.052 พีพีเอ็ม ตามลำดับ สำหรับระบบของอะซิโตน ไตรล์และน้ำ อัตราการไหลเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่ามีขีดจำกัดของการตรวจวัดสารประกอบ 20-ไฮดรอกซีเอ็กไดโชนและเอ็กไดโชน เป็น 0.026 และ 0.049 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ขีดจำกัดของการตรวจวัดสารประกอบทั้งสองเท่ากับ 0.048 และ 0.045 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ขีดจำกัดในการวิเคราะห์สารประกอบเอ็กไดสเตอรอยด์สำหรับเฟสเคลื่อนที่ทุกระบบมีค่าอยู่ในช่วง 0.086 ถึง 0.042 พีพีเอ็ม

ได้นำการสกัดโดยใช้เฟสของแข็งมาใช้เพิ่มความเข้มข้นให้กับสารประกอบเอ็กไดสเตอรอยด์ สภาวะการสกัดที่เหมาะสมคือสารละลายผสมของเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 เปอร์เซ็นต์ของ เมทานอล เป็นสารละลายที่ใช้สำหรับการชะสาร สารประกอบที่สนใจจะถูกชะออกมาและเก็บสารละลายที่ได้ 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เมื่อทำการเติมสารมาตรฐานและหาค่าร้อยละการกลับคืนของสารประกอบ 20-ไฮดรอกซีเอ็กไดโชน และเอ็กไดโชน พบว่ามีค่าเท่ากับ 101 และ 103 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อทำการสกัดตัวอย่างพืชโดยทำการสกัดด้วยตัวทำละลายและการสกัดด้วยเฟสของแข็งที่มี คาร์บอน 18 เป็นตัวดูดซับและวิเคราะห์ด้วยระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยการเติมสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นต่างๆในตัวอย่างจริงและหาค่าร้อยละการกลับคืนของสารประกอบทั้งสอง พบว่าอยู่ในช่วง 80 ถึง 111 เปอร์เซ็นต์ พบสารประกอบ 20-ไฮดรอกซีเอ็กไดโชนในช่วงความเข้มข้น ไม่สามารถตรวจวัดได้ ถึง 9.40 พีพีเอ็ม จากนั้นนำพืชของสารเอ็กไดสเตอรอยด์ที่ตรวจพบมาทำการยืนยันผลโดยใช้ลิควิด โครมาโทกราฟี แมสแมส สเปกโทรเมตรี โดยทำการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เพื่อวิเคราะห์ค่ามวลต่อ ประจุและค่าเวลาที่สารนั้นออกจากคอลัมน์