# การพัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิก ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

# DEVELOPMENT OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE DETERMINATION OF ALLANTOIN, NIACINAMIDE AND SALICYLIC ACID IN COSMETIC PRODUCTS

นุชจรินทร์ สนิท

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

# การพัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิก ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

นุชจรินทร์ สนิท

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

# DEVELOPMENT OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE DETERMINATION OF ALLANTOIN, NIACINAMIDE AND SALICYLIC ACID IN COSMETIC PRODUCTS

NUTJARIN SANIT

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of MASTER OF SCIENCE

(Chemistry)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิก ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

ของ

นุชจรินทร์ สนิท

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

---

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

---

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)

..... ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร. เภสัชกรหญิงชุติมา เพชรกระจ่าง)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ฐิติรัตน์ แม้นทิม)

| | |
|---|---|
| ชื่อเรื่อง | การพัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิก ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง |
| ผู้วิจัย | นุชจรินทร์ สนิท |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| ปีการศึกษา | 2563 |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ |

งานวิจัยนี้ได้นำเสนอวิธีการวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกันในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่พัฒนาขึ้น วิธีการเตรียมตัวอย่างสามารถทำได้ง่าย เพียงแค่นำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนแล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่ใช้คอลัมน์ C18 (4.6 x 150 mm, i.d.) มีสารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (pH 3.0) และเมทานอลในอัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 5 นาที ที่อัตราการไหล 0.80 มิลลิลิตรต่อนาที วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ค่าความเป็นเส้นตรงของอัลลันโทอิน ในช่วงความเข้มข้น 20-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกในช่วงความเข้มข้น 5-200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นที่สูง ($R^2 > 0.995$) มีความเที่ยงของวิธีทั้งแบบภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน ซึ่งแสดงในรูปของค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) มีค่าน้อยกว่า 2.0% ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของอัลลันโทอิน เท่ากับ 5 และของไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าร้อยละการคืนกลับของอัลลันโทอินอยู่ในช่วง 98.28-102.34 ไนอะซินาไมด์อยู่ในช่วง 98.44-102.43 และกรดซาลิไซลิกอยู่ในช่วง 98.44-102.53 จะเห็นได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความรวดเร็ว สะดวก ถูกต้อง และแม่นยำ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้สำเร็จ

คำสำคัญ : อัลลันโทอิน, ไนอะซินาไมด์, กรดซาลิไซลิก, ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

| | |
|---|---|
| Title | DEVELOPMENT OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE DETERMINATION OF ALLANTOIN, NIACINAMIDE AND SALICYLIC ACID IN COSMETIC PRODUCTS |
| Author | NUTJARIN SANIT |
| Degree | MASTER OF SCIENCE |
| Academic Year | 2020 |
| Thesis Advisor | Assistant Professor Dr. Piyada Jittangprasert |

This research presents a developed method for the simultaneous analysis of allantoin, niacinamide and salicylic acid in cosmetic products using high-performance liquid chromatography. A simple sample pretreatment was performed by dilution of cosmetic products in deionized water. HPLC analysis was then performed on C18 column (4.6 x 150 mm, i.d.) with a mixture of 20 mM phosphate buffer (pH 3.0) and methanol (40:60, v/v) as a mobile phase. UV absorption at 210 nm was used for detection. The results showed that allantoin, niacinamide and salicylic acid were completely separated at five minutes with a flow rate of 0.80 mL/min. The calibration curves of allantoin, niacinamide and salicylic acid were linear over the ranges 20–500, 5-200, and 5-200 mg/L, respectively with high correlation coefficients ($R^2$> 0.995). The intraday and interday precisions were measured in terms of relative standard deviation (RSD) values. The RSDs of the method were less than 2.0%. The limits of detection were 5 mg/L for allantoin and 1 mg/L for niacinamide and salicylic acid. The recoveries of allantoin, niacinamide and salicylic acid from cosmetic samples ranged from 98.28-102.34%, 98.44-102.43% and 98.44-102.53%, respectively. The developed method was successfully applied for determination of allantoin, niacinamide and salicylic acid in cosmetic products. The proposed method has the advantages of being rapid, simple, accurate and precise.

Keyword : Allantoin, Niacinamide, Salicylic acid, Cosmetic products, High-performance liquid chromatography

# กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ท่านได้เสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาและแนะนำในการดำเนินงานวิจัยทุกขั้นตอน ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องสิ่งต่าง ๆ อย่างดียิ่ง อีกทั้งทำให้ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์ในการทำงานวิจัย ได้รับความรู้และเห็นคุณค่าของงานวิจัย พร้อมทั้งยังเป็นแบบอย่างของอาจารย์ที่ทุ่มเทให้กับศิษย์ในงานด้านการวิจัยและพัฒนาอย่างไม่เหน็ดเหนื่อย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เภสัชกรหญิง ชุติมา เพชรกระจ่าง อาจารย์จากภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และอาจารย์ ดร. ฐิติรัตน์ แม้นทิม ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานและกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ครั้งนี้และให้คำแนะนำเพื่อให้ปริญญานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่คอยให้การสนับสนุนทางด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีที่คอยให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษาและการทำวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบคุณทุก ๆ ท่านไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณครอบครัว เพื่อนๆ พี่ๆ และน้อง ๆ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เป็นกำลังใจและคอยช่วยเหลือมาโดยตลอด

คุณค่าของปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณต่อครอบครัวของผู้วิจัย ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา และญาติสนิททุกท่านที่มอบความรัก กำลังใจ ความเอาใจใส่ และสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในครั้งนี้

นุชจรินทร์ สนิท

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูปภาพ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ ..... 1

ภูมิหลัง ..... 1

ความมุ่งหมายของการวิจัย ..... 3

ความสำคัญของการวิจัย ..... 3

ขอบเขตการวิจัย ..... 3

ขั้นตอนการดำเนินงาน ..... 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 5

1. เครื่องสำอาง ..... 5

2. สารออกฤทธิ์สำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ..... 6

2.1 อัลลันโทอิน (Allantoin) ..... 6

2.2 ไนอะซินาไมด์ (วิตามินบี 3) ..... 7

2.3 กรดซาลิไซลิก (Salicylic acid) ..... 8

3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 9

3.1 การตรวจวัดปริมาณอัลลันโทอินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ..... 9

3.2 การตรวจวัดปริมาณไนอะซินาไมด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง 11

3.3 การตรวจวัดปริมาณกรดซาลิไซลิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง 13

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย ..... 15

1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ..... 15

2. วิธีดำเนินการวิจัย ..... 16

2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง .. 16

2.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ..... 18

2.3 การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณ อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ..... 20

บทที่ 4 ผลการทดลอง ..... 21

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ..... 21

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ..... 28

การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ..... 32

บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ ..... 34

บรรณานุกรม ..... 37

ประวัติผู้เขียน ..... 43

# สารบัญตาราง

**หน้า**

ตาราง 1 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง ..... 29

ตาราง 2 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ..... 30

ตาราง 3 ผลการศึกษาค่าร้อยละการคืนกลับในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น..... 31

ตาราง 4 ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่วิเคราะห์โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น..... 32

# สารบัญรูปภาพ

**หน้า**

ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของอัลลันโทอิน ..... 6

ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของไนอะซินาไมด์ (ก) และกรดนิโคตินิค (ข) ..... 7

ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของกรดซาลิไซลิก ..... 8

ภาพประกอบ 4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ..... 22

ภาพประกอบ 5 โครมาโทแกรมของ (ก) สารละลายมาตรฐานอัลลันโทอิน และ (ข) สารละลายมาตรฐานกรดซาลิไซลิก โดยใช้สารละลายผสมระหว่างน้ำกับเมทานอลในอัตราส่วน 45:55 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 0.70 มิลลิลิตรต่อนาที ..... 23

ภาพประกอบ 6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ (ก) pH 3.0 (ข) pH 4.0 (ค) pH 5.0 กับ เมทานอลในอัตราส่วน 45:55 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 0.70 มิลลิลิตรต่อนาที ..... 24

ภาพประกอบ 7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรด ซาลิไซลิก เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และ เมทานอลที่อัตราส่วน (ก) 55:45 (ข) 50:50 (ค) 40:60 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.70 มิลลิลิตรต่อนาที ..... 25

ภาพประกอบ 8 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และเอทานอลที่อัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.70 มิลลิลิตรต่อนาที ..... 26

ภาพประกอบ 9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ และเวลาของการคงอยู่ของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก เมื่อใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 3.0) และเมทานอลที่อัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ 27

ภาพประกอบ 10 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และเมทานอลที่อัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.80 มิลลิลิตรต่อนาที ..... 28

ภาพประกอบ 11 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานที่ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (ก) อัลลันโทอินที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) ไนอะซินาไมด์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) กรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ..... 30

ภาพประกอบ 12 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางตัวอย่างที่ 3 ..... 33

# บทที่ 1
# บทนำ

## ภูมิหลัง

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเป็นสินค้าที่คนทั่วไปนิยมใช้กันอย่างมากในชีวิตประจำวัน เพื่อใช้ในการรักษาโรคผิวหนังและการดูแลผิวพรรณ ความงาม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เพื่อช่วยบำรุงผิวหน้าให้ขาว กระจ่างใส และลดเลือนปัญหาฝ้ากระ โดยในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจะประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์หลายชนิด ที่มีฤทธิ์แตกต่างกันออกไป อัลลันโทอิน (Allantoin) และสารอนุพันธ์ของอัลลันโทอินเป็นหนึ่งในสารออกฤทธิ์ที่ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการผลิตเครื่องสำอาง เช่น ครีมบำรุงผิว โลชั่น แชมพู และลิปสติก (Zaidi, Sena, & Basilio, 1981) โดยอัลลันโทอิน มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลดการระคายเคืองของผิว เพิ่มความชุ่มชื้น (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2561) ปกป้องและฟื้นฟูเซลล์ผิวที่เสื่อมสภาพ (Dallet, Labat, Kummer, & Dubost, 2000) อัลลันโทอินถูกนำมาใช้ทั้งในการผลิตเครื่องสำอางและในการรักษาทางการแพทย์ โดยไม่แสดงความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง โดยองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (United States Food and Drug Administration) ระบุว่าอัลลันโทอินเป็นสารออกฤทธิ์ที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการปกป้องผิวในช่วงความเข้มข้น ร้อยละ 0.5–2.0 โดยน้ำหนัก (El Mubarak, Lamari, & Kontoyannis, 2013) สำหรับไนอะซินาไมด์ (Niacinamide) หรือที่รู้จักกันในชื่อ วิตามินบี 3 อยู่ในกลุ่มวิตามินบีคอมเพล็กซ์ (B-Complex) หรือที่เรียกว่า Niacin (Nicotinic acid) เป็นวิตามินที่ละลายในน้ำได้ มักพบในอาหารหลากหลายชนิด เช่น ไข่ ผักใบเขียว นม เป็นต้น และเป็นส่วนประกอบที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง มีคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ ช่วยลดเลือนริ้วรอย ลดรอยด่างดำบนใบหน้า ช่วยลดการอักเสบของสิว ทำให้รูขุมขนดูเล็กลง ปรับสภาพผิวให้เรียบเนียน (Yang, Strickland, Kapalavavi, Marple, & Gamsky, 2011) และช่วยปกป้องผิวจากการทำร้ายของรังสี UV อีกด้วย (Zhang et al., 2019) จากผลการทดสอบทางคลินิกพบว่าการใช้ไนอะซินาไมด์ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองและที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ก็ยังคงไม่ก่อให้เกิดความรู้สึกแสบ โดยส่วนใหญ่ปริมาณไนอะซินาไมด์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ลดเลือนริ้วรอย อยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 1.0 ถึง 5.0 โดยน้ำหนัก (Cosmetic Ingredient Review Expert, 2005) ส่วนประกอบที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการผลิตเครื่องสำอางคือ กรดซาลิไซลิก (Salicylic acid) หรือ 2-hydroxy benzoic acid เป็นหนึ่งในสารกันเสียที่สำคัญ ที่มักถูกใช้ในผลิตภัณฑ์ดูแลผิว สารประกอบนี้เรียกอีกอย่างว่ากรด

เบต้าไฮดรอกซี (BHA) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม Keratolytic ด้วยคุณสมบัติความเป็นกรดจึงสามารถลอกผิวหนังชั้นนอกสุด ช่วยในการผลัดเซลล์ผิวเก่า ลดความหมองคล้ำ นอกจากนี้ กรดซาลิไซลิกยังมีฤทธิ์ในการช่วยป้องกันสิวอักเสบ เนื่องจากมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวได้ อย่างไรก็ตาม การใช้สารนี้ในปริมาณมากเกินไปอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค เช่น การระคายเคืองและอาจทำให้เกิดอันตรายต่อผิวหนัง (Gissawong, Srijaranai, & Sansuk, 2019) ดังนั้นการใช้กรดซาลิไซลิกในเครื่องสำอางจึงต้องจำกัดปริมาณในการใช้ โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอนุญาตให้ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอางได้ในระดับความเข้มข้นไม่เกินร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก เพื่อป้องกันอันตรายจากกรดที่สามารถกัดผิวหนัง และเกิดอันตรายต่อผิว (กำหนดชื่อและปริมาณของวัตถุที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง, 2551) ดังนั้นการตรวจวัดปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญชนิดต่างๆในเครื่องสำอาง จึงมีความสำคัญเพื่อตรวจสอบและควบคุมคุณภาพการผลิตผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางให้ได้ตามมาตรฐานที่กำหนด และเป็นการรับรองคุณภาพของผลิตภัณฑ์เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

สำหรับเทคนิคที่มีการรายงานเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในเครื่องสำอาง มีหลายเทคนิค ได้แก่ เทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary Electrophoresis; CE) (Alfazema, Howells, & Perrett, 1998; Iwaki, Murakami, & Kakehi, 2000) เทคนิคยูวีวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรีเชิงอนุพันธ์ (UV-Derivative Spectrophotometry; UVDS) (Braga, Sales, Marins, Ortiz, & Garcia, 2012) เทคนิคโพเทนชิโอเมตรี (Potentiometry) (Long, Li, Nie, & Yao, 2001) และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography; HPLC) ซึ่งเทคนิค HPLC จัดเป็นเทคนิคการแยกเทคนิคมาตรฐาน และได้รับความนิยมในการนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก (El Mubarak et al., 2013; Lin, Wu, & Huang, 2007; Shou et al., 2009) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความถูกต้อง ความแม่นยำ และมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์สูง สามารถตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างได้หลากหลายแบบพร้อมกัน โดยอาศัยหลักการกระจายตัวของสารที่แตกต่างกันในสองวัฏภาค คือ วัฏภาคคงที่ (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยสารใดที่สามารถกระจายตัวในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ดีกว่าวัฏภาคคงที่สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน จากการค้นคว้าข้อมูลพบว่าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีจำหน่ายทั่วไปในปัจจุบัน มักนิยมเติมสารออกฤทธิ์อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกผสมกัน แต่จากการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่ายังไม่มีรายงานวิธีการวิเคราะห์อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก แบบพร้อมกันโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจพัฒนาวิธีวิเคราะห์อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกันโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และนำวิธีที่พัฒนาได้ไปประยุกต์ใช้งานจริงในการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่วางจำหน่ายในท้องตลาด

**ความมุ่งหมายของการวิจัย**

1. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกัน

2. เพื่อประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

**ความสำคัญของการวิจัย**

ได้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกันโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มีความรวดเร็ว และประสิทธิภาพสูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้จริง

**ขอบเขตการวิจัย**

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวิร์สเฟส

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

3. ประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวหน้า ได้แก่ โทนเนอร์ และเซรั่ม ที่วางจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาด

**ขั้นตอนการดำเนินงาน**

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.1 ชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่

1.2 องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

1.3 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

2.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity)

2.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection; LOD)

2.3 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantitation; LOQ)

2.4 ค่าความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ (precision)

2.4.1 ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intraday precision)

2.4.2 ความเที่ยงระหว่างวัน (interday precision)

2.5 ร้อยละของการคืนกลับ (recovery)

3. การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวหน้า ประเภทผลิตภัณฑ์โทนเนอร์ และผลิตภัณฑ์เซรั่ม

# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และนำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. เครื่องสำอาง
2. สารออกฤทธิ์สำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง
3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 1. เครื่องสำอาง

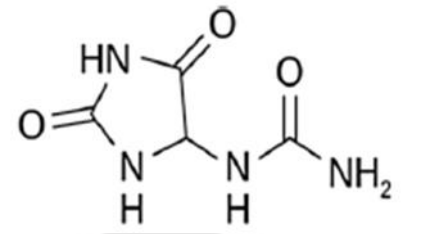
เครื่องสำอาง (Cosmetics) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ส่วนใหญ่ใช้กับผิวกายภายนอก เพื่อความสะอาด สวยงาม แต่งกลิ่นหอม และสามารถปกป้องหรือส่งเสริมให้ร่างกายสวยงามขึ้น อีกทั้งยังเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคทุกกลุ่มทุกวัยต่างก็ใช้เป็นประจำทุกวัน ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมีหลากหลายรูปแบบมากขึ้น เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ ในการผลิตเครื่องสำอางนั้น มีลักษณะการผลิตเหมือนกับการเตรียมหรือการผสมยา แต่จะมีลักษณะที่เฉพาะเด่นชัดและแตกต่างจากการผลิตยาอยู่ 3 ประการ คือเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นหอม มีลักษณะสวยงาม ทั้งลักษณะของผลิตภัณฑ์ รวมถึงการบรรจุหีบห่อ และใช้งานได้ง่าย สะดวกต่อการพกพา (ภาวดี ปรปักษ์ขาม, 2541) เครื่องสำอางโดยทั่วไปจะต้องบอกคุณลักษณะของเครื่องสำอางนั้นๆ ไว้ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.) ได้แก่ ส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ วิธีใช้ ข้อควรระวัง ภาชนะและการบรรจุ รวมถึงการทดสอบ การวิเคราะห์ปริมาณต่างๆ ซึ่งเครื่องสำอางที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันสามารถจำแนกได้เป็นหลายประเภทตามจุดประสงค์การใช้งาน ได้แก่ เครื่องสำอางทำความสะอาด (Cleansing cosmetic) เช่น แชมพู ยาสีฟัน ครีมนวดผม แอลกอฮอล์เจล เจลล้างหน้า สครับขัดผิว ครีมโกนหนวด และครีมอาบน้ำ เป็นต้น เครื่องสำอางบำรุงผิว (Skin care) เช่น โลชั่นบำรุงผิว ครีมบำรุงผิว ครีมบำรุงหน้า ครีมกันแดด ซีรั่มบำรุงผม ลิปบาล์มที่ไม่มีสี เป็นต้น และเครื่องสำอางสำหรับตกแต่ง (Make up) เช่น ครีมรองพื้น อายแชโดว์ บลัชออน ดินสอเขียนคิ้ว และมาสคาร่า เป็นต้น (กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข, 2555) โดยเครื่องสำอางที่วางจำหน่ายในปัจจุบันมีการใส่ส่วนผสมหลายชนิด ทั้งสารเคมีที่ได้จากการสังเคราะห์ และสารสกัดจากธรรมชาติ โดยเฉพาะการใส่สารออกฤทธิ์ (active ingredients) ต่างๆ เพื่อให้เกิดผลลัพธ์ตามวัตถุประสงค์ของเครื่องสำอางนั้นๆ ยกตัวอย่าง เช่น การเติมอัลลันโทอินลงในส่วนผสมของเครื่องสำอาง เพื่อช่วยในด้านการออกฤทธิ์ต้านการ

อักเสบ ลดการระคายเคืองของผิว เพิ่มความชุ่มชื้น ปกป้องและฟื้นฟูเซลล์ผิวที่เสื่อมสภาพ การใช้ไนอะซินาไมด์เป็นหนึ่งในส่วนประกอบของเครื่องสำอาง เพื่อคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ ช่วยลดเลือนริ้วรอย ลดรอยด่างดำบนใบหน้า และช่วยรักษาสิว นอกจากนี้ยังมีส่วนผสมของสารปรับแต่งอื่น ๆ เช่น สารปรับแต่งกลิ่น สี ความคงตัว สารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ช่วยควบคุมค่า pH ของเครื่องสำอาง และสารกันเสีย (Preservatives) ซึ่งผู้ผลิตส่วนใหญ่จะนิยมใส่เป็นหนึ่งในส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องสำอาง เพื่อลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ส่งผลเสียต่อผลิตภัณฑ์และผู้บริโภค ยกตัวอย่างเช่น การใช้กรดซาลิไซลิก (กำหนดวัตถุกันเสียที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง, 2560) นอกจากกรดซาลิไซลิกจะทำหน้าที่เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญอีกด้วย โดยช่วยในการผลัดเซลล์ผิว ลดความหมองคล้ำ และช่วยในการป้องกันสิวอักเสบได้

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ที่สำคัญชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตเครื่องสำอาง โดยเฉพาะเครื่องสำอางประเภทบำรุงผิวหน้า เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของเครื่องสำอางให้เป็นไปตามมาตรฐานการผลิต

## 2. สารออกฤทธิ์สำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

### 2.1 อัลลันโทอิน (Allantoin)




ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของอัลลันโทอิน

ที่ ม า : Lebot, V., Faloye, B., Okon, E., & Gueye, B. (2019). Simultaneous quantification of allantoin and steroidal saponins in yam (Dioscorea spp.) powders. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 13*, 100200. Retrieved from http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214786118304029

อัลลันโทอิน โครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 1 เป็นสารสกัดธรรมชาติจากต้นคอมเฟรย์ (Symphytum spp.) และมันแกวป่า (Dioscorea spp.) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ โดยปกติแล้วอัลลันโทอินเกิดจากการสลายเบสเพียวรีน ได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นอัลลันโทอิน ซึ่งได้มาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดยูริก เป็นที่ทราบกันดีว่าอัลลันโทอินมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา สำหรับใช้เพื่อรักษาบาดแผลเฉพาะที่และลดการอักเสบ ช่วยปกป้องเนื้อเยื่อในกระเพาะอาหาร ยับยั้งการเติบโตของเนื้องอก ลดระดับน้ำตาลในเลือด และมีฤทธิ์ต้านโรคเบาหวาน (Lebot, Faloye, Okon, & Gueye, 2019; Oster et al., 2020) ผู้ผลิตเครื่องสำอางได้นำอัลลันโทอินมาใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางประเภทต่างๆ เช่น ครีมบำรุงผิว โลชั่น แชมพู และลิปสติก (Zaidi et al., 1981) เพื่อช่วยต้านการอักเสบ ลดการระคายเคืองของผิว เพิ่มความชุ่มชื้น (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2561) ปกป้องและฟื้นฟูเซลล์ผิวที่เสื่อมสภาพ (Dallet et al., 2000) จากรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าอัลลันโทอินสามารถนำมาใช้ในเครื่องสำอางและในทางการแพทย์ โดยไม่แสดงความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง โดยองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) ระบุว่า อัลลันโทอินเป็นสารออกฤทธิ์ที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการปกป้องผิวสูงสุดในช่วงความเข้มข้น ร้อยละ 0.5–2.0 โดยน้ำหนัก (El Mubarak et al., 2013)

### 2.2 ไนอะซินาไมด์ (วิตามินบี 3)

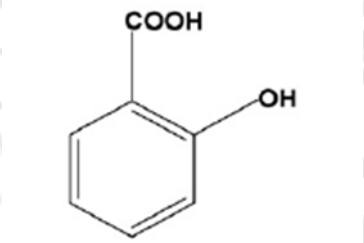
(ก) (ข)

ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของไนอะซินาไมด์ (ก) และกรดนิโคตินิค (ข)

ที่มา : Cosmetic Ingredient Review Expert, P. (2005). Final report of the safety assessment of niacinamide and niacin. *International Journal of Toxicology, 24 Suppl 5*, 1-31. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16596767

ไนอะซินาไมด์ (Niacinamide) โครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 2 (ก) หรือที่รู้จักกันในชื่อ วิตามินบี 3 ซึ่งอยู่ในกลุ่มวิตามินบีคอมเพล็กซ์ (B-Complex) หรือที่เรียกว่า Niacin (Nicotinic acid) โครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 2 (ข) เป็นวิตามินที่สามารถละลายในน้ำได้ มักพบในอาหารหลากหลายชนิด เช่น ไข่ ผักใบเขียว นม เป็นต้น และถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทบำรุงผิว เนื่องจากมีคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ ช่วยลดเลือนริ้วรอย ลดรอยด่างดำบนใบหน้า ช่วยรักษาสิว ช่วยกระชับรูขุมขนและปรับสภาพผิวให้เรียบเนียน (Yang et al., 2011) และยังสามารถช่วยปกป้องผิวจากการทำร้ายของรังสี UV (Zhang et al., 2019) จากผลการทดสอบทางคลินิกพบว่า การใช้ไนอะซินาไมด์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองและที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ก็ยังคงไม่ก่อให้เกิดความรู้สึกแสบ ดังนั้นปริมาณของไนอะซินาไมด์ ที่เหมาะกับการใช้ในผลิตภัณฑ์ลดเลือนริ้วรอย คือช่วงความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 1.0 ถึง 5.0 โดยน้ำหนัก (Cosmetic Ingredient Review Expert, 2005)

**2.3 กรดซาลิไซลิก (Salicylic acid)**




ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของกรดซาลิไซลิก

ที่มา : Shou, M., Galinada, W. A., Wei, Y. C., Tang, Q., Markovich, R. J., & Rustum, A. M. (2009). Development and validation of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of salicylic acid, betamethasone dipropionate and their related compounds in Diprosalic Lotion. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 50*(3), 356-361.

กรดซาลิไซลิก (Salicylic acid) หรือ 2-hydroxybenzoic acid โครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 3 เป็นหนึ่งในสารกันเสียที่สำคัญที่สุด ที่มักนิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ดูแลผิว สารประกอบนี้เรียกอีกอย่างว่า กรดเบต้าไฮดรอกซี (BHA) ซึ่งเป็นสาร

Keratolytic ที่ช่วยลดเคราติน หรือโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของผิวชั้นนอก ทำให้เคราตินที่แข็งนุ่มลง ผิวที่แห้งเป็นขุยจึงหลุดออกได้ง่าย (มหาวิทยาลัยมหิดล, 2558) ด้วยคุณสมบัติความเป็นกรดจึงสามารถลอกผิวหนังชั้นนอกสุด ช่วยในการผลัดเซลล์ผิวเก่า ลดความหมองคล้ำได้ นอกจากนี้กรดซาลิไซลิกยังมีฤทธิ์ในการช่วยป้องกันสิวอักเสบเนื่องจากมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวได้ อย่างไรก็ตามการใช้สารนี้ในปริมาณมากเกินไปอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค เช่น เกิดการระคายเคืองและอาจทำให้เกิดอันตรายต่อผิวหนังได้ (Gissawong et al., 2019) ดังนั้นการใช้กรดซาลิไซลิกในเครื่องสำอางยังคงต้องมีการจำกัดระดับความเข้มข้นในการใช้ โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา อนุญาตให้ใช้กรดซาลิไซลิกเป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอางได้ในระดับความเข้มข้นไม่เกินร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก เพื่อป้องกันอันตรายจากกรดที่สามารถกัดผิวหนังและเกิดอันตรายต่อผิวได้ (กำหนดชื่อและปริมาณของวัตถุที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง, 2551)

## 3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 3.1 การตรวจวัดปริมาณอัลลันโทอินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ในปี ค.ศ. 2000 ดาลเล็ท และคณะ (Dallet et al., 2000) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หายูเรีย อัลลันโทอิน และไลซีน ไพโรกลูตาเมท ในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทครีม โดยใช้คอลัมน์ชนิด Polyhydroxyethyl A (200 x 4.6 mm, 5 µm) ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของอะซีโตไนไตรล์ และสารละลายไตรเอทิลลามีนฟอสเฟต ในอัตราส่วน 80:20 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้สามารถวิเคราะห์ ยูเรีย อัลลันโทอิน และไลซีน ไพโรกลูตาเมท ได้ภายในเวลาไม่เกิน 8 นาที โดยสามารถวิเคราะห์ อัลลันโทอินได้ในช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงเท่ากับ 6-14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดอัลลันโทอินเท่ากับ 0.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีนี้ได้ร้อยละการคืนกลับของอัลลันโทอินเท่ากับ 97.1 และมีร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) เท่ากับ 8.2

ในปีเดียวกัน ซาเดอร์นา และโควอลซิค (Czauderna & Kowalczyk, 2000) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์อัลลันโทอิน กรดยูริก ไฮโปแซนทีน และแซนทีน ในตัวอย่างปัสสาวะ โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ซับซ้อน เพียงแค่นำตัวอย่างมาทำการเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน 1: 6 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ชนิด Nova-Pak C18 (250 x 4.6 mm, 4 µm) ใช้

ระบบเกรเดียนท์ของสารละลายแอมโมเนียมฟอสเฟต เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ (pH 3.5) และสารละลายผสมระหว่างสารละลายแอมโมเนียมฟอสเฟต เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ (pH 3.5) กับเมทานอลในอัตราส่วน 95:5 โดยปริมาตร สำหรับการชะสารออกจากคอลัมน์ ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยตรวจวัดอัลลันโทอินที่ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร สามารถวิเคราะห์อัลลันโทอินได้ในช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงเท่ากับ 68–1504 ไมโครโมลต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 15 นาที มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 16 ไมโครโมลต่อลิตร และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับ 52 ไมโครโมลต่อลิตร วิธีนี้ได้ร้อยละการคืนกลับของอัลลันโทอินอยู่ในช่วง 97.6-104.8 และมีร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) เท่ากับ 2.04

ในปี ค.ศ. 2009 โดอิ และคณะ (Doi et al., 2009) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ไดโซลิดินิลยูเรียยูเรีย และอัลลันโทอิน ในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทโลชั่น โดยใช้คอลัมน์ชนิด COSMOSIL HILIC triazol-bonded silica (250 x 4.6 mm, 5 µm) และใช้สารละลายผสมระหว่างน้ำและอะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 10:90 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 15 นาที สามารถวิเคราะห์อัลลันโทอินได้ในช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.25–1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.075 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร วิธีนี้ได้ร้อยละการคืนกลับของอัลลันโทอินเท่ากับ 102.91 และมีร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) เท่ากับ 1.93

ในปี ค.ศ. 2013 มูบารัก และคณะ (El Mubarak et al., 2013) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์อัลลันโทอิน และกรดไกลโคลิค ในเมือกหอยทากและในตัวอย่างเครื่องสำอางประเภทครีม โดยใช้คอลัมน์ชนิด Synergi Hydro-RP C-18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) และใช้สารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 2.7) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าวิธีการนี้สามารถแยกสารที่สนใจทั้งหมดได้ภายใน 7 นาที มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน และกรดไกลโคลิค เท่ากับ 0.0125 และ 0.2500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ วิธีนี้ได้ร้อยละการคืนกลับของอัลลันโทอินและกรดไกลโคลิค อยู่ในช่วง 96.81-102.42 และมีร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) น้อยกว่า 3.04

ในปี ค.ศ. 2018 แอนดริส และคณะ (Andries, De Rechter, Janssens, Mekahli, & Van Schepdael, 2018) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์อันลันโทอินและอะดีโนซีน ในปัสสาวะของมนุษย์ โดยใช้คอลัมน์ชนิด Zorbax SB-Aq (250 x 4.6 mm, 5 µm) เชื่อมต่อกับการ์ดคอลัมน์ Zorbax

SB-Aq (12.5 x 4.6 mm) และใช้ระบบเกรเดียนท์ของสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 4.7) และสารละลายผสมระหว่างโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 4.7) กับอะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 80:20 โดยปริมาตร ในการชะสารออกจากคอลัมน์ ที่อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที โดยตรวจวัดการดูดกลืนแสงของอันลันโทอินและอะดีโนซีน ที่ความยาวคลื่น 220 และ 259 นาโนเมตร ตามลำดับ พบว่าสามารถวิเคราะห์อัลลันโทอินและอะดีโนซีน ได้ในช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงเท่ากับ 14–800 และ 1.25-50 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับ ได้ร้อยละการคืนกลับของอันลันโทอินและอะดีโนซีนสูงกว่า 93.8 โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่างประมาณ 85 นาที

**3.2 การตรวจวัดปริมาณไนอะซินาไมด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง**

ในปี ค.ศ. 2006 หลิน และคณะ (Lin et al., 2007) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์แอสคอร์บิล-กลูโคไซด์ กรดโคจิก และไนอะซินาไมด์ ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทโลชั่นและครีม โดยใช้คอลัมน์ชนิด Hypersil Fluophase PFP (250 x 4.6 mm, 5 µm) และใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (pH 5.5) และเมทานอล ในอัตราส่วน 60:40 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่ามีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดแอสคอร์บิลกลูโคไซด์ กรดโคจิก และไนอะซินาไมด์ เท่ากับ 0.01 0.01 และ 0.007 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถวิเคราะห์ไนอะซินาไมด์ได้ในช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.024–488 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีนี้ได้ร้อยละการคืนกลับของไนอะซินาไมด์ เท่ากับ 104 และมีร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน(%RSD) เท่ากับ 5.4

ในปี ค.ศ. 2010 หยาง และคณะ (Yang et al., 2011) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ไนอะซินา-ไมด์ ในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว โดยทำการศึกษาวิเคราะห์ไนอะซินาไมด์ โดยใช้คอลัมน์ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ Waters XTerra MS C18, Waters XBridge C18 และ Hamilton PRP-1 โดยใช้น้ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ปราศจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จากการทดลองพบว่าการใช้คอลัมน์ทั้ง 3 ชนิดนี้ สามารถวิเคราะห์ไนอะซินาไมด์ ออกมาที่เวลาน้อยกว่า 3 นาที วิธีนี้ได้ร้อยละการคืนกลับของไนอะซินาไมด์ อยู่ในช่วง 100.1-101.0 และมีร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) น้อยกว่า 2

ในปี ค.ศ. 2012 จิน และคณะ (Jin et al., 2012) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์วิตามินบี 1, 2, 3, 5, 6, 9 และวิตามินซี ในเม็ดยา โดยใช้คอลัมน์ชนิด Alltima C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) และใช้สารละลายแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 3.0) และอะซีโตไนไตรล์เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยวิตามินบี 1, 3, 5, 6 และวิตามินซี จะใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์และอะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 95:5 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ส่วนวิตามินบี 2 และวิตามินบี 9 จะใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์และอะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 85:15 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และทำการตรวจวัดวิตามินบี 1, 3, 6 และวิตามินซี ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ตรวจวัดวิตามินบี 5 ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และตรวจวัดวิตามินบี 2 และ 9 ที่ความยาวคลื่น 282 นาโนเมตร ซึ่งถือเป็นวิธีที่สามารถตรวจวิเคราะห์วิตามินที่ละลายน้ำได้พร้อมกันและรวดเร็ว ใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 25 นาที สามารถวิเคราะห์วิตามินบี 3 ได้ในช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงเท่ากับ 128.2–3205 มิลลิกรัมต่อลิตร วิธีนี้ได้ร้อยละการคืนกลับของวิตามินบี 3 เท่ากับ 99.86 และมีร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) น้อยกว่า 2

ในปีเดียวกัน แสงเชททิ และคณะ (Sangshetti et al., 2016) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์อะทอร์วาสแตตินแคลเซียม และกรดนิโคตินิค ในเม็ดยา โดยใช้คอลัมน์ชนิด ZORBAX SB-C18 (150 x 4.6 mm, 3.5 µm) ใช้สารละลายผสมระหว่างอะซีโตไนไตรล์ และน้ำในอัตราส่วน 85:15 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 4.5 ด้วยกรดฟอสฟอริก ใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 261 นาโนเมตร พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์อะทอร์วาสแตตินแคลเซียม และกรดนิโคตินิค ประมาณ 7 และ 4 นาที ตามลำดับ สามารถวิเคราะห์อะทอร์วาสแตตินแคลเซียม และกรดนิโคตินิค ได้ในช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง เท่ากับ 2-12 และ 10-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ วิธีนี้ได้ร้อยละการคืนกลับของอะทอร์วาสแตตินแคลเซียม และกรดนิโคตินิค เท่ากับ 99.03 และ 99.74 ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2015 เรเมน และคณะ (Remane et al., 2015) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์กรดยูริก ครีเอตินิน และไนอะซินาไมด์ ในตัวอย่างปัสสาวะมนุษย์ โดยใช้คอลัมน์ชนิด Eclipse Plus C18 (100 x 4.6 mm) ใช้ระบบเกรเดียนท์ของสารละลายผสมระหว่างฟอร์เมทบัฟเฟอร์ และเมทานอล ในการชะสารออกจากคอลัมน์ ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 233 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์สารทั้งหมดที่สนใจน้อยกว่า 8 นาที โดยสามารถวิเคราะห์ ไนอะซินาไมด์ ได้ในช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงเท่ากับ 5.0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณไนอะซินาไมด์ เท่ากับ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในปี ค.ศ. 2016 อิบราฮิม และคณะ (Ibrahim, El-Deen, El Abass, & Shimizu, 2017) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์นิโคตินาไมด์ และคลินดาไมอะซินฟอสเฟต ในตัวอย่างเจลรักษาสิว โดยใช้เทคนิคไมเซลลาร์โครมาโทกราฟีแบบของเหลว โดยใช้คอลัมน์ชนิด Eclipse XDB-C8 (150 x 4.6 mm, 5 µm) และใช้สารละลายผสมระหว่างโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟตไตรเอทิลลามีน และกรดฟอสฟอริก เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์นิโคตินาไมด์ และคลินดาไมอะซินฟอสเฟต ประมาณ 3.8 และ 5.6 นาที ตามลำดับ และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณนิโคติ-นาไมด์ และคลินดาไมอะซินฟอสเฟต เท่ากับ 0.19 และ 0.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

**3.3 การตรวจวัดปริมาณกรดซาลิไซลิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง**

ในปี ค.ศ. 2001 เจน และคณะ (Jen, Tsai, & Yang, 2001) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์กรดซาลิไซลิก ในตัวอย่างอิมัลชันที่มีความหนืด ใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างแบบ micro-dialysis จากนั้นทำการวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ชนิด C 18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) และใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 13 มิลลิโมลาร์ (pH 2.3) และอะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 75:25 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร โดยวิธีการเตรียมตัวอย่างนี้เป็นวิธีที่ง่ายสำหรับใช้แยกกรดซาลิไซลิกออกจากตัวอย่างอิมัลชันที่มีความหนืดได้ดี และสามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์กรดซาลิไซลิกในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง พบว่าวิธีนี้สามารถวิเคราะห์กรดซาลิไซลิกได้ภายในเวลา 16 นาที มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ เท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) เท่ากับ 1.82

ในปีเดียวกัน มิกามิ และคณะ (Mikami, Goto, Ohno, Matsumoto, & Nishida, 2002) พัฒนาวิธีวิเคราะห์ กรดดีไฮโดรอะซิติก กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และกรดซาลิไซลิก ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทโลชั่นครีม และแชมพู โดยใช้คอลัมน์ชนิด TSK gel ODS-80TM (150 x 4.6 mm, 5 µm) และใช้สารละลายไทโอบาร์บิทูริกไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ (pH 7.0) และเมทานอล ในอัตราส่วน 65:35 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร พบว่ามีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดกรดดีไฮโดรอะซิติก กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และกรดซาลิไซลิก เท่ากับ 2.5, 4.0, 2.0 และ 5.5 นาโนกรัม ตามลำดับ โดยสามารถวิเคราะห์กรดซาลิไซลิก ได้ในช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงเท่ากับ 1.5-30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีการนี้ได้ร้อยละการคืนกลับของกรดซาลิไซลิกอยู่ในช่วง 96.8-98.6 และมีร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD) น้อยกว่า 3

ในปี ค.ศ. 2009 ชู และคณะ (Shou et al., 2009) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ กรดซาลิไซลิก และเบต้าเมทาโซนไดโพรพิโอเนท ในตัวอย่างโลชั่นที่ใช้รักษาโรคผิวหนัง โดยใช้คอลัมน์ชนิด ODS-H80 (150 x 4.6 mm, 4 μm) ใช้ระบบเกรเดียนท์ของสารละลายผสมระหว่างสารละลายกรดมีเทนซัลโฟนิกและอะซีโตไนไตรล์ ในการชะสารออกจากคอลัมน์ ที่อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่างประมาณ 38 นาที ผลการทดลองพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณกรดซาลิไซลิก และเบต้าเมทาโซนไดโพรพิโอเนท เท่ากับ 0.65 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และได้ร้อยละการคืนกลับของกรดซาลิไซลิกและเบต้าเมทาโซนไดโพรพิโอเนท อยู่ในช่วง 99-102

ในปี ค.ศ. 2015 อเรสต้า และ แซมโบนิน (Aresta & Zambonin, 2016) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์กรดซาลิไซลิก กรดอะซีทิลซาลิไซลิก และกรดเบนโซอิก ในเครื่องดื่มที่ได้จากผักและผลไม้ โดยใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อย และใช้คอลัมน์ชนิด Kinetex C18 (100 x 4.6 mm, 2.6 μm) และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 2 มิลลิ-โมลาร์ (pH 2.8) และอะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 30:70 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ ตามลำดับ ที่อัตราการไหล 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 336 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดสารทั้ง 3 ชนิด อยู่ในช่วง 0.002-0.028 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณสารทั้ง 3 ชนิด อยู่ในช่วง 0.007-0.095 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

4. การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

## 1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

### 1.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอร์เรย์ (Diode array)พร้อมด้วย sample loop ขนาด 20 ไมโครลิตร รุ่น LC-20AD จากบริษัท Shimadsu
- เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น V-750 จากบริษัท Jasco
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน รุ่น Labostar จากบริษัท Siemens
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น ML802E จากบริษัท Mettler Toledo
- เครื่อง pH meter รุ่น MP220 จากบริษัท Mettler Toledo
- เครื่องอัลตราโซนิค รุ่น D2 จากบริษัท GT SONIC
- คอลัมน์ชนิด C18 (Inertsil ODS-3, 150 × 4.6 mm i.d., 5 µm) และการ์ดคอลัมน์ชนิด C18 (Inertsil ODS-3, 20 × 4.0 mm i.d., 5 µm) จากบริษัท GL Sciences
- เข็มฉีดสารตัวอย่าง ขนาด 100 ไมโครลิตร จากบริษัท Vertical
- อุปกรณ์กรองสารตัวอย่าง ชนิดไนลอน ขนาด 0.22 ไมครอน จากบริษัท Lubitech
- ชุดกรองวัฏภาคเคลื่อนที่ จากบริษัท Kimble Chase
- แผ่นกรองวัฏภาคเคลื่อนที่ ชนิดไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน จากบริษัท Phenomenex

**1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย**

- เมทานอล (HPLC grade) จากบริษัท Merck
- เอทานอล (HPLC grade) จากบริษัท Sigma
- โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) จากบริษัท Univar
- กรดฟอสฟอริก ($H_3PO_4$) จากบริษัท Univar
- สารมาตรฐานอัลลันโทอิน ($C_4H_6N_4O_3$) จากบริษัท Sigma Aldrich
- สารมาตรฐานไนอะซินาไมด์ ($C_6H_6N_2O$) จากบริษัท Alfa Aesar
- สารมาตรฐานกรดซาลิไซลิก ($C_7H_6O_3$) จากบริษัท Sigma Aldrich

**1.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย**

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวหน้าที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ประเภทโทนเนอร์และประเภทเซรั่ม ที่วางจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาด

**2. วิธีดำเนินการวิจัย**

**2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง**

2.1.1 ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด

2.1.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย

2.1.1.2 ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดในข้อ 2.1.1.1 ในช่วงความยาวคลื่น 190-800 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และบันทึกสเปกตรัม

2.1.1.3 เลือกความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ($\lambda_{max}$) ของสารแต่ละชนิดเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกัน

2.1.2 ชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่

2.1.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย

2.1.2.2 เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (pH 3.0) และสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 4.0 และ 5.0

2.1.2.3 ศึกษาการใช้ชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่างๆ ได้แก่สารละลายผสมระหว่างน้ำกับเมทานอล และสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์กับเมทานอล โดยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ทำการศึกษา ได้แก่ สารละลายบัฟเฟอร์ที่ค่า pH 3.0-5.0 สภาวะการแยกที่ใช้คือ คอลัมน์ชนิด C18 (4.6 x 150 mm i.d., 5 µm) ที่อัตราการไหล 0.70 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

2.1.2.4 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่างๆ เปรียบเทียบผลการแยกที่ได้ในแต่ละสภาวะ แล้วเลือกชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่สามารถแยกอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกันได้อย่างสมบูรณ์

2.1.3 องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

2.1.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย

2.1.3.2 เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (pH 3.0)

2.1.3.3 ศึกษาการใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนี้

- สารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และเมทานอล ในอัตราส่วน 40:60, 50:50 และ 55:45 โดยปริมาตร

- สารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และเอทานอล ในอัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร

โดยใช้วัฏภาคคงที่คือ คอลัมน์ชนิด C18 (4.6 x 150 mm i.d., 5 µm) ที่อัตราการไหล 0.70 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

2.1.3.4 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่แต่ละสภาวะ เปรียบเทียบผลการแยกที่ได้ แล้วเลือกองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่สามารถแยกอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกันได้อย่างสมบูรณ์

2.1.4 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

2.1.4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 20,10 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย

2.1.4.2 ทำการแยกสารมาตรฐานผสมทั้ง 3 ชนิด ที่อัตราการไหลในช่วง 0.50-1.00 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้วัฏภาคคงที่ คือ คอลัมน์ชนิด C18 (4.6 x 150 mm i.d., 5 µm) วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ สารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 3.0) และเมทานอล ในอัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

2.1.4.3 บันทึกโครมาโทแกรมที่แต่ละอัตราการไหล และเลือกอัตราการไหลที่สามารถวิเคราะห์ผลได้เร็วที่สุดโดยยังคงประสิทธิภาพการแยกที่ดี

**2.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น**

2.2.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง

2.2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ในช่วงความเข้มข้น 5-500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย

2.2.1.2 นำสารละลายมาตรฐานผสมของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา มาทำการแยกในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.1 พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม โดยทำการฉีดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง

2.2.1.3 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานแต่ละชนิด

2.2.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ)

2.2.2.1 เตรียมสารละลายอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในขวดวัดปริมาตรโดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย

2.2.2.2 นำสารละลายข้อ 2.2.2.1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดลองฉีด พร้อมบันทึกโครมาโทแกรมโดยฉีดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ทำการวิเคราะห์จนได้ความเข้มข้นที่มีสัดส่วนของสัญญาณความสูงต่อสัญญาณรบกวน (noise) เท่ากับ 3 และ 10 ซึ่งเป็นค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ ตามลำดับ

2.2.3 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

2.2.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ที่ 3 ระดับความเข้มข้นของช่วงความเป็นเส้นตรง เพื่อเป็นตัวแทนของความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง โดยสารละลายมาตรฐานของอัลลันโทอินวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 20, 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายมาตรฐานของไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 5, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.3.2 สำหรับการศึกษาความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intraday precision) ทำการฉีดสารมาตรฐานผสมที่แต่ละระดับความเข้มข้น พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

2.2.3.3 คำนวณค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation; %RSD) ของสัญญาณพื้นที่ใต้พีคและเวลาของการคงอยู่ (retention time; Rt) ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด

2.2.3.4 สำหรับการศึกษาความเที่ยงระหว่างวัน (interday precision) ทำการฉีดสารมาตรฐานพร้อมบันทึกโครมาโทแกรม เป็นระยะเวลา 3 วันต่อเนื่องกัน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่ทุกวัน คำนวณค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสัญญาณพื้นที่ใต้พีคและเวลาของการคงอยู่ในระยะเวลา 3 วัน

2.2.4 ร้อยละของการคืนกลับ

2.2.4.1 นำแต่ละตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมาเติมสารละลายมาตรฐานผสมอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน 3 ระดับความเข้มข้น

2.2.4.2 นำตัวอย่างในข้อ 2.2.4.1 มาเจือจางให้อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรง จากนั้นนำสารตัวอย่างที่ได้มากรองผ่านแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.22 ไมครอน

2.2.4.3 ฉีดสารตัวอย่าง พร้อมบันทึกโครมาโทแกรมและสัญญาณพื้นที่ใต้พีค ทำการวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง ที่แต่ละระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป

2.2.4.4 คำนวณความเข้มข้นของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกที่เติมในตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน และคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ

**2.3 การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง**

2.3.1 นำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางแต่ละชนิดได้แก่ ผลิตภัณฑ์โทนเนอร์ และผลิตภัณฑ์เซรั่ม มาทำการเจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย

2.3.2 นำสารละลายตัวอย่างเจือจางที่ได้ ไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.22 ไมครอน

2.3.3 ฉีดสารตัวอย่างโดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นพร้อมบันทึกโครมาโทแกรมและสัญญาณพื้นที่ใต้พีค โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกในแต่ละตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

# บทที่ 4
# ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกันในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยขอนำเสนอผลการวิจัยดังหัวข้อต่อไปนี้

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

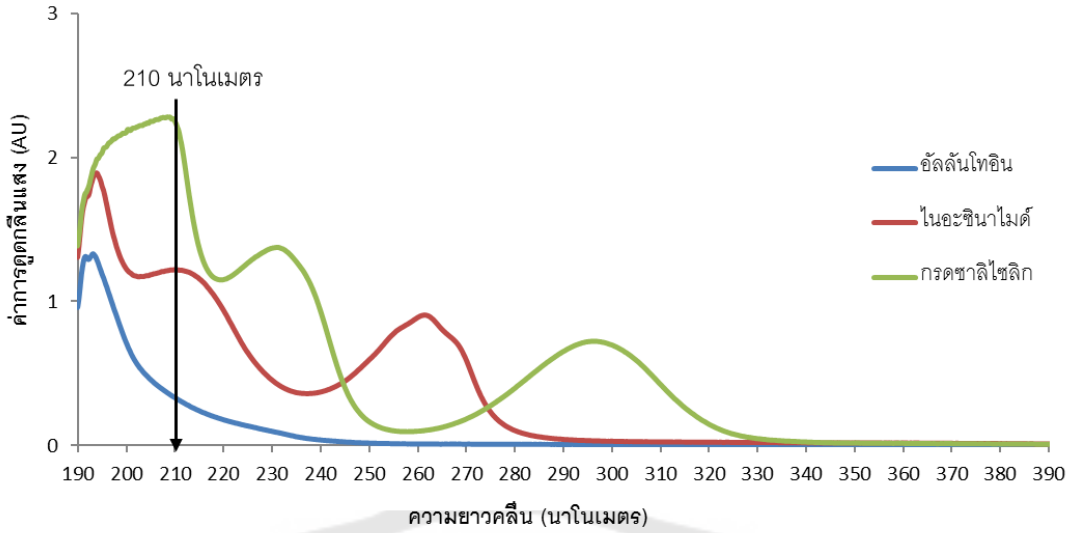
2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

3. การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณ อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

**การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง**

1. ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด

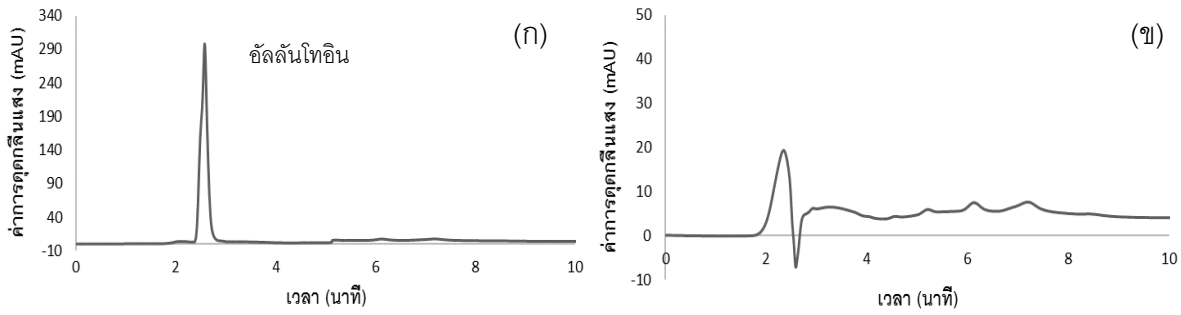
จากการทดลองเมื่อนำสารละลายมาตรฐานอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก มาวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปีที่ช่วงความยาวคลื่น 190-800 นาโนเมตร เพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัด ผลการทดลองแสดงดังภาพประกอบ 4 พบว่า อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 190 ถึง 340 นาโนเมตร โดยอัลลันโทอินมีค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด ($\lambda_{max}$) เท่ากับ 193 นาโนเมตร ในขณะที่ค่า $\lambda_{max}$ ของไนอะซินาไมด์ มีค่าเท่ากับ 194, 210 และ 262 นาโนเมตร ในขณะที่กรดซาลิไซลิก มีค่า $\lambda_{max}$ เท่ากับ 209, 232 และ 279 นาโนเมตร จะเห็นได้ว่าที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกมีค่าการดูดกลืนแสงสูง อีกทั้งยังเป็นความยาวคลื่นที่ไม่มีการรบกวนจากการดูดกลืนแสงของเมทานอล ซึ่งใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นสำหรับการตรวจวัดสารทั้ง 3 ชนิด แบบพร้อมกัน




ภาพประกอบ 4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

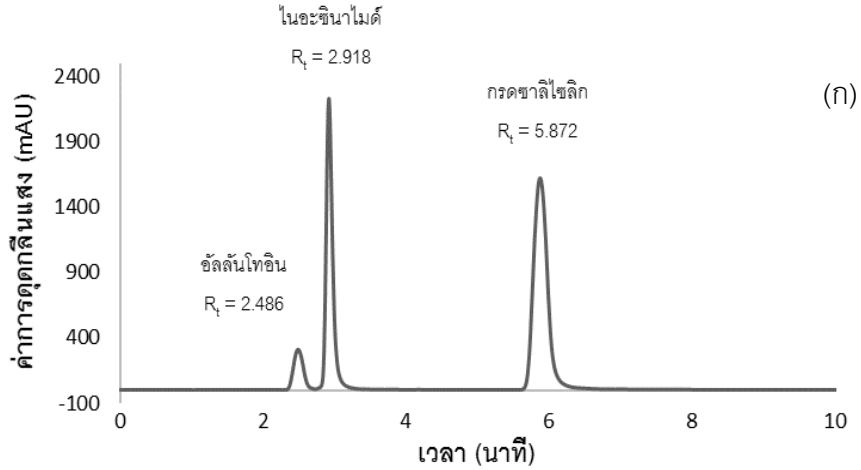
1.2 ชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่

ในงานวิจัยนี้ศึกษาชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ 2 ชนิด ที่แตกต่างกันได้แก่ สารละลายผสมระหว่างน้ำกับเมทานอล และสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์กับเมทานอล ที่มีผลต่อการแยกอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก พบว่าการใช้สารละลายผสมระหว่างน้ำกับเมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สามารถแยกอัลลันโทอินได้ (ภาพประกอบ 5 (ก)) แต่ไม่สามารถแยกไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกได้ ตัวอย่างโครมาโทแกรมของการแยกสารละลายกรดซาลิไซลิกแสดงดังภาพประกอบ 5 (ข) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า การใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์กับเมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สามารถแยกไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกออกจากกันได้ (Lin et al., 2007; Mikami et al., 2002)

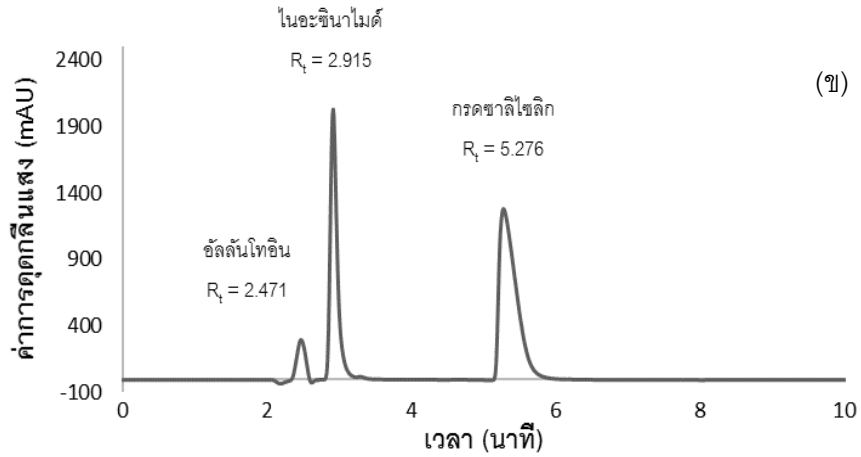


ภาพประกอบ 5 โครมาโทแกรมของ (ก) สารละลายมาตรฐานอัลลันโทอิน และ (ข) สารละลายมาตรฐานกรดซาลิไซลิก โดยใช้สารละลายผสมระหว่างน้ำกับเมทานอลในอัตราส่วน 45:55 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 0.70 มิลลิลิตรต่อนาที

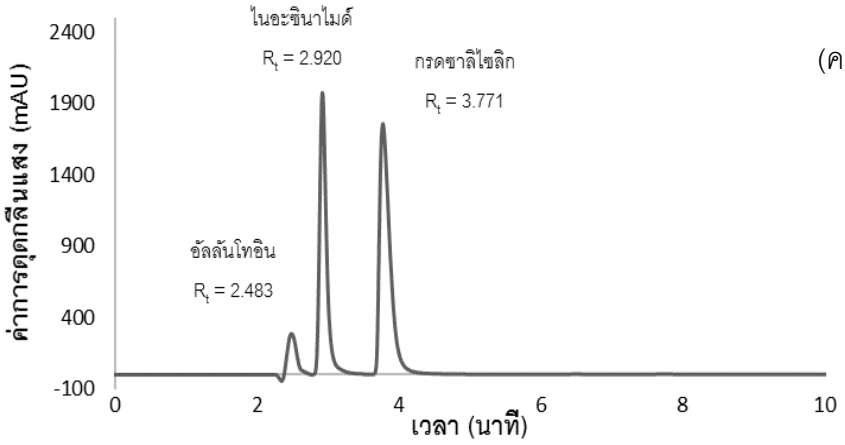
เมื่อทำการศึกษาการใช้สารละลายผสมระหว่างฟอตเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ที่ pH 3.0 กับเมทานอล (El Mubarak et al., 2013) และการใช้สารละลายผสมระหว่างอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ที่ pH 4.0 และ 5.0 กับเมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ผลการทดลองแสดงดังภาพประกอบ 6 พบว่าการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 4.0 และ 5.0 กับเมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ส่งผลต่อสัญญาณ baseline ของโครมาโทแกรม ในช่วงบริเวณด้านหน้าของพีคอัลลันโทอินและด้านหลังของพีคไนอะซินาไมด์ (ภาพประกอบ 6 (ข) และ (ค)) ในขณะที่การใช้สารละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์ที่ pH 3.0 กับเมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ให้สัญญาณ baseline ของโครมาโทแกรมที่เรียบตลอดช่วงการวิเคราะห์ (ภาพประกอบ 6 (ก)) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 3.0 กับเมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่




(ก)




(ข)

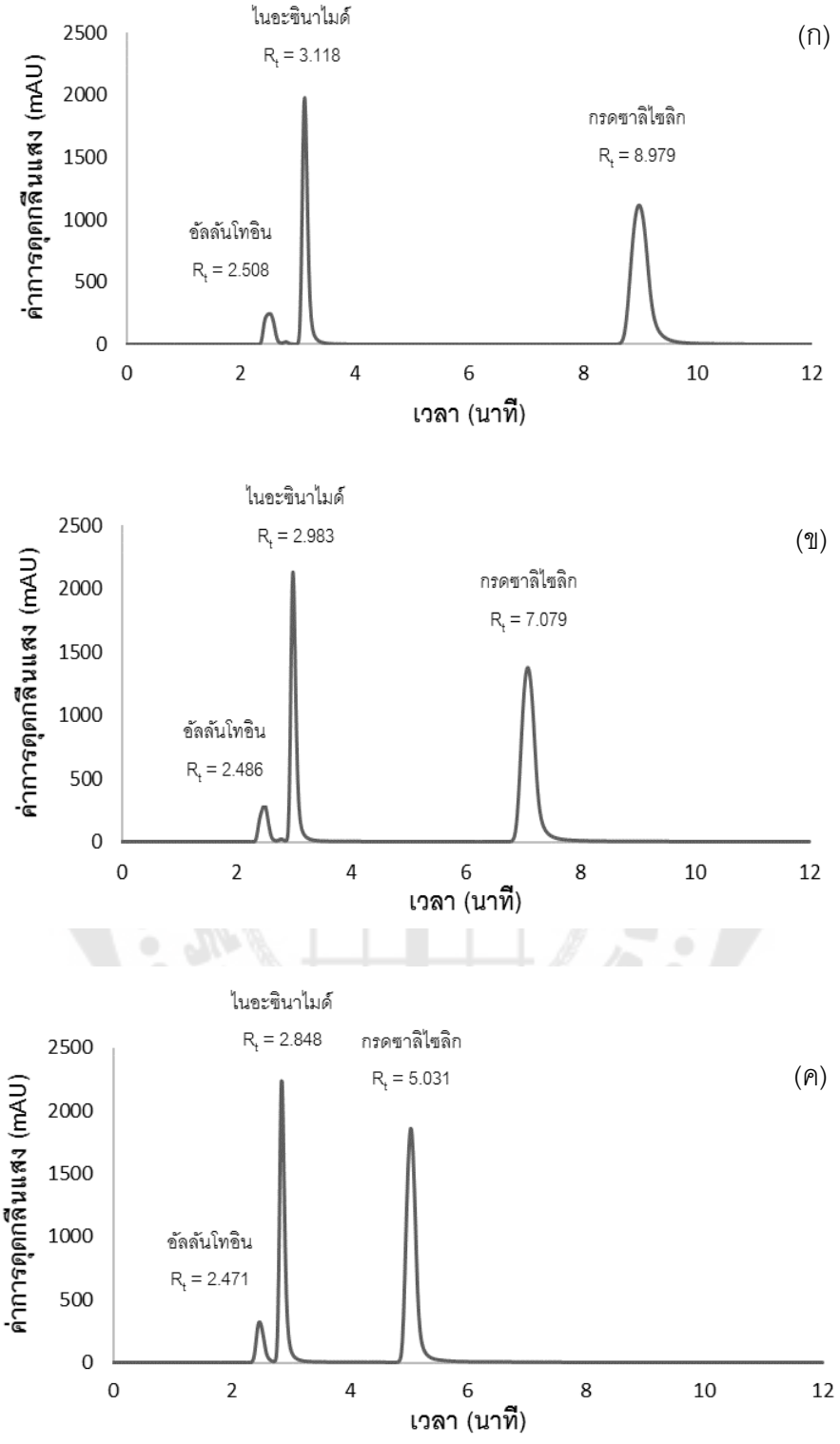



(ค)

ภาพประกอบ 6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ (ก) pH 3.0 (ข) pH 4.0 (ค) pH 5.0 กับ เมทานอลในอัตราส่วน 45:55 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 0.70 มิลลิลิตรต่อนาที

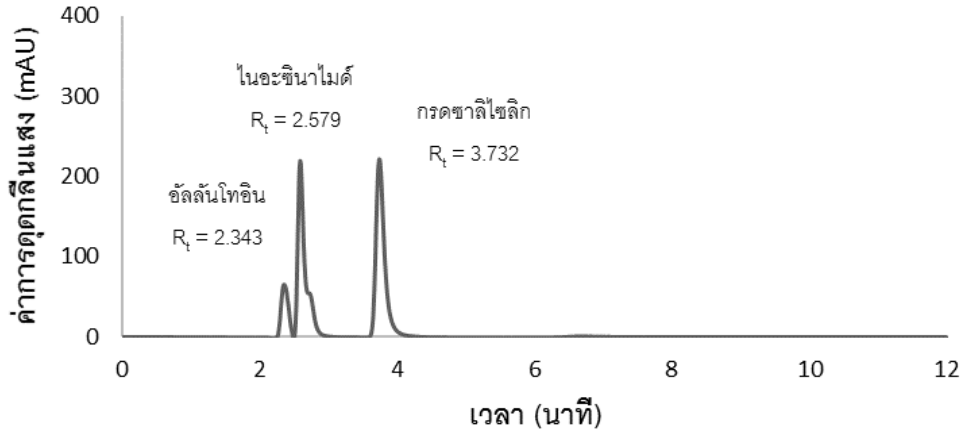
1.3 องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาการใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 3.0 ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และเมทนอลในช่วงอัตราส่วนต่างๆ พบว่าการใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 3.0) และเมทานอล ในอัตราส่วน 55:45 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่นั้นใช้เวลาในการวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิดค่อนข้างนาน (ประมาณ 10 นาที) ดังภาพประกอบ 7(ก) เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของเมทานอลเป็นร้อยละ 50 และ 60 โดยปริมาตร ทำให้สารทั้ง 3 ชนิดเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์เร็วขึ้น ดังภาพประกอบ 7 (ข) และ (ค) ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลจากการปรับความแรงของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เพิ่มขึ้น ทำให้สามารถลดเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ลงได้ จากผลการทดลองจะเห็นได้ชัดเจนว่าการใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 3.0) และเมทานอล ในอัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ใช้เวลาในการแยกอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก น้อยที่สุด และยังคงสามารถแยกสารทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์




ภาพประกอบ 7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และเมทานอลที่อัตราส่วน (ก) 55:45 (ข) 50:50 (ค) 40:60 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.70 มิลลิลิตรต่อนาที

เมื่อทำการศึกษาการใช้สารละลายเอทานอลแทนการใช้เมทานอล เนื่องจากเอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่า โดยใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 3.0) และเอทานอล ในอัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แสดงผลการทดลองในภาพประกอบ 8 จะเห็นได้ว่าสารทั้ง 3 ชนิดเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์เร็วกว่าการใช้สารละลายเมทานอลที่อัตราส่วนเดียวกัน (ภาพประกอบ 7 (ค)) เนื่องจากเอทานอลมีความแรงของวัฏภาคเคลื่อนที่สูงกว่า อย่างไรก็ตามสภาวะนี้ไม่สามารถแยกอัลลันโทอิน และไนอะซินาไมด์ออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 3.0) และเมทานอล ในอัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

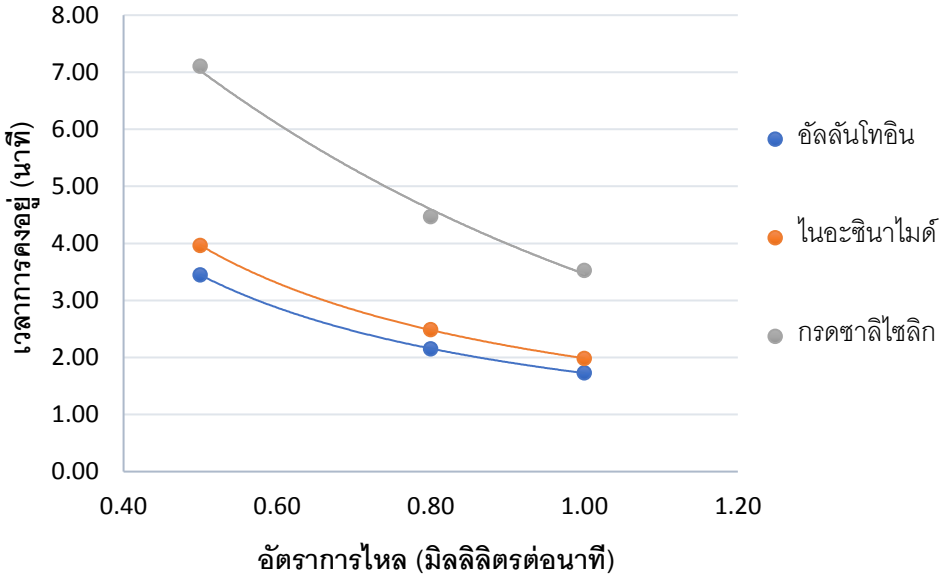



ภาพประกอบ 8 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และเอทานอลที่อัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.70 มิลลิลิตรต่อนาที

1.4 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ในช่วง 0.50-1.00 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับการตรวจวิเคราะห์อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 3.0) และเมทานอลในอัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร จากผลการศึกษาในภาพประกอบ 9 จะเห็นได้ว่าที่อัตราการไหล 0.50 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาการคงอยู่ของสารแต่ละชนิดมีค่ามาก ส่งผลให้ลักษณะของฐานพีคที่แยกได้มีความกว้างค่อนข้างมาก เมื่อเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้สารทั้ง 3 ชนิดเคลื่อนที่

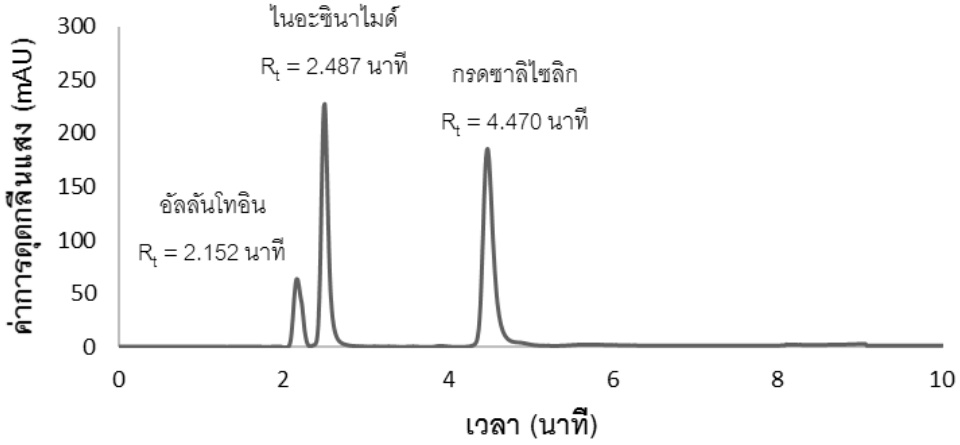
ออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น เวลาการคงอยู่ของสารทั้ง 3 ชนิดจึงมีค่าลดลง โดยที่อัตราการไหล 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที พีคของอัลลันโทอินและไนอะซินาไมด์ เริ่มมีการซ้อนทับกันเล็กน้อย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อัตราการไหลที่ 0.80 มิลลิลิตรต่อนาทีในการวิเคราะห์อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิก เนื่องจากเป็นสภาวะที่สามารถแยกสารทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์




ภาพประกอบ 9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ และเวลาของการคงอยู่ของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก เมื่อใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 3.0) และเมทานอลที่อัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาสภาวะในการแยกอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกัน ในระบบไอโซเครติกที่พัฒนาขึ้น พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิด คือ การใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 3.0) และเมทานอลที่อัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราการไหล 0.80 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดสารทั้ง 3 ชนิดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยภายใต้สภาวะดังกล่าวสามารถแยกอัลลันโทอิน ($R_t$ = 2.152 นาที) ไนอะซินาไมด์ ($R_t$ = 2.487 นาที) และกรดซาลิไซลิก ($R_t$ = 4.470 นาที) ออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 5.00 นาที (ภาพประกอบ 10 ) ซึ่งถือเป็นงานวิจัยแรกที่สามารถตรวจวิเคราะห์อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์

และกรดซาลิไซลิกได้พร้อมกัน อีกทั้งยังใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์น้อย และมีประสิทธิภาพการแยกที่ดี




ภาพประกอบ 10 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์และเมทานอลที่อัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.80 มิลลิลิตรต่อนาที

**การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น**

2.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง

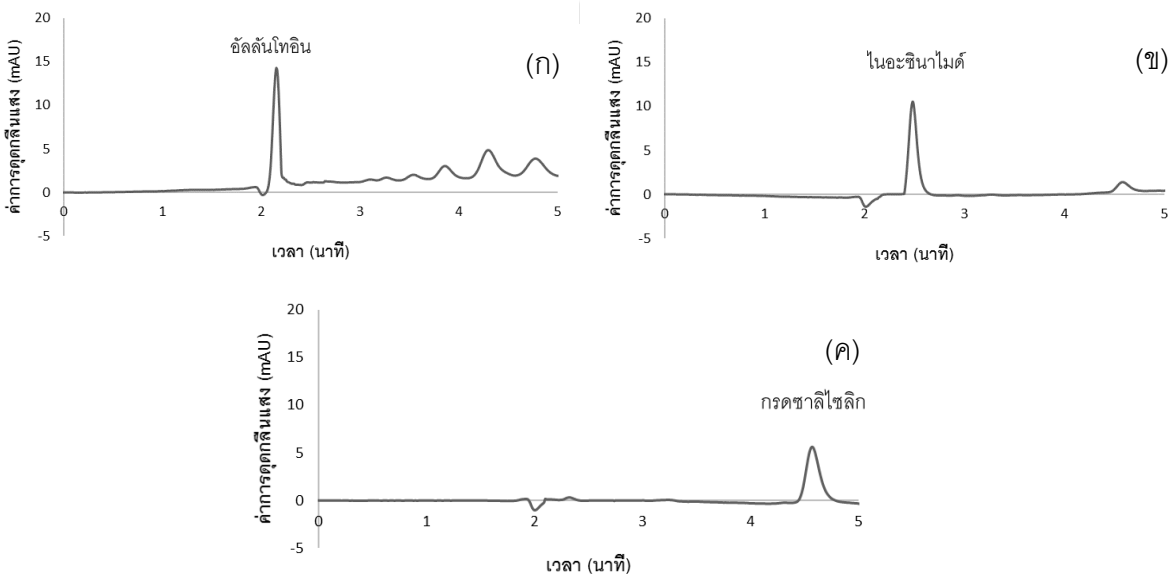
จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมในช่วงความเข้มข้น 5-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 1 พบว่า กราฟมาตรฐานของอัลลันโทอินอยู่ในช่วงความเข้มข้น 20-500 มิลลิกรัมต่อลิตร และกราฟมาตรฐานของไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก อยู่ในช่วงความเข้มข้น 5-200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยกราฟมาตรฐานของสารทั้ง 3 ชนิด มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ($R^2$) มากกว่า 0.995

ตาราง 1 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

| สารที่วิเคราะห์ | ช่วงความเป็นเส้นตรง (มิลลิกรัมต่อลิตร) | สมการเส้นตรง | ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ($R^2$) |
|---|---|---|---|
| อัลลันโทอิน | 20-500 | y = 23299x + 62747 | 0.9995 |
| ไนอะซินาไมด์ | 5-200 | y = 121642x - 225616 | 0.9971 |
| กรดซาลิไซลิก | 5-200 | y = 166133x + 639166 | 0.9958 |

2.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ LOD และ LOQ โดยเลือกจากความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่มีสัดส่วนสัญญาณของสารละลายมาตรฐานอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ต่อสัญญาณรบกวนเท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น มีค่า LOD และ LOQ ของอัลลันโทอิน เท่ากับ 5 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่า LOD และ LOQ ของไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิก เท่ากับ 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิก ที่ค่า LOD แสดงดังภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ **11** โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานที่ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (ก) อัลลันโทอินที่ความเข้มข้น **5** มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) ไนอะซินาไมด์ที่ความเข้มข้น **1** มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) กรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น **1** มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

จากการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ทั้งความเที่ยงภายในวันเดียวกัน ซึ่งทำการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 3 ครั้ง และความเที่ยงระหว่างวันซึ่งทำการวิเคราะห์เป็นระยะเวลา 3 วันต่อเนื่องกัน โดยทำการวิเคราะห์ในสารละลายมาตรฐานผสมของอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิก ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ผลการทดลองแสดงดังตาราง 2 พบว่าค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของพื้นที่ใต้พีคของสารทั้ง 3 ชนิดสำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันอยู่ในช่วง 0.57-1.75 และการวิเคราะห์ระหว่างวันอยู่ในช่วง 0.55-1.72 สำหรับ %RSD ของเวลาการคงอยู่ของสารทั้ง 3 ชนิดสำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันอยู่ในช่วง 0.14-0.55 และการวิเคราะห์ระหว่างวันอยู่ในช่วง 0.17-0.51 ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นให้ค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์เป็นที่น่าพอใจ โดยมีค่า %RSD ของพื้นที่ใต้พีคและเวลาของการคงอยู่สำหรับการวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิดทั้งการวิเคราะห์ภายในเดียวและระหว่างวันน้อยกว่า 2%

ตาราง 2 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

| สารที่วิเคราะห์ | ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) | % RSD ในวันเดียวกัน (n = 3) | | % RSD ระหว่างวัน (n = 3) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | พื้นที่ใต้พีค | เวลาคงอยู่ | พื้นที่ใต้พีค | เวลาคงอยู่ |
| อัลลันโทอิน | 20 | 1.23 | 0.26 | 1.72 | 0.33 |
| | 100 | 0.78 | 0.28 | 0.95 | 0.28 |
| | 500 | 0.69 | 0.24 | 0.74 | 0.36 |
| ไนอะซินาไมด์ | 5 | 0.59 | 0.14 | 1.71 | 0.17 |
| | 50 | 0.95 | 0.24 | 1.46 | 0.20 |
| | 200 | 0.93 | 0.18 | 1.52 | 0.22 |
| กรดซาลิไซลิก | 5 | 1.75 | 0.17 | 1.59 | 0.20 |
| | 50 | 0.57 | 0.55 | 0.55 | 0.51 |
| | 200 | 0.58 | 0.18 | 1.39 | 0.22 |

2.4 ร้อยละของการคืนกลับ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาค่าร้อยละของการคืนกลับ โดยการเติมสารละลายมาตรฐานอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกที่ 3 ระดับความเข้มข้น ลงในตัวอย่างเครื่องสำอาง จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น ผลการทดลองแสดงดังตาราง 3 พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น มีค่าร้อยละของการคืนกลับของอัลลันโทอินอยู่ในช่วงร้อยละ 98.28-102.34 ไนอะซินาไมด์อยู่ในช่วงร้อยละ 98.44-102.43 และกรดซาลิไซลิกอยู่ในช่วงร้อยละ 98.44-102.53 โดยการวิเคราะห์ในตัวอย่างทุกชนิดมีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วงร้อยละ 0.21-1.58 แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณสารทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้เป็นอย่างดี โดยไม่มีการรบกวนของสัญญาณจากสารชนิดอื่นๆที่อยู่ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

ตาราง 3 ผลการศึกษาค่าร้อยละการคืนกลับในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

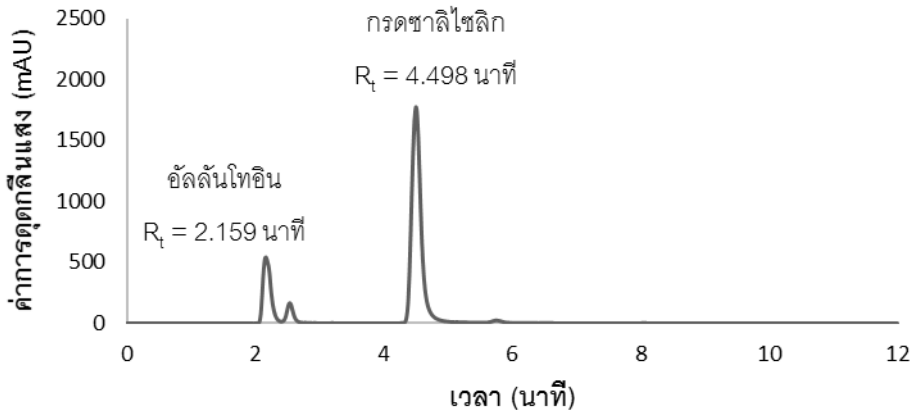
| สารที่วิเคราะห์ | ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) | ร้อยละการคืนกลับ (%RSD) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ตัวอย่าง 1 | ตัวอย่าง 2 | ตัวอย่าง 3 | ตัวอย่าง 4 |
| อัลลันโทอิน | 20 | 99.43(0.24) | - | 98.28(0.31) | 100.18(0.42) |
| | 100 | 100.57(0.56) | - | 101.75(0.46) | 99.40(0.35) |
| | 300 | 102.34(0.29) | - | 102.21(0.22) | 101.02(0.65) |
| ไนอะซินาไมด์ | 5 | 98.44(0.21) | 98.64(0.35) | - | 98.77(0.85) |
| | 20 | 100.51(0.28) | 99.04(0.23) | - | 100.87(0.33) |
| | 100 | 102.38(0.86) | 101.49(1.12) | - | 102.43(0.96) |
| กรดซาลิไซลิก | 5 | 100.76(0.33) | 99.81(0.37) | 98.44(0.38) | - |
| | 20 | 99.82(0.56) | 102.53(0.89) | 99.98(1.03) | - |
| | 100 | 99.48(1.33) | 101.89(1.58) | 101.34(1.41) | - |

**การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง**

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ประเภทโทนเนอร์และเซรั่ม จำนวน 4 ตัวอย่าง พบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกในแต่ละตัวอย่างได้ผลแสดงดังตาราง 4 จะเห็นได้ว่าชนิดของสารแต่ละชนิดที่ตรวจพบในทุกตัวอย่างตรงกับที่ระบุไว้ข้างฉลากผลิตภัณฑ์ โดยปริมาณของไนอะซินาไมด์ที่วิเคราะห์ได้ พบอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทบำรุงผิวหน้า (ร้อยละ 1-5 โดยน้ำหนัก) นอกจากนี้ปริมาณของกรดซาลิไซลิก ในทุกผลิตภัณฑ์มีค่าไม่เกินระดับความเข้มข้นที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนด (ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก) และภาพประกอบ 12 เป็นตัวอย่างโครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางตัวอย่างที่ 3 ที่วิเคราะห์โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ พบว่าในตัวอย่างนี้ตรวจพบเฉพาะอัลลันโทอินและกรดซาลิไซลิกเท่านั้น สำหรับพีคที่เวลา 2.533 นาที เป็นสารชนิดอื่นๆที่ไม่ใช่ไนอะซินาไมด์ ยืนยันได้จากสเปคตรัมของพีคดังกล่าวไม่สอดคล้องกับสเปคตรัมของไนอะซินาไมด์ อีกทั้งฉลากผลิตภัณฑ์ของตัวอย่างที่ 3 นี้ไม่ได้ระบุส่วนผสมที่มีองค์ประกอบของไนอะซินาไมด์ จะเห็นได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถวิเคราะห์อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้จริง ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้อง แม่นยำ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่เกิน 6 นาที

ตาราง 4 ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่วิเคราะห์โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น

| ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง | ปริมาณสารที่ตรวจพบ ±SD (มิลลิกรัมต่อลิตร) n=3 | | |
|---|---|---|---|
| | อัลลันโทอิน | ไนอะซินาไมด์ | กรดซาลิไซลิก |
| ตัวอย่างที่ 1 (เซรั่ม) | 130.48 ± 0.55 | 32396.10 ± 0.86 | 186.15 ± 1.28 |
| ตัวอย่างที่ 2 (เซรั่ม) | - | 17094.60 ± 1.05 | 2587.75 ± 1.53 |
| ตัวอย่างที่ 3 (โทนเนอร์) | 1478.70 ± 0.24 | - | 5149.20 ± 1.02 |
| ตัวอย่างที่ 4 (โทนเนอร์) | 37.58 ± 0.87 | 9544.00 ± 0.39 | - |




ภาพประกอบ 12 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางตัวอย่างที่ 3

# บทที่ 5
# สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกันโดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยการเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน สำหรับประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวหน้าประเภท ผลิตภัณฑ์โทนเนอร์ และผลิตภัณฑ์เซรั่ม โดยสามารถสรุปอภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะดังนี้

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวหน้า ด้วยเทคนิค HPLC ทำให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็ว และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น สำหรับในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสามารถทำได้ง่าย โดยใช้วิธีการเจือจางโดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย เมื่อทำการเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เคยรายงานก่อนหน้านี้ ซึ่งใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จะเห็นได้ว่าในงานวิจัยนี้ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ประเภทเฮกเซน นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างน้อยกว่า (Dallet et al., 2000) และเมื่อเปรียบเทียบในด้านการตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิด แบบพร้อมกันด้วยเทคนิค HPLC พบว่ายังไม่มีรายงานการตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 3 ชนิดแบบพร้อมกันมาก่อน โดยจากผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารทั้ง 3 ชนิดนั้น พบว่าเมื่อใช้คอลัมน์ C18 ขนาด 4.6 x 150 mm, i.d. โดยใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 3) และเมทานอลที่อัตราส่วน 40:60 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราการไหล 0.80 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร สามารถทำการแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 5.00 นาที โดยให้ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่ดี มีค่าความเป็นเส้นตรง ($R^2$ มากกว่า 0.995) ในช่วงความเข้มข้น 20-500 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการวิเคราะห์อัลลันโทอิน และช่วงความเข้มข้น 5-200 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการวิเคราะห์ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิก มีความเที่ยงเป็นที่น่าพอใจทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน โดยมีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ใต้พีคและเวลาการคงอยู่น้อยกว่า 2.00 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของอัลลันโทอินมีค่าเท่ากับ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ของไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกมีค่าเท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการเจือจางโดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย พบว่าให้ร้อยละการคืนกลับของอัลลันโทอินอยู่ในช่วง 98.28-102.34 ไนอะซินาไมด์อยู่ในช่วง 98.44-102.43 และกรดซาลิไซลิก

อยู่ในช่วง 98.44-102.53 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่เคยมีการรายงานพบว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้างกว่า (Doi et al., 2009; Ibrahim et al., 2017; Jen et al., 2001) มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดอัลลันโทอินใกล้เคียงกับงานวิจัยก่อนหน้า (El Mubarak et al., 2013) และมีความเที่ยงทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวันที่ดีกว่า (Doi et al., 2009; Jen et al., 2001)

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิก ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวหน้า ได้แก่ โทนเนอร์ และเซรั่ม ที่วางจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาด พบว่าปริมาณไนอะซินาไมด์ที่วิเคราะห์ได้ในทุกผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทบำรุงผิวหน้า (ร้อยละ 1-5 โดยน้ำหนัก) นอกจากนี้ปริมาณของกรดซาลิไซลิก ในทุกผลิตภัณฑ์มีค่าไม่เกินระดับความเข้มข้นที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนด (ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก) จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีจำหน่ายทั่วไปในปัจจุบันมักนิยมเติมสารออกฤทธิ์อัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกผสมกัน ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ในการตรวจวัดปริมาณของสารทั้ง 3 ชนิดพร้อมกันได้จริง

ดังนั้นจากความมุ่งหวังในงานวิจัยนี้ที่ต้องการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์ และกรดซาลิไซลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางแบบพร้อมกัน และจากการเปรียบเทียบผลการวิจัยที่เคยรายงาน พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถทำได้สะดวกรวดเร็ว ประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์สูง และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

**ข้อเสนอแนะ**

1. ความเข้มข้นของสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ที่เลือกใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่จำเป็นต้องคำนึงถึงความสามารถในการควบคุม pH เป็นสำคัญ โดยช่วงความเข้มข้นที่นิยมใช้ได้แก่ 10 มิลลิโมลาร์ จนถึง 50 มิลลิโมลาร์ อีกทั้งการเลือกช่วงความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่สูงเกินไปนั้น อาจจะส่งผลกระทบกับระบบภายในของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงได้ โดยเมื่อผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์แล้วอาจตกผลึกเป็นเกลือฟอสเฟตที่ไม่ละลายทำให้เกิดการอุดตันภายในระบบของเครื่องมือ

2. การวิเคราะห์ปริมาณอัลลันโทอิน ไนอะซินาไมด์และกรดซาลิไซลิกแบบพร้อมกันนี้สามารถประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารและตัวอย่างทางชีวภาพอื่นๆได้ โดยต้องมีการปรับวิธีการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมกับแต่ละประเภทของตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

# บรรณานุกรม


Alfazema, L. N., Howells, S., & Perrett, D. (1998). Determination of allantoin in biofluids using micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A, 817*, 345-352.

Andries, A., De Rechter, S., Janssens, P., Mekahli, D., & Van Schepdael, A. (2018). Simultaneous determination of allantoin and adenosine in human urine using liquid chromatography - UV detection. *Journal of Chromatography B, 1096*, 201-207. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30176509

Aresta, A., & Zambonin, C. (2016). Simultaneous determination of salicylic, 3-methyl salicylic, 4-methyl salicylic, acetylsalicylic and benzoic acids in fruit, vegetables and derived beverages by SPME-LC-UV/DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 121*, 63-68. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26775020

Braga, R. R., Sales, J., Marins, R. d. C. E. E., Ortiz, G. M. D., & Garcia, S. (2012). Development and validation of a method for allantoin determination in liposomes and pharmaceutical formulations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 91*, 389-394. Retrieved from http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142512001266

Cosmetic Ingredient Review Expert, P. (2005). Final report of the safety assessment of niacinamide and niacin. *International Journal of Toxicology, 24 Suppl 5*, 1-31. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16596767

Czauderna, M., & Kowalczyk, J. (2000). Quantification of allantoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in ovine urine by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. *Journal of Chromatography B, 744*, 129-138.

Dallet, P., Labat, L., Kummer, E., & Dubost, J. P. (2000). Determination of urea, allantoin and lysine pyroglutamate in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography B, 742*, 447-452.

Doi, T., Kajimura, K., Takatori, S., Fukui, N., Taguchi, S., & Iwagami, S. (2009).

Simultaneous measurement of diazolidinyl urea, urea, and allantoin in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography B, 877*(10), 1005-1010. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19269905

El Mubarak, M. A., Lamari, F. N., & Kontoyannis, C. (2013). Simultaneous determination of allantoin and glycolic acid in snail mucus and cosmetic creams with high performance liquid chromatography and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A, 1322*, 49-53. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24239039

Gissawong, N., Srijaranai, S., & Sansuk, S. (2019). A simple capture-release strategy based on an instantly formed mixed metal hydroxide sorbent for determination of salicylic acid in cosmetics. *Sustainable Chemistry and Pharmacy, 13*.

Ibrahim, F., El-Deen, A. K., El Abass, S. A., & Shimizu, K. (2017). An ecofriendly green liquid chromatographic method for simultaneous determination of nicotinamide and clindamycin phosphate in pharmaceutical gel for acne treatment. *journal of food and drug analysis, 25*(3), 741-747. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28911660

Iwaki, M., Murakami, E., & Kakehi, K. (2000). Chromatographic and capillary electrophoretic methods for the analysis of nicotinic acid and its metabolites. *Journal of Chromatography B, 747*, 229-240.

Jen, J. F., Tsai, Y. Y., & Yang, T. C. (2001). Microdialysis of salicylic acid from viscous emulsion samples prior to high-performance liquid chromatographic determination. *Journal of Chromatography A, 912*, 39-43.

Jin, P., Xia, L., Li, Z., Che, N., Zou, D., & Hu, X. (2012). Rapid determination of thiamine, riboflavin, niacinamide, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and ascorbic acid in Vitamins with Minerals Tablets by high-performance liquid chromatography with diode array detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 70*, 151-157. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22785377

Lebot, V., Faloye, B., Okon, E., & Gueye, B. (2019). Simultaneous quantification of allantoin

and steroidal saponins in yam (Dioscorea spp.) powders. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 13*, 100200. Retrieved from http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214786118304029

Lin, C. H., Wu, H. L., & Huang, Y. L. (2007). Combining high-performance liquid chromatography with on-line microdialysis sampling for the simultaneous determination of ascorbyl glucoside, kojic acid, and niacinamide in bleaching cosmetics. *Analytica Chimica Acta, 581*(1), 102-107. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17386432

Long, Y., Li, W., Nie, L., & Yao, S. (2001). Ion-selective piezoelectric sensor for niacinamide assay in serum and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 24*, 361-369.

Mikami, E., Goto, T., Ohno, T., Matsumoto, H., & Nishida, M. (2002). Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 28*, 261-267.

Oster, M., Reyer, H., Keiler, J., Ball, E., Mulvenna, C., Muráni, E., . . . Wimmers, K. (2020). Comfrey (Symphytum spp.) as an alternative field crop contributing to closed agricultural cycles in chicken feeding. *Science of The Total Environment, 742*, 140490. Retrieved from http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720340122

Remane, D., Grunwald, S., Hoeke, H., Mueller, A., Roeder, S., von Bergen, M., & Wissenbach, D. K. (2015). Validation of a multi-analyte HPLC-DAD method for determination of uric acid, creatinine, homovanillic acid, niacinamide, hippuric acid, indole-3-acetic acid and 2-methylhippuric acid in human urine. *Journal of Chromatography B, 998-999*, 40-44.

Sangshetti, J. N., Aqeel, M., Zaheer, Z., Ahmed, R. Z., Dehghan, M. H. G., & Gonjari, I. (2016). Development and validation of RP-HPLC method for determination of Atorvastatin calcium and Nicotinic acid in combined tablet dosage form. *Journal of Saudi Chemical Society, 20*, S328-S333.

Shou, M., Galinada, W. A., Wei, Y. C., Tang, Q., Markovich, R. J., & Rustum, A. M. (2009). Development and validation of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of salicylic acid, betamethasone dipropionate and their related compounds in Diprosalic Lotion. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 50*(3), 356-361. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19545962

Yang, Y., Strickland, Z., Kapalavavi, B., Marple, R., & Gamsky, C. (2011). Industrial application of green chromatography--I. Separation and analysis of niacinamide in skincare creams using pure water as the mobile phase. *Talanta, 84*(1), 169-174. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21315915

Zaidi, Z. R., Sena, F. J., & Basilio, C. P. (1981). Stability Assay of Allantoin in Lotions and Creams by High-pressure Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 71*, 997-999.

Zhang, Y., Lane, M. E., Hadgraft, J., Heinrich, M., Chen, T., Lian, G., & Sinko, B. (2019). A comparison of the in vitro permeation of niacinamide in mammalian skin and in the Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA) model. *International Journal of Pharmaceutics, 556*, 142-149. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30529662

กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. (2555). คู่มือวิชาการ เรื่อง แนวทางการประกอบกิจการที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ ประเภท การผลิต การบรรจุเครื่องสำอาง. กรุงเทพฯ: สำนักงานกิจการโรงพิมพ์ องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

กำหนดชื่อและปริมาณของวัตถุที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง. (2551). ราชกิจจานุเบกษา (เล่ม 125 ตอนพิเศษ 162 ง, น.14). Retrieved from

กำหนดวัตถุกันเสียที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง. (2560). ราชกิจจานุเบกษา (เล่ม 134 ตอนพิเศษ 167 ง, น. 19). Retrieved from

ภาวดี ปรปักษ์ขาม. (2541). การเตรียมข้อมูลสินค้าเครื่องสำอางทำความสะอาดและบำรุงผิว เพื่อจัดงานแสดงสินค้า. Retrieved from สืบค้นจาก file:///C:/Users/WINDOWS/Downloads/78177.pdf

มหาวิทยาลัยมหิดล, ค. (2558). สิวเชื้อรา และการรักษา. Retrieved from สืบค้นจาก

https://pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/272/%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%A3%E0%B8%B1%E0%B8%81%E0%B8%A9%E0%B8%B2%E0%B8%AA%E0%B8%B4%E0%B8%A7-%E0%B8%AA%E0%B8%B4%E0%B8%A7%E0%B9%80%E0%B8%8A%E0%B8%B7%E0%B9%89%E0%B8%AD%E0%B8%A3%E0%B8%B2/

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. (2561). มหัศจรรย์ “เห็ดเยื่อไผ่” อุดมด้วยคุณค่าทางโภชนาการ สารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งและป้องกันโรคสมองเสื่อม. Retrieved from สืบค้นจาก https://oer.learn.in.th/search_detail/result/142699#oer_data

# ประวัติผู้เขียน

| | |
|---|---|
| **ชื่อ-สกุล** | นุชจรินทร์ สนิท |
| **วัน เดือน ปี เกิด** | 26 มกราคม 2538 |
| **สถานที่เกิด** | ศรีสะเกษ |
| **วุฒิการศึกษา** | พ.ศ. 2555 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนกันทรลักษ์วิทยา ศรีสะเกษ<br>พ.ศ. 2559 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ |
| **ที่อยู่ปัจจุบัน** | 42 ม.1 ต.หนองหญ้าลาด อ.กันทรลักษ์ จ.ศรีสะเกษ 33110 |