[ เริ่มต้น ]

เตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่าง 1เครื่องดื่ม: ใช้ 1 ml (ไม่ต้อง dilute) กรองผ่าน 0.45 µm

ตัวอย่าง 2 ACV : ละลาย 1:100 กับน้ำ กรองผ่าน 0.45 µm

ตัวอย่าง 3 Cactus cider : ละลาย 1:100 กับน้ำ กรองผ่าน 0.45 µm

 ↓

เตรียมสารมาตรฐาน

- Quercetin

- Ferulic acid

(เตรียม stock 1000 ppm, ทำ dilution 5–100 µg/mL)

 ↓

สร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curves)

- Plot: Concentration (µg/mL) vs. Peak Area

 ↓

วิเคราะห์ด้วย HPLC หรือ HPLC-MS/MS

- คอลัมน์ C18

- Mobile phase น้ำ + 0.1% Formic acid / ACN + 0.1% Formic acid

- Gradient elution

- Detect ที่ UV 280 nm และ 360 nm หรือ MRM transitions

 ↓

จับ peak ตัวอย่าง

- Quercetin derivatives

- Kaempferol derivatives

- Isorhamnetin derivatives

- Phenolic acids (Caffeic, Ferulic)

 ↓

คำนวณผล

- ใช้กราฟมาตรฐานของแต่ละตัว

- รายงานผลเป็น mg/g ผง (Opuntia) หรือ mg/L (ACV)

 ↓

[ เสร็จสิ้น วิเคราะห์ข้อมูล ]

สภาวะเครื่อง Hplc-ms

| **รายการ** | **ค่าแนะนำ** |
| --- | --- |
| คอลัมน์ | C18, 150 × 2.1 mm, 1.7–3.5 µm particle size |
| อุณหภูมิคอลัมน์ | 30–35°C |
| อัตราการไหล | 0.3–0.4 mL/min (HPLC-MS/MS) หรือ 1.0 mL/min (HPLC-UV) |
| ปริมาตรฉีด | 2–5 µL (MS/MS) หรือ 10–20 µL (UV) |
| การตรวจจับ | UV 280 nm / 360 nm หรือ MS transitions |

| **เวลา (นาที)** | **%A (น้ำ + 0.1% Formic acid)** | **%B (Acetonitrile + 0.1% Formic acid)** | **หมายเหตุ** |
| --- | --- | --- | --- |
| 0.0 | 95 | 5 | เริ่มต้น |
| 5.0 | 90 | 10 | ล้างพวก acid ที่ retention time ต้นๆ |
| 15.0 | 75 | 25 | เริ่มดึง flavonol derivatives ออกมา |
| 25.0 | 50 | 50 | สารไฮโดรฟิลิกน้อย เริ่มออก |
| 30.0 | 30 | 70 | ดึงสารไม่ชอบน้ำ (พวก kaempferol aglycone) |
| 35.0 | 95 | 5 | Re-equilibrate (คืนระบบ) |
| 40.0 | 95 | 5 | เตรียมพร้อมรันตัวอย่างถัดไป |

| **Parameter** | **ค่าแนะนำ** |
| --- | --- |
| Ion mode | ESI− |
| Scan type | MRM |
| Dwell time | 50–100 ms ต่อ transition |
| Collision gas | Nitrogen |
| Source temperature | 120°C |
| Desolvation temperature | 350–400°C |

| **สารมาตรฐาน** | **Precursor Ion (m/z)** | **Product Ion (m/z)** | **Transition (m/z → m/z)** | **กลุ่มที่ครอบคลุม** | **หมายเหตุ** |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Quercetin | 301 | 151 | 301 → 151 | Flavonols (Quercetin derivatives) | ตัวแม่ของ quercetin-3-O-glucoside, rutin |
| Kaempferol | 285 | 133 | 285 → 133 | Flavonols (Kaempferol derivatives) | ตัวแม่ของ Nicotiflorin |
| Isorhamnetin | 315 | 300 | 315 → 300 | Flavonols (Isorhamnetin derivatives) |  |
| Rutin | 609 | 301 | 609 → 301 | Glycosylated flavonol (rutin) | แยกพีคกับ quercetin ได้ดี |
| Caffeic acid | 179 | 135 | 179 → 135 | Phenolic acid (Caffeic) | กลุ่มกรดฟีนอลิกทั่วไป |
| Ferulic acid | 193 | 134 | 193 → 134 | Phenolic acid (Ferulic) | รองจาก caffeic |

| **ชื่อสาร** | **Precursor (m/z)** | **Product (m/z)** | **หมายเหตุ** |
| --- | --- | --- | --- |
| Chlorogenic acid | 353 | 191 | สำคัญมากในแอปเปิ้ลและ ACV |
| Catechin | 289 | 245 | Flavanol ตัวหลักในแอปเปิ้ล |