

การหาปริมาณ Resveratrol ในไวน์และผลองุ่น โดยเทคนิคโครมาโตกราฟี
ของเหลวแบบสมรรถนะสูง

ปริญญานิพนธ์
ของ
อัจฉรา บัวชื่น

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี
เมษายน 2545
ลิขสิทธิ์เป็นของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การหาปริมาณ Resveratrol ในไวน์และผลองุ่น โดยเทคนิคโครมาโตกราฟี
ของเหลวแบบสมรรถนะสูง

บทคัดย่อ
ของ
อัจฉรา บัวชื่น

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี
เมษายน 2545

25 มี.ค. 2545

อัจฉรา บัวชื่น. (2545). การศึกษาหาปริมาณ Resveratrol ในไวน์และผลองุ่น โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง. ปริญญาโท กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ :
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร. ยงยุทธ ตันกุลเวสส, รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ ศรีไพโรจน์

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ของเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ ในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร resveratrol ในไวน์ และผลองุ่น

ผลการวิจัยพบว่าเมื่อวิเคราะห์ resveratrol ใช้คอลัมน์ Hypersil ODS ชนิด reversed-phase C₁₈ (4.0 x 125 mm) ขนาดอนุภาค 5 µm สารละลายเฟสเคลื่อนที่ เป็นสารผสมระหว่าง acetonitrile 25% : glacial acetic acid ในน้ำ (1 : 40) 75% อัตราการไหล 1 mL/min ทั้งเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ ให้รีเทนชันไทม์ของสารประกอบ *trans*- และ *cis*-resveratrol ประมาณ 4.50 และ 7 นาที ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, *r*) ของสารประกอบ *cis*- และ *trans*-resveratrol มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.99279 และ 0.99606 ตามลำดับ ค่า percent recovery ในการวิเคราะห์หาปริมาณ *cis*-resveratrol และ *trans*-resveratrol ในไวน์แดง 5 เครื่องหมายการค้า มีค่าเฉลี่ย 100.08 และ 100.07 ตามลำดับ ค่า percent recovery ในการวิเคราะห์หาปริมาณ *cis*-resveratrol และ *trans*-resveratrol ในผลองุ่นทั้ง 2 พันธุ์ มีค่าเฉลี่ย 96.40 และ 97.70 ตามลำดับ เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (limited of detection, LOD) ของสารประกอบ *cis*-resveratrol ในไวน์แดง และผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา ได้ว่องไวกว่าเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ประมาณ 5 และ 1 เท่า ตามลำดับ เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ ของสารประกอบ *trans*-resveratrol ในไวน์แดง ผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล และผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา ได้ว่องไวกว่าเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ประมาณ 43 17 และ 22 เท่า ตามลำดับ

การหาปริมาณรวมของสารประกอบ resveratrol (*cis*-และ *trans*-resveratrol) ในไวน์แดง 5 เครื่องหมายการค้า มีค่าเฉลี่ย 0.81 ± 0.02 µg/mL (TH1) 1.87 ± 0.08 µg/mL (IT2) 2.27 ± 0.10 µg/mL (IT1) 3.14 ± 0.11 µg/mL (FR1) และ 3.69 ± 0.08 µg/mL (TH2) ตามลำดับโดยที่ไวน์แดงดังกล่าวมีความเข้มข้นของสาร *trans*-resveratrol สูงกว่า *cis*-resveratrol ผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาและคาร์ดินัลมีปริมาณรวมของสารประกอบ resveratrol 0.38 ± 0.02 และ 0.83 ± 0.03 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม

DETERMINATION OF RESVERATROL IN WINES AND GRAPES BY
HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE

AN ABSTRACT
BY
ATCHARA BUACHUEN

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University
April 2002

Atchara Buachuen. (2002). *Determination of Resveratrol in Wines and Grapes by High Performance Liquid Chromatography Technique*. Master thesis, M.Ed. (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Assoc. Prof. Dr Yongyuth Tundulawessa, Assoc. Prof. Dr. Prasert Sripairot

The objective of this study was to determine the optimal condition of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique with photodiode array, and fluorescence detector for resveratrol quantitative analysis in red wines and grapes.

The results showed that when resveratrol were analyzed using a Hypersil ODS reversed – phase C₁₈ column (4.0 x 125 mm) with the 5 µm particle size. The mobile phase was a mixture of acetonitrile 25% : glacial acetic acid in water (1 : 40) 75% with a flow rate of 1 mL/min. Both photodiode array and fluorescence detector showed the retention time of *trans*-resveratrol was 4.50 minute and 7 minute respectively. The correlation coefficient (*r*) *cis*-resveratrol and *trans*-resveratrol was ≥ 0.99279 and 0.99606 respectively. The average of percentage recovery for *cis*- and *trans*-resveratrol quantitative analysis in red wines five brand name were 100.08 and 100.07 respectively. The average of percentage recovery for *cis*- and *trans*-resveratrol quantitative analysis in two grape species were 96.40 and 97.70 respectively. The photodiode array detector showed more detection limited of *cis*-resveratrol in red wines and White malaga than fluorescence detector about 5 and 1 time respectively. The fluorescence detector showed more detection limited of *trans*-resveratrol in red wines Cardinal grape and White malaga grape than photodiode array detector about 43, 17 and 22 time respectively.

The average total quantity of resveratrol (*cis*- and *trans*-resveratrol) in red wines five brand name were 0.81 ± 0.02 µg/mL (brand name; TH1), 1.87 ± 0.08 µg/mL (brand name; IT2), 2.27 ± 0.10 µg/mL (brand name; IT1), 3.14 ± 0.11 µg/mL (brand name; FR1) and 3.69 ± 0.08 µg/mL (brand name; TH2) respectively. In all red wines, the *trans*-resveratrol were found in higher concentrations than the *cis*-resveratrol. Total quantity of resveratrol in White malaga and Cardinal grapes were 0.38 ± 0.02 µg/g of fresh weight, and 0.83 ± 0.03 µg/g of fresh weight respectively.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

การหาปริมาณ Resveratrol ในไวน์และผลองุ่น โดยเทคนิคโครมาโตกราฟี
ของเหลวแบบสมรรถนะสูง

ของ
นางสาวอัจฉรา บัวชื่น

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. นภาพร หะวานนท์)
วันที่ 10 เดือนเมษายน พ.ศ. 2545

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ยงยุทธ ดัณฑลเวสส)
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ ศรีไพโรจน์)
.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชญาสิทธิกุล)
.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือ แนะนำ และให้ความอนุเคราะห์อย่างดีจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ยงยุทธ ดัณฑกุลเวสส ประธานกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ ศรีไพโรจน์ กรรมการ และ อาจารย์วราดุล จัตรทอง ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนของการวิจัยตลอดจนการเขียนปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล และ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล ที่ได้ร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์และให้คำแนะนำต่างๆ ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้ความเมตตาแก่ผู้วิจัยมาตลอด

ขอขอบพระคุณอาจารย์ธัญญะ พรหมศร หมวตวิชาวาทยาศาสตร์พื้นฐาน คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์ และคุณสมมนตร์ ม่วงมี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี เพื่อน พี่ และน้อง นิสิตปริญญโททุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลืออำนวยความสะดวกและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา ที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาดำเนินตลอดมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

อัจฉรา บัวชื่น

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมาย.....	5
ความสำคัญของการวิจัย.....	5
ขอบเขตของการวิจัย.....	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
การแยกสารประกอบ resveratrol จากพืช.....	6
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ resveratrol โดยเทคนิค GC.....	8
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ resveratrol โดยเทคนิค HPLC.....	10
การศึกษาทางเภสัชวิทยาของสารประกอบ resveratrol.....	18
อื่นๆ.....	19
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
อุปกรณ์ สารเคมีและวัสดุที่ใช้วิจัย.....	21
สภาวะเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์สารประกอบ resveratrol.....	25
การเตรียมสารละลายมาตรฐาน.....	25
การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์.....	26
การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่น.....	31
สถิติที่ใช้ในการวิจัย.....	35
4 ผลการทดลอง.....	37
การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์สารประกอบ resveratrol.....	37
การหาค่าพารามิเตอร์ และปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ 5 เครื่องหมายการค้า และในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล และพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์.....	41

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า
4(ต่อ) การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์.....	41
การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์	
คาร์ดินัล.....	54
การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์	
ไวท์มะละกา.....	62
5 สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	73
ข้อเสนอแนะ.....	86
บรรณานุกรม.....	87
ภาคผนวก.....	91
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	100

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 สรุป สภาวะของเครื่อง percent recovery และ limited of detection ของเทคนิค HPLC จากงานวิจัยที่ผ่านมา.....	16
2 แสดง linear regression line ของวิธีหาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ โดย <i>cis</i> -resveratrol ที่ระดับความเข้มข้น 0.03 0.49 0.98 1.97 และ 3.93 µg/mL และ <i>trans</i> -resveratrol ที่ระดับความเข้มข้น 0.08 1.50 3.00 6.00 และ 12.00 µg/mL จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อ $n = 3$	42
3 แสดง percent recovery ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน <i>cis</i> -resveratrol ในไวน์ จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ (เติม <i>cis</i> -resveratrol 3.93 µg/mL) เมื่อ $n = 3$	44
4 แสดง percent recovery ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน <i>trans</i> -resveratrol ในไวน์ จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ (เติม <i>trans</i> -resveratrol 12.00 µg/mL) เมื่อ $n = 3$	46
5 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอด-แอรย์ เมื่อ $n = 9$	47
6 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์จากเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อ $n = 9$	51
7 แสดง linear regression line ของวิธีหาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดย <i>cis</i> -resveratrol ที่ระดับความเข้มข้น 0.03 0.49 0.98 1.97 และ 3.93 µg/mL และ <i>trans</i> -resveratrol ที่ระดับความเข้มข้น 0.08 1.50 3.00 6.00 และ 12.00 µg/mL จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อ $n = 3$	54
8 แสดง percent recovery ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน <i>trans</i> -resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรย์และฟลูออเรสเซนซ์ (เติม <i>trans</i> -resveratrol 12.00 µg/mL) เมื่อ $n = 6$	56
9 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรย์ เมื่อ $n = 6$	57
10 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล จากเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อ $n = 6$	60

บัญชีตาราง(ต่อ)

ตาราง		หน้า
11	แสดง linear regression line ของวิธีหาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผล องุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดย <i>cis</i> -resveratrol ที่ระดับความเข้มข้น 0.03 0.49 0.98 1.97 และ 3.93 $\mu\text{g/mL}$ และ <i>trans</i> -resveratrol ที่ระดับความเข้มข้น 0.08 1.50 3.00 6.00 และ 12.00 $\mu\text{g/mL}$ จากเครื่องตรวจวัดโฟโตได- โอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อ $n = 3$	62
12	แสดง percent recovery ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน <i>cis</i> -resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และ ฟลูออเรสเซนซ์ (เติม <i>cis</i> -resveratrol 3.93 $\mu\text{g/mL}$) เมื่อ $n = 3$	64
13	แสดง percent recovery ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน <i>trans</i> -resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออ- เรสเซนซ์ (เติม <i>trans</i> -resveratrol 12.00 $\mu\text{g/mL}$) เมื่อ $n = 3$	66
14	แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา จากเครื่อง ตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ เมื่อ $n = 6$	67
15	แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา จากเครื่อง ตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อ $n = 6$	70
16	สรุปค่า limited of detection จากการวิจัย.....	85
17	แสดงน้ำหนักผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล ที่ใช้ในการสกัด resveratrol แต่ละครั้ง.....	93
18	แสดงน้ำหนักผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา ที่ใช้ในการสกัด resveratrol แต่ละครั้ง...	93

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างพื้นฐานหลักของสารประกอบ stilbene.....	1
2 โครงสร้างสารประกอบ <i>trans</i> -3,5,4'-trihydroxystilbene.....	2
3 โครงสร้างสารประกอบ <i>cis</i> -3,5,4'-trihydroxystilbene.....	2
4 แสดงปฏิกิริยา Photochemical isomerization ของสารประกอบ resveratrol.....	2
5 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการหาปริมาณ resveratrol ในไวน์.....	23
6 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการหาปริมาณ resveratrol ในผลองุ่น.....	24
7 โคโรมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน <i>cis</i> -resveratrol และ <i>trans</i> -resveratrol ใน methanol 40% เข้มข้น 4.987 และ 1.013 µg/mL ตามลำดับ โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 306 nm.....	38
8 โคโรมาโตแกรมของสารละลาย methanol 40% โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับ เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 306 nm.....	38
9 โคโรมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน <i>cis</i> -resveratrol และ <i>trans</i> -resveratrol ใน methanol 40% เข้มข้น 4.987 และ 1.013 µg/mL ตามลำดับโดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 285 nm..	39
10 โคโรมาโตแกรมของสารละลาย methanol 40% โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับ เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 285 nm.....	39
11 โคโรมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน <i>cis</i> -resveratrol และ <i>trans</i> -resveratrol ใน methanol 40% เข้มข้น 4.987 และ 1.013 µg/mL ตามลำดับ โดยใช้ เทคนิคHPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (ex : 340 nm และ em : 385 nm).....	40
12 โคโรมาโตแกรมของสารละลาย methanol 40% โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับ เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (ex : 340 nm และ em : 385 nm).....	40
13 โคโรมาโตแกรมของสารประกอบ <i>cis</i> -resveratrol ในไวน์แดง โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 285 nm.....	50
14 โคโรมาโตแกรมของสารประกอบ <i>trans</i> -resveratrol ในไวน์แดง โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 306 nm.....	50

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
15 โคโรมาโตแกรมของสารประกอบ <i>cis-resveratrol</i> และ <i>trans-resveratrol</i> ในไวน์แดง โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (ex : 340 nm และ em : 385 nm).....	53
16 โคโรมาโตแกรมของสารประกอบ <i>cis-resveratrol</i> ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 285 nm.....	59
17 โคโรมาโตแกรมของสารประกอบ <i>trans-resveratrol</i> ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 306 nm.....	59
18 โคโรมาโตแกรมของสารประกอบ <i>cis-resveratrol</i> และ <i>trans-resveratrol</i> ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (ex : 340 nm และ em : 385 nm).....	61
19 โคโรมาโตแกรมของสารประกอบ <i>cis-resveratrol</i> ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 285 nm.....	69
20 โคโรมาโตแกรมของสารประกอบ <i>trans-resveratrol</i> ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 306 nm.....	69
21 โคโรมาโตแกรมของสารประกอบ <i>cis-resveratrol</i> และ <i>trans-resveratrol</i> ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (ex : 340 nm และ em : 385 nm).....	72
22 ผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล.....	92
23 ผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา.....	92
24 Excitation Spectrum ของ <i>trans</i> -3,5,4'-trihydroxystilbene เมื่อใช้สารละลายผสมอัตราส่วนระหว่าง acetonitrile 25% : glacial acetic acid ในน้ำ (1 : 40) 75%.....	94
25 Emission Spectrum ของ <i>trans</i> -3,5,4'-trihydroxystilbene เมื่อใช้สารละลายผสมอัตราส่วนระหว่าง acetonitrile 25% : glacial acetic acid ในน้ำ (1 : 40) 75%.....	95

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

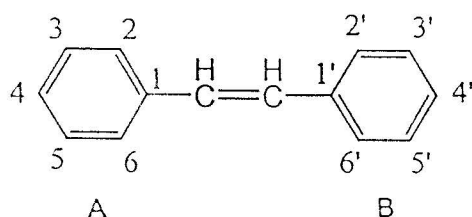
ภาพประกอบ	หน้า
26 กราฟเส้นตรงระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของ peak height กับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น ของ <i>cis-resveratrol</i> ในผลอ่อนพันธุ์ไวท์มะละกา โดยเทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรีย์.....	96
27 กราฟเส้นตรงแสดง detection limit ของ <i>cis-resveratrol</i> ในผลอ่อนพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรีย์.....	96
28 กราฟเส้นตรงระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของ peak height กับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นของ <i>trans-resveratrol</i> ในผลอ่อนพันธุ์ไวท์มะละกา โดยเทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรีย์.....	97
29 กราฟเส้นตรงแสดง detection limit ของ <i>trans-resveratrol</i> ในผลอ่อนพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรีย์.....	97
30 กราฟเส้นตรงระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของ peak height กับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น ของ <i>cis-resveratrol</i> ในผลอ่อนพันธุ์ไวท์มะละกา โดยเทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์.....	98
31 กราฟเส้นตรงแสดง detection limit ของ <i>cis-resveratrol</i> ในผลอ่อนพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์.....	98
32 กราฟเส้นตรงระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของ peak height กับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น ของ <i>trans-resveratrol</i> ในผลอ่อนพันธุ์ไวท์มะละกา โดยเทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์.....	99
33 กราฟเส้นตรงแสดง detection limit ของ <i>trans-resveratrol</i> ในผลอ่อนพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์.....	99

บทที่ 1

บทนำ

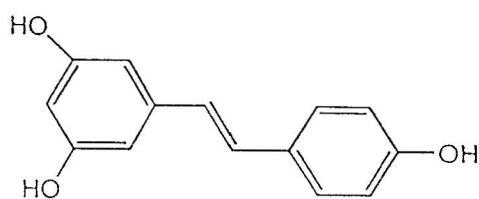
ภูมิหลัง

Resveratrol จัดอยู่ในสารประกอบเคมีกลุ่ม stilbene ซึ่งสารประกอบ stilbene หรือ อนุพันธ์ เป็นผลิตภัณฑ์จากพืชและเป็นสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่มเล็กๆ พบว่าเกิดอยู่ในพืชหลายวงศ์ด้วยกัน เช่น Combretaceae Pinaceae และ Moraceae เป็นต้น สำหรับโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบ stilbene ประกอบด้วยโครงร่างของคาร์บอนคือ $C_6 - C_2 - C_6$ หรือ ประกอบด้วยวงแหวนแอโรมาติก - เอ (aromatic - A) เชื่อมต่อกับวงแหวนแอโรมาติก - บี (aromatic - B) ด้วยคาร์บอน 2 อะตอม ที่มีพันธะแบบไมอิมตัวอยู่ระหว่างวงแหวนแอโรมาติก ดังภาพประกอบ 1 (Harborne, Baxter & Moss. 1999 : 560)

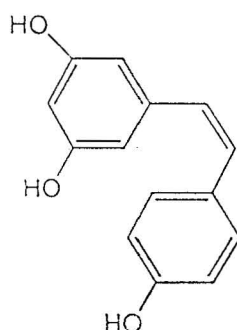


ภาพประกอบ 1 โครงสร้างพื้นฐานหลักของสารประกอบ stilbene

สำหรับสูตรโมเลกุลของสารประกอบ resveratrol คือ $C_{14}H_{12}O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 228 ชื่อทางเคมี 3,5,4'-trihydroxystilbene ซึ่งมี 2 isomers คือ *trans*-isomer และ *cis*-isomer สำหรับ *trans*-isomer คือ *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน จุดหลอมเหลว $260^{\circ}C$ มีโครงสร้างภาพประกอบ 2 ส่วน *cis*-isomer คือ *cis*-3,5,4'-trihydroxystilbene มีลักษณะเป็นผงสีขาว (White powder) จุดหลอมเหลว $170 - 174^{\circ}C$ มีโครงสร้างภาพประกอบ 3 (Jayatilake, et al. 1993 : 1805-1810)

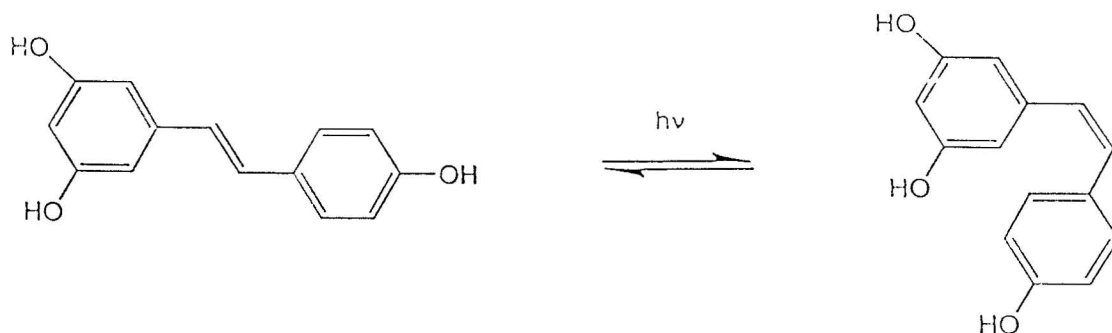


ภาพประกอบ 2 โครงสร้างสารประกอบ *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างสารประกอบ *cis*-3,5,4'-trihydroxystilbene

สารประกอบ resveratrol ชนิด *trans*-resveratrol หรือ *trans*-isomer จะมีความคงตัวมากกว่าชนิด *cis*-resveratrol หรือ *cis*-isomer แต่ถ้าหากถูกฉาย (irradiated) ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต หรือเมื่อได้รับแสงสว่างจะเกิดปฏิกิริยา photochemical isomerization เปลี่ยนไปเป็น *cis*-resveratrol ได้ง่ายมากดังภาพประกอบ 4 (Siemann & Creasy. 1992 : 49-52)



ภาพประกอบ 4 แสดงปฏิกิริยา Photochemical isomerization ของสารประกอบ resveratrol (Walter. 1996 : 618)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าพืชสร้างสารประกอบ resveratrol ขึ้นมา เมื่อพืชนั้นได้รับภาวะที่บีบคั้น ไม่ว่าจะเป็นจากสิ่งที่มีชีวิตหรือไม่มีชีวิตก็ตาม ยกตัวอย่างเช่น การติดเชื้อรา การมีแมลงมารบกวน ชนิดของแสง เป็นต้น ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า resveratrol เป็นสารที่อยู่ในพวก phytoalexins (Langcake & Pryce. 1976 : 77-86) นอกจากนี้ยังพบสารประกอบ resveratrol ในพืชหลายชนิดด้วยกัน เช่น

- *Pterolobium hexapetallum* อยู่ในวงศ์ Caesalpinaceae (Kumar, et al. 1988 : 3625-3626)

- *Veratrum grandiflorum* อยู่ในวงศ์ Liliaceae พบในส่วนของใบ (Hanawa, Tahara & mizutani. 1992 : 3005-3007)

- *Polygonum cuspidatum* อยู่ในวงศ์ Polygonaceae (Jayatilake, et al. 1993 : 1805-1810)

- *Festuca argentina* อยู่ในวงศ์ Poaceae (Casabuono & Pomilio. 1994 : 479-483)

- องุ่น (*Vitis vinifera* Linn) อยู่ในวงศ์ Vitaceae ซึ่งมีผู้ค้นพบ resveratrol ดังนี้

- ใบ (Cornford, Langcake & Pryce. 1979 : 1025-1027)

- ผล (Jeandet, Bessis & Gautheron. 1991 : 41-46)

- ราก (Korhammer, Reniero & Mattivi. 1995 : 1501-1504)

นอกจากนี้ยังพบสารประกอบ resveratrol ในไวน์ที่ทำมาจากองุ่นอีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งไวน์แดงมีปริมาณสารประกอบ resveratrol มากกว่าไวน์ขาว และยังพบอีกว่ามีปริมาณ *trans-* มากกว่า *cis-isomer* (Pezet, Pont & Cuenat. 1994 : 191-197)

จากการศึกษาพบว่าสารประกอบ resveratrol มีผลต่อการลดระดับการสะสมของโคเลสเตอรอล (cholesterol) และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ในตับของหนูทดลอง (Arichi, et al. 1982 : 1766-1770) และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่เกิดจาก

nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) และ adenosine-5'-

diphosphate (ADP) ในไมโครโซม (microsomes) ของตับหนู (Kimura, et al. 1983 : 51-

54) นอกจากนี้ resveratrol ยังมีคุณสมบัติในการป้องกันโรคหัวใจเนื่องจากสามารถไปยับยั้ง

การเกาะตัวของเกล็ดเลือด (inhibits platelet aggregation) (Kimura, Okuda & Arichi. 1985 : 275-278) การดื่มไวน์แดง (Bordeaux) จะช่วยให้ระบบการหมุนเวียนของเลือดดีขึ้น และป้องกันโรคหัวใจได้อีกด้วย (Siemann & Creasy. 1992 : 49 ; citing Seigneur. et al. Effect of

the Consumption of Alcohol, White Wine and Red Wine on Platelet Function and Serum Lipids. p. 215-222) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารประกอบ resveratrol เป็น

สารที่ต่อต้านมะเร็ง โดยไปยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส (cyclooxygenase) ซึ่งเอนไซม์

ชนิดนี้ จะเป็นสาเหตุที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตไปเป็นเซลล์มะเร็ง ในรูปของอนุมูลอิสระ (freeradical) (Jang, et al. 1997: 218-220)

สำหรับการศึกษาหาปริมาณ resveratrol นั้นได้มีการใช้เทคนิคต่างๆ ในการวิเคราะห์ ดังนี้ เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC) และเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) เนื่องจากมีความสะดวกและรวดเร็วในการวิเคราะห์ อีกทั้งสามารถตรวจวิเคราะห์สารในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้ โดยเฉพาะเทคนิค HPLC สามารถตรวจวิเคราะห์สารในระดับความเข้มข้นที่ต่ำมาก จนถึงระดับ ppb

การศึกษาหาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดอัลตราไวโอเลต (UV detector) (Siemann & Creasy. 1992 : 49-52) นั้น วิธีการนี้ การเตรียมสารตัวอย่างค่อนข้างมีความยุ่งยากมาก ซึ่งอาจทำให้ปริมาณ *cis-* และ *trans-resveratrol* ที่วิเคราะห์ได้อาจไม่ถูกต้อง เนื่องจาก *trans-isomer* สามารถเปลี่ยน เป็น *cis-isomer* ได้ง่ายมากเมื่อถูกแสง ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น ดังนั้นความไวของเครื่องตรวจวัดอาจถูกจำกัดไว้ด้วยปริมาณของ resveratrol ต่อมา มีการพัฒนาวิธีศึกษาหาปริมาณ resveratrol โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับการตรวจวัดโดยอาศัยคุณสมบัติเคมีไฟฟ้า(Electrochemical detector) และได้มีการพัฒนาวิธีการเตรียมสารตัวอย่างไวน์ โดยเพียงนำไวน์ไปกรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยตรง วิธีนี้เป็นการลดระยะเวลาในการวิเคราะห์หาปริมาณ resveratrol เป็นอย่างมาก (Mcmurtrey, et al. 1994 : 2077-2080) และในปีเดียวกัน มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องตรวจวัดระหว่าง อัลตราไวโอเลตและฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อหาปริมาณ resveratrol ในไวน์ โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถตรวจวัดได้ (limited of detection, LOD) ผลการวิจัย การตรวจวิเคราะห์ *trans-resveratrol* พบว่าเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence) มีความไวมากกว่าเครื่องตรวจวัดอัลตราไวโอเลตถึง 50 เท่า แต่ไม่ได้มีการรายงานการตรวจวิเคราะห์ *cis-resveratrol* ด้วยเครื่องตรวจวัดดังกล่าว (Pezet, Pont & Cuenat. 1994 : 191-197) ในปี ค.ศ.1999 มีการศึกษาหาปริมาณสารประกอบ *trans-resveratrol* ในพลาสมาของมนุษย์ โดยแยกสารตัวอย่างให้บริสุทธิ์โดยวิธีสกัดแบบ Solid Phase Extraction (SPE) ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคชนิด reversed - phase C-18 จากนั้นนำไปตรวจหาปริมาณด้วยเครื่อง HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัด UV-VIS Photodiod array (Juan, et al. 1999 : 747-750)

จากงานวิจัยดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาปริมาณ resveratrol ในไวน์ และผลของพันธุ์ไวน์ที่มีผล (องุ่นเขียว) และองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล (องุ่นดำ) โดยใช้เทคนิค HPLC ซึ่งมีความสะดวกและรวดเร็วในการวิเคราะห์เป็นอย่างมาก อีกทั้งสามารถวัดระดับความเข้มข้นของสารได้ละเอียดกว่าเทคนิค GC และผู้วิจัยจะศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ

เครื่องตรวจวัดระหว่างโฟโตไดโอดแอเรย์ กับ ฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อเป็นการศึกษาหาวิธีที่สะดวกและรวดเร็วที่สุด ในการวิเคราะห์สารประกอบ resveratrol

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกวิเคราะห์สารประกอบ resveratrol ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง
2. เพื่อศึกษาหาค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ (analytical parameter) ระหว่างเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และ ฟลูออเรสเซนซ์
3. เพื่อศึกษาหาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ 5 เครื่องหมายการค้าและในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล และพันธุ์ไวท์มะละกา

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทำให้ทราบหลักการและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง
2. ทำให้ทราบค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ระหว่างเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และ ฟลูออเรสเซนซ์
3. ทำให้ทราบปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ 5 เครื่องหมายการค้า และในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล และพันธุ์ไวท์มะละกา

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาปริมาณสารประกอบ resveratrol เฉพาะไวน์แดง 5 เครื่องหมายการค้า ซึ่งแบ่งเป็นไวน์ที่ผลิตในประเทศไทย 2 เครื่องหมายการค้า คือ TH1 และ TH2 ไวน์ที่ผลิตจากต่างประเทศ 3 เครื่องหมายการค้า คือ IT1 และ IT2 ผลิตในประเทศอิตาลี FR1 ผลิตในประเทศฝรั่งเศส ซึ่งผู้วิจัยทำการสั่งซื้อจากร้านขายไวน์ที่ตั้งอยู่ในห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานคร
2. ศึกษาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นเฉพาะพันธุ์คาร์ดินัลและองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา ซึ่งผลองุ่นอยู่ในระยะเก็บเกี่ยวเหมาะกับการรับประทานผลสด ผู้วิจัยทำการสั่งซื้อจากร้านขายผลไม้สดในตลาดคลองเตย กรุงเทพมหานคร

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง โดยนำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. การแยกสารประกอบ resveratrol จากพืช
2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ resveratrol โดยใช้เทคนิค GC
3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ resveratrol โดยใช้เทคนิค HPLC
4. การศึกษาทางเภสัชวิทยาของสารประกอบ resveratrol
5. อื่นๆ

1. การแยกสารประกอบ resveratrol จากพืช

กุมาร์ และคณะ (Kumar, et al. 1988 : 3625-3626) แยกสารประกอบ resveratrol จากลำต้นของ *Pterolobium hexapetallum* อยู่ในวงศ์ Caesalpinaceae โดยนำลำต้นไปล้าง ลมให้แห้ง นำไปบดให้เป็นผงสกัดด้วย methanol เอาส่วนสกัดที่ได้ไประเหยแห้งและสกัดด้วยวิธี Soxhlet โดยใช้สารละลาย ethyl acetate สารประกอบที่ได้นี้แยกและทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ ด้วยระบบ benzene : ethyl acetate (7 : 3)

ฮานาวะ ทาฮาระ และมิซุทานิ (Hanawa, Tahara & Mizutani. 1992 : 3005-3007) แยกสารประกอบ resveratrol จากใบของ *Veratrum grandiflorum* อยู่ในวงศ์ Liliaceae โดยนำใบของ *Veratrum grandiflorum* แช่ใน cupric chloride เข้มข้น 3 mM นาน 1 นาที แล้วนำไปใส่ในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นสูง วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสกัดด้วย acetone 3 ครั้ง นำไประเหยแห้งจะได้สารสกัดที่เป็นของเหลว ต่อจากนั้นนำไปสกัดด้วย ethyl acetate 2 ครั้ง นำไประเหยแห้งจะได้ของแข็งซึ่งมีลักษณะคล้ายแป้งด้วยระบบ hexane : ethyl acetate (5 : 3) แล้วนำมาแยกต่อด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์อีกครั้งหนึ่งโดยใช้ระบบ chloroform : methanol (100 : 1) สารประกอบที่ได้นำมาแยกต่อด้วยโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง ได้สารประกอบ resveratrol ที่ค่า R_f 0.5 ในสารละลาย chloroform : methanol (5 : 1) และนำสารประกอบที่ได้นี้ไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC โดยวิธี reversed - phase ใช้คอลัมน์ ODS ขนาด 20.0 x 250 mm เฟสเคลื่อนที่ใช้ H_2O : acetonitrile (2 : 1) อัตราการไหล 3 mL/min พบว่าสารประกอบ resveratrol ปรากฏที่รีเทนชันไทม์ 11.36 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี จะพบสารประกอบ *trans-resveratrol* : *cis-resveratrol* ในอัตราส่วน 3 : 2

จายาทีเลค และคณะ (Jayatilake, et al. 1993 : 1805-1810) แยกสารประกอบ resveratrol จากรากของ *Polygonum cuspidatum* อยู่ในวงศ์ Polygonaceae ได้จากส่วนสกัดชั้น ethanol 95% สารประกอบที่ได้นี้แยกและทำให้บริสุทธิ์ โดยนำส่วนสกัดชั้น ethanol 95% ระเหยแห้ง แล้วสกัดแบบการแบ่งส่วนการละลายระหว่าง dichloromethane กับน้ำกลั่น นำส่วนสกัดชั้น dichloromethane ไประเหยแห้งนำมาสกัดแบ่งส่วนการละลายระหว่าง hexane และ aqueous methanol 90% ในอัตราส่วน 1 : 1 ตามด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ พบสารประกอบ resveratrol ในชั้นของ methanol

แมนนิลา แทลวิตี และโคเลฮไมเนน (Mannila, Talvitie & Kolehmainen. 1993 : 813-816) แยกสารประกอบ resveratrol จากเปลือกของลำต้น *Picea abies* อยู่ในวงศ์ Pinaceae โดยนำเปลือก *Picea abies* มาสกัดด้วย ethyl acetate นำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ โดยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ แล้วนำไปวิเคราะห์โครงสร้าง

คาซาบูโอโน และโพมิลิโอ (Casabuono & Pomilio. 1994 : 479-483) แยกสารประกอบ resveratrol จาก *Festuca argentina* โดยนำ *Festuca argentina* ทั้งต้น ตากให้แห้งนำไปบดสกัดด้วยวิธี soxhlet โดยใช้ petroleum (60 – 80°C) สกัดได้ 1.6% เมื่อเทียบกับพืชแห้ง และสกัดด้วย methanol ได้สารสกัด 6.6% เมื่อเทียบกับน้ำหนักพืชแห้ง ส่วนสกัด methanol นำไปแยกต่อด้วยวิธี percolated กับ polyaminde โดยสารละลาย dichloromethane H₂O และ methanol ได้ สารประกอบที่แยกได้ dichloromethane 1% H₂O 2.8% และ methanol 2.3% เมื่อเทียบกับน้ำหนักพืชแห้ง นำส่วนของ methanol 2.3% เมื่อเทียบกับน้ำหนักพืชแห้งนี้ไปแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex LH – 20 ซะด้วย methanol และแยกต่อด้วยโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง นำสารประกอบที่ได้ไปวิเคราะห์โครงสร้าง

โพลเวลล์ และคณะ (Powell, et al. 1994 : 335-338) แยกสารประกอบ resveratrol จากเมล็ด *Festuca versuta* อยู่ในวงศ์ Poaceae โดยนำเมล็ดของ *Festuca versuta* มาผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำไปบดให้เป็นผง สกัดด้วยสารละลาย methanol : ammonium hydroxide (99.5 : 0.5) โดยนำไปวางบน shaker (170 rpm) ทั้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง สารประกอบที่ได้นำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 54 แล้วนำไประเหยแห้งโดยใช้ อุณหภูมิ 32°C แยกสารประกอบที่ได้นี้ ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ โดยสารละลาย dichloromethane : methanol ซะด้วยระบบแบบเกรเดียน รวมแฟรกชันที่มีสารประกอบ resveratrol เข้าด้วยกันนำไประเหยแห้ง แล้วแยกด้วยคอลัมน์โดยทำซ้ำเหมือนเดิม จะได้สารที่บริสุทธิ์นำไปวิเคราะห์โครงสร้าง

คอร์แฮมเมอร์ เรนโร และแมททีวี (Korhammer, Reniero & Mattivi. 1995 : 1501-1504) แยกสารประกอบ resveratrol จากรากองุ่น (*Vitis vinifera*) อยู่ในวงศ์ Vitaceae ได้จากส่วนสกัดชั้น methanol สารประกอบที่ได้นี้แยกและทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol โดยใช้เทคนิค GC

แลงเคค และไพรซ์ (Langcake & Pryce. 1976 : 77-86) ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ *trans-resveratrol* ในใบองุ่น (*Vitis vinifera*) ที่ทำให้ติดเชื้อ *Botrytis cinerea* และฉายแสงอัลตราไวโอเลต หลังจากนั้นนำไปแยกสารประกอบให้บริสุทธิ์โดยนำไปปั่นให้ละเอียดกับสารละลาย methanol 70% นำไปกรองและปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง แยกเอาส่วนที่เป็นสารละลายใส (supernatant) ระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 40°C เติมน้ำกลั่นลงไปละลาย แล้วสกัดด้วย ethyl acetate นำส่วน ethyl acetate มาล้างด้วยสารละลาย sodium bicarbonate 3% ระเหยสารให้แห้ง เติม octacosane ลงไป 4 µg เป็น internal standard และใส่สารละลาย ethyl acetate และ *N,O*-bis(trimethylsilyl) acetamide นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.3 cm ยาว 152 cm เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิด เฟลมไอออไนเซชัน (Flame ionization detector, FID) อุณหภูมิคอลัมน์ 232°C แก๊สตัวพา (carrier gas) ใช้แก๊สไนโตรเจน อัตราการไหล 40 mL/min ผลการวิเคราะห์ปริมาณในใบองุ่นที่ทำให้ติดเชื้อ และฉายแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าสารประกอบ *trans-resveratrol* เข้มข้นอยู่ในช่วง 50 – 400 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม และ 500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ตามลำดับ ส่วนในใบองุ่นที่ไม่ติดเชื้อและไม่ถูกฉายแสงอัลตราไวโอเลตตรวจไม่พบปริมาณสารประกอบ *trans-resveratrol* ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ประมาณ 1 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม

จินด์เทท เบสซิช และกอลเชอร์รอน (Jeandet, Basis & Gautheron. 1991 : 41-46) ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ *trans-3,5,4'*-trihydroxystilbene ในใบและผลองุ่นระยะต่างๆ โดยนำองุ่นสายพันธุ์ที่ติดเชื้อง่าย (*Vitis vinifera*) และองุ่นสายพันธุ์ที่ติดเชื้อมาก (*Vitis labrusca*) หลังจากเก็บเกี่ยวแล้วนำมาฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 nm นาน 15 นาที ต่อจากนั้นเก็บไว้ในที่มีดพร้อมกับกลุ่มควบคุมเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ส่วนที่เป็นผลองุ่นนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยนำไปบดกับทรายแล้วเติม methanol 95% ลงไป 30 mL นำสารตัวอย่างนี้ไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายใส นำไประเหยแห้งจากนั้นนำมาแบ่งส่วนการละลาย ด้วย ethyl acetate และ sodium hydrogen carbonate 3% (v/v) แล้วล้าง organic phase ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และระเหย ethyl acetate ออกไปที่อุณหภูมิ 40°C ละลายสารตัวอย่างที่ได้ใน ethyl acetate ปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักสด 1 กรัม สำหรับส่วนที่เป็นใบทำเหมือนผลองุ่นทุกขั้นตอนแต่ยกเว้นหลังจากนำไประเหย ethyl acetate ออกที่อุณหภูมิ 40°C แล้วเติม methanol 4 mL และน้ำกลั่น 1 mL จากนั้นนำไปแยกด้วยวิธี SPE โดยใช้คอลัมน์ C_{18} ซะด้วย MeOH : H₂O (8:2) 40 mL หลังชะแล้วได้สารตัวอย่างออกมา นำไประเหยแห้ง แล้วละลายด้วย ethyl acetate 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักสด 1 กรัม หาปริมาณ resveratrol ด้วยเทคนิค GC โดยทำการ

เปลี่ยน resveratrol ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ trimethylsilyl ซึ่งมี octacosane เป็น internal standard ใช้คอลัมน์คาพิลลารี เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 mm ยาว 25 m เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิดเฟลมไอออไนเซชัน อุณหภูมิส่วนที่ฉีดสาร 200°C สำหรับอุณหภูมิในการวิเคราะห์ของคอลัมน์เริ่มตั้งแต่ 200 - 290°C โดยค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 5 องศาเซลเซียส ต่อนาที แก๊สตัวพาใช้แก๊สไนโตรเจน ความดันของแก๊สตัวพา 50 kPa ผลการวิเคราะห์พบว่า สารอนุพันธ์ของ resveratrol รีเทนชันไทม์ที่ 14.85 นาที และปรากฏว่าอุณหภูมิ *Vitis labrusca* ทั้งใบและผลจะพบ resveratrol มากกว่า *Vitis vinifera* ซึ่งอุณหภูมิทั้ง 2 สายพันธุ์ พบ resveratrol ในปริมาณที่มากเมื่อผลยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่ และค่อยๆลดลงเมื่อผลสุก นอกจากนี้ยังพบว่า ในเปลือกมีมากกว่าในเนื้อของผลองุ่นอีกด้วย เช่น ผลองุ่น ระยะ 3 สัปดาห์ สายพันธุ์ *Vitis vinifera* ในเปลือกพบ 50-60 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเปลือกสด 1 กรัม ขณะที่ในเนื้อพบต่ำกว่า 1 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเนื้อองุ่นสด 1 กรัม สำหรับสายพันธุ์ *Vitis labrusca* พบในเปลือก 70 - 100 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเปลือกสด 1 กรัม ส่วนในเนื้อของผลองุ่นพบปริมาณ 3 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเนื้อองุ่นสด 1 กรัม สำหรับปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ในงานวิจัยครั้งนี้ เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม

โกลด์เบิร์ก และคณะ (Goldberg, et al. 1995 : 1245-1250) ศึกษาการวิเคราะห์ ปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์มากกว่า 450 ชนิด ทำให้สารบริสุทธิ์โดยเทคนิค Solid Phase Extraction คอลัมน์ C_{18} น้ำหนักของอนุภาคที่บรรจุอยู่ภายใน 500 mg ปริมาตร 3 mL ทำการล้างคอลัมน์ด้วย ethyl acetate ตามด้วย methanol 96% (v/v) และ ethanol 10% ใส่สารตัวอย่างไวน์ ปริมาตร 1 mL ลงไปในคอลัมน์ แล้วทำให้แห้งภายใต้ แก๊สไนโตรเจน ชะ คอลัมน์ด้วย ethyl acetate 2 mL นำเอา 1 mL แรกไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS ใช้คอลัมน์ คาพิลลารี ผ่นภายในเคลือบด้วย DB - 17 หน้า 0.15 μm ขนาดของคอลัมน์ เส้นผ่าศูนย์กลาง ภายใน 0.25 mm ยาว 15 m เครื่องตรวจวัดสัญญาณ Quadrupole MS อุณหภูมิคอลัมน์เริ่ม ตั้งแต่ 150-305°C ผลวิเคราะห์พบว่าในเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี สารประกอบมีมวลโมเลกุล 228 และในเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี กราฟมาตรฐานของ *trans-resveratrol* อยู่ในช่วงของความเข้มข้น 0.1 - 10.0 mg/L กราฟมาตรฐานของ *cis-resveratrol* ทำโดยนำสารประกอบ *trans-resveratrol* ไปฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาคำนวณหาความเข้มข้นโดยเทียบกับความเข้มข้น *trans-resveratrol* ช่วงของความเข้มข้น ของกราฟมาตรฐาน 0.1 - 12.5 mg/L สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มีค่าใกล้เคียงกันคือ 0.999 พบ สารประกอบ *cis-resveratrol* และ *trans-resveratrol* ปรากฏที่รีเทนชันไทม์ประมาณ 4.3 และ 5.7 นาที ตามลำดับ ความเข้มข้นของ *cis-resveratrol* โดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.56 - 3.04 mg/L ผลรวมของความเข้มข้น สารประกอบ resveratrol ทั้ง *cis-* และ *trans-* isomer อยู่ในช่วง

1.98 – 7.13 mg/L percent recovery อยู่ในช่วง 92.2 – 97.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุด 10 µg/L

เบลช และคณะ (Blache, et al. 1997 : 103-110) ศึกษาการวิเคราะห์ ปริมาณสารประกอบ resveratrol ในพลาสมา (plasma) ไลโปโปรตีน (lipoprotein) และ เซลล์เม็ดเลือดหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง การสกัดสารตัวอย่างให้บริสุทธิ์โดยใช้สารละลาย acetone เย็น ไขมันจะตกตะกอน resveratrol จะอยู่ในชั้นของ acetone นำไประเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC ใช้คอลัมน์คอปิลลารี ภายในเคลือบด้วย OV 1701 หนา 0.1 µm ขนาดของคอลัมน์เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 mm ยาว 25 m เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิด เฟลมิอออนไนเซชัน อุณหภูมิส่วนที่ฉีดสาร 270°C คอลัมน์ 275°C แก๊สตัวพาใช้แก๊สฮีเลียม อัตราการไหล 12 mL/min ผลการวิเคราะห์ *cis*- และ *trans*-resveratrol ปรากฏที่รีเทนชันไทม์ประมาณ 6.6 และ 12.9 นาที ตามลำดับ สำหรับ percent recovery เท่ากับ 96.8 การวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ประมาณ 50 ng/mL จากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า มี resveratrol อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดและไลโปโปรตีน

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ resveratrol โดยใช้เทคนิค HPLC

ลามูลา-ราเวนทอส และวอเตอร์เฮาส์ (Lamuela-Raventos & Waterhouse. 1993 : 521-523) ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ California โดยใช้เทคนิค HPLC มุ่งเน้นเพื่อการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้รวดเร็วและสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณ resveratrol ในไวน์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยนำตัวอย่างไวน์แดงปี 1989 มา 3 เครื่องหมาย การค้ำนี้ Cabernet sauvignon Zinfandel และ Pinot noir นอกจากนี้ได้นำไวน์ขาวปี 1990 มาทดสอบด้วยดังนี้ Sauteres และ Chardonnay สาเหตุที่เลือกไวน์ขาวมาทำการทดลองเนื่องจากองุ่นที่นำมาทำไวน์ขาวเหล่านี้ติดเชื้อ *Botrytis cinerea* แล้วเตรียมตัวอย่างไวน์ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC ทำการสกัดแบบ Liquid – Liquid โดยนำไวน์มาระเหยเพื่อลดปริมาณ ethanol ให้เหลือน้อยลง แล้วนำไปสกัดด้วย chloroform 2 ครั้ง แล้วทิ้งชั้นของ chloroform จากนั้นสกัดด้วย ethyl acetate 3 ครั้ง รวมชั้นของ ethyl acetate เข้าด้วยกัน หลังจากนั้นล้างด้วย sodium chloride อิมตัว 2 ครั้ง เก็บเอาชั้น ethyl acetate ไว้ นำไประเหยแห้งละลายด้วย H₂O : acetonitrile (1 : 1) นำไปกรองผ่านกระดาดกรอง poly (tetrafluoroethylene) (PTFE) ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 µm แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ในคอลัมน์ Novapack C₁₈ อนุภาคที่บรรจุภายในมีขนาด 4 µm คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3.9 mm ยาว 150 mm เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย สารละลาย A คือ orthophosphoric acid 0.2 M ปรับ pH ให้เท่ากับ 1.5 ด้วย ammonia สารละลาย B คือ นำ A มา 20% ผสมกับ acetonitrile 80% ใช้โปรแกรมแบบเกรเดียน เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิดโฟโตไดโอดแอรเรย์ใช้ค่าการดูดกลืนแสงสำหรับ

สารประกอบ *trans-resveratrol* ที่ 306 nm อัตราการไหล 0.5 mL/min ผลการวิเคราะห์ปริมาณพบว่า *trans-resveratrol* ปรากฏที่รีเทนชันไทม์ ประมาณ 14 -17 นาที โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ความเข้มข้นในไวน์แดงอยู่ในช่วงต่ำกว่า 0.05 - 0.68 mg/L และพบว่าไวน์แดง pinot noir มีสารประกอบ *trans-resveratrol* มากกว่าไวน์แดงชนิดอื่น ส่วนในไวน์ขาวที่ทำมาจากองุ่นติดเชื้อ *Botrytis cinerea* พบว่า Sauternes มีสารประกอบ *trans-resveratrol* ต่ำกว่า 0.05 mg/L และ Chardonnay ไม่พบสารประกอบ *trans-resveratrol* การวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.05 mg/L ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ≥ 0.999 percent recovery เท่ากับ 45

เพเล็ท พ็อนท์ และคูแนท (Pezet, Pont & Cuenat. 1994 : 191-197) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่น และ ไวน์ 5 ชนิด จากประเทศสวิสเซอร์แลนด์ โดยนำผลองุ่นสุกที่ติดเชื้อ *Plasmopara viticola* มาบ่มให้ละเอียดในสารละลาย methanol จากนั้นนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง เอาส่วนที่เป็นสารละลายใส มาเติมน้ำลงไป 20 % แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Solid phase extraction แล้วนำไปสกัดด้วย diethyl ether และทำสารละลายให้แห้ง ละลายด้วยสารละลาย methanol นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ส่วนการเตรียมไวน์ที่เป็นสารตัวอย่าง จะฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยตรง ทำการเปรียบเทียบเครื่องตรวจวัด 2 ชนิด คือ UV detector และ Fluorescence ใช้คอลัมน์ ชนิด reversed – phase อนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ คือ Lichrospher – C₁₈ ขนาดของอนุภาคที่บรรจุ 5 μ m คอลัมน์มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.5 mm ยาว 250 mm สารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นสารละลาย methanol และ formic acid ความเข้มข้น 50 mM ใช้โปรแกรมแบบเกรเดียน (gradient elution program) เครื่องตรวจวัดสัญญาณอัลตราไวโอเล็ต ใช้ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 306 nm และ เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ใช้ค่า maximum excitation wavelength ; (ex) 330 nm และ maximum emission wavelength ; (em) 374 nm ผลการวิเคราะห์ปริมาณพบว่าสารประกอบ resveratrol รีเทนชันไทม์ที่ 15.6 นาที ในผลองุ่นมีความเข้มข้น 1.21 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ในไวน์ขาวช่วงของความเข้มข้นตั้งแต่ 0.14 – 0.15 mM และไวน์แดงช่วงของความเข้มข้นตั้งแต่ 2.16 – 6.47 mM โดยใช้เครื่องตรวจวัด Fluorescence ความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้เท่ากับ 0.1 ng/10 μ L และเครื่องตรวจวัดอัลตราไวโอเล็ตเท่ากับ 5 ng/10 μ L สำหรับ percent recovery เท่ากับ 100 การตอบสนองของการตรวจวัดเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.1 - 100 ng/10 μ L

แม็คเมอร์ทรี และคณะ (Mcmurtrey, et al. 1994 : 2077-2080) ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ *trans-resveratrol* ในไวน์ 11 ชนิด โดยใช้วิธีฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยตรง ใช้คอลัมน์ชนิด Nucleosil C₁₈ อนุภาคที่บรรจุอยู่ภายในมีขนาด 5 μ m คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 mm ยาว 150 mm เฟสเคลื่อนที่ ประกอบด้วย NH₄H₂PO₄

0.05 mol/L ในสารละลาย acetonitrile 25 % (v/v) ใช้โปรแกรมแบบไอโซเครติก (Isocratic elution program) ร่วมกับ electrochemical detector ผลการวิเคราะห์ปริมาณพบว่า สารประกอบ resveratrol รีเทนชันไทม์ ประมาณ 16 นาที ในไวน์ขาวมีความเข้มข้นน้อยกว่า 0.02 mg/L และไวน์แดง ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.99 – 5.01 ppb percent recovery เท่ากับ 89 ± 1 การตอบสนองการตรวจวัดเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.10 – 8.00 ppb

วอเตอร์เฮาส์ และลามูล่า-ราเวนทอส (Waterhouse & Lamuela-Raventos. 1994 : 571-573) ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ piceid (3- β -glucoside resveratrol) และ *trans*-resveratrol ในเปลือกผลองุ่น 5 สายพันธุ์ โดยลอกเปลือกของผลองุ่นออก นำเฉพาะเปลือกไปทำให้แห้งด้วย lyophilized แล้วนำเปลือกองุ่นแห้งมาปั่นกับสารละลาย methanol : ethanol (90:10) จากนั้นล้างสารสกัดจาก alcohol ด้วย petroleum ether 2 ครั้ง และระเหยให้เป็นสารละลายชั้น ละลายสารละลายชั้นด้วย sodium chloride อิมัลชันในน้ำและ ethyl acetate จะได้สารแยกชั้นเป็น 2 เฟส นำเฟสที่เป็นน้ำไปแยกด้วยวิธี SPE สารที่สกัดได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งละลายด้วยน้ำกลั่นและนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อหาปริมาณสารประกอบ piceid สารส่วนที่ 2 ละลายด้วย H₂O : Acetonitrile (1:1) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ *trans*-resveratrol แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC วิธี reverse-phase ใช้คอลัมน์ C₁₈ อนุภาคที่บรรจุภายในมีขนาด 5 μ m คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4 mm ยาว 250 mm สารละลายเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย สารละลาย A คือ orthophosphoric acid 0.2 M ปรับ pH ให้เท่ากับ 1.5 ด้วย ammonium hydroxide สารละลาย B คือ น้ำ A มา 20% ผสมกับ acetonitrile 80% ในการวิเคราะห์สารประกอบ piceid ใช้โปรแกรมแบบไอโซเครติก โดยใช้สารละลาย A 80% และ B 20% ส่วนการวิเคราะห์สารประกอบ *trans*-resveratrol ใช้สารละลาย A 70% และ B 30% อัตราการไหล 1 mL/min เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิดโฟโตไดโอดอาร์เรย์ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 306 nm พบว่าสารประกอบ piceid ในเปลือกผลองุ่น *Vitis vinifera* "Pinot noir", UCD-31 มีความเข้มข้นมากที่สุดถึง 187 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเปลือกแห้ง 1 กรัม แต่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ *trans*-resveratrol ได้ องุ่นพันธุ์ *Vitis X labruscana* Bail. "Concord", UCD-05 ไม่สามารถวิเคราะห์ piceid ได้ สำหรับสารประกอบ *trans*-resveratrol ในเปลือกผลองุ่น *Vitis vinifera* "Pinot noir", UCD-29 มีความเข้มข้นมากที่สุดถึง 78.5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเปลือกแห้ง 1 กรัม สารประกอบ piceid มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.999 percent recovery เท่ากับ 73 ส่วนสารประกอบ *trans*-resveratrol มี percent recovery เท่ากับ 37

ลามูล่า-ราเวนทอส และคณะ (Lamuela – Raventos, et al. 1995 : 281-283) ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์แดง 18 ชนิดจากประเทศสเปน โดยใช้วิธีฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยตรง ใช้คอลัมน์ชนิด reversed -phase C₁₈ ขนาดของอนุภาคที่บรรจุ

อยู่ภายใน มีขนาด 5 μm คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.4 cm ยาว 25 cm สารละลายเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย A คือ glacial acetic acid ในน้ำ pH 2.4 และ B คือ acetonitrile 80% และ glacial acetic acid ในน้ำ 20% ใช้โปรแกรมแบบเกรเดียนต์เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิดโฟโตไดโอดอาร์เรย์ใช้ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสำหรับสารประกอบ *cis-resveratrol* และ *trans-resveratrol* ที่ 285 และ 306 nm ตามลำดับ อัตราการไหล 1.5 mL/min ผลการวิเคราะห์ปริมาณพบว่า *trans-resveratrol* ปรากฏที่รีเทนชันไทม์ ที่ประมาณ 17 นาที ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.60 – 8.00 mg/L การวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดมีค่า 0.003 mg/L Limit of quantitation (LQ) 0.01 mg/L และ *cis-resveratrol* มีรีเทนชันไทม์ ที่ประมาณ 21.4 นาที ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.15 – 2.48 mg/L

แมททีวี เรเนียร์ และคอร์แฮมเมอร์ (Mattivi, Reniero & Korhammer. 1995 : 1820-1823) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในระหว่างการหมักไวน์แดง ประกอบด้วย *trans-* และ *cis-resveratrol* และ *trans-resveratrol* β -D-glucopyranoside และ *cis-resveratrol* β -D-glucopyranoside ศึกษาด้วยเทคนิค HPLC ที่สภาวะเช่นเดียวกันกับของแมททีวี (Mattivi. 1993a: 522-525) โดยศึกษาตัวอย่างน้ำองุ่นทุกวันจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นไวน์หยุดการหมักโดยเติม sodium hydrogen sulphate (200 mg/L) ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C การวิเคราะห์ทำภายในวันเดียวกันกับที่เก็บตัวอย่าง เมื่อเริ่มต้นการหมักไวน์และเริ่มต้นการตรวจวิเคราะห์พบว่าสารประกอบเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ *cis-resveratrol*/ β -D-glucopyranoside (21.2 $\mu\text{mol/L}$) *trans-resveratrol* β -D-glucopyranoside (7.4 $\mu\text{mol/L}$) *trans-resveratrol* (3.2 $\mu\text{mol/L}$) และ *cis-resveratrol* (ตรวจไม่พบ) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการเพิ่มขึ้นของ ethanol กับปริมาณ *trans-* และ *cis-resveratrol* พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณ ethanol เพิ่มมากขึ้น ปริมาณ *trans-* และ *cis-resveratrol* จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย หลังจากแยกผลองุ่นออกไปพบว่าสารทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณลดลง ความเข้มข้นสุดท้ายจะพบ *trans-* มากกว่า *cis-resveratrol* เมื่อพิจารณาการเพิ่มขึ้นของ ethanol กับปริมาณ *cis-* และ *trans* β -D-glucopyranoside พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณ ethanol เพิ่มมากขึ้น ปริมาณ *cis-* β -D-glucopyranoside จะลดลง ส่วนปริมาณ *trans* β -D-glucopyranoside จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยของวันที่ 3 ของการหมักไวน์ (11.4 $\mu\text{mol/L}$) หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลงทีละน้อยจนมีปริมาณสุดท้ายเท่ากับ 2.9 $\mu\text{mol/L}$ เมื่อพิจารณาวันสุดท้ายของการหมักไวน์ (วันที่ 13) การตรวจวิเคราะห์พบว่าสารประกอบเรียงลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ *trans-resveratrol* (27.1 $\mu\text{mol/L}$) *cis-resveratrol* (22.4 $\mu\text{mol/L}$) *cis-resveratrol* β -D-glucopyranoside (7.1 $\mu\text{mol/L}$) และ *trans-resveratrol* β -D-glucopyranoside (2.9 $\mu\text{mol/L}$) ตามลำดับ

จินเด็ต และคณะ (Jeandet, et al. 1995 : 1-4) ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณ resveratrol ในไวน์ที่บ่มไว้อย่างต่างๆ กัน และความสัมพันธ์ในการติดเชื้อราจากสวองุ่น ที่มีผลต่อปริมาณ resveratrol โดยนำตัวอย่างไวน์แดงตลอด 13 ปี ตั้งแต่ 1980-1992 มาสกัดด้วย

วิธี Liquid-Liquid Extraction ของ ซีแมนและครีซี (Siemann & Creasy. 1992 : 49-52) นำตัวอย่างไวน์ที่สกัดแล้วมาสกัดด้วย ethyl acetate 3 ครั้ง รวมสารละลาย ethyl acetate เข้าด้วยกัน แล้วล้างด้วย sodium bicarbonate 3% v/v และล้างด้วยน้ำกลั่น deionized 2 ครั้ง นำไประเหยแห้งเอา ethyl acetate ออกไปที่อุณหภูมิ 40°C นำสารละลาย ethanol บริสุทธิ์ (AR grade) ละลายสารที่ได้จากการระเหยแห้ง (ระหว่างการเตรียมตัวอย่างไม่ให้ถูกแสง) แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ C₁₈ เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.5 mm ยาว 250 mm เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย acetonitrile : น้ำ (40 : 60) ใช้โปรแกรมแบบไอโซเครติก เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิดโฟโตไดโอดแอรเรย์ ใช้ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง สำหรับสารประกอบ *trans-resveratrol* ที่ 306 nm และ *cis-resveratrol* 280 nm อัตราการไหล 0.6 mL/min ผลการวิเคราะห์พบว่า *trans-resveratrol* ปรากฏที่รีเทนชันไทม์ 9.30 นาที และ *cis-resveratrol* 11.40 นาที เมื่อพิจารณาความเข้มข้น *resveratrol* โดยในแต่ละปีองุ่นติดเชื้อรา 3 ชนิด ดังนี้ grey mold powdery mildew และ downy mildew พบว่ารา grey mold สายพันธุ์ *Botrytis cinerea* สวนองุ่นติดเชื้อราชนิดนี้เป็นจำนวนมากในปี 1980 1981 1983 และ 1986 และติดเชื้อปานกลางเฉพาะปี 1991 จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *resveratrol* ในไวน์ พบว่ามีปริมาณค่อนข้างต่ำเฉลี่ยระหว่าง 0.89 – 1.48 mg/L ในทางตรงกันข้ามไวน์จากปี 1982, 1989, 1990 และ 1992 ซึ่งสวนองุ่นติดเชื้อรา grey mold สายพันธุ์ *Botrytis cinerea* เป็นปริมาณน้อย พบว่าปริมาณสารประกอบ *resveratrol* มีความเข้มข้นสูงคือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.00 - 2.49 mg/L

เทรล่า และวอเตอร์เฮาส์ (Trela & Waterhouse. 1996 : 1253-1257) ศึกษาหาค่า Molar absorptivity และความเสถียรของสารประกอบ *cis-* และ *trans-resveratrol* การศึกษาหาค่า Molar absorptivity โดยเตรียมสารละลาย *cis-* และ *trans-resveratrol* ใน ethanol โดย *cis-resveratrol* ที่ระดับความเข้มข้น 5.26 - 52.76 $\mu\text{mol/L}$ และ *trans-resveratrol* ที่ระดับความเข้มข้น 5.52 – 55.61 $\mu\text{mol/L}$ แล้วนำไปวัดค่า absorbance หาความชัน ผลปรากฏว่า สารประกอบ *cis-resveratrol* { $\text{UV}_{\lambda_{\text{max}}}(\text{EtOH}) \text{ nm } (\epsilon) 288 (12600)$ } และ CV = 5.1% ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มี 0.99 ในสารประกอบ *trans-resveratrol* { $\text{UV}_{\lambda_{\text{max}}}(\text{EtOH}) \text{ nm } (\epsilon) 308 (30000)$ } การศึกษาความเสถียรของสารประกอบ *cis-* และ *trans-resveratrol* โดยทดสอบการเปลี่ยน isomers ของ *trans-resveratrol* ไปเป็น *cis-resveratrol* โดยการฉายแสง UV ดังนั้น เตรียมสารละลาย *trans-resveratrol* เข้มข้น 418 $\mu\text{mol/L}$ ใน ethanol 50% ใส่ในขวดแก้ว borosilicate หนา 2 mm เอาไปวางไว้ใกล้หลอด UV ความเข้มแสง 180 $\mu\text{W/cm}^2$ ที่ 366 nm และทำเปรียบเทียบกับอีกชุดหนึ่ง หลอด UV ความเข้มแสง 750 $\mu\text{W/cm}^2$ ที่ 254 nm แล้วตรวจวัดหาปริมาณ *cis-resveratrol* ทุกๆ 10 นาที โดยนำไปกรองผ่านกระดาษกรองชนิด PTFE ที่มีรูพรุน 0.45 μm 1 ครั้ง ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ hypersil ODS (C₁₈) อนุภาคที่บรรจุภายในมีขนาด 5 μm คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.1 mm ยาว 100 mm สาร

ละลายเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย A คือ น้ำกลั่น deionized B คือ methanol ตรวจวัดที่อุณหภูมิ 40°C ใช้โปรแกรมแบบเกรเดียน เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิดโฟโตไดโอดแอเรย์ ใช้ค่าการดูดกลืนคลีนแสงสำหรับสารประกอบ *trans-resveratrol* ที่ 306 nm และ *cis-resveratrol* ที่ 286 nm อัตราการไหล 0.5 mL/min พบว่าสารประกอบ *trans-resveratrol* มีรีเทนชันไทม์ที่ 7.3 นาที และ *cis-resveratrol* ที่ 8 นาที จากผลการทดลองพบว่า สารละลาย *trans-resveratrol* เข้มข้น 418 $\mu\text{mol/L}$ เมื่อนำไปฉายแสง UV เป็นเวลา 120 นาที ที่ความยาวคลื่น 366 nm ที่เวลา 100 นาที พบว่า *trans-resveratrol* เปลี่ยนไปเป็น *cis-resveratrol* ได้มากที่สุดถึง 90.6% เมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบกับ *trans-resveratrol* เข้มข้น 418 $\mu\text{mol/L}$ ฉายแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm นาน 60 นาที พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมง สามารถเปลี่ยน isomer จาก *trans-* เป็น *cis-resveratrol* ได้เพียง 63% ซึ่งทั้งสองกลุ่มการทดลองไม่พบสารอื่นปะปนในโครมาโตแกรมเลย เมื่อทำการทดลองอีกกลุ่มการทดลองโดยเตรียมสารละลาย *trans-resveratrol* เข้มข้น 8.94 mmol/L แล้วฉายแสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเปลี่ยนไปเป็น *cis-resveratrol* ได้มากกว่า 80% เมื่อค่า r^2 มากกว่า 0.999 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ของ *trans-resveratrol* มีค่า 0.6 $\mu\text{mol/L}$ และ *cis-resveratrol* ที่ 0.6 $\mu\text{mol/L}$ การทดสอบความคงตัวของ *cis-* และ *trans-resveratrol* ในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ กัน โดยได้จาก phosphoric acid buffer ใช้ sulfuric acid ปรับ pH ให้ต่ำลง และใช้สารละลาย ammonium hydroxide สำหรับปรับ pH ให้สูงขึ้น เพื่อให้ได้ pH 1.0 3.5 7.0 และ 10.0 ผสมสารประกอบ *resveratrol* : buffer (1:1) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 276 $\mu\text{mol/L}$ พบว่า *trans-resveratrol* (ใน buffer pH 1-7) เมื่อไม่ให้อุณหภูมิแสงจะคงตัวได้อย่างน้อย 42 ชั่วโมง ($\text{CV} \leq 1.0\%$) หรืออย่างน้อย 28 วัน ($\text{CV} \leq 4.7\%$) *trans-resveratrol* จะสลายตัวเมื่ออยู่ใน buffer pH 10 จะมี half-life 1.6 ชั่วโมง *cis-resveratrol* จะสลายตัวเมื่ออยู่ใน buffer pH 10 โดยมีค่า half-life 63.7 ชั่วโมง ไม่สลายตัวที่ pH 7 ($\text{CV} = 0.7\%$) และคงตัวน้อยลงเมื่อ pH 3.5 ($\text{CV} = 2.6\%$) ใน buffer pH ต่างๆ กัน พบว่า *cis-resveratrol* ถูกฉายแสง UV ที่ 366 nm นาน 5 นาที แล้วปล่อยให้เย็นในห้องทดลองเป็นเวลา 30 วัน จะพบ *cis-resveratrol* เหลือประมาณ 86% ยกเว้นที่ pH 1.0 เหลือประมาณ 33.7% และที่ pH 10 ไม่พบ *cis-resveratrol* เลย

จวน และคณะ (Juan, et al. 1999 : 747-750) ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ *trans-resveratrol* ในพลาสมา เตรียมสารตัวอย่างโดยดูดเลือดจากหลอดเลือดดำของหนูทดลอง หลังจากให้กินสารประกอบ *trans-resveratrol* ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม แล้วฆ่าหนูที่เวลา 15 30 และ 45 นาที นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงและนำส่วนของพลาสมาไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีสกัดแบบ Solid Phase Extraction ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคชนิด reversed – phase C_{18} จากนั้นจึงนำไปแยกวิเคราะห์ปริมาณด้วย HPLC ใช้คอลัมน์ที่บรรจุเฟสชนิด reversed – phase อนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์คือ Nucleosil – C_{18} ขนาดของอนุภาคที่บรรจุ 5 μm คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.4 cm ยาว 25 cm

เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย glacial acetic acid ในน้ำ pH 2 และสารละลายผสมระหว่าง glacial acetic acid 20% กับ acetonitrile 80% อัตราการไหล 1.5 mL/min ใช้โปรแกรมแบบเกรเดียน เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิดโฟโตไดโอดแอร์เรย์ ใช้ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 306 nm ผลการวิเคราะห์ปริมาณพบว่า ใช้เวลาในการวิเคราะห์สาร 1 โครมาโตแกรม 18 นาที พบสารประกอบ *trans-resveratrol* ปรากฏที่รีเทนชันไทม์ประมาณ 8 นาที หลังจากให้หนูทดลองกินสารประกอบนี้เข้าไปเป็นเวลา 15 นาที พบว่าความเข้มข้นที่ตรวจพบเท่ากับ 0.175 mg/L สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ที่ร้อยละ 2.82 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9985 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ 7 µg/L

ตาราง 1 สรุป สภาวะของเครื่อง percent recovery และ limited of detection ของเทคนิค HPLC จากงานวิจัยที่ผ่านมา

ชื่อผู้วิจัย	ตัวอย่าง	isomer	สภาวะของเครื่อง	percent recovery	LOD (µg/mL)
ลามูลา-ราเวนทอส และวอเตอร์เฮาส์ (1993)	ไวน์	<i>trans</i> -	- คอลัมน์ Novapack C ₁₈ (3.9 × 150 mm) - วิเคราะห์แบบเกรเดียน - เฟสเคลื่อนที่ เมื่อ A คือ orthophosphoric acid 0.2 M (pH 1.5) และ B คือ A 20% ผสมกับ acetonitrile 80% - เครื่องตรวจวัด DAD	45	0.05
เพเล็ท ฟ็อนท์ และ คูแนท์ (1994)	- ผลองุ่น - ไวน์	<i>trans</i> -	- คอลัมน์ Lichrospher-C ₁₈ (4.5 x 250 mm) - วิเคราะห์แบบเกรเดียน - เฟสเคลื่อนที่ methanol และ formic acid เข้มข้น 50 mM - เครื่องตรวจวัด UVD และ FLD	100	UVD 0.5 FLD 0.01
แม็คเมอทธิ และ คณะ (1994)	ไวน์	<i>trans</i> -	- คอลัมน์ Nucleosil C ₁₈ (4.6 x 150 mm) - วิเคราะห์แบบไอโซเครติก - เฟสเคลื่อนที่ NH ₂ H ₂ PO ₄ 0.05 mol/L ใน สารละลาย acetonitrile 25% (v/v) - เครื่องตรวจวัด electrochemical	89 ± 1	0.02

ตาราง 1 (ต่อ)

ชื่อผู้วิจัย	ตัวอย่าง	isomer	สภาวะของเครื่อง	percent recovery	LOD ($\mu\text{g/mL}$)
วอเตอร์เฮาส์ และ ลามูล่า-ราเวนทอส (1994)	- เปลือก - ผลอ่อน	<i>trans</i> -	- คอลัมน์ C_{18} (4 x 250 mm) - วิเคราะห์แบบไอโซเครติก - เฟสเคลื่อนที่ เมื่อ A คือ orthophosphoric acid 0.2 M (pH 1.5) : B คือ A 20% ผสมกับ acetonitrile 80% (70 : 30) - เครื่องตรวจวัด DAD	37	-
ลามูล่า-ราเวนทอส และคณะ (1995)	ไวน์	<i>cis</i> - <i>trans</i> -	- คอลัมน์ C_{18} (4 x 250 mm) - วิเคราะห์แบบเกรเดียน - เฟสเคลื่อนที่ A คือ glacial acetic acid ในน้ำ pH 2.4 และ B คือ acetonitrile 80% ผสมกับ A 20% - เครื่องตรวจวัด DAD	-	-
จินเต้ท และคณะ (1995)	ไวน์	<i>cis</i> - <i>trans</i> -	- คอลัมน์ C_{18} (4.5 x 250 mm) - วิเคราะห์แบบไอโซเครติก - เฟสเคลื่อนที่ acetonitrile : H_2O (40 : 60) - เครื่องตรวจวัด DAD	-	-
จวน และคณะ (1999)	พลาสมา	<i>trans</i> -	- คอลัมน์ Nucleosil- C_{18} (4 x 250 mm) - วิเคราะห์แบบเกรเดียน - เฟสเคลื่อนที่ เมื่อ A คือ glacial acetic acid ในน้ำ pH 2 และ B คือ A 20% ผสม กับ acetonitrile 80% - เครื่องตรวจวัด DAD	-	0.007

4. การศึกษาทางเภสัชวิทยาของสารประกอบ resveratrol

อะริชิ และคณะ (Arichi, et al. 1982 : 1766–1770) ศึกษาสารประกอบ resveratrol ใน *Polygonum cuspidatum* (ในประเทศญี่ปุ่นเรียกว่า *kojo – kon* หรือ *itadori – kon*) โดยให้หนูทดลองกินอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำมันข้าวโพด 10% โคเลสเตอรอล 1% และ กรดโคลิค (cholic acid) หลังจาก 7 วันให้หนูกินสารประกอบ resveratrol ขนาด 50 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม แล้วตรวจวัดปริมาณกรดไขมันอิสระ (free fatty acid, FFA) ผลรวมของโคเลสเตอรอล (total cholesterol, TC) ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride, TG) ฟอสโฟลิปิด (phospholipid, PL) high density lipoprotein-cholesterol (HDL-ch) low density lipoprotein-cholesterol (LDL-ch) ในซีรัม (serum) พร้อมทั้งตรวจวัดปริมาณ TC TG และ FFA ในตับ หนูเทียบกับกลุ่มทดลอง พบว่า resveratrol ป้องกันการเกาะตัวของ TC และ LDL-ch ในซีรัม และป้องกันการเกาะตัวของ TC และ TG ในตับของหนูทดลอง ดังนั้นจึงดูเหมือนว่า resveratrol สามารถช่วยป้องกันการอุดตันของหลอดเลือด (atherosclerosis) ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจได้

คิมูระ โอคุตะ และอะริชิ (Kimura, Okuda & Arichi. 1985 : 275-278) ศึกษาผลของสารประกอบ resveratrol ที่มีต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของ arachidonate ในเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยนำสารประกอบ resveratrol มาจากการแยก *Polygonum cuspidatum* แล้วนำไปศึกษาผลที่มีต่อแอคติวิตี (activity) ของไซโคลออกซีจีเนส และ ไลโปจีเนส พบว่า resveratrol สามารถยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองเพื่อไม่ให้สร้าง 5-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid (5-HETE) และ 12-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid (HHT) ตามลำดับ และยังยับยั้งกระบวนการสร้าง thromboxane B₂ ผลการศึกษาพบว่า ค่า IC₅₀ ในการยับยั้งการสร้างผลิตภัณฑ์ในเม็ดเลือดขาวของเอนไซม์ไลโปจีเนส ที่สร้าง 5-HETE เท่ากับ $2.72 \pm 0.262 \mu\text{M}$ สำหรับเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส ที่สร้าง HHT และ thromboxane B₂ มีค่า $0.682 \pm 0.163 \mu\text{M}$ และ $0.810 \pm 0.274 \mu\text{M}$ ตามลำดับ เป็นที่ทราบกันว่าสารทั้ง 3 ตัวนี้คือ 5-HETE HHT และ thromboxane B₂ จะถูกสร้างขึ้นมาระหว่างที่เกิดการอักเสบทำให้เกิดความเจ็บปวด อาการบวมแดงและเป็นไข้ และทำให้เกล็ดเลือดเกาะตัวกันเป็นกลุ่ม ดังนั้นสารประกอบ resveratrol มีฤทธิ์ระงับการอักเสบ เพราะ resveratrol สามารถไปยับยั้งการสร้างสารเหล่านี้ได้

แจง และคณะ (Jang, et al. 1997 : 218-220) ศึกษาสารประกอบ resveratrol ในองุ่น ที่มีผลต่อมะเร็ง จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารประกอบนี้ มีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดมะเร็งได้ทั้ง 3 ระยะ คือ ระยะกระตุ้นให้เกิดมะเร็ง (initiation) ระยะส่งเสริมให้เกิดมะเร็ง (promotion) และระยะพัฒนาการของมะเร็ง (progression) นอกจากนี้ยังสามารถไปยับยั้งการ

พัฒนาร่องรอยในการรักษามะเร็งต่อมน้ำนมของหนูทดลอง และยับยั้ง tomorigenesis ที่ผิวหนังของหนูทดลอง

เรจิอัน และคณะ (Ragione, et al. 1998 : 53-58) ศึกษาสารประกอบ resveratrol ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง (HL-60) ศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ในสารประกอบ resveratrol ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 10 30 50 และ 100 μM จากการทดลองพบว่าค่า IC_{50} ของสารประกอบ resveratrol อยู่ที่ความเข้มข้น 10 μM และความเข้มข้น 30 μM สารประกอบ resveratrol สามารถมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นคือ 50 และ 100 μM สารประกอบ resveratrol จะเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง นั่นคือเป็นเหตุให้จำนวนเซลล์มะเร็งลดจำนวนลง

คาร์โบ และคณะ (Carbo, et al. 1999 : 739-743) ศึกษาสารประกอบ resveratrol ที่มีผลต่อเซลล์เนื้องอก Yoshida AH - 130 ascites hepatoma ซึ่งเป็นเนื้องอกที่เจริญเติบโตได้รวดเร็วมาก เมื่อนำไปปลูกในหนูทดลองจะทำให้หนูทดลองเสียชีวิตภายใน 10 วัน เนื่องจากการเจริญเติบโตของเนื้องอกเป็นสาเหตุให้โปรตีนถูกทำลายอย่างรวดเร็ว และยังมีผลในการรบกวนเกี่ยวกับระบบฮอร์โมนของร่างกายอีกด้วย การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยปลูกเซลล์เนื้องอก Yoshida AH - 130 ascites hepatoma ในหนูทดลอง หลังจากนั้นฉีดสารประกอบ resveratrol 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม เข้าที่ช่องท้องของหนูทดลอง พบว่าสารประกอบ resveratrol สามารถทำให้การเจริญเติบโตของเนื้องอกในหนูทดลองลดลงได้ 25%

5. องุ่น

องุ่นมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Vitis vinifera* Linn. และชื่ออื่นๆ Grape Grape vine Wine grape เป็นพืชในวงศ์ Vitaceae มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ดังนี้ เป็นไม้พุ่มเลื้อย ความยาวของลำต้น 2 – 8 m ลักษณะใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับกัน รูปใบคล้ายโล่ ขอบเว้าเป็นพู 3 – 5 พู กว้างและยาว 10 – 16 cm โคนใบเป็นรูปหัวใจ ขอบใบหยักซี่ฟันหยาบ มีมือเกาะ ดอกช่อแยกแขนงออกที่ซอกใบ กลีบดอกสีเขียว ยาวประมาณ 2 mm จากฐานดอกเชื่อมติดกับโคนรังไข่ ผลสดมี รูปราง ขนาด สี และรสหลายแบบ เมล็ดรูปไข่กลับหรือรูป ลูกแพร์ (นันทวัน บุญยะประภัสร และอรนุช โชคชัยเจริญพร 2529 : 305-306)

องุ่นเป็นพืชที่ขึ้นได้ดีทั้งในเขตหนาว เขตกึ่งร้อน และแถบเมืองร้อน โดยในเขตอากาศหนาวนั้น องุ่นจะมีลักษณะเป็นพืชผลัดใบ จะผลัดใบในฤดูใบไม้ร่วง พักตัวในฤดูหนาว แตกตาในฤดูใบไม้ผลิ และเจริญเติบโตไปจนผลแก่ในฤดูร้อน ส่วนองุ่นที่นำมาปลูกใน เขตร้อนจะมีลักษณะใบเขียวตลอดปี ไม่มีการพักตัวตามธรรมชาติ จึงต้องทำการตัดแต่งเพื่อให้ต้นได้พักตัว และแตกตาดอก ตาใบได้ สำหรับการขยายพันธุ์องุ่น เป็นพืชที่ขยายพันธุ์ได้ง่ายและรวดเร็ว

และสามารถทำได้หลายวิธี เช่น เพาะเมล็ด ปักชำ ติดตาต่อกิ่ง ทาบกิ่ง และ การตอนกิ่ง เป็นต้น แต่ที่นิยมกันคือ การขยายพันธุ์แบบปักชำและการตอนกิ่ง

พันธุ์องุ่นโดยทั่วไปแล้ว จะแบ่งออกตามการใช้ประโยชน์ เช่น สำหรับรับประทานผลสด สำหรับทำลูกเกด สำหรับการบรรจุกระป๋อง การทำเหล้าองุ่น และไวน์ เป็นต้น ซึ่งแต่ละประเภท แต่ละพันธุ์ มีคุณสมบัติเฉพาะตัว สำหรับพันธุ์องุ่นที่นำมาปลูกในประเทศไทยมีมากมายหลายพันธุ์ หลายประเภท พันธุ์เก่าก็เสื่อมความนิยมไป และมีการนำพันธุ์ใหม่ๆ เข้ามาทดลองปลูกกันอยู่เสมอ บางพันธุ์ก็มีแนวโน้มที่จะสามารถปลูกเป็นการค้าได้ บางพันธุ์ก็ไม่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในประเทศไทยได้ ให้ผลผลิตไม่เป็นที่พอใจต้องเลิกปลูกไปก็มี ปัจจุบันมีพันธุ์องุ่นที่ปลูกเป็นการค้าในประเทศไทย เช่น

- พันธุ์ไวท์มะละกา เป็นพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้ามากที่สุดในปัจจุบันเป็นที่นิยมของผู้บริโภคโดยทั่วไป ลักษณะผลค่อนข้างยาวเมื่อแก่ผลเป็นสีเขียวอมเหลือง รสหวานกรอบ ซ่อผลยาว รูปทรงสวยงามดี ให้ดอกตก ติดผลมากจนต้องปลิดผลทิ้งบ้าง สามารถให้ผลได้ปีละ 2 ครั้ง
- พันธุ์คาร์ดินัล ลักษณะทั่วไปของพันธุ์นี้คือ ผลค่อนข้างกลม เมื่อแก่สีม่วงอมแดง หรือม่วงดำ รสหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย ซ่อผลค่อนข้างกลม ซ่อไม่ใหญ่ ติดผลกำลังดี ไม่เปื่อยดเสียตกกันมาก ไม่ต้องปลิดผลทิ้งมาก (ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ 2527 : 1-18)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยประกอบไปด้วย 5 ส่วนดังนี้

1. สภาพของเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์สารประกอบ resveratrol
2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน
3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์
4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่น
5. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์ สารเคมีและวัสดุที่ใช้วิจัย

สารเคมีและวัสดุที่ใช้วิจัย

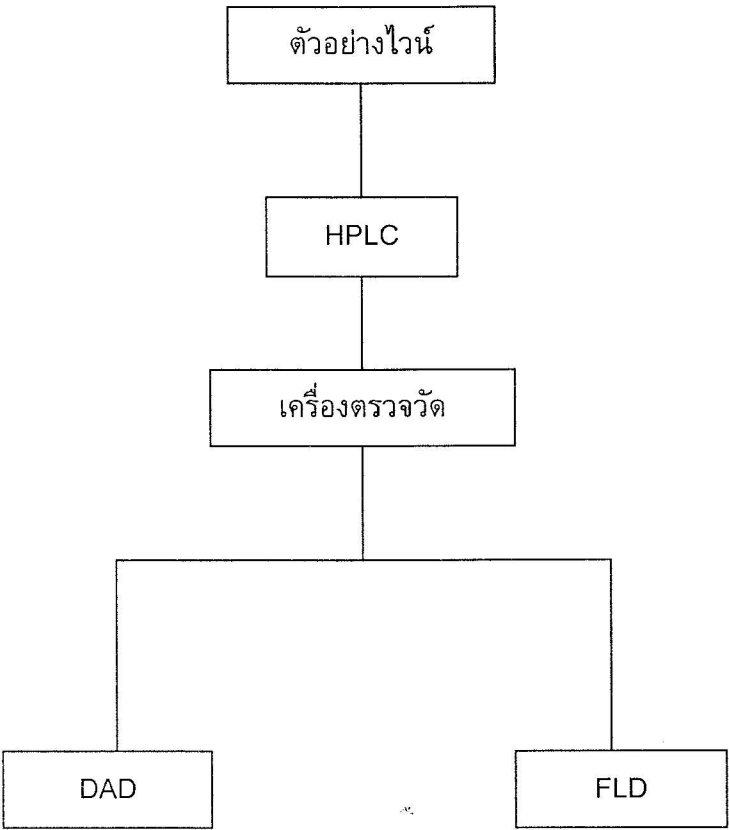
- | | | | |
|---|-----------------|-------|----------------|
| 1. acetonitrile | HPLC | grade | (Carlo Erba) |
| 2. glacial acetic acid | AR | grade | (Merk) |
| 3. methanol | AR | grade | (Carlo Erba) |
| 4. diethyl ether | AR | grade | (APS Finechem) |
| 5. sodium sulphate anhydrous | AR | grade | (Carlo Erba) |
| 6. standard <i>trans</i> -3,5,4'- trihydroxystilbene 99% | | | (Sigma) |
| 7. น้ำกลั่น | HPLC | grade | (Lab-Scan) |
| 8. ไวน์แดง TH1 (1999) | ผลิตในประเทศไทย | | |
| 9. ไวน์แดง TH2 (1999) | ผลิตในประเทศไทย | | |
| 10. ไวน์แดง IT1 (1999) | ผลิตในอิตาลี | | |
| 11. ไวน์แดง IT2 (1999) | ผลิตในอิตาลี | | |
| 12. ไวน์แดง FR1 (1999) | ผลิตในฝรั่งเศส | | |
| 13. องุ่นพันธุ์คาร์ดินัล (นิพนธ์ วิสารทนนท์, สัมภาษณ์. 2544) | | | |
| 14. องุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา (นิพนธ์ วิสารทนนท์, สัมภาษณ์. 2544) | | | |

อุปกรณ์ / เครื่องมือ

1. เครื่องวัด pH (Metrohm 713)
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa 240 A)
3. กระดาษกรองเบอร์ 42 (Whatman)
4. กรวยบุนเนอร์
5. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Hettich D-7200)
6. บีม (B=chi B – 169)
7. ชุดกรองลดความดัน (Satorius)
8. rotary evaporator (B=chi Rotavapor R – 114)
9. เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Hewlett Packard)
 - Detector : UV – VIS photodiode array (Agilent 1100 Series)
 - Detector : Fluorescence (Agilent 1100 Series)
 - Column : อนุภาคที่บรรจุ Hypersil ODS (C₁₈) ขนาดอนุภาค 5 µm คอลัมน์
ขนาด 4.0 x 125 mm (Agilent)
 - Loop ขนาด 100 µL
10. Fluorescence Spectrophotometer (Shimadzu FP – 6200)
11. Cellulose nitrate filter pore size 0.2 µm 47 mm (Whatman)
12. Nylon filter pore size 0.2 µm 13 mm (Alltech)
13. Nylon filter pore size 0.2 µm 47 mm (Alltech)
14. Sep-Pak (C₁₈) (Waters)
15. Syringe ขนาด 500 µL (Hamilton)

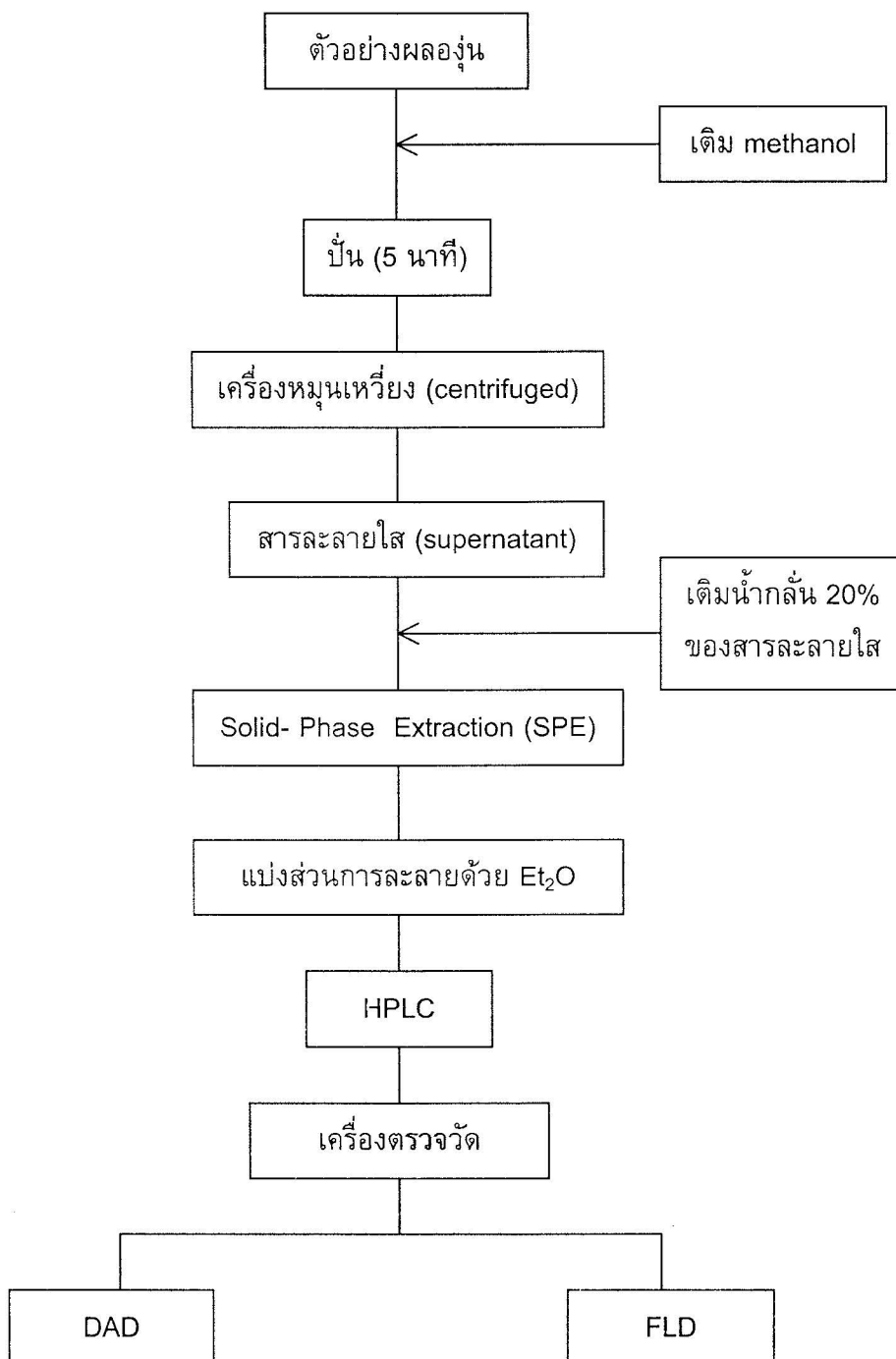
การหาปริมาณ resveratrol แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

1. การหาปริมาณ resveratrol ในไวน์



ภาพประกอบ 5 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการหาปริมาณ resveratrol ในไวน์

2. การหาปริมาณ resveratrol ในผลองุ่น



ภาพประกอบ 6 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการหาปริมาณ resveratrol ในผลองุ่น

1. สภาวะของเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์สารประกอบ resveratrol

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของวิธีที่สามารถวิเคราะห์สารประกอบ resveratrol ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด ระหว่างเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงดำเนินการวิจัยด้วยสภาวะของเครื่อง HPLC เพียงสภาวะเดียว เพื่อให้เหมาะสมกับเครื่องตรวจวัดทั้ง 2 ชนิด ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ resveratrol ในสารตัวอย่าง โดยใช้เครื่องตรวจวัดที่ละชนิด

1.1 สภาวะของเครื่อง HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์

- วิเคราะห์แบบ isocratic โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ อัตราส่วนระหว่าง acetonitrile 25% : glacial acetic acid ในน้ำ (1 : 40) 75%
- อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 mL/min
- ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 200 - 400 nm
- *trans-resveratrol* วัดหาพื้นที่พีคที่ความยาวคลื่น 306 nm
- *cis-resveratrol* วัดหาพื้นที่พีคที่ความยาวคลื่น 285 nm

1.2 สภาวะของเครื่อง HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

- วิเคราะห์แบบ isocratic โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ คือ อัตราส่วนระหว่าง acetonitrile 25% : glacial acetic acid ในน้ำ (1 : 40) 75%
- อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 mL/min
- maximum excitation wavelength : 340 nm
- maximum emission wavelength : 385 nm

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ที่ระดับความเข้มข้น 120 µg/mL

ชั่งสารมาตรฐาน *trans-resveratrol* 0.0120 g ละลายใน methanol 40% แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol 40% ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ถ่ายสารละลายเก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิ -4°C เพื่อใช้เป็น stock standard solution

2.2 การเตรียมสารมาตรฐาน *cis-resveratrol* ที่ระดับความเข้มข้น 7.864 µg/mL

2.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ความเข้มข้น 120 µg/mL ปริมาตร 10 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol 40% จนมีปริมาตรครบ 100 mL ตั้งทิ้งไว้ภายในห้องที่มีแสงสว่างนาน 2 ชั่วโมง นำไปกรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุน 0.20 µm นำสารละลายที่กรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 µL วัดพื้นที่พีคของ *trans-resveratrol* ที่เหลือหลังจากเปลี่ยนไปเป็น *cis-resveratrol* โดยอ่านความเข้มข้น

จากกราฟมาตรฐาน *trans-resveratrol* ที่ได้จากการเตรียมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 5 ระดับความเข้มข้นดังนี้ 0.075 1.50 3.00 6.00 และ 12.00 µg/mL

2.2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 12.00 µg/mL โดยเจือจาง จากสารละลายข้อ 2.1 ดังนี้ ปิเปตสารละลายข้อ 2.1 ปริมาตร 1 mL ลงใน ขวดวัด ปริมาตรขนาด 10 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol 40% จนมีปริมาตรครบ 10 mL จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 12.00 µg/mL

2.2.1.2 เจือจางสารละลายข้อ 2.2.1.1 แบบ two fold serial dilution จะได้สารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ที่ระดับความเข้มข้น 6.00 3.00 1.50 และ 0.075 µg/mL ตามลำดับ

2.2.2 นำสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* และ *cis-resveratrol* ที่เตรียมในข้อ 2.2.1 แต่ละความเข้มข้นไปกรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.20 µm นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 µL โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ทำการตรวจวัด ที่ความยาวคลื่น 200 – 400 nm วัดหาพื้นที่พีคที่ความยาวคลื่น 306 nm

2.2.3 นำพื้นที่พีค และความเข้มข้นไปสร้างกราฟมาตรฐาน ทำซ้ำเช่นนี้ 5 ครั้ง เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปหาค่าทางสถิติ

2.2.4 การคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol*

$$C_c = I - C_{tr}$$

I แทน ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* (µg/mL)

C_c แทน ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* (µg/mL)

C_{tr} แทน ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ที่เหลือหลังจากสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* เริ่มต้น ได้รับแสงสว่างนาน 2 ชั่วโมง (µg/mL)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ *resveratrol* ในไวน์

3.1 การเตรียมสารตัวอย่างไวน์

โดยไวน์มากรอง 2 ครั้ง ด้วย nylon filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.20 µm เส้นผ่าศูนย์กลาง 13 mm ในที่มีดเก็บใส่ขวดสีชา นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

3.2 วิธีวิเคราะห์สารประกอบ *trans-resveratrol* ในไวน์

3.2.1 การหาช่วงที่เป็นเส้นตรง

3.2.1.1 นำสารละลายมาตรฐาน ตามข้อ 2.2.1.1 – 2.2.1.2 แต่ละความเข้มข้นไปกรองด้วย nylon filter ที่มีพอร์ขนาด 0.20 μm นำสารละลายที่กรองแล้วไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 μL วัดหาพื้นที่พีค

3.2.1.2 นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาช่วงที่เป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น $\mu\text{g/mL}$ กับพื้นที่พีคโดยใช้โปรแกรม HP chemstation ในหมวด Calibration

3.2.2 การหาปริมาณ *trans-resveratrol* ในไวน์

3.2.2.1 นำตัวอย่างไวน์ที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 μL โดยทำการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดทีละชนิด

3.2.2.2 นำตัวอย่างไวน์แต่ละเครื่องมาทำการคำนวณตามข้อ 3.2.2.1 กระทำซ้ำ 9 ครั้ง แล้วคำนวณข้อมูลหาค่าทางสถิติ

3.2.3 การหา percent recovery

3.2.3.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 12.00 $\mu\text{g/mL}$ หรือ methanol 40% อย่างละ 1.00 mL ใส่ในขวดสีชา แล้วเติม ตัวอย่างไวน์ใส่ในแต่ละขวดปริมาตร 3 mL เขย่าให้เข้ากัน นำไปกรองด้วย nylon filter ที่มีพอร์ขนาด 0.20 μm 2 ครั้ง

3.2.3.2 นำสารละลายที่กรองแล้วไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 μL ทำการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัด 2 ชนิด โดยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 200 - 400 nm วัดหาพื้นที่พีคที่ความยาวคลื่น 306 nm ส่วนเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่ค่า ex : 340 nm และ em : 385 nm

3.2.3.3 นำพื้นที่พีคที่ได้ไปอ่านความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานในข้อ 3.2.1 ความเข้มข้นที่ได้นำไปคำนวณหา percent recovery

$$C = A - B$$

- เมื่อ A แทน ปริมาณ *trans-resveratrol* ในสารละลายตัวอย่างไวน์ที่เติม
สารมาตรฐาน *trans-resveratrol* ($\mu\text{g/mL}$)
- B แทน ปริมาณ *trans-resveratrol* ในสารละลายตัวอย่างไวน์ที่เติม
methanol 40% ($\mu\text{g/mL}$)
- C แทน ปริมาณสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* หลังจาก
เติมลงในตัวอย่างไวน์ ($\mu\text{g/mL}$)

$$\text{percent recovery} = \frac{C \times 100}{D}$$

เมื่อ C แทน ปริมาณสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* หลังจากเติมลงในตัวอย่างไวน์ (µg/mL)

D แทน ปริมาณสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ก่อนเติมลงในตัวอย่างไวน์ (µg/mL)

3.2.3.4 กระทำซ้ำทุกตัวอย่าง 5 ครั้ง นำข้อมูลไปคำนวณค่าทางสถิติ

3.2.4 การหาความสามารถของวิธีที่สามารถวิเคราะห์ ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด

3.2.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol*

2.025 µg/mL โดยดำเนินการตามข้อ 2.2 แต่เพิ่มเวลาในการเปลี่ยน isomer จาก *trans-resveratrol* เป็น *cis-resveratrol* จากเดิมตั้งทิ้งไว้ภายในห้องที่มีแสงสว่างนาน 2 ชั่วโมง ให้เพิ่มเป็น 8 ชั่วโมง แล้วนำไปคำนวณเช่นเดียวกับข้อ 2.2.4 ผลปรากฏว่าปริมาณสารมาตรฐาน *trans-resveratrol* เหลืออยู่ 2.025 µg/mL และเปลี่ยนไปเป็น *cis-resveratrol* 9.975 µg/mL ใส่ขวดสีชานำไปเก็บที่อุณหภูมิ -4°C เพื่อใช้เป็น stock standard solution ในการหาความสามารถของวิธีสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

3.2.4.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ที่มีความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 6 ระดับความเข้มข้นดังนี้ 0.063 0.127 0.253 0.506 1.013 และ 2.025 µg/mL โดยการเจือจางสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* จากข้อ 3.2.4.1 แบบ two fold serial dilution จะได้สารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ที่ระดับความเข้มข้น 1.013 0.506 0.253 0.127 และ 0.063 µg/mL ตามลำดับ

3.2.4.3 นำสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* เข้มข้น 0.063 0.253 0.506 1.013 และ 2.025 µg/mL กรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.20 µm นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัด 2 ชนิด ซึ่งวิเคราะห์ทีละชนิด นำพื้นที่พีคที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

3.2.4.4 ปิเปตสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.127 0.253 0.506 1.013 และ 2.025 µg/mL จำนวนความเข้มข้นละ 1.00 mL ใส่ในขวดสีชา แล้วเติมตัวอย่างไวน์ลงในแต่ละขวดปริมาตร 3 mL เขย่าให้เข้ากัน นำไปกรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.20 µm 2 ครั้งเก็บใส่ขวดสีชา

3.2.4.5 นำสารละลายที่กรองแล้วไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 μL โดยใช้เครื่องตรวจวัด 2 ชนิด ซึ่งใช้วิเคราะห์ที่ละชนิด นำพื้นที่พีคที่ได้ไปอ่านความเข้มข้นของ *trans-resveratrol* จากกราฟมาตรฐาน

3.2.4.6 ทดตัวอย่างกระทำซ้ำ 5 ครั้ง คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นและ peak height

3.2.4.7 นำค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น และ peak height สร้างเป็นกราฟเส้นตรงโดย แกนตั้ง คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height และ แกนนอน คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น โดยใช้โปรแกรม Excel 97

3.2.4.8 ลากกราฟเส้นตรงที่ได้ให้ตัดแกนตั้ง จะได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height ที่ความเข้มข้น *trans-resveratrol* เป็นศูนย์และคูณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height ที่ได้ด้วย 3 เพื่อนำค่าที่ได้ไปหาความสามารถของวิธีที่สามารถวิเคราะห์ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำสุด

3.2.4.9 สร้างกราฟเส้นตรงระหว่าง peak height และความเข้มข้น โดยให้ แกนตั้ง คือ peak height แกนนอน คือ ความเข้มข้น โดยใช้โปรแกรม Excel 97

3.2.4.10 เมื่อสร้างกราฟเส้นตรงระหว่าง peak height และความเข้มข้นเรียบร้อยแล้วอ่านความเข้มข้นจากกราฟเส้นตรงนี้ด้วยค่า 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height ในข้อ 3.2.4.8 จะได้ค่าความสามารถของวิธีที่สามารถวิเคราะห์ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดของ *trans-resveratrol* ในไวน์

3.3 วิธีวิเคราะห์สารประกอบ *cis-resveratrol* ในไวน์

3.3.1 การหาช่วงที่เป็นเส้นตรง

3.3.1.1 เตรียมสารมาตรฐาน *cis-resveratrol* ที่ความเข้มข้นต่างๆ 6 ระดับ ความเข้มข้นดังนี้ 0.025 0.246 0.492 0.983 1.966 และ 3.932 $\mu\text{g/mL}$

3.3.1.2 เจือจางสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* จากข้อ 2.2 แบบ two fold serial dilution จะได้สารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* ที่ระดับความเข้มข้น 3.932 1.966 0.983 0.492 0.246 0.025 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

3.3.1.3 นำสารละลายมาตรฐานเข้มข้นในข้อ 0.025 0.492 0.983 1.966 และ 3.932 $\mu\text{g/mL}$ ไปกรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุน 0.20 μm นำสารละลายมาตรฐานที่กรองแล้วไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 μL วัดหาพื้นที่พีค

3.3.1.4 นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาช่วงที่เป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) กับพื้นที่พีคโดยใช้โปรแกรม HP Chemstation ในหมวด Calibration

3.3.2 การหาปริมาณ *cis-resveratrol* ในไวน์

3.3.2.1 นำตัวอย่างไวน์ที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ

100 μ L ทำการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัด 2 ชนิด ซึ่งตรวจวัดทีละชนิดโดยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 200-400 nm วัดหาพื้นที่ฟีดที่ความยาวคลื่น 285 nm ส่วนเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ค่า ex : 340 nm และ em : 385 nm

3.3.2.2 กระทำซ้ำทุกอย่าง 9 ครั้ง นำข้อมูลคำนวณค่าทางสถิติ

3.3.3 การหา percent recovery

3.3.3.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* เข้มข้น 3.932 μ g/mL และ methanol 40% อย่างละ 1.00 mL ใส่ในขวดสีชา แล้วเติมตัวอย่างไวน์ใส่ในแต่ละขวด ปริมาตร 3 mL เขย่าให้เข้ากัน นำไปกรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.20 μ m 2 ครั้ง

3.3.3.2 นำสารละลายที่กรองแล้วไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 μ L แล้วดำเนินการตามข้อ 3.2.3.3 - 3.2.3.4 แต่เปลี่ยนจาก *trans-resveratrol* เป็น *cis-resveratrol* เพื่อคำนวณหา percent recovery

3.3.4 การหาความสามารถของวิธีที่สามารถวิเคราะห์ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำสุด

3.3.4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* ที่ความเข้มข้นต่างๆ 6 ระดับความเข้มข้นดังนี้ 0.312 0.623 1.247 2.497 4.987 และ 9.975 μ g/mL

3.3.4.2 เจือจางสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* จากข้อ 3.2.4.1 แบบ two fold serial dilution จะได้สารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* ที่ระดับความเข้มข้น 4.987 2.497 1.247 0.623 และ 0.312 μ g/mL

3.3.4.3 นำสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* เข้มข้น 0.312 0.247 2.497 4.987 และ 9.975 μ g/mL ไปกรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.20 μ m นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยเครื่องตรวจวัด 2 ชนิด ซึ่งใช้วิเคราะห์ทีละชนิด นำพื้นที่ฟีดที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

3.3.4.4 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* เข้มข้น 0.623 1.247 2.497 4.987 และ 9.975 μ g/mL ความเข้มข้นละ 1.00 mL ใส่ในขวดสีชา แล้วเติมตัวอย่างไวน์ลงในแต่ละขวดปริมาตร 3 mL เขย่าให้เข้ากันนำไปกรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.20 μ m 2 ครั้ง

3.3.4.5 นำสารละลายที่กรองแล้วไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 μ L โดยเครื่องตรวจวัด 2 ชนิด ซึ่งใช้วิเคราะห์ทีละชนิด นำพื้นที่ฟีดที่ได้ไปอ่านความเข้มข้นของ *cis-resveratrol* จากกราฟมาตรฐาน

3.3.4.6 ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.6 – 3.2.4.10 แต่เปลี่ยนจาก *trans-resveratrol* เป็น *cis-resveratrol*

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ *resveratrol* ในผลองุ่น

4.1 การเตรียมสารตัวอย่างผลองุ่น

4.1.1 นำผลองุ่นแต่ละพันธุ์ (คาร์ดินัล ไวท์มะละกา) ประมาณ 10 กรัม ดังตาราง 17 และ 18 ของแต่ละตัวอย่างที่ซึ่งเรียบร้อยแล้วเติมสารละลาย methanol 40 mL นำไปปั่นให้ละเอียดนาน 5 นาที

4.1.2 สารตัวอย่างที่ได้นำไปแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายใสออกมา แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 20% ของสารละลายใสนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Solid Phase Extraction ด้วยคอลัมน์ C_{18} (Sep-Pak) ปริมาตร 3 mL

4.1.3 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Solid Phase Extraction ใช้คอลัมน์ C_{18} ปริมาตร 3 mL ปรับคอลัมน์ให้เข้าสู่สภาวะสมดุลโดย methanol : H_2O (4 : 1) ปริมาตร 5 mL ตามด้วยสารตัวอย่างผลองุ่นข้อ 4.1.2 อัตราการไหล 2 mL/min ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายผสมระหว่าง methanol : H_2O อัตราส่วน 4 : 1 ปริมาตร 5 mL แล้วปรับปริมาตรของสารละลายที่ได้ด้วย methanol ให้เท่ากับปริมาตรเริ่มต้น สารละลายที่ได้นำไประเหยแห้งโดยใช้ rotary evaporator อุณหภูมิ $40^{\circ}C$ จะเหลือสารละลายที่เป็นของเหลว นำไปสกัดด้วย diethyl ether 3 ครั้ง รวมส่วนที่สกัดได้ของ diethyl ether เติมสารดูดความชื้น sodium sulphate anhydrous นำไปกรองด้วยกรวยบุชเนอร์ โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วระเหยแห้งที่อุณหภูมิ $40^{\circ}C$ จะได้ของแข็ง จากนั้นนำของแข็งที่ได้ไปละลายด้วย methanol 1.00 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol 40% จนครบ 20 mL ในขวดวัดปริมาตร จากนั้นกรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุนขนาด $0.20\ \mu m$ 2 ครั้ง เก็บใส่ขวดสีชา

4.1.4 ทุกตัวอย่างของผลองุ่นแต่ละพันธุ์กระทำซ้ำ 6 ครั้ง

4.2 วิธีวิเคราะห์สารประกอบ *trans-resveratrol* ในผลองุ่น หลังจากผ่านการเตรียมตัวอย่างผลองุ่นเรียบร้อยแล้ว

4.2.1 การหาช่วงที่เป็นเส้นตรง ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1

4.2.2 การหาปริมาณ *trans-resveratrol* ในผลองุ่น

4.2.2.1 นำตัวอย่างผลองุ่นที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1.3 ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 μL โดยทำการตรวจวัดหาปริมาณ *trans-resveratrol* ด้วยเครื่องตรวจวัดที่ละชนิด

4.2.2.2 คำนวณหาค่าทางสถิติ

4.2.3 การหา percent recovery

4.2.3.1 นำผลองุ่นแต่ละพันธุ์ (คาร์ดินัล ไวท์มะละกา) ของแต่ละตัวอย่างที่ซึ่งนำหนักเรียบร้อยแล้วเติมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* 12.00 $\mu g/mL$ ปริมาตร

7 mL และ methanol 40 mL นำไปปั่นนาน 5 นาที แล้วให้ดำเนินการดังข้อ 4.1.1 – 4.1.3 แต่เมื่อถึงขั้นตอนการระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 40°C จะได้ของแข็ง จากนั้นนำของแข็งที่ได้ไปละลายด้วย methanol 1.00 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol 40% จนมีปริมาตร 27 mL จากนั้นกรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.20 µg/mL 2 ครั้ง เก็บใส่ขวดสีชา

4.2.3.2 นำผลล่องุ่นแต่ละพันธุ์แต่ละตัวอย่างที่ซึ่งเรียบร้อยแล้ว นำมาเติมสารละลาย methanol 40% ปริมาตร 7 mL และ methanol 40 mL นำไปปั่น 5 นาที แล้วดำเนินการดังข้อ 4.1.1 – 4.1.3 แต่เมื่อถึงขั้นตอนการระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 40°C จะได้ของแข็ง จากนั้นนำของแข็งที่ได้ไปละลายด้วย methanol 1.00 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol 40% จนมีปริมาตร 27 mL จากนั้นกรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.20 µm 2 ครั้ง เก็บใส่ขวดสีชา

4.2.3.3 นำสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 4.2.3.1 – 4.2.3.2 ของแต่ละพันธุ์ของแต่ละตัวอย่างที่กรองแล้วไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 µL ทำการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัด 2 ชนิด โดยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 200 – 400 nm วัดหาพื้นที่พีคที่ความยาวคลื่น 306 nm ส่วนเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่ค่า ex : 340 nm และ em : 385 nm

4.2.3.4 นำพื้นที่พีคที่ได้ไปอ่านความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานความเข้มข้นที่ได้นำไปคำนวณหา percent recovery

$$C = A - B$$

เมื่อ	A	แทน	ปริมาณ <i>trans-resveratrol</i> ในสารละลายตัวอย่างผลล่องุ่นที่เติมสารละลายมาตรฐาน <i>trans-resveratrol</i> (µg/mL)
	B	แทน	ปริมาณ <i>trans-resveratrol</i> ในสารละลายตัวอย่างผลล่องุ่นที่เติม methanol 40% และผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่าง (µg/mL)
	C	แทน	ปริมาณ <i>trans-resveratrol</i> หลังจากเติมลงในตัวอย่างผลล่องุ่นและผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่าง (µg/mL)

$$\text{percent recovery} = \frac{C \times 100}{D}$$

เมื่อ C แทน ปริมาณ *trans-resveratrol* หลังจากเติมลงในตัวอย่างผลองุ่น
และผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่าง (µg/mL)

D แทน ปริมาณ *trans-resveratrol* ก่อนเติมลงในตัวอย่างผลองุ่น
(µg/mL)

4.2.3.5 คำนวณหาค่าทางสถิติ

4.2.4 การหาความสามารถของวิธีที่สามารถวิเคราะห์ได้ถึงความเข้มข้นต่ำสุด

4.2.4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.2

4.2.4.2 สร้างกราฟมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.3

4.2.4.3 ปิเปตสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.127 0.253 0.506 1.013 และ 2.025 µg/mL ความเข้มข้นละ 1.00 mL ใส่ในขวดสีชา แล้วเติมตัวอย่างผลองุ่นที่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างเรียบร้อยแล้วลงในแต่ละขวดปริมาตร 3 mL เขย่าให้เข้ากัน นำไปกรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.20 µm 2 ครั้ง

4.2.4.4 นำสารละลายที่กรองแล้วไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 µL โดยเครื่องตรวจวัด 2 ชนิด ซึ่งใช้วิเคราะห์ที่ละชนิด นำพื้นที่พีคที่ได้ไปอ่านความเข้มข้นของ *trans-resveratrol* จากกราฟมาตรฐาน

4.2.4.5 ทุกตัวอย่างของผลองุ่นแต่ละพันธุ์ (คาร์ดินัล ไวท์มะละกา) ของแต่ละตัวอย่างกระทำซ้ำ 5 ครั้ง เพื่อหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นและ peak height

4.2.4.6 สร้างกราฟเส้นตรงเพื่อหาค่าความสามารถของวิธีที่สามารถวิเคราะห์ได้ถึงความเข้มข้นต่ำสุด โดยดำเนินการตามข้อ 3.2.4.7 – 3.2.4.10

4.3 วิธีวิเคราะห์สารประกอบ *cis-resveratrol* ในผลองุ่น หลังจากผ่านการเตรียมตัวอย่างผลองุ่นเรียบร้อยแล้ว

4.3.1 การหาช่วงที่เป็นเส้นตรง ดำเนินการเช่นเดียวกับ 3.3.1

4.3.2 การหาปริมาณ *cis-resveratrol* ในผลองุ่น

4.3.2.1 นำตัวอย่างผลองุ่นที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้วในข้อ 4.1.3 ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 µg/mL โดยทำการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดที่ละชนิด

4.3.2.2 คำนวณหาค่าทางสถิติ

4.3.3 การหา percent recovery

4.3.3.1 นำผลล่องุ่นแต่ละพันธุ์ (คาร์ดินัล ไวท์มะละกา) ของแต่ละตัวอย่าง ที่ซึ่งน้ำหนักเรียบร้อยแล้ว เติมสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* 3.932 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 7 mL และ methanol 40 mL นำไปปั่นนาน 5 นาที แล้วให้ดำเนินการตามข้อ 4.1.1 – 4.1.3 แต่เมื่อถึงขั้นตอนการระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 40°C จะได้ของแข็งจากนั้นนำของแข็งที่ได้ไปละลายด้วย methanol 1.00 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol 40% จนมีปริมาตร 27 mL จากนั้นกรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุนขนาด $0.20\ \mu\text{m}$ 2 ครั้ง เก็บใส่ขวดสีชา

4.3.3.2 นำผลล่องุ่นแต่ละพันธุ์แต่ละตัวอย่างที่ซึ่งน้ำหนักเรียบร้อยแล้ว นำมา เติมสารละลาย methanol 40% ปริมาตร 7 mL และ methanol 40 mL นำไปปั่นนาน 5 นาที แล้วดำเนินการดังข้อ 4.1.1 – 4.1.3 แต่เมื่อถึงขั้นตอนการระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 40°C จะได้ของแข็ง จากนั้นนำของแข็งที่ได้ไปละลายด้วย methanol 1.00 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol 40% จนมีปริมาตร 27 mL จากนั้นกรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุนขนาด $0.20\ \mu\text{m}$ 2 ครั้ง เก็บใส่ขวดสีชา

4.3.3.3 นำสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 4.3.3.1 – 4.3.3.2 ของแต่ละพันธุ์ของ แต่ละตัวอย่างที่กรองแล้วไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 μL ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง ตรวจวัด 2 ชนิด โดยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 200 – 400 nm วัดหาพื้นที่พีคที่ความยาวคลื่น 285 nm ส่วนเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่ค่า $\text{ex} : 340\ \text{nm}$ และ $\text{em } 385\ \text{nm}$

4.3.3.4 คำนวณหา percent recovery ของวิธีโดยดำเนินการตามข้อ 4.2.3.4 – 4.2.3.5 โดยเปลี่ยน *trans-resveratrol* เป็น *cis-resveratrol*

4.3.4 การหาความสามารถของวิธีที่สามารถวิเคราะห์ได้ถึงความเข้มข้นต่ำสุด

4.3.4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* ดำเนินการเช่นเดียวกับ ข้อ 3.3.4.1 – 3.3.4.2

4.3.4.2 สร้างกราฟมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.3

4.3.4.3 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* ที่ระดับความเข้มข้น 0.623 1.247 2.497 4.987 และ 9.975 $\mu\text{g/mL}$ ความเข้มข้นละ 1.00 mL ใส่ในขวดสีชา แล้วเติมตัวอย่างผลล่องุ่นในแต่ละขวดปริมาตร 3 mL เขย่าให้เข้ากัน นำไปกรองด้วย nylon filter ที่มีรูพรุนขนาด $0.20\ \mu\text{m}$ 2 ครั้ง

4.3.4.4 นำสารละลายที่กรองแล้วไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 μL โดยเครื่องตรวจวัด 2 ชนิด ซึ่งใช้วิเคราะห์ทีละชนิด นำพื้นที่พีคที่ได้ไปอ่านความเข้มข้นของ *cis-resveratrol* จากกราฟมาตรฐาน

4.3.4.5 หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น และ peak height

4.3.4.6 สร้างกราฟเส้นตรงเพื่อหาค่าความสามารถของวิธีที่สามารถวิเคราะห์ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำสุด โดยดำเนินการตามข้อ 3.2.4.7 – 3.2.4.10 แต่เปลี่ยนจาก *trans-resveratrol* เป็น *cis-resveratrol* เมื่อทุกตัวอย่างกระทำ 5 ครั้ง

5. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

5.1 ค่าเฉลี่ย (Mean, $\bar{X}$) คำนวณได้จากสูตร

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N}$$

- เมื่อ $\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง
- X_i คือ ค่าที่ได้จากการทดลองในแต่ละครั้ง
- N คือ จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง

5.2 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) คำนวณได้จากสูตร

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

- | | | | |
|-------|-----------|-----|----------------------------------|
| เมื่อ | SD | คือ | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน |
| | X_i | คือ | ค่าที่ได้จากการทดลองในแต่ละครั้ง |
| | $\bar{X}$ | คือ | ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง |
| | N | คือ | จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง |

5.3 ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient of variation, CV)

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

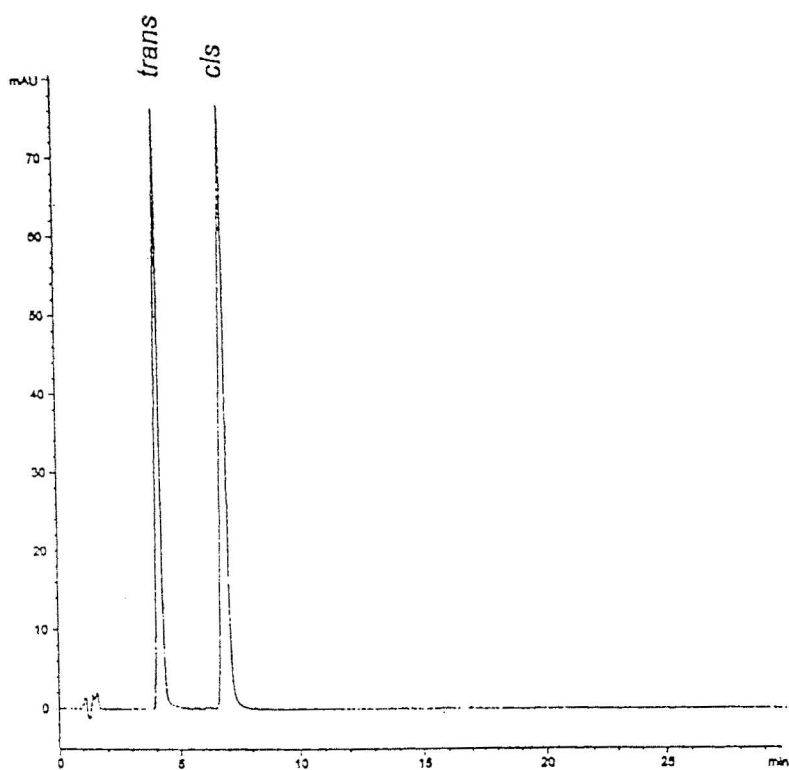
การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยเสนอผลการวิจัยตามลำดับ ดังนี้

1. สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์ สารประกอบ resveratrol
2. ค่าพารามิเตอร์ และปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ 5 เครื่องหมายการค้า และในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล และพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์

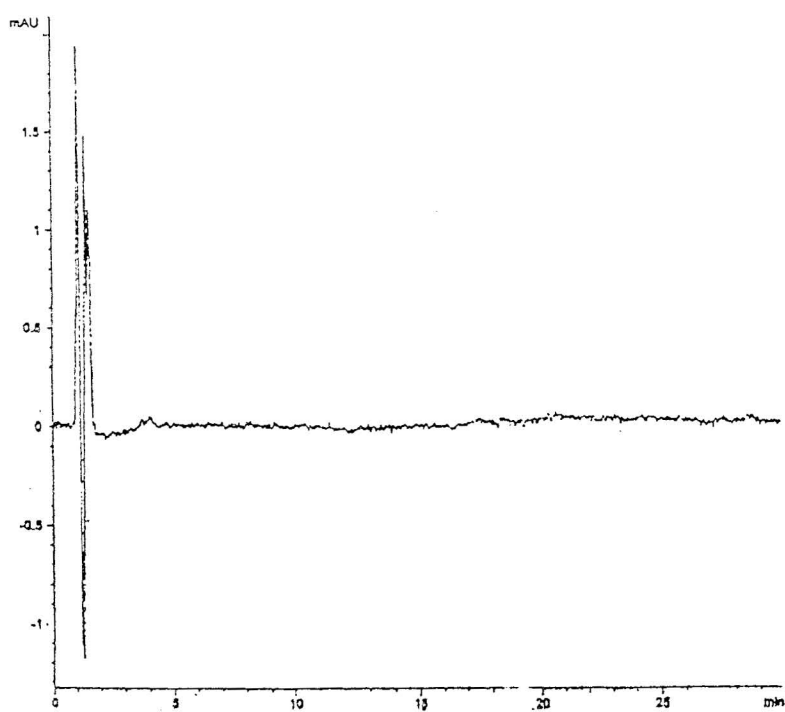
1. สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์สารประกอบ resveratrol

การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์สารประกอบ resveratrol นี้ ผู้วิจัยดำเนินการวิจัยหาสภาวะที่เหมาะสมเพียงสภาวะเดียวกับเครื่องตรวจวัด โฟโตไดโอดแอเรย์ และ ฟลูออเรสเซนซ์ กับสารละลายมาตรฐาน *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene 99% (sigma) ซึ่งคือ *trans*-resveratrol ส่วน *cis*-3,5,4'-trihydroxystilbene (*cis*-resveratrol) ได้จากการเปลี่ยน isomer ของ *trans*-resveratrol โดยนำสารละลายมาตรฐาน *trans*-resveratrol ใน methanol 40% ตั้งทิ้งไว้ภายในห้องที่มีแสงสว่าง จากนั้นดำเนินการหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC พบว่าเมื่อใช้คอลัมน์ Hypersil ODS (C₁₈) (Agilent) ขนาด 4.0 x 125 mm อนุภาคที่บรรจุภายในมีขนาด 0.5 μ m มีสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ Acetonitrile 25% : glacial acetic acid ในน้ำ (1 :40) 75% ใช้โปรแกรมแบบ isocratic อัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 1 mL/min เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่ 306 nm พบว่า *trans*-resveratrol ใน methanol 40% มีค่ารีเทนชันไทม์ประมาณ 4.50 นาที ดังภาพประกอบ 7 พร้อมทั้งแสดงโครมาโตแกรม methanol 40% ดังภาพประกอบ 8 และค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุด ที่ 285 nm พบว่า *cis*-resveratrol ใน methanol 40% มีค่ารีเทนชันไทม์ประมาณ 7 นาที ดังภาพประกอบ 9 พร้อมทั้งแสดงโครมาโตแกรมของ methanol 40% ดังภาพประกอบ 10

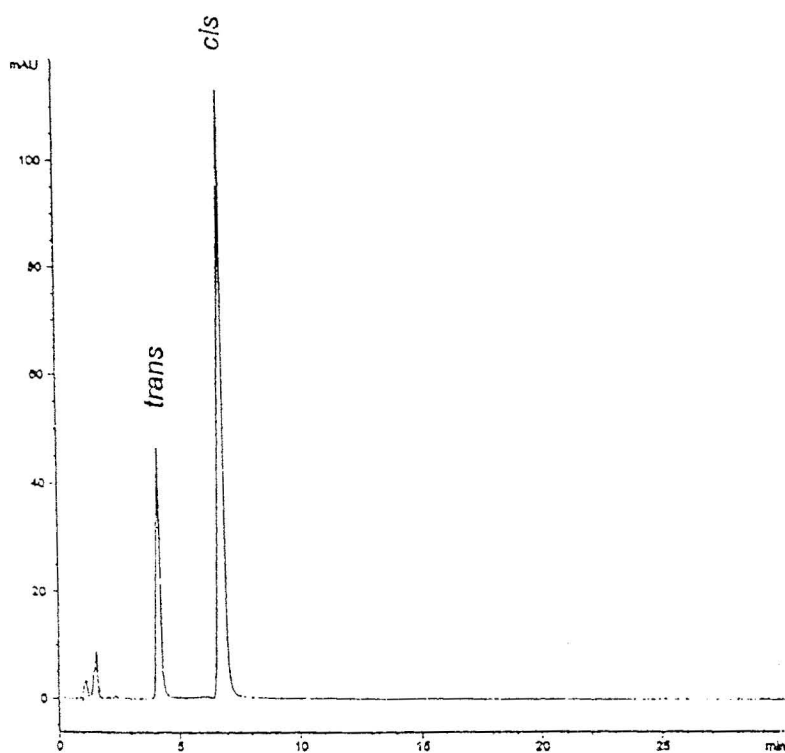
เมื่อใช้คอลัมน์ สารละลายเฟสเคลื่อนที่ และอัตราการไหลที่สภาวะเดียวกัน แต่เปลี่ยนเครื่องตรวจวัดเป็นชนิดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าที่ค่า ex : 340 nm และ em : 385 nm *trans*-resveratrol ใน methanol 40% มีค่ารีเทนชันไทม์ประมาณ 4.50 นาที และ *cis*-resveratrol ใน methanol 40% ประมาณ 7 นาที ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 11 พร้อมทั้งแสดงโครมาโตแกรม methanol 40% ดังภาพประกอบ 12



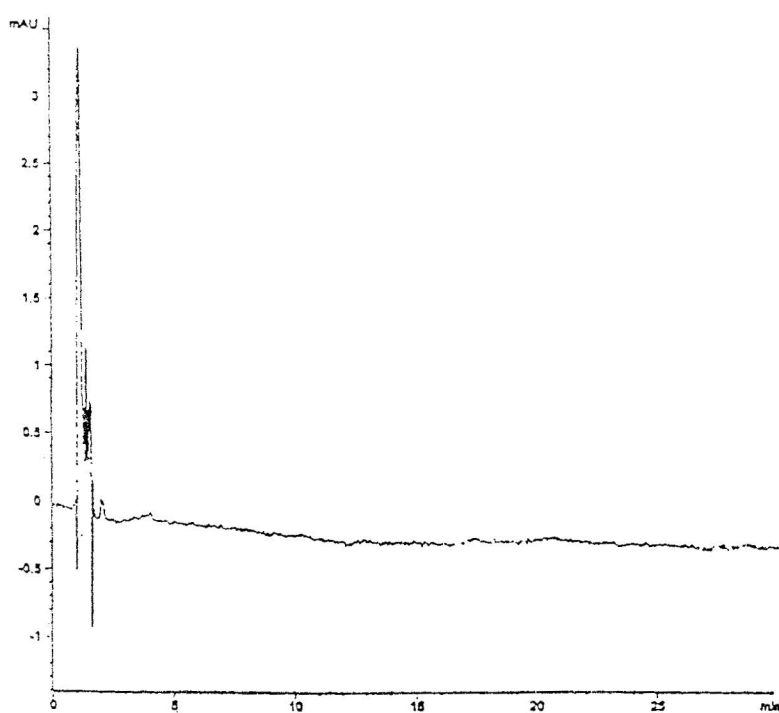
ภาพประกอบ 7 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน *cis*-resveratrol และ *trans*-resveratrol ใน methanol 40% เข้มข้น 4.987 และ 1.013 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 306 nm



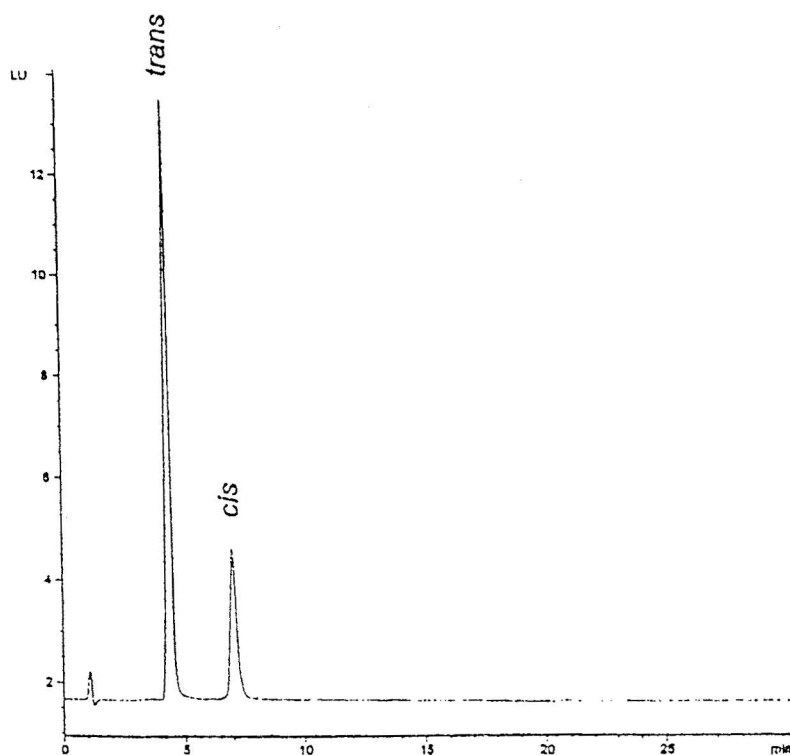
ภาพประกอบ 8 โครมาโตแกรมของสารละลาย methanol 40% โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 306 nm



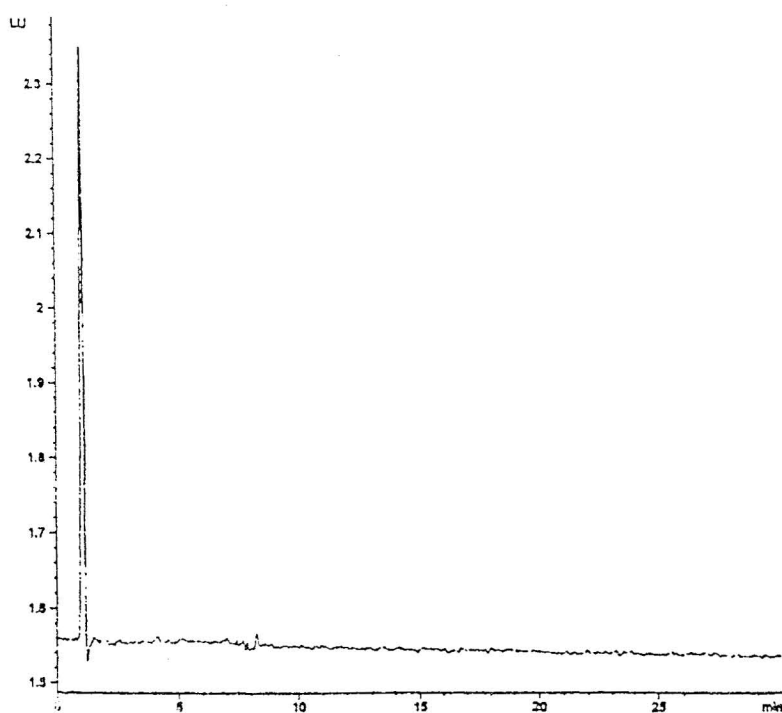
ภาพประกอบ 9 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน *cis*-resveratrol และ *trans*-resveratrol ใน methanol 40% เข้มข้น 4.987 และ 1.013 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 285 nm



ภาพประกอบ 10 โครมาโตแกรมของสารละลาย methanol 40% โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 285 nm



ภาพประกอบ 11 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน *cis*-resveratrol และ *trans*-resveratrol ใน methanol 40% เข้มข้น 4.987 และ 1.013 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (ex : 340 nm และ em : 385 nm)



ภาพประกอบ 12 โครมาโตแกรมของสารละลาย methanol 40% โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (ex : 340 nm และ em : 385 nm)

2. ค่าพารามิเตอร์ และปริมาณสารประกอบ *resveratrol* ในไวน์ 5 เครื่องหมายการค้า และในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล และพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์

เนื่องจากการทดลองใช้เทคนิค HPLC ประกอบด้วยเครื่องตรวจวัด 2 ชนิด คือ โฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ สารประกอบ *resveratrol* ในไวน์และผลองุ่น โดยใช้เครื่องตรวจวัดทีละชนิด ดังนั้นผลการทดลอง จึงรายงานทั้งค่าที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์

2.1 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ *resveratrol* ในไวน์

2.1.1 Linear regression line ของวิธีหาปริมาณ *cis*- และ *trans-resveratrol* โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์

ตาราง 2 แสดง linear regression line ของวิธีหาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ โดย *cis*-resveratrol ที่ระดับความเข้มข้น 0.03 0.49 0.98 1.97 และ 3.93 µg/mL และ *trans*-resveratrol ที่ระดับความเข้มข้น 0.08 1.50 3.00 6.00 และ 12.00 µg/mL จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อ n = 3

ครั้งที่	DAD		FLD	
	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>
	(r)	(r)	(r)	(r)
1	0.99994	1.00000	0.99998	0.99997
2	0.99999	0.99997	0.99747	0.99990
3	0.99998	0.99996	0.99989	0.99989
4	0.99997	0.99998	0.99979	0.99994
5	0.99973	0.99985	0.99990	0.99992
6	0.99955	0.99915	0.99991	0.99955
7	0.99991	0.99993	0.99938	0.99985
8	0.99948	0.99994	0.99994	0.99996
9	0.99974	0.99898	0.99990	0.99927
10	0.99999	1.00000	0.99983	0.99989
11	0.99997	1.00000	0.99978	0.99991
12	0.99957	0.99999	0.99995	0.99899
13	0.99870	0.99977	0.99885	0.99980
14	0.99948	0.99996	0.99997	0.99947
15	0.99972	0.99965	0.99943	0.99946
Mean	0.99972	0.99981	0.99960	0.99972
SD	0.00034	0.00032	0.00066	0.00030
CV(%)	0.03411	0.03191	0.06643	0.02991

จากตาราง 2 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์แบบ reversed-phase ในข้อ 1 ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ที่ความยาวคลื่น 200 - 400 nm วัดหาพื้นที่พีคของสารประกอบ *cis-resveratrol* ใน methanol 40% ที่ความยาวคลื่น 285 nm ความเข้มข้น 0.03 0.49 0.98 1.97 และ 3.93 $\mu\text{g/mL}$ ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ปรากฏว่าสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ตอบสนองต่อความเข้มข้นเป็นเส้นตรงในรูปของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) มีค่าอยู่ในช่วง 0.99870 - 0.99999 เฉลี่ย 0.99972 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00034 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.03411 สำหรับ *trans-resveratrol* วัดหาพื้นที่พีคที่ความยาวคลื่น 306 nm พบว่าเมื่อนำพื้นที่พีคของสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ใน methanol 40% ความเข้มข้น 0.08 1.50 3.00 6.00 และ 12.00 $\mu\text{g/mL}$ ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ปรากฏว่าสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ตอบสนองต่อความเข้มข้นเป็นเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.99898 - 1.00000 เฉลี่ย 0.99981 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00032 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.03191

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่สภาวะเดียวกัน ตรวจวัดสารประกอบทั้ง *cis*-และ *trans-resveratrol* ที่ค่า ex : 340 nm และ em : 385 nm พบว่า *cis-resveratrol* มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.99747 - 0.99998 เฉลี่ย 0.99960 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00066 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.06643 สำหรับ *trans-resveratrol* มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.99899 - 0.99997 เฉลี่ย 0.99972 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00030 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.02991

2.1.2 percent recovery ของสารประกอบ *cis-resveratrol* ในไวน์ โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์

ตาราง 3 แสดง percent recovery ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน *cis-resveratrol* ในไวน์ จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ (เติม *cis-resveratrol* 3.93 µg/mL) เมื่อ n = 3

ครั้งที่	DAD		FLD	
	ค่าเฉลี่ย	percent	ค่าเฉลี่ย	percent
	ที่ตรวจพบ	recovery	ที่ตรวจพบ	recovery
	µg/mL	(%)	µg/mL	(%)
1	3.89	99.01	3.97	100.98
2	3.91	99.60	3.93	99.87
3	3.95	100.47	3.97	100.94
4	3.91	99.37	3.94	100.31
5	3.93	100.00	3.94	100.23
Mean	3.92	99.69	3.95	100.46
SD	0.02	0.56	0.02	0.46
CV(%)	0.57	0.57	0.48	0.48

จากตาราง 3 แสดง percent recovery ของสารประกอบ *cis-resveratrol* ในไวน์ โดยเติมสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* เข้มข้น 3.93 µg/mL ลงในตัวอย่างไวน์เขย่าให้เข้ากันนำไปกรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 µL ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ปรากฏว่าค่าที่ตรวจพบสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* อยู่ในช่วง 3.89-3.95 µg/mL

เฉลี่ย 3.92 $\mu\text{g/mL}$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.02 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.57 percent recovery อยู่ในช่วง 99.01 - 100.47 เฉลี่ย 99.69 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.56 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.57

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่การทดลองเดียวกัน ปรากฏว่าค่าที่ตรวจพบสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* อยู่ในช่วง 3.93 - 3.97 $\mu\text{g/mL}$ เฉลี่ย 3.95 $\mu\text{g/mL}$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.02 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.48 percent recovery อยู่ในช่วง 99.87 - 100.98 เฉลี่ย 100.46 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.46 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.48

2.1.3 percent recovery ของสารประกอบ *trans-resveratrol* ในไวน์ โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์

ตาราง 4 แสดง percent recovery ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน *trans-resveratrol* ในไวน์ จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ (เติม *trans-resveratrol* 12.00 µg/mL) เมื่อ n = 3

ครั้งที่	DAD		FLD	
	ค่าเฉลี่ย	percent	ค่าเฉลี่ย	percent
	ที่ตรวจพบ	recovery	ที่ตรวจพบ	recovery
	µg/mL	(%)	µg/mL	(%)
1	12.00	100.00	12.04	100.30
2	11.97	99.76	12.02	100.13
3	12.01	100.08	12.01	100.10
4	12.00	100.03	12.02	100.17
5	12.01	100.09	12.01	100.09
Mean	12.00	99.99	12.02	100.16
SD	0.02	0.13	0.01	0.09
CV(%)	0.13	0.13	0.09	0.09

จากตาราง 4 แสดง percent recovery ของสารประกอบ *trans-resveratrol* ในไวน์ โดยเติมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* เข้มข้น 12.00 µg/mL ลงในตัวอย่างไวน์เข้าให้เข้ากัน นำไปกรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 µL ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ปรากฏว่าค่าที่ตรวจพบสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* อยู่ในช่วง

11.97 -12.01 $\mu\text{g/mL}$ เฉลี่ย 12.00 $\mu\text{g/mL}$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.02 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.13 percent recovery อยู่ในช่วง 99.76 - 100.09 เฉลี่ย 99.99 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.13 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.13

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่การทดลองเดียวกัน ปรากฏว่าค่าที่ตรวจพบสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* อยู่ในช่วง 12.01 - 12.04 $\mu\text{g/mL}$ เฉลี่ย 12.02 $\mu\text{g/mL}$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.01 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.09 percent recovery อยู่ในช่วง 100.09 - 100.30 เฉลี่ย 100.16 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.09 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.09

2.1.4 ปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์

ตาราง 5 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ เมื่อ $n = 9$

ไวน์แดง (1999)	<i>cis-resveratrol</i>			<i>trans-resveratrol</i>			total resveratrol		
	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)
IT1	0.96	0.05	5.36	1.29	0.01	0.47	2.25	0.12	5.11
IT2	0.54	0.03	4.57	1.23	0.04	2.82	1.76	0.07	4.04
FRI	1.03	0.05	3.59	1.99	0.03	1.30	2.97	0.14	4.73
TH1	0.11	0.003	2.87	0.68	0.01	1.42	0.78	0.004	0.50
TH2	1.52	0.03	2.06	2.13	0.06	2.61	3.64	0.09	2.57

จากตาราง 5 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่าสารประกอบ *cis-resveratrol* ตรวจวัดพื้นที่พิคที่ความยาวคลื่น 285 nm

ดังภาพประกอบ 13 ในวโน 5 เครื่องหมายการคำ คือ IT1 IT2 FR1 TH1 และ TH2 เข้มข้น 0.96 0.54 1.03 0.11 และ 1.52 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.05 0.03 0.05 0.003 และ 0.03 ตามลำดับ สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนในรูปของร้อยละ เรียงตามลำดับดังนี้ 5.36 4.57 3.59 2.87 และ 2.06

สำหรับสารประกอบ *trans-resveratrol* วัดหาพื้นที่พิคที่ความยาวคลื่น 306 nm ดังภาพประกอบ 14 ในวโน 5 เครื่องหมายการคำ คือ IT1 IT2 FR1 TH1 และ TH2 เข้มข้น 1.29 1.23 1.99 0.68 และ 2.13 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.01 0.04 0.03 0.01 และ 0.06 ตามลำดับ สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนในรูปร้อยละ เรียงตามลำดับดังนี้ 0.47 2.82 1.30 1.42 และ 2.61

เมื่อรวม isomers ทั้ง *cis-* และ *trans-resveratrol* เข้าด้วยกัน พบปริมาณสารประกอบ *resveratrol* ในวโน 5 เครื่องหมายการคำ คือ IT1 IT FR1 TH1 และ TH2 เข้มข้น 2.25 1.76 2.97 0.78 และ 3.64 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.12 0.07 0.14 0.004 และ 0.09 ตามลำดับ สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนในรูปร้อยละ เรียงตามลำดับดังนี้ 5.11 4.04 4.73 0.50 และ 2.57

2.1.5 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ ของ *cis-resveratrol* ในวโน โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่าสารประกอบ *cis-resveratrol* มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ เมื่อ $S/N = 3$ ที่ได้จากการสร้างกราฟเส้นตรง โดยกำหนดให้แกนตั้งคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height และ แกนนอนคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น ดังข้อ 3.2.4.7 – 3.2.4.8 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 0.0085x + 0.1912$ เมื่อให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น (x) เท่ากับศูนย์ พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height (y) มีค่าเท่ากับ 0.1912 หลังจากนั้นนำ factor 3 คูณกับค่า y จะมีค่าเท่ากับ 0.5736

เมื่อสร้างกราฟเส้นตรงโดยกำหนดให้แกนตั้งคือ peak height มีหน่วยเป็น mAU และ แกนนอนคือ ความเข้มข้นมีหน่วยเป็น $\mu\text{g/mL}$ ดังข้อ 3.2.4.9 – 3.2.4.10 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 24.917x + 0.237$ เมื่อแทน y ด้วย 0.5736 พบว่า ความเข้มข้น (x) มีค่าเท่ากับ 0.01351 $\mu\text{g/mL}$ นั่นคือ *cis-resveratrol* มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.01351 $\mu\text{g/mL}$

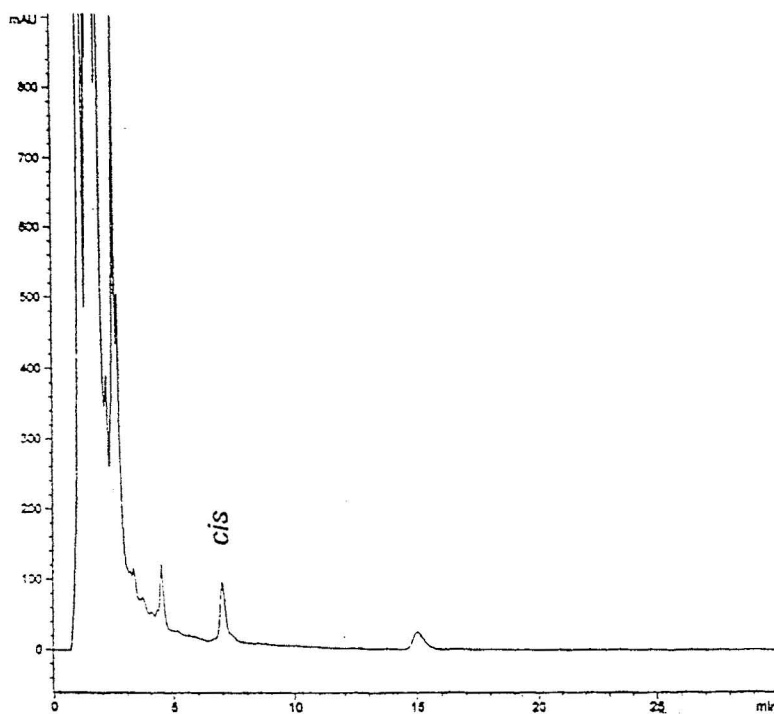
2.1.6 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ของ *trans-resveratrol* ในวโน โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ตรวจวัดความเข้มข้นต่ำสุดของ *trans-resveratrol* ในวโน เมื่อ $S/N = 3$ ได้จากการสร้างกราฟเส้นตรง โดยกำหนดให้แกนตั้งคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height และ แกนนอนคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น ดังข้อ 3.2.4.7 – 3.2.4.8 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 2.4552x + 1.1766$ เมื่อให้ ค่า

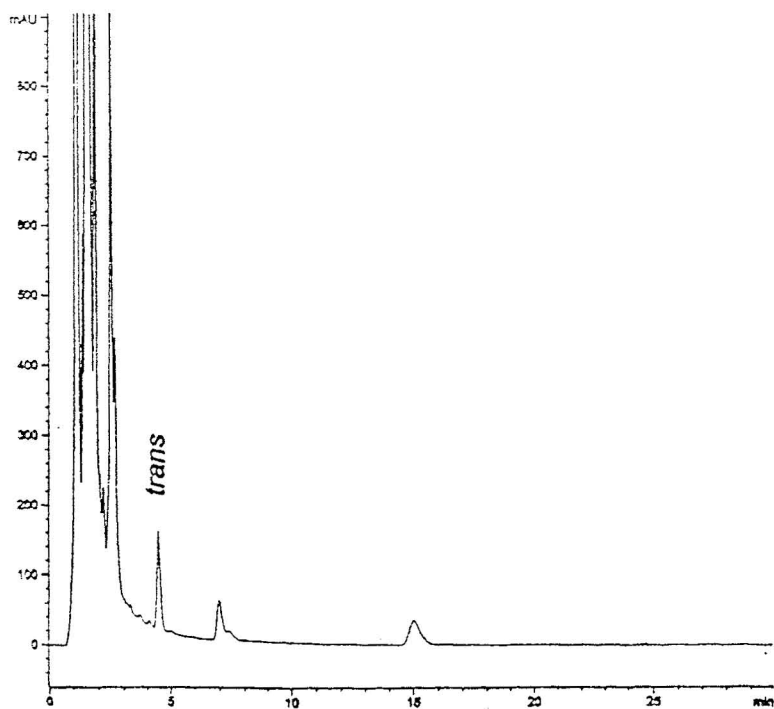
เบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น (x) เท่ากับศูนย์ พบว่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height (y) มีค่าเท่ากับ 1.1766 หลังจากนั้นนำ factor 3 คูณกับค่า y จะมีค่าเท่ากับ 3.5298

เมื่อสร้างกราฟเส้นตรงโดยกำหนดให้แกนตั้งคือ peak height มีหน่วยเป็น mAU และ แกนนอนคือ ความเข้มข้นมีหน่วยเป็น $\mu\text{g/mL}$ ดังข้อ 3.2.4.9 – 3.2.4.10 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 81.966x + 1.1264$ เมื่อแทนค่า y ด้วย 3.5298 พบว่าความเข้มข้น (x) มีค่าเท่ากับ $0.02932 \mu\text{g/mL}$ นั่นคือ *trans-resveratrol* มีความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ $0.02932 \mu\text{g/mL}$

2.1.7 ปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ โดยใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์



ภาพประกอบ 13 โครมาโตแกรมของสารประกอบ *cis*-resveratrol ในไวน์แดง โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 285 nm



ภาพประกอบ 14 โครมาโตแกรมของสารประกอบ *trans*-resveratrol ในไวน์แดง โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 306 nm

ตาราง 6 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ จากเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อ $n = 9$

ไวน์แดง (1999)	<i>cis</i> -resveratrol			<i>trans</i> -resveratrol			total resveratrol		
	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)
IT1	1.00	0.02	1.85	1.29	0.02	1.59	2.29	0.09	3.86
IT2	0.64	0.04	5.95	1.33	0.06	4.23	1.97	0.09	4.56
FR1	1.07	0.03	2.95	2.18	0.05	2.23	3.25	0.08	2.59
TH1	0.12	0.004	3.50	0.71	0.02	2.47	0.83	0.03	3.10
TH2	1.55	0.06	3.58	2.18	0.03	1.24	3.73	0.07	1.98

จากตาราง 6 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์โดยใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ตรวจวัดสารประกอบทั้ง *cis*- และ *trans*-resveratrol ที่ค่า $\text{ex} : 340 \text{ nm}$ และ $\text{em} : 385 \text{ nm}$ ดังภาพประกอบ 15 ในไวน์ 5 เครื่องหมายการค้า คือ IT1 IT2 FR1 TH1 และ TH2 พบว่า *cis*-resveratrol เข้มข้น 1.00 0.64 1.07 0.12 และ 1.55 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.02 0.04 0.03 0.004 และ 0.06 ตามลำดับ สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนใน รูปของร้อยละ เรียงตามลำดับดังนี้ 1.85 5.95 2.95 3.50 และ 3.58

สำหรับสารประกอบ *trans*-resveratrol ในไวน์ 5 เครื่องหมายการค้า คือ IT1 IT2 FR1 TH1 และ TH2 พบว่าเข้มข้น 1.29 1.33 2.18 0.17 และ 2.18 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.02 0.06 0.05 0.02 และ 0.03 ตามลำดับ สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนในรูปของร้อยละเรียงตามลำดับดังนี้ 1.59 4.23 2.23 2.47 และ 1.24

เมื่อรวม isomers ทั้ง *cis*- และ *trans*-resveratrol เข้าด้วยกันพบว่าปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ 5 เครื่องหมายการค้า คือ IT1 IT2 FR1 TH1 และ TH2 เข้มข้น 2.29 1.97 3.25 0.83 และ 3.73 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.09 0.09 0.08

0.03 และ 0.07 ตามลำดับ สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนในรูปของร้อยละ เรียงตามลำดับดังนี้
3.86 4.56 2.59 3.10 และ 1.98

2.1.8 ความเข้มข้นต่ำที่สามารถตรวจวัดได้ ของ *cis-resveratrol* ในไวน์ โดยใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

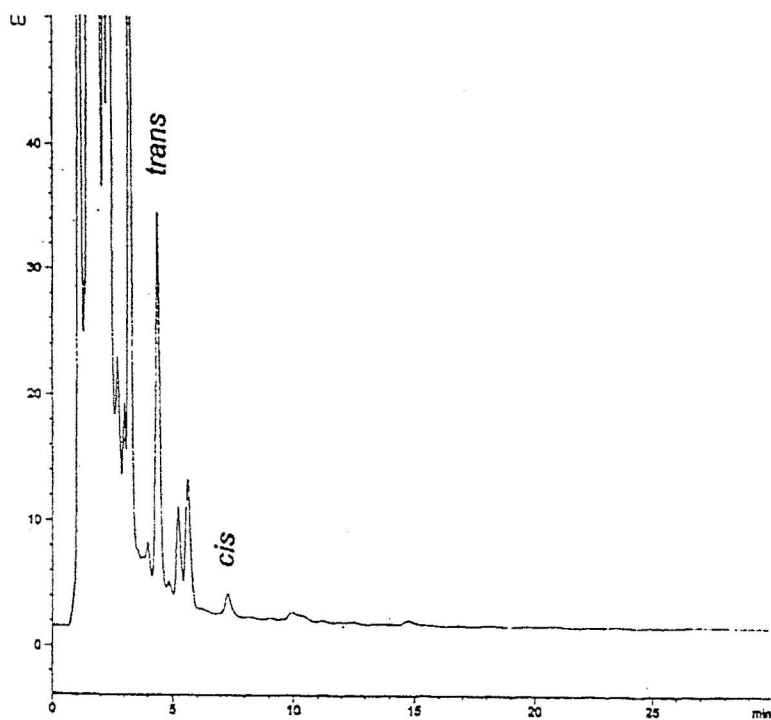
เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าสารประกอบ *cis-resveratrol* มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ เมื่อ $S/N = 3$ ที่ได้จากการสร้างกราฟเส้นตรง โดยกำหนดให้แกนตั้งคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height และ แกนนอนคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น ดังข้อ 3.2.4.7 – 3.2.4.8 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 0.8514x + 0.01280$ เมื่อให้ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น (x) เท่ากับศูนย์ พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height (y) มีค่าเท่ากับ 0.01280 หลังจากนั้นนำ factor 3 คูณกับค่า y จะมีค่าเท่ากับ 0.03840

เมื่อสร้างกราฟเส้นตรงโดยกำหนดให้แกนตั้งคือ peak height มีหน่วยเป็น LU และ แกนนอนคือ ความเข้มข้นมีหน่วยเป็น $\mu\text{g/mL}$ ดังข้อ 3.2.4.9 – 3.2.4.10 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 0.292x + 0.01890$ เมื่อแทน y ด้วย 0.03840 พบว่า ความเข้มข้น (x) มีค่าเท่ากับ 0.06678 $\mu\text{g/mL}$ นั่นคือ *cis-resveratrol* มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.06678 $\mu\text{g/mL}$

2.1.9 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ของ *trans-resveratrol* ในไวน์ โดยใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ตรวจความเข้มข้นต่ำสุดของ *trans-resveratrol* ในไวน์ เมื่อ $S/N = 3$ ได้จากการสร้างกราฟเส้นตรง โดยกำหนดให้แกนตั้งคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height และ แกนนอนคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นดังข้อ 3.2.4.7 – 3.2.4.8 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 18.657x + 0.00420$ เมื่อให้ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น (x) เท่ากับศูนย์ พบว่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height (y) มีค่าเท่ากับ 0.00420 หลังจากนั้นนำ factor 3 คูณกับค่า y จะมีค่าเท่ากับ 0.0126

เมื่อสร้างกราฟเส้นตรงโดยกำหนดให้แกนตั้งคือ peak height มีหน่วยเป็น LU และ แกนนอนคือ ความเข้มข้นมีหน่วยเป็น $\mu\text{g/mL}$ ดังข้อ 3.2.4.9 – 3.2.4.10 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 15.78x + 0.0018$ เมื่อแทนค่า y ด้วย 0.0126 พบว่าความเข้มข้น (x) มีค่าเท่ากับ 0.00068 $\mu\text{g/mL}$ นั่นคือ *trans-resveratrol* มีความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.00068 $\mu\text{g/mL}$



ภาพประกอบ 15 โครมาโตแกรมของสารประกอบ *cis*-resveratrol และ *trans*-resveratrol ในไวน์แดง โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (ex : 340 nm และ em : 385 nm)

2.2 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล

2.2.1 Linear regression line ของวิธีหาปริมาณสารประกอบ cis- และ trans-resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์และฟลูออเรสเซนซ์

ตาราง 7 แสดง linear regression line ของวิธีหาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดย cis-resveratrol ที่ระดับความเข้มข้น 0.03 0.49 0.98 1.97 และ 3.93 µg/mL และ trans-resveratrol ที่ระดับความเข้มข้น 0.08 1.50 3.00 6.00 และ 12.00 µg/mL จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อ n = 3

ครั้งที่	DAD		FLD	
	cis	trans	cis	trans
	(r)	(r)	(r)	(r)
1	-	0.99997	-	0.99990
2	-	0.99831	-	0.99606
3	-	0.99993	-	0.99850
Mean	-	0.99940	-	0.99815
SD	-	0.00095	-	0.00194
CV(%)	-	0.09476	-	0.19466

จากตาราง 7 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ แบบ resversed-phase โดยใช้คอลัมน์ Hypersil ODS C₁₈ (Agilent) สารละลายเฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนระหว่าง

acetonitrile 25% : glacial acetic acid ในน้ำ (1 : 40) 75% อัตราการไหล 1 mL/min ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ที่ความยาวคลื่น 200 - 400 nm

ปรากฏว่าการทดลองในครั้งนี้ ไม่สามารถรายงานค่าพารามิเตอร์ของสารประกอบ *cis-resveratrol* ระหว่างเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนส์ได้เนื่องจากมีองค์ประกอบอื่นในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลมารบกวนการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นจึงรายงานค่าพารามิเตอร์เฉพาะสารประกอบ *trans-resveratrol* โดยวัดหาพื้นที่พีคที่ความยาวคลื่น 306 nm เมื่อสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* เข้มข้น 0.08 1.50 3.00 6.00 และ 12.00 µg/mL นำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่พีคกับความเข้มข้น ปรากฏว่าสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ตอบสนองต่อความเข้มข้นเป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.99831 - 0.99997 เฉลี่ย 0.99940 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00095 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.09476

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์ที่สภาวะเดียวกัน ตรวจวัดสารประกอบ *trans-resveratrol* ที่ค่า ex : 340 nm และ em : 385 nm พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.99606 - 0.99990 เฉลี่ย 0.99815 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00194 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.19466

2.2.2 percent recovery ของสารประกอบ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนส์

ตาราง 8 แสดง percent recovery ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ (เติม *trans-resveratrol* 12.00 µg/mL) เมื่อ n = 3

ครั้งที่	DAD		FLD	
	ค่าเฉลี่ย	percent	ค่าเฉลี่ย	percent
	ที่ตรวจพบ	recovery	ที่ตรวจพบ	recovery
	µg/mL	(%)	µg/mL	(%)
1	11.49	95.73	11.73	97.74
2	11.57	96.43	11.60	96.69
3	11.62	96.84	11.78	98.13
4	11.75	97.91	11.83	98.55
5	11.73	97.74	11.71	97.54
6	11.85	98.75	11.87	98.95
Mean	11.67	97.23	11.75	97.93
SD	0.13	1.10	0.10	0.80
CV(%)	1.14	1.14	0.82	0.82

จากตาราง 8 แสดง percent recovery ของสารประกอบ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดยเติมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* เข้มข้น 12.00 µg/mL ลงในตัวอย่าง

อย่างผลอ่อนพันธุ์ดินัล แล้วดำเนินการเตรียมตัวอย่างตามกระบวนการตามข้อ 4.1.1 - 4.1.3 ในบทที่ 3 นำไปกรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 μL ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ที่ความยาวคลื่น 306 nm ปรากฏว่าค่าที่ตรวจพบสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* อยู่ในช่วง 11.49 - 11.85 $\mu\text{g/mL}$ เฉลี่ย 11.67 $\mu\text{g/mL}$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.13 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 1.14 percent recovery อยู่ในช่วง 95.73 - 98.75 เฉลี่ย 97.23 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 1.10 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 1.14

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่การทดลองเดียวกัน ปรากฏว่าค่าที่ตรวจพบสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* อยู่ในช่วง 11.60 - 11.87 $\mu\text{g/mL}$ เฉลี่ย 11.75 $\mu\text{g/mL}$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.10 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.82 percent recovery อยู่ในช่วง 96.69 - 98.95 เฉลี่ย 97.93 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.80 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.82

2.2.3 ปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลอ่อนพันธุ์คาร์ดินัล โดยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์

ตาราง 9 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลอ่อนพันธุ์คาร์ดินัล จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ เมื่อ $n = 6$

พันธุ์ อ่อน	<i>cis-resveratrol</i>			<i>trans-resveratrol</i>			total resveratrol		
	($\mu\text{g/g}$ fresh wt)			($\mu\text{g/g}$ fresh wt)			($\mu\text{g/g}$ fresh wt)		
	Mean	SD	CV(%)	Mean	SD	CV(%)	Mean	SD	CV(%)
คาร์ดินัล	...	...	...	0.83	0.04	4.47	0.83	0.04	4.47

... หมายถึง ตรวจวัดไม่ได้เนื่องจากมีองค์ประกอบอื่นในผลอ่อนพันธุ์คาร์ดินัล มารบกวนการตรวจวิเคราะห์

จากตาราง 9 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลอ่อนพันธุ์คาร์ดินัล โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่าสารประกอบ *cis-resveratrol* ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้เนื่องจากมีองค์ประกอบอื่นในผลอ่อนพันธุ์คาร์ดินัลมารบกวนในการตรวจวิเคราะห์

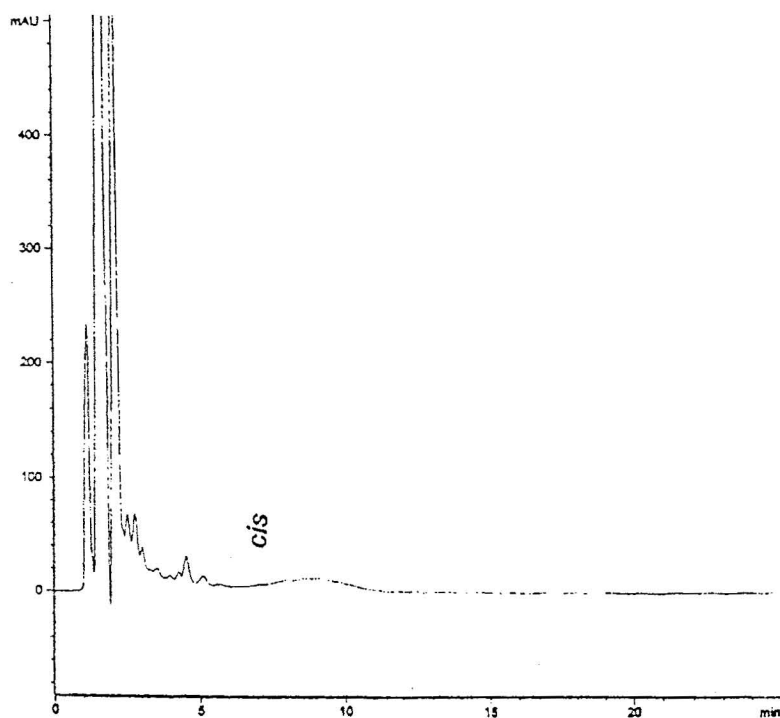
ที่ความยาวคลื่น 285 nm ดังภาพประกอบ 16 สำหรับ *trans-resveratrol* ตรวจวัดพื้นที่พีคที่ความยาวคลื่น 306 nm ดังภาพประกอบ 17 พบว่า เข้มข้น 0.83 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.04 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 4.47

2.2.4 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ของ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์

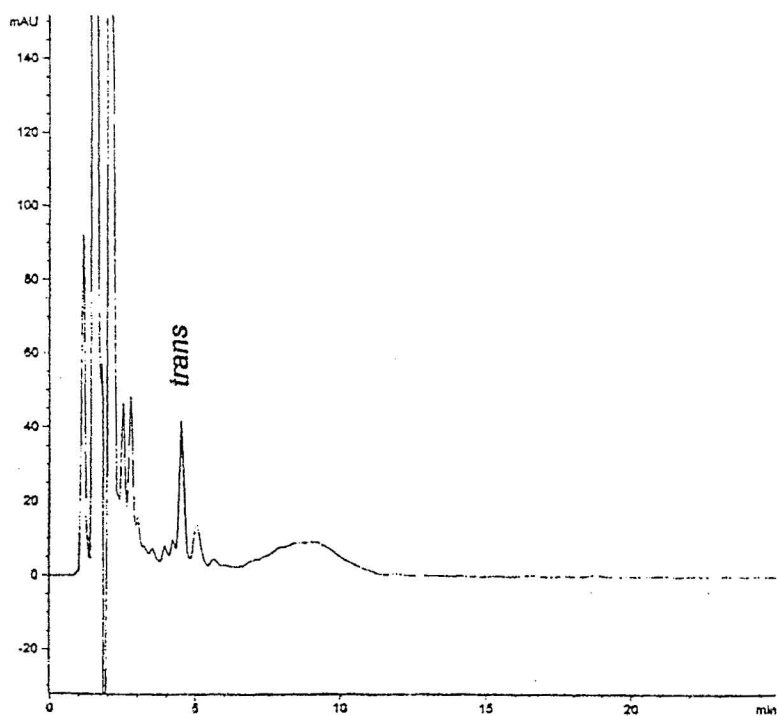
เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ ตรวจความเข้มข้นต่ำสุดของ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล เมื่อ $S/N = 3$ ได้จากการสร้างกราฟเส้นตรง โดยกำหนดให้แกนตั้งคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height และ แกนนอนคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นดังข้อ 3.2.4.7 – 3.2.4.8 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 128.49x + 0.81$ เมื่อให้ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น (x) เท่ากับศูนย์ พบว่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height (y) มีค่าเท่ากับ 0.81 หลังจากนั้นนำ factor 3 คูณกับค่า y จะมีค่าเท่ากับ 2.43

เมื่อสร้างกราฟเส้นตรงโดยกำหนดให้แกนตั้งคือ peak height มีหน่วยเป็น mAU และ แกนนอนคือ ความเข้มข้นมีหน่วยเป็น $\mu\text{g/mL}$ ดังข้อ 3.2.4.9 – 3.2.4.10 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 66.129x + 0.5940$ เมื่อแทนค่า y ด้วย 2.43 พบว่าความเข้มข้น (x) มีค่าเท่ากับ 0.0278 $\mu\text{g/mL}$ นั่นคือ *trans-resveratrol* มีความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.0278 $\mu\text{g/mL}$

2.2.5 ปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดยใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์



ภาพประกอบ 16 โครมาโตแกรมของสารประกอบ *cis*-resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 285 nm



ภาพประกอบ 17 โครมาโตแกรมของสารประกอบ *trans*-resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 306 nm

ตาราง 10 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล จากเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อ $n = 6$

พันธุ์ องุ่น	<i>cis</i> -resveratrol			<i>trans</i> -resveratrol			total resveratrol		
	(μg/g fresh wt)			(μg/g fresh wt)			(μg/g fresh wt)		
	Mean	SD	CV(%)	Mean	SD	CV(%)	Mean	SD	CV(%)
คาร์ดินัล	-	-	-	0.83	0.03	3.53	0.83	0.03	3.53

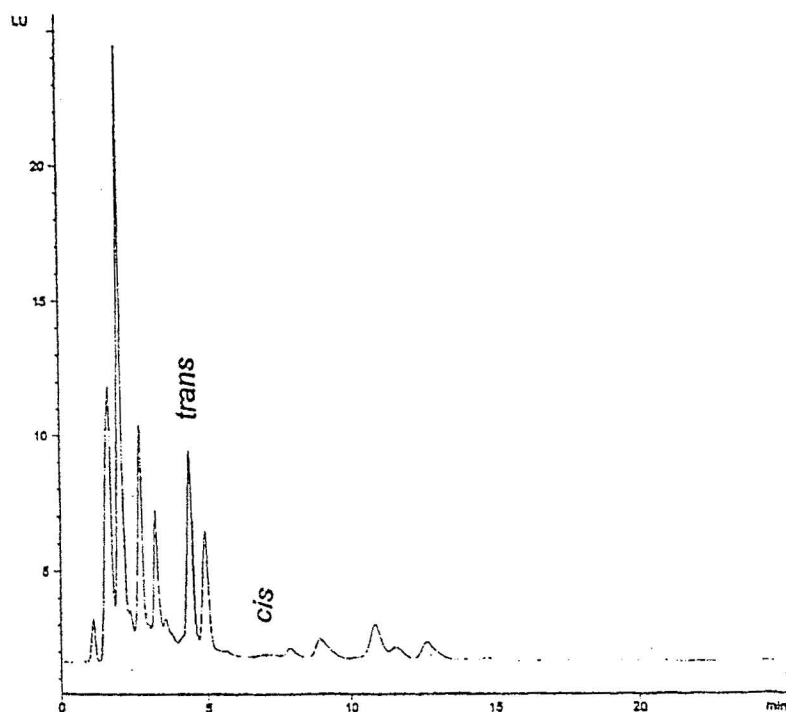
— หมายถึง ตรวจวัดไม่พบ

จากตาราง 10 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดยใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ปรากฏว่าไม่พบสารประกอบ *cis*-resveratrol แต่พบพีคของ *trans*-resveratrol ดังภาพประกอบ 18 เมื่อนำพื้นที่พีคไปอ่านความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานพบว่า *trans*-resveratrol เข้มข้น 0.83 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.03 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 3.53

2.2.6 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ของ *trans*-resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดยใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ตรวจวัดความเข้มข้นต่ำสุดของ *trans*-resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล เมื่อ $S/N = 3$ ได้จากการสร้างกราฟเส้นตรง โดยกำหนดให้แกนตั้งคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height และ แกนนอนคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นดังข้อ 3.2.4.7 – 3.2.4.8 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 43.406x + 0.01370$ เมื่อให้ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น (x) เท่ากับศูนย์ พบว่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height (y) มีค่าเท่ากับ 0.01370 หลังจากนั้นนำ factor 3 คูณกับค่า y จะมีค่าเท่ากับ 0.0411

เมื่อสร้างกราฟเส้นตรงโดยกำหนดให้แกนตั้งคือ peak height มีหน่วยเป็น LU และ แกนนอนคือ ความเข้มข้นมีหน่วยเป็น μg/mL ดังข้อ 3.2.4.9 – 3.2.4.10 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 13.581x + 0.020$ เมื่อแทนค่า y ด้วย 0.0411 พบว่าความเข้มข้น (x) มีค่าเท่ากับ 0.0016 μg/mL นั่นคือ *trans*-resveratrol มีความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.0016 μg/mL



ภาพประกอบ 18 โครมาโตแกรมของสารประกอบ *cis*-resveratrol และ *trans*-resveratrol ในผล
องุ่นพันธุ์คาร์ดินัล โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (ex : 340 nm
และ em : 385 nm)

2.3 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา

2.3.1 Linear regression line ของวิธีหาปริมาณสารประกอบ *cis*- และ *trans*-resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์

ตาราง 11 แสดง linear regression line ของวิธีหาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดย *cis*-resveratrol ที่ระดับความเข้มข้น 0.03 0.49 0.98 1.97 และ 3.93 µg/mL และ *trans*-resveratrol ที่ระดับความเข้มข้น 0.08 1.50 3.00 6.00 และ 12.00 µg/mL จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อ n = 3

ครั้งที่	DAD		FLD	
	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>
	(r)	(r)	(r)	(r)
1	0.99994	0.99994	0.99751	0.99982
2	0.99992	0.99999	0.99923	0.99990
3	0.99986	0.99998	0.99279	0.99850
Mean	0.99991	0.99997	0.99651	0.99941
SD	0.00004	0.00003	0.00333	0.00079
CV(%)	0.00420	0.00260	0.33457	0.07865

จากตาราง 11 พบว่าเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ resveratrol ที่สภาวะเดียวกับการตรวจวิเคราะห์ในไวน์ และผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล พบว่าเมื่อตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดแอรเรย์ ที่

ความยาวคลื่น 200 - 400 nm วัดหาพื้นที่ฟีกของสารประกอบ *cis-resveratrol* ใน methanol 40% ที่ความยาวคลื่น 285 nm ความเข้มข้น 0.03 0.49 0.98 1.97 และ 3.93 $\mu\text{g/mL}$ ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ปรากฏว่าสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ตอบสนองต่อความเข้มข้นเป็นเส้นตรงในรูปของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ มีค่าอยู่ในช่วง 0.99986 - 0.99994 เฉลี่ย 0.99991 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00004 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.00420 สำหรับ *trans-resveratrol* วัดหาพื้นที่ฟีกที่ความยาวคลื่น 306 nm พบว่าเมื่อนำพื้นที่ฟีกของสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ใน methanol 40% ความเข้มข้น 0.08 1.50 3.00 6.00 และ 12.00 $\mu\text{g/mL}$ ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ปรากฏว่าสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ตอบสนองต่อความเข้มข้นเป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.99994 - 0.99999 เฉลี่ย 0.99997 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00003 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.00260

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่สภาวะเดียวกัน ตรวจวัดสารประกอบ *cis-* และ *trans-resveratrol* ที่ $\text{ex} : 340 \text{ nm}$ และ $\text{em} : 385 \text{ nm}$ พบว่า *cis-resveratrol* มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.99279 - 0.99923 เฉลี่ย 0.99651 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00333 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.33457 สำหรับ *trans-resveratrol* มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.99850 - 0.99990 เฉลี่ย 0.99941 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00079 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.07865

2.3.2 percent recovery ของสารประกอบ *cis-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์

ตาราง 12 แสดง percent recovery ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน *cis-resveratrol* ใน
ผลงุ่นพันธุ์ไวก์มะละกา จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์
(เติม *cis-resveratrol* 3.93 µg/mL) เมื่อ n = 3

ครั้งที่	DAD		FLD	
	ค่าเฉลี่ย	percent	ค่าเฉลี่ย	percent
	ที่ตรวจพบ µg/mL	recovery (%)	ที่ตรวจพบ µg/mL	recovery (%)
1	3.84	97.68	3.73	95.00
2	3.81	96.90	3.72	94.76
3	3.81	96.85	3.78	96.25
4	3.84	97.59	3.72	94.71
5	3.80	96.65	3.79	96.39
6	3.81	97.04	3.81	96.98
Mean	3.82	97.12	3.76	95.68
SD	0.02	0.42	0.04	0.98
CV(%)	0.43	0.43	1.02	1.02

จากตาราง 12 แสดง percent recovery ของสารประกอบ *cis-resveratrol* ในผลงุ่น
พันธุ์ไวก์มะละกา โดยเติมสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* เข้มข้น 3.93 µg/mL ลงในตัวอย่าง

อย่าง ผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาแล้วดำเนินการเตรียมตัวอย่างตามกระบวนการในข้อ 4.1.1 - 4.1.3 ในบทที่ 3 นำไปกรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 μL ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัด โฟโตไดโอดแอเรย์ ปรากฏว่าค่าที่ตรวจพบสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* อยู่ในช่วง 3.80 - 3.84 $\mu\text{g/mL}$ เฉลี่ย 3.82 $\mu\text{g/mL}$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.02 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.43 percent recovery อยู่ในช่วง 96.65 - 97.68 เฉลี่ย 97.12 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.42 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.43

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่การทดลองเดียวกัน ปรากฏว่าค่าที่ตรวจพบสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* อยู่ในช่วง 3.72 - 3.81 $\mu\text{g/mL}$ เฉลี่ย 3.76 $\mu\text{g/mL}$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.04 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 1.02 percent recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 94.71-96.98 เฉลี่ย 95.68 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.98 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 1.02

2.3.3 percent recovery ของสารประกอบ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์

ตาราง 13 แสดง percent recovery ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน *trans-resveratrol* ในผลอุ้งนพันธุ์ไวกั่มะละกา จากเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนส์ (เติม *trans-resveratrol* 12.00 µg/mL) เมื่อ n = 3

ครั้งที่	DAD		FLD	
	ค่าเฉลี่ย	percent	ค่าเฉลี่ย	percent
	ที่ตรวจพบ µg/mL	recovery (%)	ที่ตรวจพบ µg/mL	recovery (%)
1	11.79	98.21	11.67	97.24
2	11.75	97.93	11.57	96.45
3	11.90	99.13	11.69	97.44
4	11.82	98.49	11.65	97.04
5	11.74	97.87	11.63	96.93
6	11.82	98.51	11.82	98.50
Mean	11.80	98.35	11.67	97.26
SD	0.06	0.46	0.08	0.69
CV(%)	0.47	0.47	0.71	0.71

จากตาราง 13 แสดง percent recovery ของสารประกอบ *trans-resveratrol* ในผลอุ้งนพันธุ์ไวกั่มะละกา โดยเติมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* เข้มข้น 12.00 µg/mL ลง

ในตัวอย่างผลงุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา ดำเนินการเตรียมตัวอย่างตามกระบวนการใน ข้อ 4.1.1 - 4.1.3 ในบทที่ 3 นำไปกรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 100 μL ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ปรากฏว่าค่าที่ตรวจพบสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* อยู่ในช่วง 11.74 - 11.90 $\mu\text{g/mL}$ เฉลี่ย 11.80 $\mu\text{g/mL}$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.06 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.47 percent recovery อยู่ในช่วง 97.87 - 99.13 เฉลี่ย 98.35 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.46 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.47

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่การทดลองเดียวกัน ปรากฏว่าค่าที่ตรวจพบสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* อยู่ในช่วง 11.57 - 11.82 $\mu\text{g/mL}$ เฉลี่ย 11.67 $\mu\text{g/mL}$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.08 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.71 percent recovery อยู่ในช่วง 96.45 - 98.50 เฉลี่ย 97.26 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.69 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.71

2.3.4 ปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลงุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์

ตาราง 14 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลงุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ เมื่อ $n = 6$

พันธุ์ องุ่น	<i>cis-resveratrol</i>			<i>trans-resveratrol</i>			total resveratrol		
	($\mu\text{g/g}$ fresh wt)			($\mu\text{g/g}$ fresh wt)			($\mu\text{g/g}$ fresh wt)		
	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)
ไวท์มะ- ละกา	0.09	0.004	4.40	0.29	0.01	4.20	0.38	0.01	2.52

จากตาราง 14 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลงุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาโดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่าสารประกอบ *cis-resveratrol* ตรวจวัดพื้นที่พีค ที่ความยาวคลื่น 285 nm ดังภาพประกอบ 19 พบว่าเข้มข้น 0.09 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.004 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 4.40

สำหรับสารประกอบ *trans-resveratrol* วัดหาพื้นที่พีคที่ความยาวคลื่น 306 nm ในดังภาพประกอบ 20 ผลงุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา พบว่าเข้มข้น 0.29 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.01 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 4.20

เมื่อรวม isomers ทั้ง *cis*- และ *trans*-resveratrol เข้าด้วยกันพบว่าปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาที่ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ เข้มข้น 0.38 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.01 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 2.52

2.3.5 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ของ *cis*-resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่าสารประกอบ *cis*-resveratrol มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ เมื่อ $S/N = 3$ ที่ได้จากการสร้างกราฟเส้นตรง โดยกำหนดให้แกนตั้งคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height และ แกนนอนคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น ดังข้อ 3.2.4.7 – 3.2.4.8 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 30.898x + 0.8600$ เมื่อให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น (x) เท่ากับศูนย์ พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height (y) มีค่าเท่ากับ 0.8600 หลังจากนั้นนำ factor 3 คูณกับค่า y จะมีค่าเท่ากับ 2.58

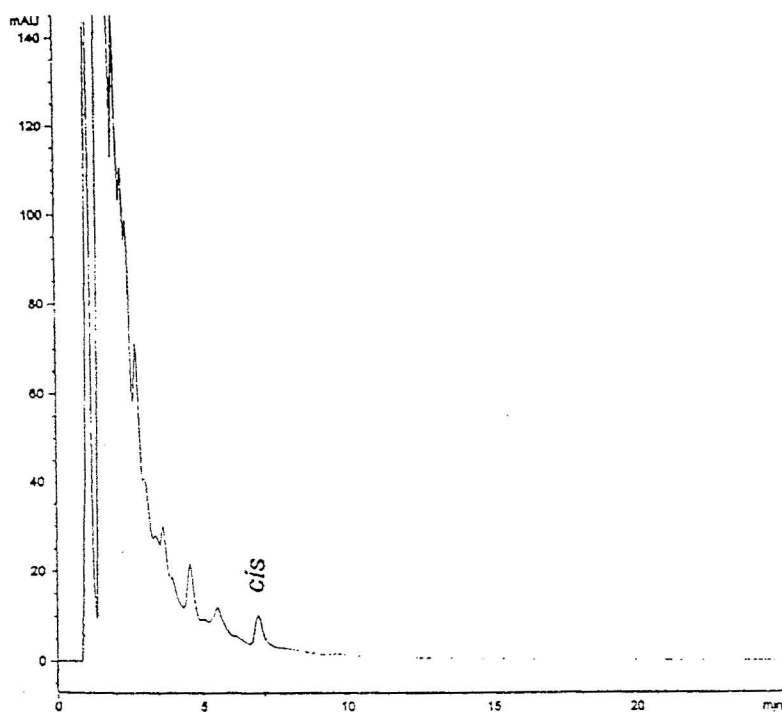
เมื่อสร้างกราฟเส้นตรงโดยกำหนดให้แกนตั้งคือ peak height มีหน่วยเป็น mAU และ แกนนอนคือ ความเข้มข้นมีหน่วยเป็น $\mu\text{g/mL}$ ดังข้อ 3.2.4.9 – 3.2.4.10 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 37.484x + 1.008$ เมื่อแทนค่า y ด้วย 2.58 พบว่า ความเข้มข้น (x) มีค่าเท่ากับ $0.0419 \mu\text{g/mL}$ นั่นคือ *cis*-resveratrol มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ $0.0419 \mu\text{g/mL}$

2.3.6 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ของ *trans*-resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์

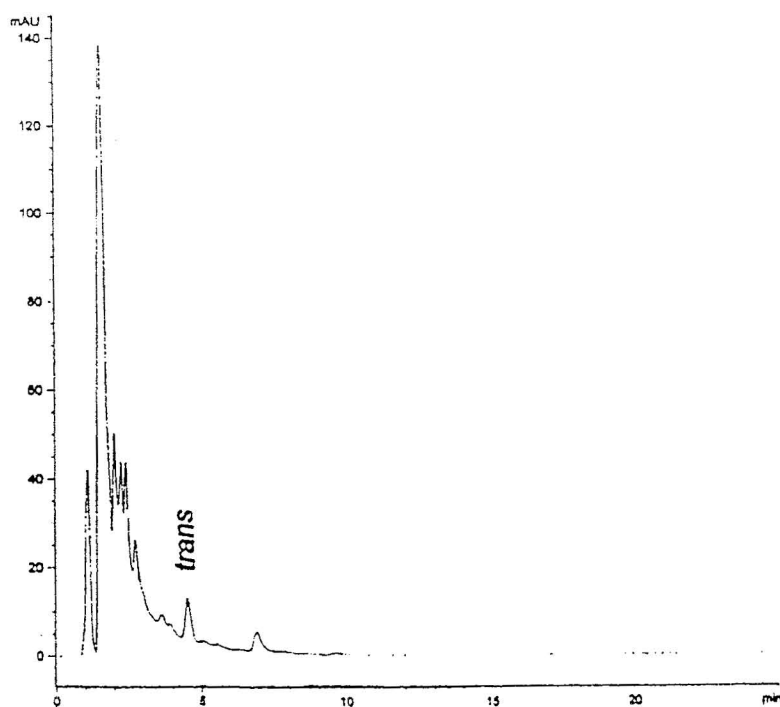
เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ตรวจความเข้มข้นต่ำสุดของ *trans*-resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา เมื่อ $S/N = 3$ ได้จากการสร้างกราฟเส้นตรง โดยกำหนดให้แกนตั้งคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height และ แกนนอนคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นดังข้อ 3.2.4.7 – 3.2.4.8 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 49.045x + 1.2760$ เมื่อให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น (x) เท่ากับศูนย์ พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height (y) มีค่าเท่ากับ 1.2760 หลังจากนั้นนำ factor 3 คูณกับค่า y จะมีค่าเท่ากับ 3.8280

เมื่อสร้างกราฟเส้นตรงโดยกำหนดให้แกนตั้งคือ peak height มีหน่วยเป็น mAU และ แกนนอนคือ ความเข้มข้นมีหน่วยเป็น $\mu\text{g/mL}$ ดังข้อ 3.2.4.9 – 3.2.4.10 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 89.515x + 0.2430$ เมื่อแทนค่า y ด้วย 3.8280 พบว่าความเข้มข้นมีค่าเท่ากับ $0.0401 \mu\text{g/mL}$ นั่นคือ *trans*-resveratrol มีความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ $0.0401 \mu\text{g/mL}$

2.3.7 ปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์



ภาพประกอบ 19 โครมาโตแกรมของสารประกอบ *cis-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 285 nm



ภาพประกอบ 20 โครมาโตแกรมของสารประกอบ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ วัดที่ความยาวคลื่น 306 nm

ตาราง 15 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา จากเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อ $n = 6$

พันธุ์ องุ่น	<i>cis</i> -resveratrol			<i>trans</i> -resveratrol			total resveratrol		
	(μg/g fresh wt)			(μg/g fresh wt)			(μg/g fresh wt)		
	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)
ไวท์มะ- ละกา	0.09	0.01	4.87	0.29	0.01	3.93	0.38	0.02	5.12

จากตาราง 15 แสดงปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์โดยใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ตรวจวัดสารประกอบทั้ง *cis*- และ *trans*-resveratrol ที่ค่า λ_{ex} : 340 nm และ λ_{em} : 385 nm ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา ดังภาพประกอบ 21 พบว่า สารประกอบ *cis*-resveratrol เข้มข้น 0.09 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.01 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 4.87

สำหรับสารประกอบ *trans*-resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา พบว่าเข้มข้น 0.29 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.01 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 3.93

เมื่อรวม isomers ทั้ง *cis*- และ *trans*-resveratrol เข้าด้วยกันพบว่าปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา เข้มข้น 0.38 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.02 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 5.12

2.3.8 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ของ *cis*-resveratrol ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

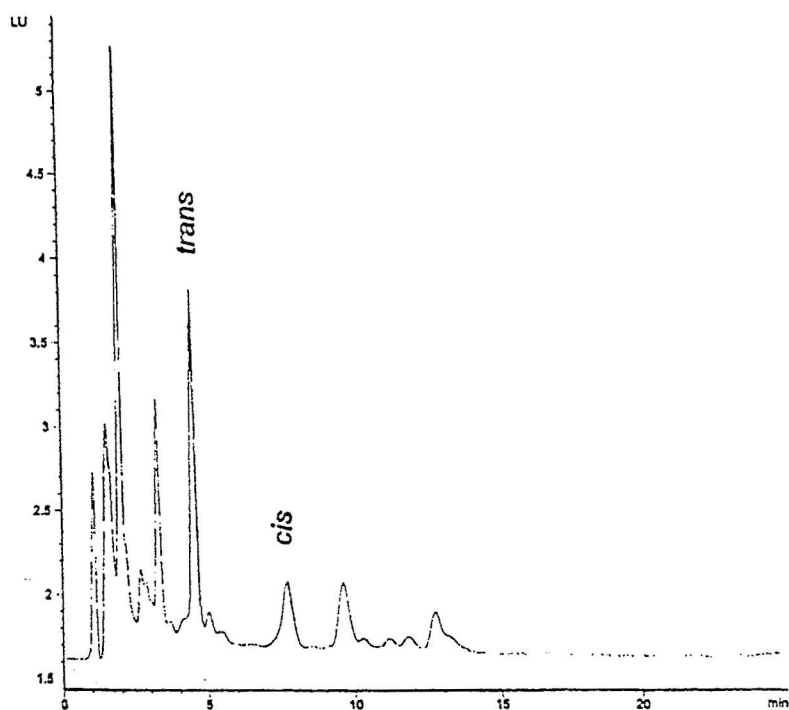
เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าสารประกอบ *cis*-resveratrol มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ เมื่อ $S/N = 3$ ที่ได้จากการสร้างกราฟเส้นตรง โดยกำหนดให้แกนตั้งคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height และ แกนนอนคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น ดังข้อ 3.2.4.7 – 3.2.4.8 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 0.4777x + 0.0227$ เมื่อให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น (x) เท่ากับศูนย์ พบว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height (y) มีค่าเท่ากับ 0.0227 หลังจากนั้นนำ factor 3 คูณกับค่า y จะมีค่าเท่ากับ 0.0681

เมื่อสร้างกราฟเส้นตรงโดยกำหนดให้แกนตั้งคือ peak height มีหน่วยเป็น LU และ แกนนอนคือ ความเข้มข้นมีหน่วยเป็น $\mu\text{g/mL}$ ดังข้อ 3.2.4.9 – 3.2.4.10 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 0.9328x + 0.0130$ เมื่อแทน y ด้วย 0.0681 พบว่า ความเข้มข้น (x) มีค่าเท่ากับ 0.0590 $\mu\text{g/mL}$ นั่นคือ *cis-resveratrol* มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.0590 $\mu\text{g/mL}$

2.3.9 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ของ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ตรวจวัดความเข้มข้นต่ำสุดของ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์มะละกา เมื่อ $S/N = 3$ ได้จากการสร้างกราฟเส้นตรง โดยกำหนดให้แกนตั้งคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height และ แกนนอนคือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นดังข้อ 3.2.4.7 – 3.2.4.8 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 9.9518x + 0.0203$ เมื่อให้ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น (x) เท่ากับศูนย์ พบว่า ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height (y) มีค่าเท่ากับ 0.0203 หลังจากนั้นนำ factor 3 คูณกับค่า y จะมีค่าเท่ากับ 0.0609

เมื่อสร้างกราฟเส้นตรงโดยกำหนดให้แกนตั้งคือ peak height มีหน่วยเป็น LU และ แกนนอนคือ ความเข้มข้นมีหน่วยเป็น $\mu\text{g/mL}$ ดังข้อ 3.2.4.9 – 3.2.4.10 ในบทที่ 3 จะได้สมการเส้นตรง $y = 17.536x + 0.029$ เมื่อแทนค่า y ด้วย 0.0609 พบว่าความเข้มข้น (x) มีค่าเท่ากับ 0.0018 $\mu\text{g/mL}$ นั่นคือ *trans-resveratrol* มีความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.0018 $\mu\text{g/mL}$



ภาพประกอบ 21 โครมาโตแกรมของสารประกอบ *cis*-resveratrol และ *trans*-resveratrol ในผล
องุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์
(ex : 340 nm และ em : 385 nm)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัย สรุปผล อภิปราย และเสนอแนะ การทดลองตามลำดับดังนี้

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC เพียงสภาวะเดียว ในการวิเคราะห์สารประกอบ resveratrol โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์

1.1 เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์

ผลการวิจัยโดยใช้คอลัมน์ Hypersil ODS (C₁₈) (Agilent) ขนาด 4.0 x 125 mm อนุภาคบรรจุภายในขนาด 5 µm โปรแกรมการวิเคราะห์แบบ isocratic สารละลายเฟสเคลื่อนที่ คือ อัตราส่วนระหว่าง acetonitrile 25% : glacial acetic acid ในน้ำ (1 : 40) 75% อัตราการไหล 1 mL/min

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดแอเรย์ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 306 nm พบค่ารีเทนชันไทม์ของ *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene (*trans*-resveratrol) ประมาณ 4.50 นาที ดังภาพประกอบ 7 (หน้า 38) และค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 285 nm พบว่า *cis*-3,5,4'-trihydroxystilbene (*cis*-resveratrol) มีค่ารีเทนชันไทม์ประมาณ 7 นาที ดังภาพประกอบ 9 (หน้า 39)

ผลการวิจัยในการหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC (Hewlett Packard ; 1100 Series) พบว่าสารประกอบ *trans*- และ *cis*-resveratrol มีแนวโน้มของค่ารีเทนชันไทม์ สอดคล้องกับ ลามูเลา – ราเวนทอส และคณะ (Lamuela – Raventos, et al. 1995 : 281 – 283) ที่ใช้คอลัมน์ชนิด reversed – phase C₁₈ ขนาด 4 x 250 mm อนุภาคบรรจุภายในขนาด 5 µm โปรแกรมการวิเคราะห์แบบเกรเดียนต์ สารละลายเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย A คือ glacial acetic acid ในน้ำ pH 2.4 และ B คือ glacial acetic acid ในน้ำ 20% และ acetonitrile 80% อัตราการไหล 1.5 mL/min โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 306 nm พบว่ารีเทนชันไทม์ของ *trans*-resveratrol ประมาณ 17 นาที และค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 285 nm พบค่า *cis*-resveratrol มีค่ารีเทนชันไทม์ประมาณ 21.4 นาที นอกจากนี้สอดคล้องกับของ จีนเด็ต และคณะ (Jeandet, et al. 1995 : 1-4) ที่ใช้คอลัมน์ชนิด reversed - phase C₁₈ ขนาด 4.5 x 250 mm โปรแกรมการวิเคราะห์แบบ isocratic สารละลายเฟสเคลื่อนที่ คือ อัตราส่วนระหว่าง acetonitrile : H₂O (40 : 60) อัตราการไหล

0.6 mL/min โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 306 nm พบค่ารีเทนชันไทม์ของ *trans-resveratrol* ปรากฏที่ 9.30 นาที และค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 nm *cis-resveratrol* มีค่ารีเทนชันไทม์ที่ 11.40 นาที

จากการวิจัยครั้งนี้จะเห็นว่า เมื่อใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ ชนิดเดียวกับของ ลามูเล-ราเวนทอส และคณะ (Lamuela – Raventos, et al. 1995 : 281-283) แต่แตกต่างกันที่ค่า pH ของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ glacial acetic acid ในน้ำ งานวิจัยครั้งนี้ใช้ pH ที่สูงกว่า คือ pH 2.5 และใช้โปรแกรมการวิเคราะห์แบบ isocratic พบว่ารีเทนชันไทม์ของ *trans-* และ *cis-resveratrol* ใช้เวลาในการวิเคราะห์เร็วกว่าประมาณ 12.5 และ 14.4 นาที ตามลำดับ สำหรับการวิจัยของจินเด็ท และคณะ (Jeandet, et al. 1995 : 1-4) ซึ่งใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ชนิดใกล้เคียงกัน แต่ของ จินเด็ท และคณะใช้ น้ำ กับ acetonitrile และใช้โปรแกรมการวิเคราะห์แบบ isocratic เหมือนกัน ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่ารีเทนชันไทม์ ของ *trans-* และ *cis-resveratrol* ใช้เวลาวิเคราะห์เร็วกว่าประมาณ 4.80 และ 4.40 นาที ตามลำดับ จากงานวิจัยในครั้งนี้ พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์สารประกอบ *trans-* และ *cis-resveratrol* น้อยกว่างานวิจัยที่ผ่านมาดังกล่าวข้างต้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะขนาดและความยาวของคอลัมน์ที่เล็กกว่า และชนิดของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน จึงช่วยในการประหยัดเวลาและตัวทำละลายเฟสเคลื่อนที่

1.2 เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

เมื่อใช้คอลัมน์ สารละลายเฟสเคลื่อนที่ และอัตราการไหลที่สภาวะเดียวกันแต่เปลี่ยนเครื่องตรวจวัดเป็นชนิดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าค่า ex : 340 nm และ em : 385 nm *trans-resveratrol* มีค่ารีเทนชันไทม์ประมาณ 4.50 นาที และ *cis-resveratrol* ประมาณ 7 นาที ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 11 (หน้า 40) จากงานวิจัยที่ผ่านมาของ เพเล็ท พ็อนท์ และคูเน็ท (Pezet, Pont & Cuenat. 1994 : 191-197) ใช้คอลัมน์ Lichrospher - C₁₈ ขนาด 4.5 x 250 mm อนุภาคบรรจุภายในขนาด 5 μ m โปรแกรมการวิเคราะห์แบบเกรเดียนต์ สารละลายเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และ formic acid ความเข้มข้น 50 mM พบว่า ex : 330 nm และ em : 374 nm ปรากฏค่ารีเทนชันไทม์ ของ *trans-resveratrol* ที่ 15.6 นาที แต่ *cis-resveratrol* ไม่ได้ทำการวิจัยไว้

2. การหาค่าพารามิเตอร์ และปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ 5 เครื่องหมายการค้า และในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล และพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์และฟลูออเรสเซนซ์

เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้ใช้เทคนิค HPLC ประกอบด้วยเครื่องตรวจวัด 2 ชนิด คือ โฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์ และผลองุ่น โดยใช้เครื่องตรวจวัดทีละชนิด ดังนั้นจึง สรุป และอภิปราย ผลการทดลอง ทั้งเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ และฟลูออเรสเซนซ์

2.1 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในไวน์

2.1.1 เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์

2.1.1.1 ปริมาณสารประกอบ *cis*-resveratrol ในไวน์

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่าการตอบสนองของสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ต่อความเข้มข้นของ *cis*-resveratrol ในช่วง 0.03 – 3.93 $\mu\text{g/mL}$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.99870 - 0.99999 เฉลี่ย 0.99972 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00034 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.03411 ตามลำดับ จากข้อมูลพบว่า ค่าตอบสนองการตรวจวัดเป็นเส้นตรงดีมาก มีค่าเข้าใกล้ 1

เมื่อพิจารณา percent recovery ของสารประกอบ *cis*-resveratrol ในไวน์ โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน *cis*-resveratrol ที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างไวน์ เมื่อตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่าค่า percent recovery อยู่ในช่วง 99.01 - 100.47 เฉลี่ย 99.69 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.56 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.57

สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อยู่ที่ 0.01351 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อ $S/N = 3$

การวิเคราะห์ปริมาณ *cis*-resveratrol ไวน์แดง 5 เครื่องหมายการค้า ด้วยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ เรียงลำดับจากน้อยไปมากดังนี้ TH1 IT2 IT1 FR1 และ TH2 เข้มข้น 0.11 0.54 0.96 1.03 และ 1.52 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.003 0.03 0.05 0.05 และ 0.03 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 2.87 4.57 5.36 3.59 และ 2.06 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาข้อมูลทางสถิติ พบว่ามีความแม่นยำดีมากและทำให้ทราบว่า ไวน์เครื่องหมายการค้า TH2 ซึ่งผลิตในประเทศไทยพบปริมาณ *cis*-resveratrol มากที่สุดคือ 1.52 $\mu\text{g/mL}$

2.1.1.2 ปริมาณสารประกอบ *trans*-resveratrol ในไวน์

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่าการตอบสนองของสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ต่อความเข้มข้นของ *trans*-resveratrol ในช่วง 0.08 - 12.0 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าเป็นเส้นตรงดีมาก ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.99898 - 1.00000 เฉลี่ย 0.99981 สำหรับค่า

เบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00032 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.03191 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก

เมื่อพิจารณา percent recovery *trans-resveratrol* ในไวน์ โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างไวน์ เมื่อตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่า percent recovery อยู่ในช่วง 99.76 - 100.09 เฉลี่ย 99.99 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.13 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.57 แสดงว่าสภาวะการทดลองนี้มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ *trans-resveratrol* ในไวน์มาก เนื่องจากค่า percent recovery มีค่าเฉลี่ยเข้าใกล้ 100 มาก พร้อมทั้งมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก เมื่อพิจารณาจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน ซึ่งมีค่าน้อยมาก

สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.02932 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อ $S/N = 3$

จากงานวิจัยครั้งนี้ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ของ *trans-resveratrol* ในไวน์ ด้วยเทคนิค HPLC เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสภาวะของเครื่อง HPLC ในการทดลองนี้ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้มีความไวในการตรวจวิเคราะห์ดีกว่า วิธีของ ลามูล่า - ราเวนทอส และวอเตอร์แฮสส์ ประมาณ

2 เท่า (Lamuela – Raventos & Waterhouse. 1993 : 521 – 523) ซึ่งลามูล่า - ราเวนทอส และวอเตอร์แฮสส์ ศึกษาหาปริมาณ resveratrol ในไวน์ California โดยใช้คอลัมน์ Novapack C_{18} ขนาด 3.9×150 mm อนุภาคบรรจุภายในขนาด $4 \mu\text{m}$ โปรแกรมการวิเคราะห์แบบเกรเดียนต์ สารละลายเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย A คือ orthophosphoric acid 0.2 M ปรับ pH ให้เท่ากับ 1.5 ด้วย ammonia และ B คือ A 20% ผสมกับ acetonitrile 80% อัตราการไหล 0.5 mL/min โดยใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 306 nm ผลการวิเคราะห์ *trans-resveratrol* ปรากฏที่รีเทนชันไทม์ประมาณ 14 – 17 นาที ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.05 mg/L และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ เพเล็ท ฟ็อนท์ และคูแนท (Pezet, Pont & Cuenat. 1994 : 191-197) พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ของ *trans-resveratrol* ในไวน์ ด้วยสภาวะการทดลองนี้มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ดีกว่าวิธีของ เพเล็ท ฟ็อนท์ และคูแนท ประมาณ 17 เท่า โดยงานวิจัยดังกล่าวใช้คอลัมน์ Lichrospher C_{18} ขนาด 4.5×250 mm อนุภาคที่บรรจุภายในขนาด $5 \mu\text{m}$ โปรแกรมการวิเคราะห์แบบเกรเดียนต์ สารละลายเฟสเคลื่อนที่ คือ methanol กับ formic acid เข้มข้น 50 mM ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 306 nm ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้เท่ากับ 5 $\text{ng}/10 \mu\text{L}$

การวิเคราะห์ปริมาณ *trans-resveratrol* ในไวน์ 5 เครื่องหมายการค้าด้วยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์เรียงลำดับจากน้อยไปมากดังนี้ TH1 IT2 IT1 FR1 และ TH2 เข้มข้น 0.68 1.23 1.29 1.99 และ 2.13 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.01 0.04

0.01 0.03 และ 0.06 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 1.42 2.82 0.47 1.30 และ 2.61 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาข้อมูลทางสถิติ พบว่ามีความแม่นยำดีมากและทำให้ทราบว่า ไวน์เครื่องหมายการค้า TH2 ซึ่งผลิตในประเทศไทย พบปริมาณ *trans-resveratrol* มากที่สุดคือ 1.52 µg/mL

2.1.1.3 ปริมาณรวมสารประกอบ *cis*- และ *trans-resveratrol* ในไวน์

พิจารณาปริมาณรวม *cis*- และ *trans-resveratrol* ในไวน์ เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ พบว่าไวน์ 5 เครื่องหมายการค้า เรียงลำดับจากน้อยไปมากดังนี้ TH1 IT2 IT1 FR1 และ TH2 เข้มข้น 0.78 1.76 2.25 2.97 และ 3.64 µg/mL ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.004 0.07 0.12 0.14 และ 0.09 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.50 4.04 5.11 4.73 และ 2.57 ตามลำดับ สังเกตได้ว่าไวน์ที่ผลิตในประเทศไทย (TH2) พบปริมาณ *resveratrol* มากที่สุด คือ 3.64 µg/mL

จากงานวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับของ ลามูล่า – ราเวนทอส และคณะ (Lamuela - Raventos, et al. 1995 : 281-283) และ แมททิวี่ เรเนียร์ และคอร์แฮมเมอร์ (Mattivi, Reniero & Korhammer. 1995 : 1820-1823) เนื่องจากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณ *trans-resveratrol* ในไวน์ มากกว่า *cis-resveratrol* ซึ่ง ลามูล่า – ราเวนทอส และคณะ ทำการศึกษาหาปริมาณ *cis*- และ *trans-resveratrol* ในไวน์แดง 18 ชนิด จากประเทศสเปน โดยใช้วิธีฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยตรงใช้คอลัมน์ชนิด reversed – phase พบว่าปริมาณ *cis-resveratrol* ในไวน์เข้มข้นอยู่ในช่วง 0.15 - 2.48 mg/L และ *trans-resveratrol* เข้มข้น 0.60 – 8.00 mg/L ตามลำดับ สำหรับ แมททิวี่ เรเนียร์ และคอร์แฮมเมอร์ ศึกษาปริมาณ *cis*- และ *trans-resveratrol* ในช่วงของการหมักไวน์ โดยใช้เทคนิค HPLC วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ *resveratrol* พบว่าวันสุดท้ายของการหมักไวน์ ปริมาณ *cis-resveratrol* เข้มข้น 22.40 µmol/mL และ *trans-resveratrol* เข้มข้น 27.10 µmol/L

2.1.2 เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

2.1.2.1 ปริมาณสารประกอบ *cis-resveratrol* ในไวน์

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าการตอบสนองของสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ต่อความเข้มข้นของ *cis-resveratrol* ในช่วง 0.03 – 3.93 µg/mL มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.99747 – 0.99998 เฉลี่ย 0.99960 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00066 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.06643 ตามลำดับ จากข้อมูลพบว่า ค่าตอบสนองการตรวจวัดเป็นเส้นตรงดีมาก เนื่องจากมีค่าเข้าใกล้ 1

เมื่อพิจารณา percent recovery ของสารประกอบ *cis-resveratrol* ในไวน์โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* ที่ทราบความเข้มข้นในตัวอย่างไวน์ เมื่อตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า percent recovery อยู่ในช่วง 99.87 – 100.98 เฉลี่ย 100.46 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.46 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.48

สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.06678 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อ $S/N = 3$ เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรีย์พบว่า เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรีย์ มีความว่องไวในการตรวจวัด *cis-resveratrol* ในไวน์ดีกว่าเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ประมาณ 5 เท่า ซึ่งการรายงานนี้ยังไม่มีผู้รายงานไว้

การวิเคราะห์ปริมาณ *cis-resveratrol* ในไวน์ 5 เครื่องหมายการค้า ด้วยเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ เรียงลำดับจากน้อยไปมากดังนี้ TH1 IT2 IT1 FR1 และ TH2 เข้มข้น 0.12 0.64 1.00 1.07 และ 1.55 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.004 0.04 0.02 0.03 และ 0.06 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 3.50 5.95 1.85 2.95 และ 3.58 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาข้อมูลทางสถิติที่ได้จากการทดลอง พบว่ามีความแม่นยำดีมากและทำให้ทราบว่า ไวน์เครื่องหมายการค้า TH2 ซึ่งผลิตในประเทศไทย พบปริมาณ *cis-resveratrol* มากที่สุดคือ 1.55 $\mu\text{g/mL}$

2.1.2.2 ปริมาณสารประกอบ *trans-resveratrol* ในไวน์

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าการตอบสนองของสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ต่อความเข้มข้นของ *trans-resveratrol* ในช่วง 0.08 – 12.00 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าเป็นเส้นตรงดีมาก ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.99899 – 0.99997 เฉลี่ย 0.99972 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00030 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.02991 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก

เมื่อพิจารณา percent recovery ของ *trans-resveratrol* ในไวน์โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างไวน์เมื่อตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า percent recovery อยู่ในช่วง 100.09 – 100.30 เฉลี่ย 100.16 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.09 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.09 แสดงว่าสภาวะการทดลองนี้มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ *trans-resveratrol* ในไวน์มาก เนื่องจาก percent recovery มีค่าสูงถึง 100.16 พร้อมทั้งมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก เมื่อพิจารณาจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน ซึ่งมีค่าน้อยมาก

สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.00068 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อ $S/N = 3$ เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรีย์ ที่สภาวะการทดลองเดียวกันพบว่า เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ มีความว่องไวกว่าเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรีย์ประมาณ 43 เท่า แสดงว่าสภาวะของเครื่อง HPLC ในการทดลองนี้ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์สารประกอบ *trans-resveratrol* ในไวน์ มากกว่า เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรีย์

จากงานวิจัยของ เพเล็ท พ็อนท์ และคูเนท (Pezet, Pont & Cuenat. 1994 : 191-197) ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นและไวน์ โดยเทคนิค HPLC ใช้คอลัมน์ Lichrospher C_{18} ขนาด 4.5 x 250 mm อนุภาคที่บรรจุภายในขนาด 5 μm

โปรแกรมการวิเคราะห์แบบเกรเดียน เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิดอัลตราไวโอเลต ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง 306 nm และเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ใช้ค่า ex : 330 nm และ em : 374 nm ผลปรากฏว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ของเครื่องตรวจวัดอัลตราไวโอเลต 5 ng/10 μ L และเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ 0.1 ng/10 μ L แสดงให้เห็นว่าเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ มีความไวในการตรวจวัด *trans-resveratrol* ดีกว่าเครื่องตรวจวัดอัลตราไวโอเลต ประมาณ 50 เท่า แต่งานวิจัยของ เพเล็ท ฟ็อน และคุนึทซ์ ไม่ได้รายงานการตรวจวัดสารประกอบ *cis-resveratrol* ไว้ด้วย

การวิเคราะห์ปริมาณ *trans-resveratrol* ในไวน์ 5 เครื่องหมายการค้า ด้วยเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ เรียงลำดับจากน้อยไปมากดังนี้ TH1 IT1 IT2 FR1 และ TH2 เข้มข้น 0.71 1.29 1.33 2.18 และ 2.18 μ g/mL ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.02 0.02 0.06 0.05 และ 0.03 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 2.47 1.59 4.23 2.23 และ 1.24 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้มีความแม่นยำดีมาก จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่าไวน์เครื่องหมายการค้า TH2 ซึ่งผลิตในประเทศไทย และ FR1 ผลิตในประเทศฝรั่งเศส พบปริมาณ *trans-resveratrol* เท่ากันคือ 2.18 μ g/mL

2.1.2.3 ปริมาณรวมสารประกอบ *cis-* และ *trans-resveratrol* ในไวน์

พิจารณาปริมาณของ *cis-* และ *trans-resveratrol* ในไวน์ เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าไวน์ 5 เครื่องหมายการค้า เรียงลำดับจากน้อยไปมากดังนี้ TH1 IT2 IT1 FR1 และ TH2 เข้มข้น 0.83 1.97 2.29 3.25 และ 3.75 μ g/mL ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.03 0.09 0.09 0.08 และ 0.07 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 3.10 4.56 3.86 2.59 และ 1.98 ตามลำดับ สังเกตได้ว่าไวน์ที่ผลิตในประเทศไทย (TH2) พบปริมาณ *resveratrol* มากที่สุดคือ 3.73 μ g/mL ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์

2.2 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ *resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล

2.2.1 เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์

2.2.1.1 ปริมาณสารประกอบ *cis-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *cis-resveratrol* ในตัวอย่างผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลที่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว พบว่าพีคของ *cis-resveratrol* ในโครมาโตแกรม ถูกรบกวนด้วยสารประกอบอื่นที่มีอยู่ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล จึงทำให้ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *cis-resveratrol* ได้ ดังภาพประกอบ 16 (หน้า 59) สาเหตุอาจเนื่องจาก สารประกอบที่มารบกวนนั้นไม่สามารถแยกออกจาก สารประกอบ *cis-resveratrol* ได้ ด้วยวิธีการเตรียมสารตัวอย่างดังกล่าว อีกทั้งสารเหล่านี้สามารถดูดกลืนคลื่นแสง ที่ 285 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นแสงที่ *cis-resveratrol* ดูดกลืน จึงทำให้พีคของ *cis-*

resveratrol ถูกบดบังด้วยฟีดของสารที่มารบกวน งานวิจัยนี้จึงไม่สามารถรายงานปริมาณ *cis-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลได้

2.2.1.2 ปริมาณสารประกอบ *trans-resveratrol* เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ พบว่าการตอบสนองของสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ต่อความเข้มข้นของ *trans-resveratrol* ในช่วง 0.08 – 12.00 µg/mL พบว่าเป็นเส้นตรงดีมาก ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.99831 – 0.99997 เฉลี่ย 0.99940 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 สำหรับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00095 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.09476 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก

เมื่อพิจารณา percent recovery ของ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลโดยการเติมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล นำไปผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างผลองุ่น เมื่อตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดแอรเรย์ พบว่า percent recovery อยู่ในช่วง 95.73 – 98.75 เฉลี่ย 97.23 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 1.10 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 1.14 แสดงว่าสภาวะการทดลองนี้มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลมาก เนื่องจาก percent recovery มีค่าเข้าใกล้ 100 พร้อมทั้งมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนเฉลี่ยร้อยละ 1.14

สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อยู่ที่ 0.0278 µg/mL เมื่อ S/N = 3

วิเคราะห์ปริมาณ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล ด้วยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ พบว่าเข้มข้น 0.83 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.04 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 4.47 ความแม่นยำของวิธีนี้อยู่ในเกณฑ์ดี เนื่องจากมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และร้อยละสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนมีค่าค่อนข้างต่ำ

2.2.2 เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

2.2.2.1 ปริมาณสารประกอบ *cis-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *cis-resveratrol* ในตัวอย่างผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลที่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว พบว่าไม่พบฟีดของ *cis-resveratrol* ในโครมาโตแกรมดังภาพประกอบ 18 (หน้า 61)

2.2.2.2 ปริมาณสารประกอบ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลเมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าการตอบสนองของสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ต่อความเข้มข้นของ *trans-resveratrol* ในช่วง 0.08 – 12.00 µg/mL พบว่าเป็นเส้นตรงดีมาก ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.99606 – 0.99990 เฉลี่ย 0.99815 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 สำหรับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00194 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.19466 แสดงให้เห็นว่ามีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก

เมื่อพิจารณา percent recovery ของ *trans-resveratrol* ในผลลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลโดยการเติมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างผลลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล นำไปผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างผลลองุ่น เมื่อตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า percent recovery อยู่ในช่วง 96.69 – 98.95 เฉลี่ย 97.93 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.80 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.82 แสดงว่าสภาวะการทดลองนี้มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ *trans-resveratrol* ในผลลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล เนื่องจากค่า percent recovery มีค่าเข้าใกล้ 100 พร้อมทั้งมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก เมื่อพิจารณาจาก ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนเพียงร้อยละ 0.82 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเครื่องตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดแอรเรย์ประมาณ 1 เท่า

สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อยู่ที่ 0.0016 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อ $S/N = 3$ เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องตรวจโฟโตไดโอดแอรเรย์ พบว่าเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ มีความไวในการตรวจวิเคราะห์ดีกว่า เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ประมาณ 17 เท่า จากการวิจัยทำให้ทราบว่า เมื่อใช้สภาวะของเครื่อง HPLC ในการทดลองนี้ตรวจวัด *trans-resveratrol* จากผลลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลที่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ฟลูออเรสเซนซ์ เป็นเครื่องตรวจวัดที่เหมาะสมกว่าโฟโตไดโอดแอรเรย์ เนื่องจากมีความไวในการตรวจวิเคราะห์ ที่ความเข้มข้นต่ำสุดดีกว่าถึงประมาณ 17 เท่า และโครมาโตแกรมที่ได้มี องค์ประกอบอื่นมารบกวนน้อยกว่าโครมาโตแกรมที่ได้จากการตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดแอรเรย์ เนื่องจากเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ มีความเฉพาะเจาะจงกว่าเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์

2.3 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา

2.3.1 เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์

2.3.1.1 ปริมาณสารประกอบ *cis-resveratrol* ในผลลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ พบว่าการตอบสนองของสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ต่อความเข้มข้น ของ *cis-resveratrol* ในช่วง 0.03 – 3.93 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าเป็นเส้นตรงดีมาก ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่าง 0.99986 – 0.99994 เฉลี่ย 0.99991 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 มาก สำหรับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00004 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.00420 แสดงให้เห็นว่ามีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก

เมื่อพิจารณา percent recovery ของ *cis-resveratrol* ในผลลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* ที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างผลลองุ่น เมื่อตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดแอรเรย์ พบว่า percent recovery อยู่ในช่วง 96.65 – 97.68 เฉลี่ย 97.12 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.42 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.43 แสดงว่าสภาวะการทดลองนี้มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ *cis-resveratrol* ในผลลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา เนื่องจากค่า percent recovery เข้าใกล้ 100 พร้อมทั้งมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก

เมื่อพิจารณาจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน ซึ่งมีค่าน้อยมาก

สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้เท่ากับ $0.0419 \mu\text{g/mL}$ เมื่อ $S/N = 3$

การวิเคราะห์ปริมาณ *cis-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาด้วยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่ามีความเข้มข้น 0.09 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.004 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 4.40

2.3.1.2 ปริมาณสารประกอบ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่าการตอบสนองของสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ต่อความเข้มข้นของ *trans-resveratrol* ในช่วง $0.08 - 12.00 \mu\text{g/mL}$ พบว่าเป็นเส้นตรงดีมาก ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่าง $0.99994 - 0.99999$ เฉลี่ย 0.99997 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 มาก สำหรับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00003 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.00260 แสดงให้เห็นว่ามีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก

เมื่อพิจารณา percent recovery ของ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา นำไปผ่านกระบวนการเตรียมผลองุ่น เมื่อตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่า percent recovery อยู่ในช่วง $97.87 - 99.13$ เฉลี่ย 98.35 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.46 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.47 แสดงว่าสภาวะการทดลองนี้มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา เนื่องจากค่า percent recovery มีค่าเข้าใกล้ 100 พร้อมทั้งมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก เมื่อพิจารณาจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน ซึ่งมีค่าน้อยมาก

สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้เท่ากับ $0.0401 \mu\text{g/mL}$ เมื่อ $S/N = 3$ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ *cis-resveratrol*

การวิเคราะห์ปริมาณ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาด้วยเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่ามีความเข้มข้น 0.29 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.01 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 4.20 จากการวิจัยนี้ ปริมาณ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา มีมากกว่า *cis-resveratrol* ประมาณ 3 เท่า

2.3.1.3 ปริมาณรวมสารประกอบ *cis-* และ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา

พิจารณาปริมาณรวม *cis-* และ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่า ผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา มี *resveratrol* เข้มข้น 0.38 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.01 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 2.52

2.3.2 เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

2.3.2.1 ปริมาณ *cis-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าการตอบสนองของสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ต่อความเข้มข้นของ *cis-resveratrol* ในช่วง 0.03 – 3.93 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าเป็นเส้นตรงดีมาก ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่าง 0.99279 – 0.99923 เฉลี่ย 0.99651 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00333 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.33457 แสดงให้เห็นว่ามีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก

เมื่อพิจารณา percent recovery ของ *cis-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน *cis-resveratrol* ที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างนำไปผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างผลองุ่น เมื่อตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า percent recovery อยู่ในช่วง 94.71 – 96.98 เฉลี่ย 95.68 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.98 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 1.02

สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.0590 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อ $S/N = 3$ เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ พบว่าเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ มีความว่องไวในการตรวจวัด *cis-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา ดีกว่าเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ประมาณ 1 เท่า จากการวิจัยครั้งนี้ ทำให้ทราบว่าเมื่อใช้สภาวะการทดลองนี้ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรเรย์ตรวจวิเคราะห์ *cis-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา เหมาะสมกว่าเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

การวิเคราะห์ปริมาณ *cis-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาด้วยเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่ามีความเข้มข้น 0.09 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.005 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 4.87 แสดงว่า การทดลองนี้มีความแม่นยำดีมาก

2.3.2.2 ปริมาณ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา

เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าการตอบสนองของสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ต่อความเข้มข้นของ *trans-resveratrol* ในช่วง 0.08 – 12.00 $\mu\text{g/mL}$ พบว่า เป็นเส้นตรงดีมาก ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่าง 0.99850 – 0.99990 เฉลี่ย 0.99941 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 มาก ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.00079 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.07865 แสดงให้เห็นว่ามีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก

เมื่อพิจารณา percent recovery ของ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน *trans-resveratrol* ที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่าง องุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา นำไปผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างผลองุ่น เมื่อตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า percent recovery อยู่ในช่วง 96.45 – 98.50 เฉลี่ย 97.26 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.69 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 0.71 แสดงว่าสภาวะการทดลองนี้มีความ

เหมาะสม ในการวิเคราะห์ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา เนื่องจากค่า percent recovery มีค่าเข้าใกล้ 100 พร้อมทั้งมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ดีมาก เมื่อพิจารณาจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน ซึ่งมีค่าน้อยมาก

สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.0018 µg/mL เมื่อ S/N = 3 เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ พบว่าเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ มีความไวในการตรวจวัด ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ของ *trans-resveratrol* ดีกว่า เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ประมาณ 22 เท่า จากการวิจัยครั้งนี้ ทำให้ทราบว่าเมื่อใช้สภาวะการทดลองนี้ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ ตรวจวิเคราะห์ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา เหมาะสมกว่าเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์

การวิเคราะห์ปริมาณ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาด้วยเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่ามีความเข้มข้น 0.29 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.01 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 3.93 แสดงว่าการทดลองนี้มีความแม่นยำดีมาก จากการวิจัยนี้ ปริมาณ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา มีมากกว่า *cis-resveratrol* ประมาณ 3 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์

2.3.2.3 ปริมาณรวมสารประกอบ *cis-* และ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา

พิจารณาปริมาณรวม *cis-* และ *trans-resveratrol* เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา มี *resveratrol* เข้มข้น 0.38 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.02 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนร้อยละ 5.12 จากผลการวิจัยพบว่าปริมาณ *resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลมีมากกว่า ผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา

จากการวิจัยของ จีนเด็ท เบสซิช และกอลเชอร์รอน (Jeandet, Besis & Gautheron. 1991 : 41-46) วิเคราะห์ประมาณ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นระยะต่างๆ โดยนำผลองุ่นสายพันธุ์ที่ติดเชื่อง่าย (*Vitis vinifera*) และองุ่นสายพันธุ์ที่ติดเชื่อยาก (*Vitis labrusca*) หลังจากเก็บเกี่ยวแล้วนำมาฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm นาน 15 นาที ต่อจากนั้นเก็บไว้ในที่มืดพร้อมกับกลุ่มควบคุมเป็นเวลา 16 ชั่วโมง และดำเนินการเตรียมตัวอย่าง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC โดยทำการเปลี่ยน *resveratrol* ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ trimethylsilyl ซึ่งมี octacosane เป็น internal standard ใช้คอลัมน์คอปิลลารี เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 mm ยาว 25 m เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิดเฟลมิออออไนเซชัน แก๊สดำพา คือ ไนโตรเจน ปรากฏว่า ผลองุ่นพันธุ์ *Vitis labrusca* จะพบ *resveratrol* มากกว่า *Vitis vinifera* ซึ่งองุ่นทั้ง 2 สายพันธุ์ จะพบ *resveratrol* ในปริมาณที่มากเมื่อผลยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่ และค่อยๆ ลดลงเมื่อผลสุก นอกจากนี้ ยังพบว่าในเปลือกมีมากกว่าในเนื้อ ผลองุ่นระยะ 3 สัปดาห์ สายพันธุ์ *Vitis vinifera* ในเปลือกพบ 50 – 60 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเปลือกสด 1 กรัม ขณะที่ในเนื้อพบต่ำกว่า 1 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเนื้อองุ่นสด 1 กรัม

สำหรับสายพันธุ์ *Vitis labrusca* พบในเปลือก 70 – 100 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเปลือกสด 1 กรัม ส่วนในเนื้อของผลองุ่นพบปริมาณ 3 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเนื้อองุ่นสด 1 กรัม

จากงานวิจัยของ เพซ็ท พ็อนท์ และ คูแนท (Pezet, Pont & Cuenat. 1994 : 191-197) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ resveratrol ในผลองุ่นสุกที่ติดเชื้อ *Plasmopara viticola* มาผ่านกระบวนการเตรียมผลองุ่น แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอรีย์ และฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าในผลองุ่นมีความเข้มข้นของ resveratrol 1.21 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม

จากงานวิจัยดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ resveratrol ในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่า ทั้งในผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัลและผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา มีปริมาณ resveratrol น้อยกว่ามาก อาจเนื่องมาจาก ผลองุ่นทั้ง 2 พันธุ์ เป็นผลองุ่นที่สมบูรณ์ไม่ติดเชื้อรา และไม่ได้นำไปฉายแสง UV จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พบปริมาณ resveratrol ในปริมาณที่ต่ำ

ตาราง 16 สรุปค่า limited of detection จากการวิจัย

สารตัวอย่าง และ isomers ของ resveratrol	LOD	LOD
	จาก DAD (µg/mL)	จาก FLD (µg/mL)
ไวน์		
- <i>cis</i> -resveratrol	0.01351	0.06678
- <i>trans</i> -resveratrol	0.02932	0.00068
ผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล		
- <i>trans</i> -resveratrol	0.02780	0.00160
ผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา		
- <i>cis</i> -resveratrol	0.04190	0.05900
- <i>trans</i> -resveratrol	0.04010	0.00180

ข้อเสนอแนะ

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ resveratrol ด้วยเทคนิค HPLC เมื่อใช้คอลัมน์สารละลายเฟสเคลื่อนที่ และอัตราการไหลที่สภาวะเดียวกับการทดลองนี้ เมื่อตรวจวิเคราะห์สารประกอบ *cis-resveratrol* ควรใช้เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 285 nm เนื่องจากมีความไวในการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ดีกว่าเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ สำหรับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ มีความเหมาะสมในการตรวจวัดสารประกอบ *trans-resveratrol* เนื่องจากมีความไวในการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ดีกว่า เครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดแอเรย์ที่ความยาวคลื่น 306 nm

2. สามารถประยุกต์ใช้วิธีการวิจัยนี้กับสารประกอบ phenolic ชนิดอื่นๆ

3. ค่าพารามิเตอร์ควรทำการเก็บข้อมูลทุกครั้งที่ทำการศึกษาด้วยเครื่องมือ

4. องุ่นเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ ให้ปริมาณสารประกอบ resveratrol ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า resveratrol มีผลต่อการลดระดับการสะสมของโคเลสเตอรอล (cholesterol) และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่เกิดจาก nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) และ adenosine-5'-diphosphate (ADP) ในตับ นอกจากนี้ ยังมีคุณสมบัติในการป้องกันโรคหัวใจเนื่องจากสามารถไปยับยั้งการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (inhibits

platelet aggregation) อีกด้วย

ดังนั้นจึงควรส่งเสริมให้ผู้บริโภค เห็นความสำคัญของการบริโภคองุ่นมากขึ้น โดยเฉพาะองุ่นที่ปลูกภายในประเทศ ซึ่งมีวางขายตามท้องตลาดทั่วไป มีอยู่ด้วยกัน 2 พันธุ์ คือ พันธุ์คาร์ดินัล (องุ่นดำ) และองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา (องุ่นเขียว) ซึ่งราคาถูกกว่าองุ่นที่นำเข้าจากต่างประเทศมาก และยังเป็นการส่งเสริมเกษตรกรไทยให้มีรายได้เพิ่มมากขึ้น

5. สามารถนำวิธีการตรวจวัดสารประกอบ resveratrol จากการวิจัยนี้ ไปเป็นส่วนหนึ่งของการเพิ่มคุณภาพ ของขั้นตอนการผลิตไวน์ เช่น การตรวจสอบปริมาณ resveratrol ขณะการหมักไวน์ เพื่อจะได้พัฒนาวิธีการหมักและบ่มไวน์ ที่ทำให้สูญเสียสาร resveratrol น้อยที่สุด นอกจากนี้ สามารถใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณ resveratrol ซึ่งใช้บอกปริมาณคุณค่าทางโภชนาการ ติดสลากไว้ข้างขวดระบุปริมาณ resveratrol เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผู้บริโภค

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- นันทวัน บุญยะประภัตร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2541). สมุนไพรพื้นบ้าน(5). กรุงเทพฯ: ประชาชน.
- นิพนธ์ วิจารณ์ เป็นผู้ให้สัมภาษณ์, อัจฉรา บัวชื่น เป็นผู้สัมภาษณ์, ที่ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อวันที่ 27 กันยายน 2544.
- ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรมมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (2527). *การปลูกองุ่น*. กรุงเทพฯ: ศูนย์ฯ.
- Arichi, H. et al. (1982). "Effects of Stilbene Components of the Roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.," *Chem. Pharm. Bull.* 30(5) : 1766-1770.
- Blache, D. et al. (1997). "Gas Chromatographic Analysis of Resveratrol in Plasma, Lipoproteins and Cells After in Vitro Incubations," *J.Chromatogr. B.* Vol 702 : 103-110.
- Carbo, N. et al. (1999). "Resveratrol, a Natural Product Present in Wine, Decreases Tumour Growth in a Rat Tumour Model," *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 254(3) : 739-743.
- Casabueno, A.C., & Pomolio, A.B. (1994). "Lignans and a Stilbene from *Festuca argentina*," *Phytochem.* 35(2) : 479-483.
- Cornford, C.A., Langcake, P. & Pryce, R.J. (1979). "Identification of Pterostilbene as a Phytoalexin from *Vitis vinifera* Leaves," *Phytochem.* Vol.18 : 1025-1027.
- Goldberg, D.M. et al. (1995). "Direct Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Method to Assay *cis*-Resveratrol in Wines : Preliminary Survey of Its Concentration in Commercial Wines," *J. Agric. Food Chem.* 43(5) : 1245-1250.
- Hanawa, F., Taharo, S. & Mizutani, J. (1992). "Antifungal Stress Compounds from *Veratrum grandiflorum*," *Phytochem.* 31(9) : 3005-3007.
- Harborne, J.B., Baxter, H. & Moss, G.P. (1999). *Phytochemical Dictionary*. London : Academic Press.
- Jang, M. et al. (1997). "Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes," *Science*. Vol.275 : 218-220.
- Jayatilake, G.S. et al. (1993). "Kinase Inhibitors from *Polygonum cuspidatum*," *J. Nat. Prod.* 56(10) : 1805-1810.

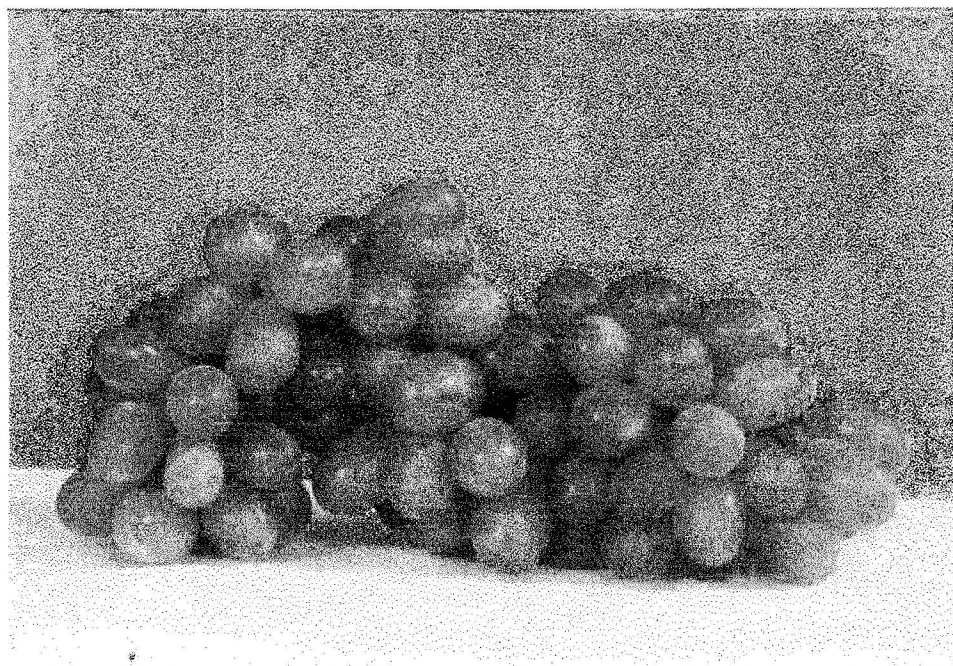
- Jeandet, P., Bessis, R. & Gautheron, B. (1991). "The Production of Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by Grape Berries in Different Developmental Stages," *Am. J. Enol. Vitic.* 42(1) : 41-46.
- Jeandet, P. et al. (1995). "Resveratrol Content of Wine of Different Ages : Relationship With Fungal Disease Pressure in the Vineyard," *Am. J. Enol. Vitic.* 46(1) : 1-4.
- Juan, M.E. et al. (1999). "Determination of *trans*-Resveratrol in Plasma by HPLC," *Anal. Chem.* 71(3) : 747-750.
- Kimura, Y. et al. (1983). "Effect of Stilbene Components of Roots of *Polygonum* ssp in Liver Injury in Peroxidized Oil-fed Rats," *J. Med. Plant Res.* Vol.49 : 51-54.
- Kimura, Y., Okuda, H. & Arichi, S. (1985). "Effects of Stilbenes on Arachidonate Metabolism in Leukocytes," *Biochimica et Biophysica Acta* . Vol.834 : 275-278.
- Korhammer, S., Reniero, F. & Mattivi, F. (1995). "An Oligostilbene from Vitis Roots," *Phytochem.* 38(6) : 1501-1504.
- Kumar, R.J. et al. (1988). "Phenanthrene and Stilbenes from *Pterolobium hexapetalum*," *Phytochem.* 27(11) : 3625-3626.
- Lamuela-Raventos, R.M. et al. (1995). "Direct HPLC Analysis of *cis*- and *trans*-Resveratrol and Piceid Isomers in Spanish Red *Vitis Vinifera* Wines," *J. Agric. Food Chem.* 43(2) : 281-283.
- Lamuela-Raventos, R.M. & Waterhouse, A.L. (1993). "Occurrence of Resveratrol in Selected California Wines by a New HPLC Method," *J. Agric. Food Chem.* 41(4) : 521-523.
- Langcake, P. & Pryce, R.J. (1976). "The Production of Resveratrol by *Vitis vinifera* and Other Members of the Vitaceae as a Response to Infection or Injury," *Physiol. Plant Pathol.* Vol.9 : 77-86.
- Mannila, E., Talritic, A. & Kolehmainen, E. (1993). "Anti-Leukaemic Compounds Derived from Stilbenes in *Picea abies* Bark," *Phytochem.* 33(4) : 813-816.
- Mattivi, F., Reniero, F. & Korhammer, S. (1995). "Isolation, Characterization, and Evolution in Red Wine Vinification of Resveratrol Monomers," *J. Agric. Food Chem.* 43(7) : 1820-1823.
- McMurtrey, K.D. et al. (1994). "Analysis of Wines for Resveratrol Using Direct Injection High-Pressure Liquid Chromatography with Electrochemical Detection," *J. Agric. Food Chem.* 42(10) : 2077-2080.

- Pezet, R., Pont, V. & Cuenat, P. (1994). "Method to Determine Resveratrol and Pterostilbene in Grape Berries and Wines using High-Performance Liquid Chromatography and Highly Sensitive Fluorimetric Detection," *J. Chromatogr A*. Vol.663 : 191-197.
- Powell, R.G. et al. (1994). "Isolation of Resveratrol from *Festuca versuta* and Evidence for the Widespread Occurrence of this Stilbene in the Poaceae," *Phytochem.* 35(2) : 335-338.
- Pryce, R.J. & Langcake, P. (1977). " α -Vitiferin : an Antifungal Resveratrol Trimer from Grapevines," *Phytochem.* Vol.16 : 452-454.
- Regione, F.D. et al. (1998). "Resveratrol Arrests the Cell Division Cycle at S/G2 Phase Transition," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250(1) : 53-58.
- Siemann, E.H. & Creasy, L.L. (1992). "Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine," *Am. J. Enol. Vitic.* 43(1) : 49-52.
- Trela, B.C. & Waterhouse, A.L. (1996). "Resveratrol : Isomeric Molar Absorptivities And Stability," *J. Agric. Food Chem.* 44(5) : 1253-1257.
- Walter, B. (1996). *Handbook of Organic Chemistry*. London : Prentice Hall.
- Waterhouse, A.L. & Lamuela-Raventos, R.M. (1994). "the Occurrence of Piceid, A Stilbene Glucoside, in Grape Berries," *Phytochem.* 37(2) : 571-573.

ภาคผนวก



ภาพประกอบ 22 ผลองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล



ภาพประกอบ 23 ผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา

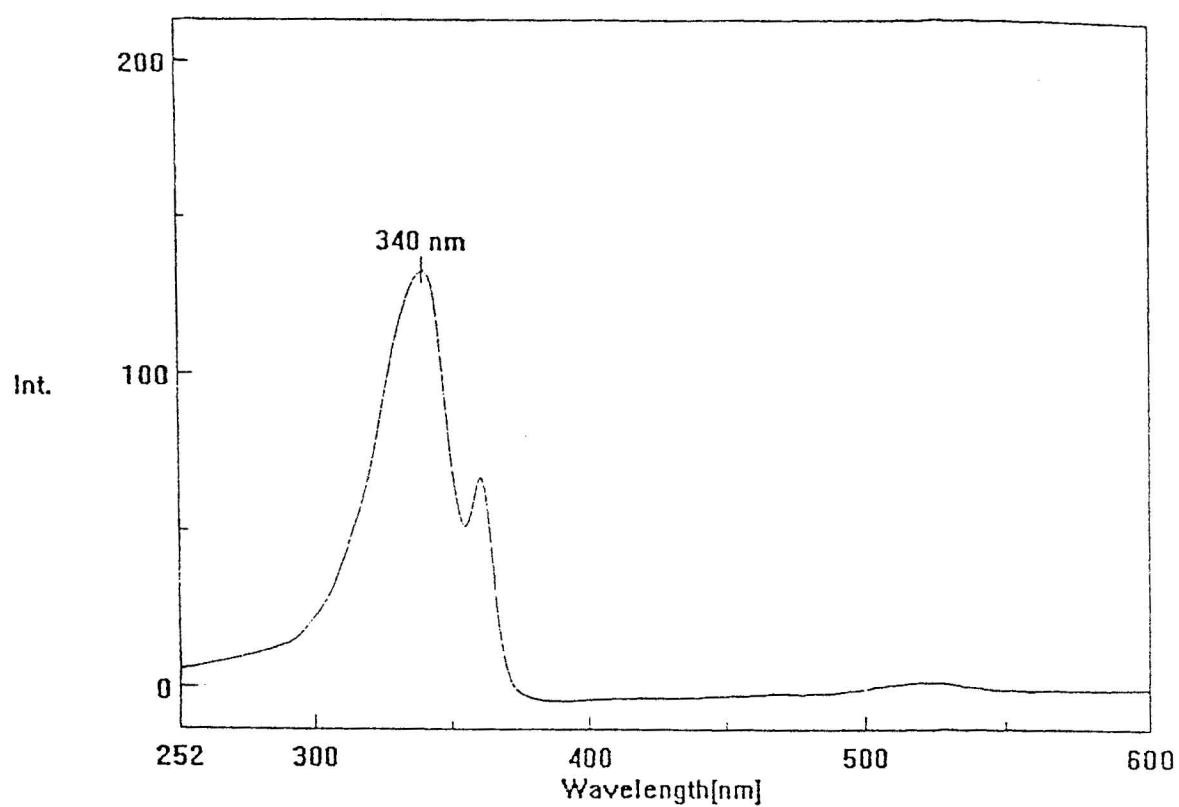
น้ำหนักรสของน้ำที่ใช้วิจัย

ตาราง 17 แสดงน้ำหนักของน้ำที่คาร์ดินัลในการสกัด resveratrol แต่ละครั้ง

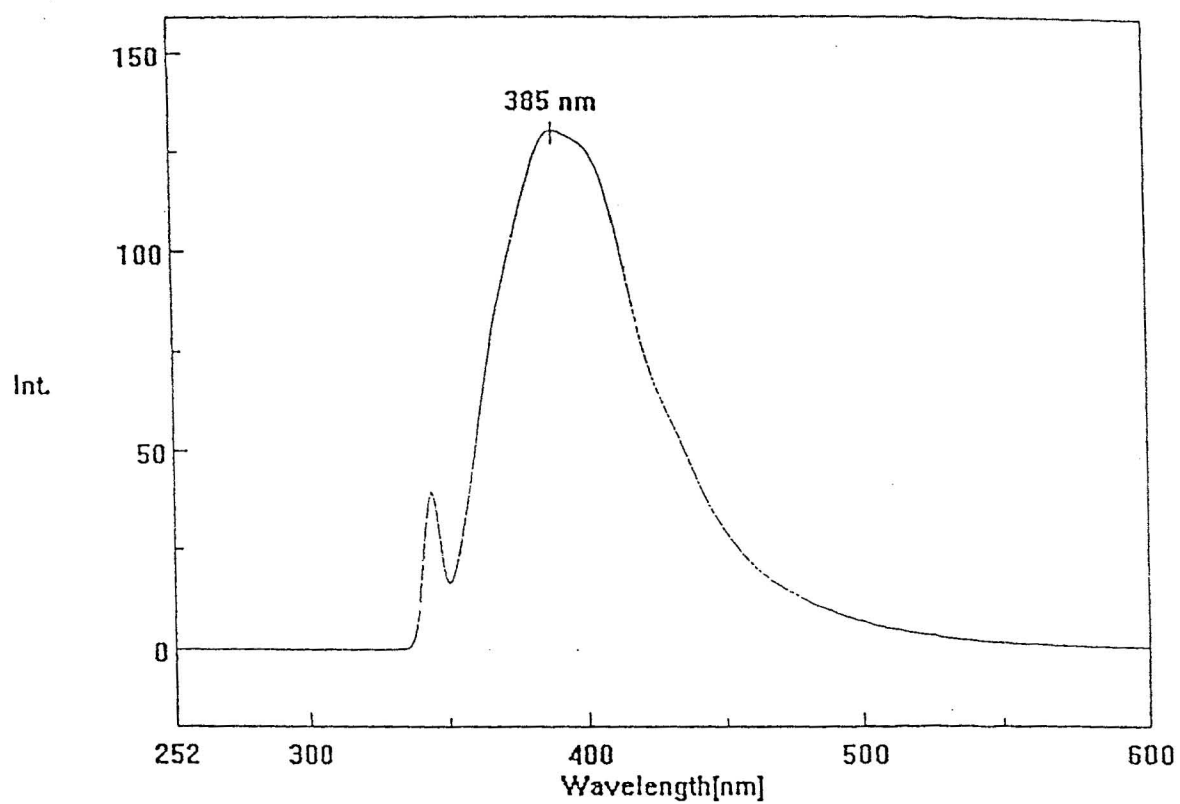
ลำดับที่	ผลของน้ำ	ผลของน้ำ + trans	ผลของน้ำ + cis	ผลของน้ำ + MeOH 40%
	(g)	(g)	(g)	(g)
1	10.5772	10.4719	10.6025	10.5120
2	10.6368	10.7520	10.5711	10.8215
3	10.6703	10.6583	10.7955	10.6772
4	10.5646	10.6124	10.7182	10.7025
5	10.5914	10.6165	10.6544	10.7051
6	10.7110	10.8120	10.5973	10.5900

ตาราง 18 แสดงน้ำหนักของน้ำที่คาร์ดินัลในการสกัด resveratrol แต่ละครั้ง

ลำดับที่	ผลของน้ำ	ผลของน้ำ + trans	ผลของน้ำ + cis	ผลของน้ำ + MeOH 40%
	(g)	(g)	(g)	(g)
1	10.6391	10.7102	10.5449	10.5989
2	10.7589	10.6938	10.8201	10.7258
3	10.8780	10.8579	10.7340	10.8388
4	10.8586	10.7956	10.6783	10.6890
5	10.7370	10.7524	10.5891	10.7657
6	10.5774	10.5097	10.6695	10.4815

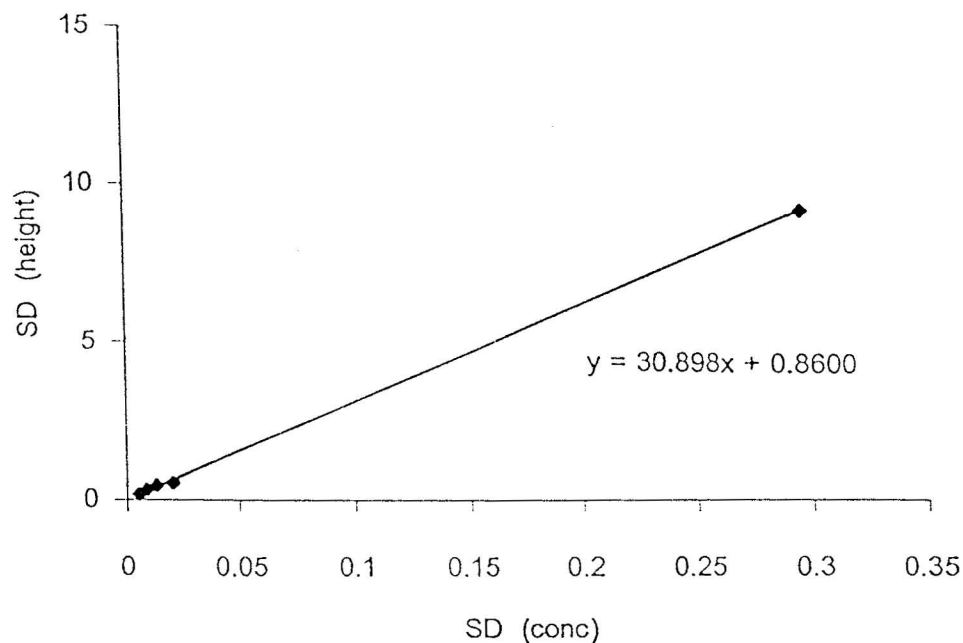


ภาพประกอบ 24 Excitation Spectrum ของ *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene เมื่อใช้สารละลายผสมอัตราส่วนระหว่าง acetonitrile 25% : glacial acetic acid ในน้ำ (1 : 40) 75%

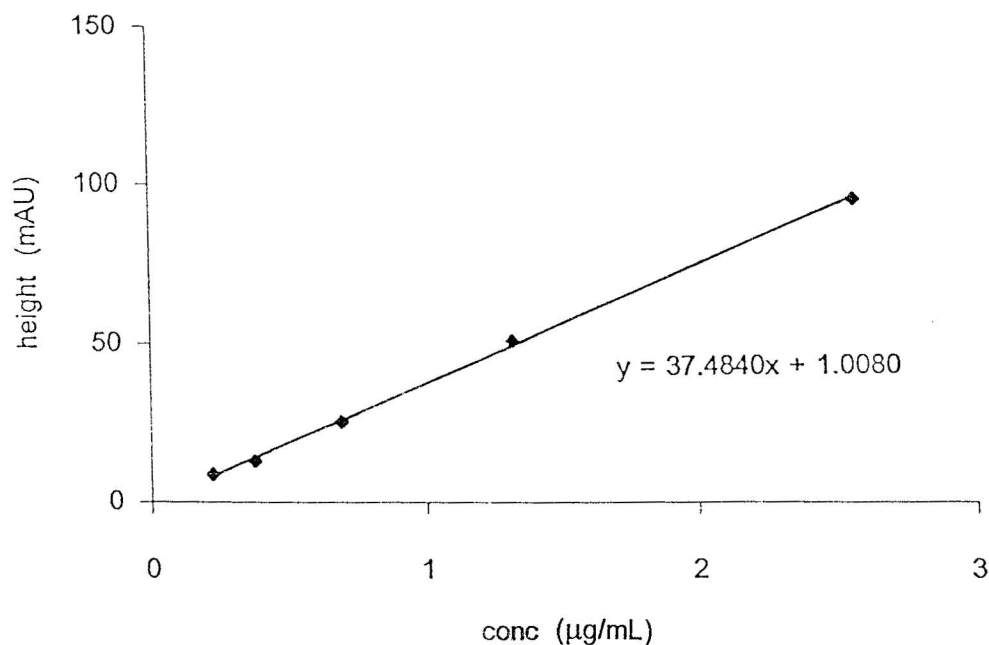


ภาพประกอบ 25 Emission Spectrum ของ *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene เมื่อใช้สาร
ละลายผสมอัตราส่วนระหว่าง acetonitrile 25% : glacial acetic acid ในน้ำ (1 : 40) 75%

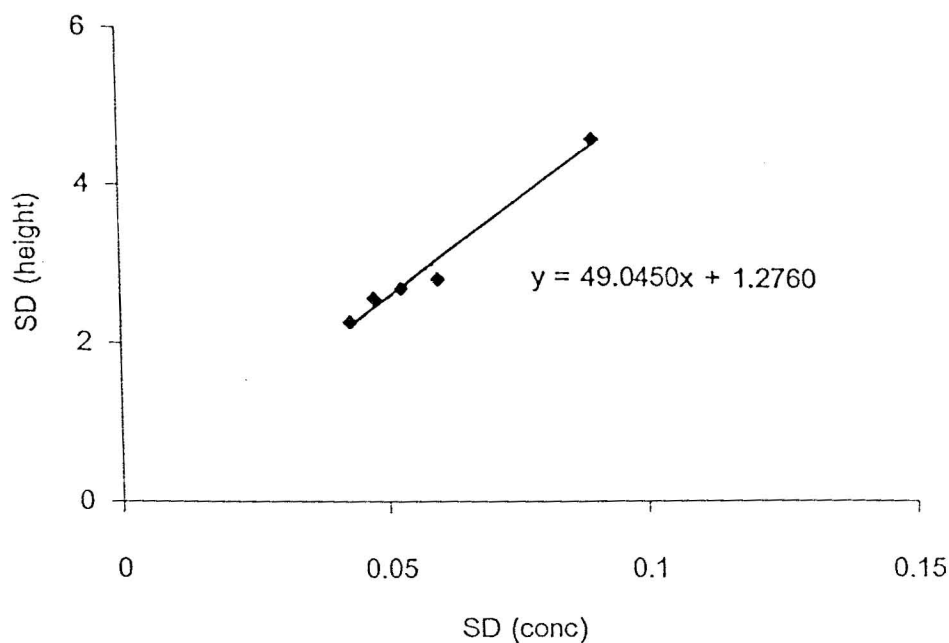
ตัวอย่างกราฟเส้นตรง และสมการเส้นตรงในการทำ detection limit



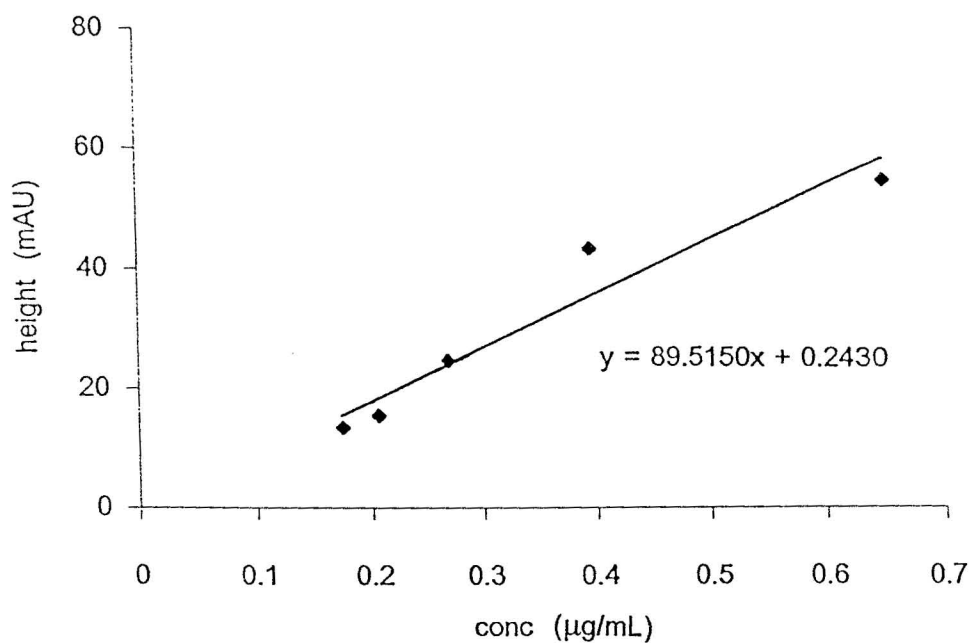
ภาพประกอบ 26 กราฟเส้นตรงระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height กับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น ของ *cis-resveratrol* ในผลล่องนพันธุ์ไวท์มะละกา โดยเทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออโรไดโอดแอเรย์



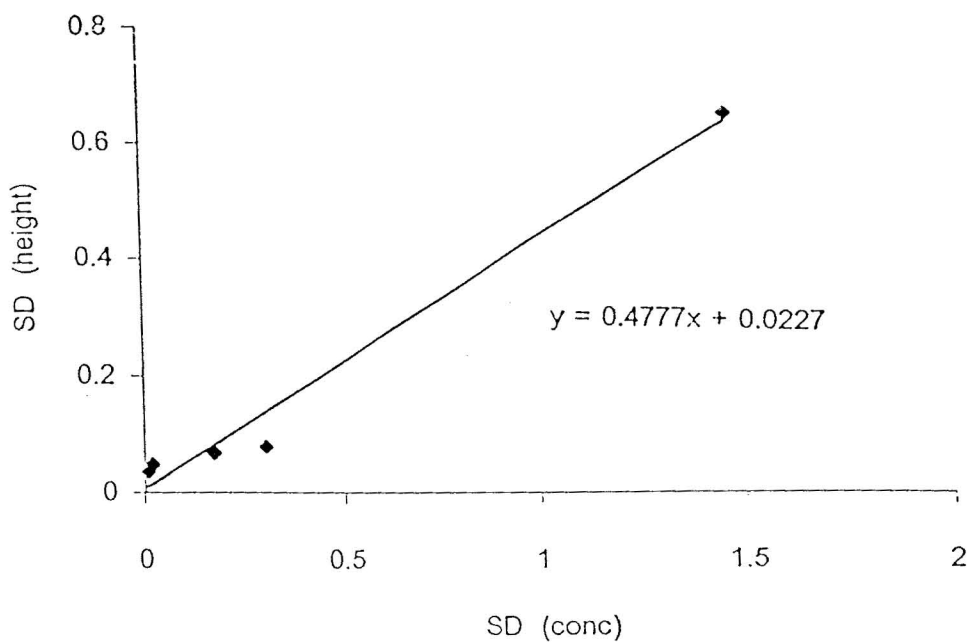
ภาพประกอบ 27 กราฟเส้นตรงแสดง detection limit ของ *cis-resveratrol* ในผลล่องนพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออโรไดโอดแอเรย์



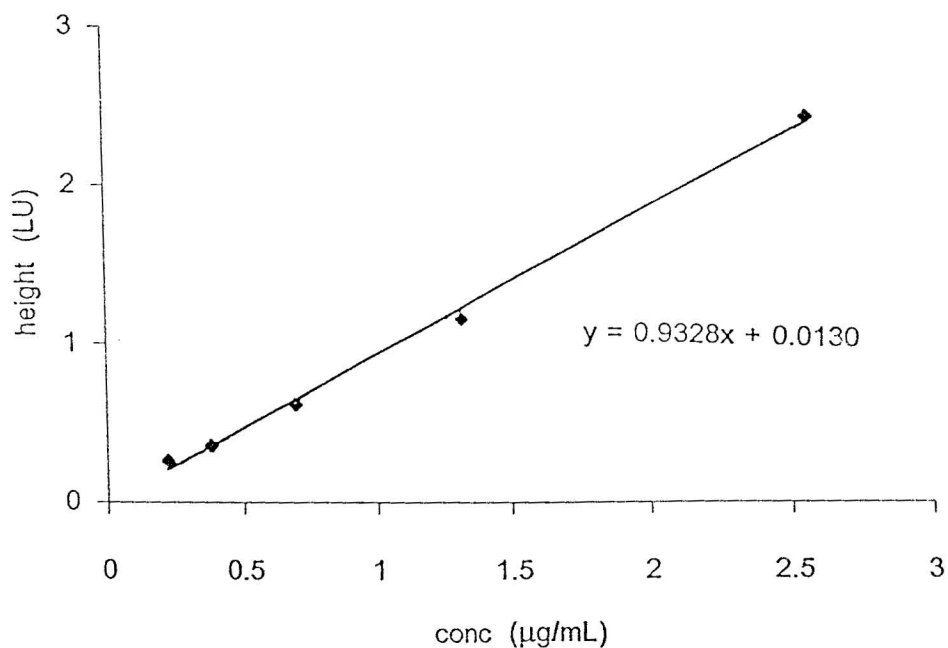
ภาพประกอบ 28 กราฟเส้นตรงระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height กับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น ของ *trans-resveratrol* ในผลลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยเทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออโรไดโอดแอเรย์



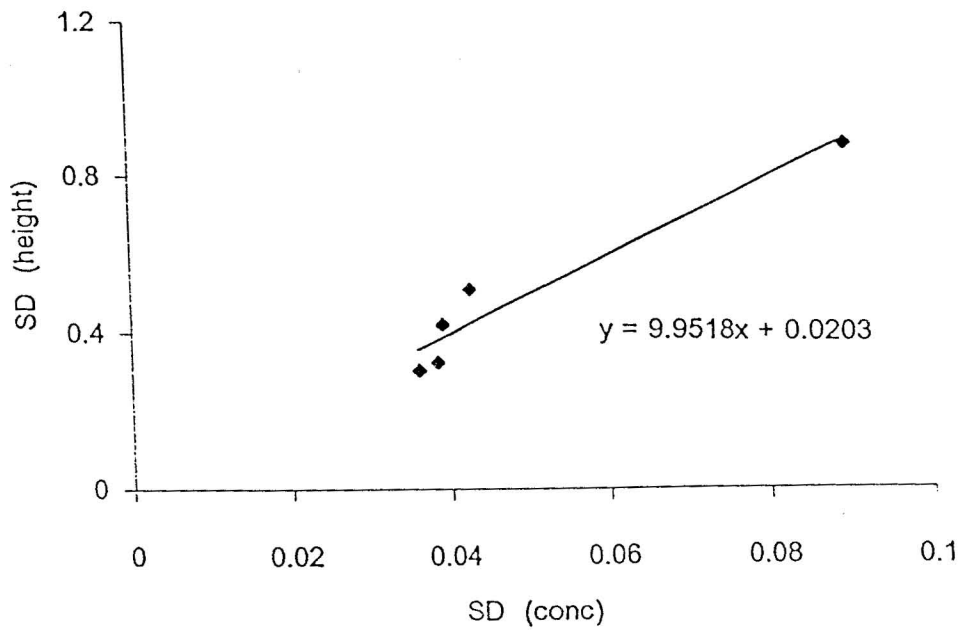
ภาพประกอบ 29 กราฟเส้นตรงแสดง detection limit ของ *trans-resveratrol* ในผลลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออโรไดโอดแอเรย์



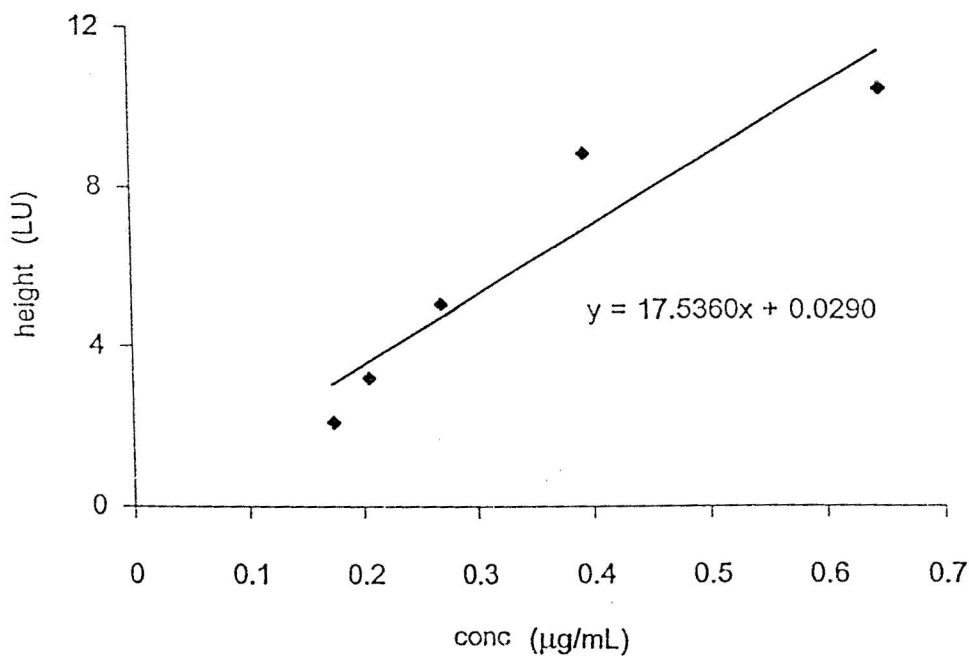
ภาพประกอบ 30 กราฟเส้นตรงระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height กับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น ของ *cis-resveratrol* ในผลล่องน้พันธุ์ไวท์มะละกา โดยเทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์



ภาพประกอบ 31 กราฟเส้นตรงแสดง detection limit ของ *cis-resveratrol* ในผลล่องน้พันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์



ภาพประกอบ 32 กราฟเส้นตรงระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak height กับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น ของ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยเทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์



ภาพประกอบ 33 กราฟเส้นตรงแสดง detection limit ของ *trans-resveratrol* ในผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ สกุล	นางสาวอัจฉรา บัวชื่น
วันเดือนปีเกิด	5 ตุลาคม 2516
สถานที่เกิด	อำเภอหันคา จังหวัดชัยนาท
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	194 หมู่ 6 ตำบลสุขเดือนห้า กิ่งอำเภอเนินขาม จังหวัดชัยนาท
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	อาจารย์ 1 ระดับ 4
สถานที่ทำงาน	โรงเรียนกาญจนาภิเษกวิทยาลัย อุทัยธานี กรมสามัญศึกษา
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2533	มัธยมศึกษาปีที่ 3 จากโรงเรียนเนินขามรัฐประชานุเคราะห์
พ.ศ. 2535	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนคุรุประชาสรรค์
พ.ศ. 2538	คบ. (เคมี) จากสถาบันราชภัฏกำแพงเพชร
พ.ศ. 2545	กศ.ม. (เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร