การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพรบางชนิด ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ปริญญานิพนธ์

ของ

วชิราพรรณ บวรชาติ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กรกฎาคม 2559

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพรบางชนิด ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ปริญญานิพนธ์

ของ

วชิราพรรณ บวรชาติ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กรกฎาคม 2559

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพรบางชนิด ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

บทคัดย่อ

ของ

วชิราพรรณ บวรชาติ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กรกฎาคม 2559

วชิราพรรณ บวรชาติ. (2559). *การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพรบางชนิด ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.* ปริญญานิพนธ์ วท.ม.(เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพรจากพืช 5 ชนิด ได้แก่ ฝาง หญ้าหวาน ตะไคร้ รากสามสิบ และเหงือกปลาหมอ โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอร์เรย์ ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ การใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นกรดแอซีติกความเข้มข้น 5% และอะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 85.5:14.5 โดยปริมาตร ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 324 นาโนเมตร ผลการประเมินความใช้ได้ของวิธีการทดลอง พบว่า ให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) ของกรดไฮดรอกซีซินนามิก 4 ตัวที่ทำการวิเคราะห์อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.08-0.15 และ 0.20-0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 2-100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง ($R^2 \approx 0.9993 - 0.9997$) ให้ค่าร้อยละการกลับคืนของกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดอยู่ในช่วง 83.54-96.45 ค่าร้อยละของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (%RSD) อยู่ในช่วง 0.49-1.45 นอกจากนี้ได้ศึกษาและพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกโดยใช้วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD) ผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างของวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion ได้แก่ ชนิดของวัฏภาคของแข็ง คือ สารผสมระหว่างออกตะเดคซิลและซิลิกา ในอัตราส่วน 1:1 ในการผสมตัวอย่างจะใช้อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็งเท่ากับ 1:2 ทำการผสมตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็งใช้เวลานาน 30 วินาที ใช้ 80% เมทานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตรเป็นสารชะกรดไฮดรอกซีซินนามิก เมื่อนำวิธีการตรวจสอบไปวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างในตัวอย่างพืชสมุนไพร พบว่า ตัวอย่างพืชสมุนไพรตรวจพบกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกอยู่ในช่วง 28.54±0.21-1114.55±0.70 12.86±0.53-37.98±0.36 10.49±0.71-14.27±0.34 และ 8.41±0.93-56.17±0.89 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

DETERMINATION OF HYDROXYCINNAMIC ACID CONTENTS IN SOME MEDICINAL PLANT BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE

AN ABSTRACT

BY

WACHIRAPHUN BOVORNCHART

Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the

Master of Science Degree in Chemistry

at Srinakharinwirot University

July 2016

Wachiraphun Bovornchart. (2016). *Determination of hydroxycinnamic acid contents in some medicinal plant by high performance liquid chromatography technique.* Master thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee. Associate Professor Dr.Pornpimol Muangthai.

The objective of this research was to analyze the hydroxycinnamic acid content in five types of medicinal plants (*Caesalpinia sappan* Linn., *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Cymbo pogon citratus* (DC.) Stapf, *Asparagus racemosus* Willd. and *Acanthus ebracteatus* Vahl.) by high performance liquid chromatography coupled with a diode array detector. The optimization of the experimental conditions for the purpose of analysis were also studied. The best mobile phase system was determined to be 5% acetic acid:acetonitrile with ratio of 85.5:14.5 v/v, controlled flow rate as 1.0 ml/min and a detection wavelength of 324 nm. With regard to the validation of the proposed method, it was found that the limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) for the four acids were determined to be in the range of 0.08-0.15 and 0.20-0.50 mg/L were respectively obtained. The linearity of the four acids was determined to be the in range of 2-100 mg/L with a high correlation coefficient ($R^2 \approx 0.9993 - 0.9997$). The percentage recoveries of four hydroxycinnamic acids were in the range of 83.54-96.45. The relative standard deviations (%RSD) were in the range of 0.49-1.45. The optimization of the experimental conditions for the preparation of the sample to analyze the hydroxycinnamic acid contents by matrix solid phase dispersion (MSPD) were also studied. The results reuealed that the optimization of the experimental conditions of matrix solid phase dispersion used C18 mixed with silica in a 1:1 as the adsorbent, blending the sample with the adsorbent at 1:2 within 30 seconds, using 3 ml of 80% methanol as eluent. This method was applied to analyse the hydroxycinnamic acid in medicinal plant samples and revealed that medicinal plants contained chlorogenic acid caffeic acid *p*-coumaric acid and ferulic acid in the range of 28.54±0.21-1114.55±0.70 12.86 ±0.53-37.98±0.36 10.49±0.71-14.27±0.34 and 8.41±0.93-56.17±0.89 mg/L, respectively.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพรบางชนิด
ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
ของ
วชิราพรรณ บวรชาติ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....รักษาการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร)
วันที่..... เดือน.....พ.ศ. 2559

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน
(อาจารย์ ดร.ณิชนันทน์ เทพศุภรังษิกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุจิตรา ศรีสังข์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับคำแนะนำ ความอนุเคราะห์จากคณาจารย์ในภาควิชาเคมี ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ ช่วยแก้ไขปัญหาในการทำงานวิจัย ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์นี้แก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดี อีกทั้งทำให้ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์ ได้เรียนรู้และเห็นคุณค่าของงานวิจัย

ขอขอบพระคุณดร.ณิชนันทน์ เทพศุภรังษิกุล ประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และ ดร.สุจิตรา ศรีสังข์ กรรมการควบคุมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่อง เพื่อให้ปริญญานิพนธ์นี้มีความสมบรูณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ทางเคมี ขอขอบคุณเจ้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมีทุกคน ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัย

ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา และญาติสนิททุกท่านที่ได้อบรมเลี้ยงดู ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัย ขอบพระคุณอาจารย์ รวมถึงผู้มีพระคุณทุกๆ ท่านที่มิได้กล่าวรายนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

วชิราพรรณ บวรชาติ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง……	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย……	2
ความสำคัญของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
สารประกอบฟีนอลิก……..	4
วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก.....	9
พืชสมุนไพร.....	12
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย……	23
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย……	23
ตัวอย่างพืชสมุนไพร.....	24
ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง……	24
การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์.....	25
ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก ในตัวอย่างพืชสมุนไพร.....	26
การศึกษาผลของสารรบกวนของการวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซินนามิก.....	29
การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร.....	30
4 ผลการทดลอง	31
ตอนที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง……..	31

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

4 (ต่อ)

ศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่..... 31

อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่..... 34

ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์..... 37

การสร้างกราฟมาตรฐาน..... 37

ศึกษาค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ)..... 39

ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์..... 39

ศึกษาความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์..... 40

ตอนที่ 3 ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร..... 41

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD)..... 41

การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD) ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลว (LLE) และวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลวแล้วตามด้วยวิธีการสกัดแบบดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน (LLE-DLLME)..... 46

ตอนที่ 4 การศึกษาผลของสารรบกวนของการวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซินนามิก 47

ตอนที่ 5 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร 48

5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ..... 50

บรรณานุกรม..... 53

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

ภาคผนวก..... 59

ภาคผนวก ก..... 60

ภาคผนวก ข..... 62

ภาคผนวก ค..... 66

ประวัติย่อผู้วิจัย..... 69

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกกรดไฮดรอกซีซินนามิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	36
2	ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง	38
3	ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ)	39
4	ค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ในตัวอย่างพืชสมุนไพร	39
5	ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์	40
6	ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร	49

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 ชนิดของสารประกอบฟีนอลิก..... 5

2 โครงสร้างทางเคมีของกรดคลอโรจีนิก..... 6

3 โครงสร้างทางเคมีของกรดคาเฟอิก..... 7

4 โครงสร้างทางเคมีของกรดพาราคูมาริก..... 7

5 โครงสร้างทางเคมีของกรดเฟอร์รูลิก..... 8

6 ขั้นตอนการสกัดแบบ matrix solid phase dispersion..... 10

7 ขั้นตอนการสกัดด้วยวิธีดิพเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแอคชัน..... 11

8 ขั้นตอนการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว..... 12

9 โครมาโทแกรมของกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด ที่ได้จากการศึกษา
องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ (กรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่อเมทานอล)..... 32

10 โครมาโทแกรมของกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด ที่ได้จากการศึกษา
องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ (กรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่ออะซีโตไนไตรล์) 33

11 ผลการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่..... 34

12 โครมาโทแกรมของกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด ที่ได้จากการศึกษา
อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่..... 35

13 แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์
ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก..... 37

14 กราฟมาตรฐานของกรดไฮดรอกซีซินนามิก..... 38

15 ผลการศึกษาชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่..... 41

16 ผลการศึกษาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็ง..... 42

17 ผลการศึกษาเวลาในการบดตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็ง..... 43

18 ผลการศึกษาชนิดตัวชะสาร..... 44

19 ผลการศึกษาปริมาตรของตัวชะ..... 45

20 ผลการศึกษาการเปรียบเทียบเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง..... 46

21 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานของกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก
กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกที่เติมสารรบกวน 3 ชนิด..... 48

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

22 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD)..... 61

23 โครมาโทแกรมตัวอย่างหญ้าหวาน..... 63

24 โครมาโทแกรมตัวอย่างรากสามสิบ..... 63

25 โครมาโทแกรมตัวอย่างฝาง..... 64

26 โครมาโทแกรมตัวอย่างตะไคร้..... 64

27 โครมาโทแกรมตัวอย่างเหงือกปลาหมอ..... 65

28 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอร์เรย์ (จากบริษัท Hewlett-Packard รุ่น HP 1100)..... 67

29 เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน..... 67

30 เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง..... 68

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันประชาชนทั่วไปให้ความสำคัญกับการดูแลสุขภาพมากขึ้น พืชสมุนไพร จัดเป็นพืชสำคัญที่คนไทยนำมาใช้ประโยชน์ เช่น ในการรักษาโรค ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร ใช้ในการผลิตเครื่องสำอาง เป็นต้น พืชสมุนไพรนั้นเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) หลายชนิด และยังอุดมไปด้วยเกลือแร่ และวิตามิน ซึ่งให้คุณค่าและประโยชน์ต่อร่างกายโดยตรง ปกติสารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสะหรือต้านการเกิดออกซิเดชันที่มีบทบาทในการป้องกันการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบหวาน โรคมะเร็ง และชะลอความชรา เป็นต้น (ณัษฐภรณ์ ไม่อ่อนมือ. 2552)

สารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ตามธรรมชาติมีหลายกลุ่ม ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่พบจะเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เช่น ฟลาโวน (flavone) ไอโซฟลาโวน (isoflavone) ฟลาโวนอล (flavonol) และฟลาวาโนน (flavonone) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่มกรดฟีนอลิก (phenolic acid) เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) กรดโปโตคาเทชูอิก (protocatechuic acid) กรดคาเฟอิก (caffeic acid) กรดเฟอร์รูลิก (ferulic acid) และกรดคลอโรจีนิก (chlorogenic acid) กรดพาราคูมาริก (*p*-coumaric acid) เป็นต้น แหล่งที่พบ คือ พืชและผลไม้ (ณัษฐภรณ์ ไม่อ่อนมือ. 2552) พืชที่เป็นสมุนไพรมีสรรพคุณทางยาค่อนข้างสูงมีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น ชาตะไคร้ มะตูม ปอกระบิด หญ้าหวาน และ รากสามสิบ เป็นต้น ทั้งนี้ในพืชสมุนไพรจะพบสารสำคัญโดยเฉพาะสารในกลุ่มกรดฟีนอลิก ที่สำคัญหลายชนิด แต่ที่น่าสนใจ คือ กรดฟีนอลิกในกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก เนื่องจากกรดไฮดรอกซีซินนามิกนั้นเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพซึ่งสามารถป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็ง และโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคหัวใจ นอกจากนี้ยังสามารถช่วยชะลอความชราตลอดจนสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้

จากความสำคัญที่กล่าวมาข้างต้นสารฟีนอลิกในกลุ่มของกรดไฮดรอกซีซินนามิกนั้นมีความน่าสนใจอย่างมาก ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐาน ซึ่งสามารถนำผลไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยด้านอื่นๆ ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ ด้านสุขอนามัย ด้านเศรษฐกิจและประโยชน์ด้านอื่นๆ ต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก

2. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

3. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก

4. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทราบวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2. ทราบวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

3. ทราบปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก

4. ทราบปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

ขอบเขตของการวิจัย

1. กรดไฮดรอกซีซินนามิกที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ กรดคลอโรจีนิก กรดพาราคูมาริก กรดคาเฟอิก และกรดเฟอร์รูลิก ส่วนพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ฝางเสน หญ้าหวานตะไคร้ รากสามสิบ และเหงือกปลาหมอ

2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2.1 ศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

2.2 ศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

3. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ (Method of validation)

3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range)

3.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection, LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of quantitation, LOQ)

3.3 ค่าความถูกต้อง (% Recovery)

3.4 ค่าความแม่นยำ (% RSD)

4. ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร โดยทำการศึกษา 3 วิธี ได้แก่

4.1 การสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ Matrix solid phase dispersion (MSPD)

4.2 การสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว (LLE)

4.3 การสกัดด้วยวัฏภาคของเหลวแล้วตามด้วยวิธีสกัดแบบดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน (liquid-liquid extraction followed by a dispersive liquid-liquid microextrction (LLE-DLLME))

5. ศึกษาผลของสารรบกวนของการวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซินนามิก

6. นำวิธีการวิเคราะห์และวิธีการเตรียมตัวอย่างไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1. สารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิก
2. วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก
3. พืชสมุนไพร
4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

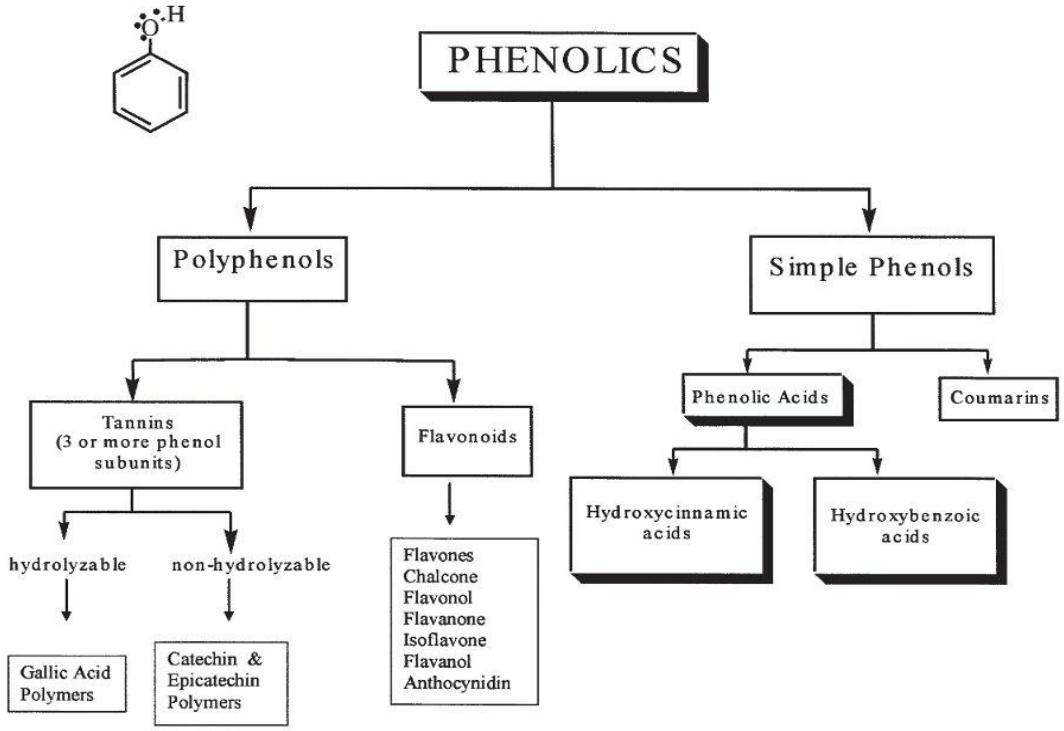
1. สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีคุณสมบัติเป็นสารอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่าหนึ่งหมู่ในโมเลกุล (วิไลพร ปองเพียร. 2551) โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลิกจะอยู่ในรูปของไกลโคไซด์ คือสารประกอบฟีนอลิกจับอยู่กับโมเลกุลของน้ำตาล ซึ่งอาจเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ก็ได้ แต่น้ำตาลที่พบมากที่สุด คือ กลูโคส (glucose) นอกจากนี้ยังอาจรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับสารประกอบฟีนอลิกด้วยกันเอง หรือสารประกอบฟีนอลิกกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดอินทรีย์ เอมีน กรดคาร์บอกซิลิก และไขมัน เป็นต้น

ปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิดในธรรมชาติ ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ โพลีฟีนอล (polyphenols) และโมเลกุลฟีนอลอย่างง่าย (simple phenols)แสดงดังภาพประกอบ 1 แม้ว่าปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในธรรมชาติจะมีปริมาณที่แตกต่างกัน แต่พบว่าปริมาณโดยเฉลี่ยที่คนได้รับต่อวันจะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 20 มิลลิกรัม-1 กรัม สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญ เนื่องจากมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการก่อมะเร็ง ตลอดจนลดความดันโลหิต (เบญจภรณ์ ปาวิน. 2555)

กรดฟีนอลิกจัดเป็นสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มใหญ่ที่พบมากในพืชที่ใช้เป็นอาหาร สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acids) ตัวอย่าง ได้แก่ กรดแกลลิก กรดโปรโตคาเทชูอิก เป็นต้น และกรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acids)

ได้แก่ กรดคาเฟอิก กรดเฟอร์รูลิก และกรดคลอโรจีนิก เป็นต้น (ณัษฐภรณ์ ไม่อ่อนมือ. 2552)



ภาพประกอบ 1 ชนิดของสารประกอบฟีนอลิก

ที่มา: Devanand L; & Luthria. (2006).

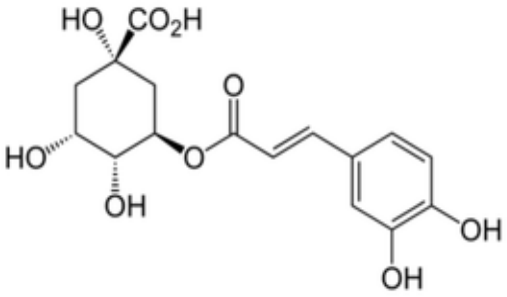
ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารในกลุ่มกรดฟีนอลิก และเอสเทอร์ของกรดฟีนอลิก ขึ้นอยู่กับจำนวนหมู่แทนที่ไฮดรอกซิลในโมเลกุล สมบัติในการดึงอิเล็กตรอนของหมู่คาร์บอกซิลิกในกรดเบนโซอิกจะส่งผลให้ความสามารถในการให้ไฮโดรเจนของไฮดรอกซีเบนโซเอทน้อยลง ดังนั้นจะพบว่าสารกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิกจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า (โอภา; และคณะ. 2551)

กรดคลอโรจีนิก

กรดคลอโรจีนิกเป็นเอสเทอร์ของกรดควินิกกับกรดคาเฟอิกหรือกรดเฟอร์รูลิก ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแสดงดังภาพประกอบ 2 กรดคลอโรจีนิกเป็นสารให้รสขมในกาแฟและจัดเป็นกลุ่มของสารประกอบที่สำคัญ 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ เอสเทอร์ของกรดควินิกกับกรดคาเฟอิก ซึ่งเรียกว่ากรดคาเฟอิกโออิลควินิก เช่น กรด 3-คาเฟอิลควินิก (3-cafeoylquinic acid) กรด 3,4 ไดคาเฟ

โออิลควินิก (3,4-dicafeoyquinic acid) เป็นต้น และเอสเทอร์ของกรดควินิกกับกรดเฟอร์รูลิกซึ่งเรียกว่า กรดเฟอรูโลอิลควินิก (ferruloylquinic acid) เช่น กรด 3-เฟอรูโลอิลควินิก (3-ferruloyl quinic acid) เป็นต้น (อวยพร อภิรักษ์อร่ามวง. 2548)

กรดคลอโรจีนิกนั้นมีคุณสมบัติทางเคมีดังนี้ สูตรโมเลกุล คือ $C_{16}H_{18}O_9$ น้ำหนักมวลโมเลกุลเท่ากับ 354.31 กรัม/โมล จุดหลอมเหลวเท่ากับ 207 °C มีค่า pKa เท่ากับ 2.5 มีลักษณะทางกายภาพเป็นเม็ด สีขาว สามารถละลายได้ดีในน้ำ และแอลกอฮอล์



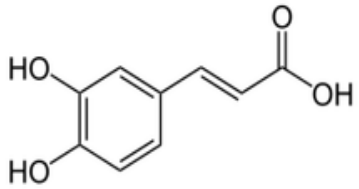
ภาพประกอบ 2 โครงสร้างทางเคมีของกรดคลอโรจีนิก

ที่มา: Hung-Ju; et al. (2012).

กรดคลอโรจีนิกสามารถพบได้ทั้งในพืชและผลไม้ ตัวอย่างเช่น ลูกพรุน เบอรี่ องุ่น แอปเปิ้ล สตรอเบอรี่ และชา กาแฟ เป็นต้น

กรดคาเฟอิก

กรดคาเฟอิกหรือ 3,4-ไดไฮดรอกซีซินนามิก (3,4-dihydroxycinnamic acid) ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอล ในกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแสดงดังภาพประกอบ 3 กรดคาเฟอิกมีคุณสมบัติทางเคมีดังนี้ สูตรโมเลกุล $C_9H_8O_4$ น้ำหนักมวลโมเลกุล 180.16 กรัม/โมล จุดหลอมเหลวเท่ากับ 223-225 °C มีค่า pKa เท่ากับ 4.62 มีลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีเหลือง และสามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์



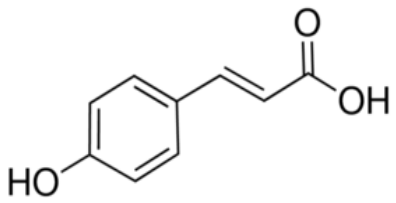
ภาพประกอบ 3 โครงสร้างทางเคมีของกรดคาเฟอิก

ที่มา: Hung-Ju; et al. (2012).

กรดคาเฟอิกสามารถพบได้ทั้งพืชและผลไม้ ตัวอย่างเช่น มันฝรั่ง แอปเปิ้ล ส้ม ผักชี สาระแหน่ โหระพา กระวาน และกาแฟ เป็นต้น

กรดพาราคูมาริก

กรดพาราคูมาริกเป็นสารประกอบฟีนอลในกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแสดงดังภาพประกอบ 4 มีคุณสมบัติทางเคมีดังนี้ สูตรโมเลกุล $C_9H_8O_3$ น้ำหนักมวลโมเลกุล 164.16 กรัม/โมล จุดหลอมเหลวเท่ากับ 210-213 °C มีค่า pKa เท่ากับ 4.4 มีลักษณะทางกายภาพเป็นผง สีขาว และสามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างทางเคมีของกรดพาราคูมาริก

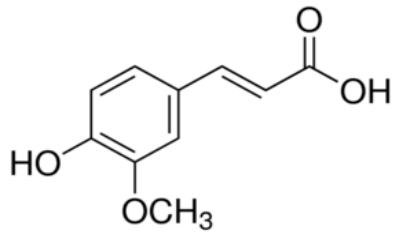
ที่มา: Leonoram; et al. (2011).

กรดพาราคูมาริกสามารถพบได้ทั้งพืชและผลไม้ ตัวอย่างเช่น ถั่ว มะเขือเทศ แครอท ข้าวบาเลย์ และส้ม เป็นต้น

กรดเฟอร์รูลิก

กรดเฟอร์รูลิกเป็นอนุพันธุ์ของกรดซินนามิก ในธรรมชาติส่วนใหญ่อยู่ในรูปกรดเฟอร์รูลิกชนิดทรานส์ (*trans* ferulic acid) เป็นสารพฤษเคมีอยู่ในรูปของสารประกอบฟีนอลิก มีโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลรวมอยู่ในโมเลกุล ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแสดงดังภาพประกอบ 5

กรดเฟอร์รูลิกนั้นมีคุณสมบัติทางเคมีดังนี้ สูตรโมเลกุล $C_{10}H_{10}O_4$ น้ำหนักมวลโมเลกุลเท่ากับ 194.18 กรัม/โมล จุดหลอมเหลวเท่ากับ 168-172 °C มีค่า pKa เท่ากับ 4.58 มีลักษณะทางกายภาพเป็นผลึก สีขาวเหลือง และสามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างทางเคมีของกรดเฟอร์รูลิก

ที่มา: Ying; et al. (2013).

กรดเฟอร์รูลิกเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชโดยจะอยู่รวมกับลิกโนเซลลูโลส มีคุณสมบัติช่วยให้ผนังเซลล์พืชแข็งแรง แหล่งที่พบกรดเฟอร์รูลิกมากที่สุด ได้แก่ เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวโพด เมล็ดกาแฟ ถั่วลิสง และผลไม้สด เช่น แอปเปิ้ล ส้ม และสับปะรด เป็นต้น (จุฑามาศ สูนแดง. 2554)

2. วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก

สำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่าง ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างนั้นเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เพราะเนื่องจากตัวอย่างต่างๆ ที่นำมาวิเคราะห์ต่างมีสิ่งเจือปนหรือสารรบกวน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องแยกสารที่สนใจออกจากสิ่งเจือปนหรือสารรบกวน เพื่อป้องกันไม่ให้มีผลต่อการวิเคราะห์สารที่สนใจ และยังทำให้สารที่สนใจวิเคราะห์มีความเข้มข้นขึ้น

กรดไฮดรอกซีซินนามิกเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบตามธรรมชาติ ซึ่งจะพบทั้งในตัวอย่างพืชและผลไม้ ซึ่งในตัวอย่างแต่ละชนิดต่างมีวิธีในการเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่า โดยส่วนใหญ่วิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์หากรดไฮดรอกซีซินนามิกมีดังนี้

1. Solid/Liquid Extraction เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมซึ่งเป็นของแข็ง

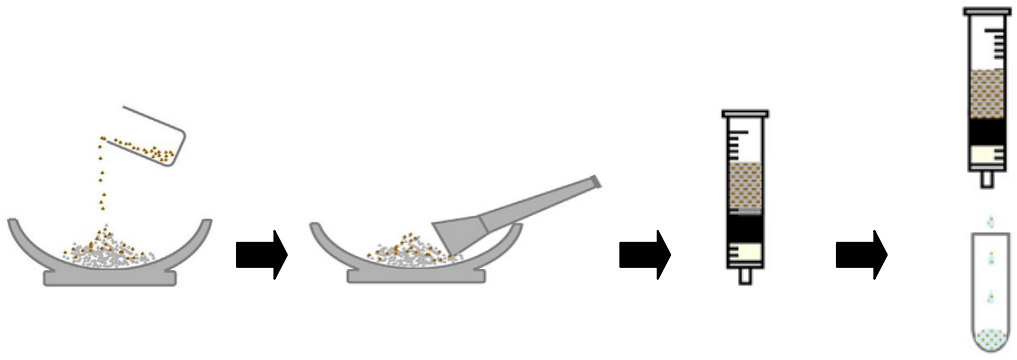
งานวิจัยที่ใช้วิธี solid/liquid extraction ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์หากรดไฮดรอกซีซินนามิก เช่น ในปี ค.ศ. 2011 Violeta และคณะ ได้ทำการตรวจวัดกรดฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และจูโกลน (juglone) ในตัวอย่างใบถั่ว ซึ่งในการตรวจวัดกรดฟีนอลิกได้มีการตรวจวัดกรดคลอโรจีนิกและเฟอร์รูลิก ซึ่งได้ทำการเตรียมตัวอย่างใบถั่วโดยทำการสกัดด้วยเมทานอลด้วยเครื่องอัตราโซนิก และในปี ค.ศ. 2011 Yong-chun และคณะ ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารโอเรียนทิน (orientin) ไอโซโอเรียนทิน (isoorientin) วิทีซีน (vitexin) ไอโซวิทีซีน (isovitexin) กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก และกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างใบไผ่ โดยทำการเตรียมตัวอย่างใบไผ่โดยทำการสกัดด้วย 70% เมทานอลด้วยเครื่องอัตราโซนิก ในปี ค.ศ. 2013 Edgar ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดคลอโรจีนิกในตัวอย่างกาแฟ โดยทำการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีซอกห์เลต (Soxhlet extraction) โดยทำการสกัดด้วย 50% เมทานอล

2. Liquid/Liquid extraction เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมซึ่งเป็นของเหลว

งานวิจัยที่ใช้วิธี liquid/liquid extraction ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์หากรดไฮดรอกซีซินนามิก เช่น ในปี ค.ศ. 2007 Waksumundzka-Hajnos และคณะ ได้ทำการตรวจวัดกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างพืช โดยทำการเตรียมตัวอย่างพืชโดยใช้ไดเอทิลอีเทอร์เป็นสารสกัด ในปี ค.ศ. 2012 Nevena และคณะ ได้ทำการตรวจวัดกรดคลอโรจีนิกในตัวอย่างชา โดยทำการเตรียมตัวอย่างชาโดยใช้เมทานอล (40-60%) เป็นสารสกัด

ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองศึกษาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร 3 วิธี คือ วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD) วิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลวแล้วตามด้วยวิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิดไมโครเอ็กแทรคชัน (LLE-DLLME) และวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว (LLE)

วิธีการการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD) เป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างที่พัฒนามาจากการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งเพื่อแก้ไขข้อเสียของเทคนิคดังกล่าวคือการสัมผัสระหว่างตัวอย่างกับพื้นผิวของตัวดูดซับของแข็งเกิดได้น้อย ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดตัวอย่างลดลง แต่หลักการแยกสารที่สนใจจะวิเคราะห์และปัจจัยในการแยกนั้นจะเหมือนกับการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งแต่การสกัดแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD) จะนิยมใช้ในกรณีที่ตัวอย่างมีลักษณะแข็งหรือกึ่งแข็ง เทคนิคนี้จะนำตัวอย่างนั้นมาบดรวมกันกับเฟสของแข็งเพื่อให้สารที่สนใจวิเคราะห์นั้นสามารถกระจายตัวบนวัฏภาคของแข็งได้ดียิ่งขึ้น ทำให้ตัวอย่างสามารถสัมผัสกับวัฏภาคของแข็งได้ดียิ่งขึ้น ส่งผลทำให้การสกัดสารที่สนใจวิเคราะห์มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงขึ้น จากนั้นนำสารผสมนี้บรรจุลงในคาร์ทริดจ์ แล้วใช้สารละลายที่เหมาะสมชะสารที่สนใจออกจากคาร์ทริดจ์ ส่วนสารรบกวนอื่นๆ ก็จะดูดซับอยู่บนพื้นผิวของวัฏภาคของแข็ง ขั้นตอนการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD) แสดงดังภาพประกอบ 6

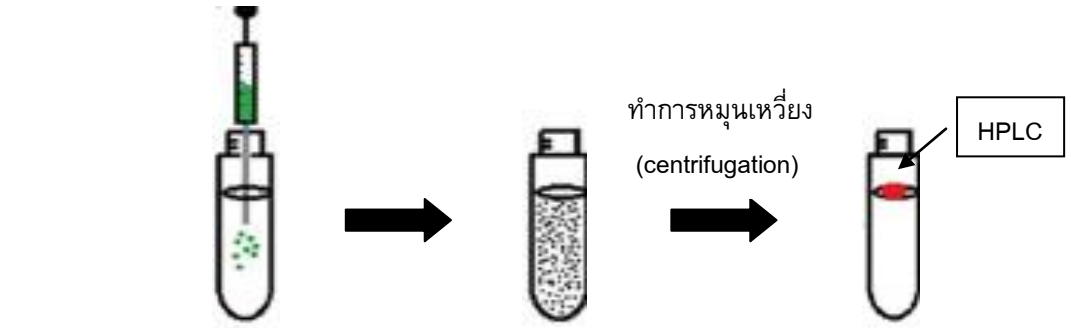


1. นำตัวอย่างกับตัวดูดซับมาผสมกัน
2. บดผสมให้เข้ากัน
3. บรรจุลงคาร์ทริดจ์
4. ชะสารด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

ภาพประกอบ 6 ขั้นตอนการสกัดแบบ matrix solid phase dispersion

ที่มา: ดัดแปลงจาก Rodriguez-Gonzalez; et al. (2014).

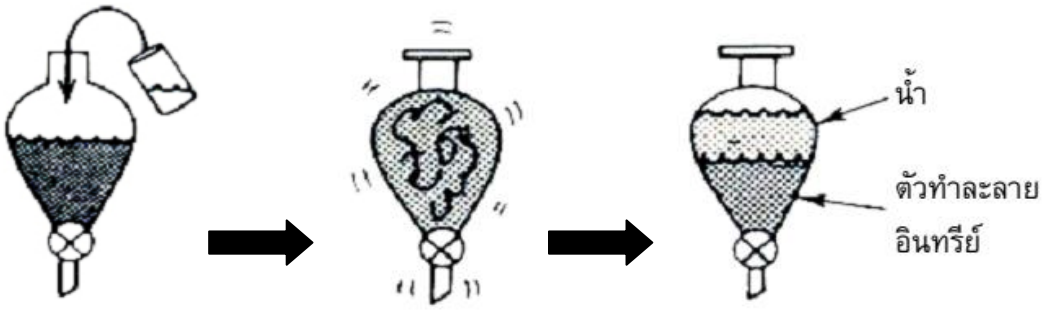
วิธีดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิดไมโครเอ็กแทรคชัน (DLLME) เป็นวิธีการสกัดที่นำเอาหลักการในการสกัดแบบ Liquid/Liquid Extraction มาใช้ โดยการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีนี้จะใช้สารในการสกัด 2 ชนิด คือ ตัวทำละลายสกัด (extraction solvent) และตัวทำละลายการกระจาย (dispersive solvent) เทคนิคนี้จะทำการเติมตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายการกระจายอย่างรวดเร็วลงไปยังสารละลายตัวอย่าง ซึ่งตัวทำละลายการกระจายจะทำหน้าที่ช่วยให้ตัวทำละลายสกัดเข้าไปยังเฟสของสารละลายตัวอย่างได้ดียิ่งขึ้น ทำให้มีประสิทธิภาพในการสกัดดีขึ้น หลังจากที่เติมตัวทำละลายสกัดและตัวละลายกระจายสารละลายจะมีลักษณะขุ่น เนื่องจากเกิดหยดของตัวทำละลายอินทรีย์เล็กๆ ลอยอยู่บนเฟสน้ำ ซึ่งเรียกว่า cloudy solution โดยการเกิดนี้จะทำให้สารที่สนใจวิเคราะห์เคลื่อนเข้าสู่เฟสตัวทำละลายสกัด จากนั้นทำการหมุนเหวี่ยง ก็จะได้สารที่สนใจวิเคราะห์ ขั้นตอนการสกัดด้วยวิธีดิพเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิดไมโครเอ็กแทรคชันแสดงดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 ขั้นตอนการสกัดด้วยวิธีดิพเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิดไมโครเอ็กแทรคชัน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Mojtaba; et al. (2014).

วิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว (LLE) การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีนี้เป็นการสกัดด้วยตัวทำละลาย กระบวนการแยกนั้นอาศัยหลักการละลายของสารที่สนใจในตัวทำละลายที่แตกต่างกันระหว่างวัฏภาคสองวัฏภาคคือ วัฏภาคตัวอย่างและวัฏภาคของตัวทำละลายที่ใช้ ขั้นตอนการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลวแสดงดังภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 8 ขั้นตอนการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว

ที่มา: การสกัดด้วยตัวทำละลาย. (ม.ป.ป.ออนไลน์).

3. พืชสมุนไพร

3.1. ความหมายของพืชสมุนไพร

พืชสมุนไพร หมายถึง พืช ยาธรรมชาติทั้งสดและแห้งในสภาพที่ยังไม่ได้แปรรูปนำมาใช้ประโยชน์ทางป้องกันและรักษาโรค รวมถึงบำรุงร่างกาย (สมพร ภูติยานันต์. 2542)

พืชสมุนไพร หมายถึง พืชที่ใช้ทำเป็นยารักษาโรค โดยใช้ส่วนต่างๆ ของพืชชนิดเดียวหรือหลายชนิดพร้อมกัน (ธวัชชัย สันติสุข. 2544)

พืชสมุนไพร หมายถึง พันธุ์ไม้ต่างๆ ที่สามารถนำมาใช้ปรุงหรือประกอบเป็นยารักษาโรคต่างๆ ใช้ในการส่งเสริมสุขภาพร่างกายได้ (น้ำทิพย์ วงศ์ประทีป. 2548)

3.2 ประเภทของพืชสมุนไพร

รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ (2540) ได้จำแนกพืชสมุนไพรไว้หลายวิธี ดังนี้

3.2.1 จำแนกตามลักษณะการใช้ แบ่งออกเป็น 2 พวก คือ ใช้สำหรับภายในและใช้สำหรับภายนอก

3.2.2 จำแนกตามฤทธิ์ที่สมุนไพรมีผลต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย แบ่งออกเป็น 9 หมวดคือ ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์ ผิวหนัง แก้ไข้ แก้ไข้จับสั่น แก้ปวด แก้อาการอักเสบจากการติดเชื้อ อื่นๆ

3.2.3 จำแนกตามสรรพคุณ แบ่งออกเป็น 14 ประเภท คือ ยาระบาย ยาแก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ขับลม ยาแก้ท้องเดิน ยาแก้ปวดท้อง ยาแก้บิดปวดเบ่ง ยาถ่ายพยาธิ ยาแก้ไข้ ยาแก้ไอขับเสมหะ ยาขับปัสสาวะ ยาแก้ลม บำรุงหัวใจ ยาระงับอาการปวดฟัน ยาแก้โรคผิวหนัง ยาแก้เหาไร ยาแก้พิษแมลงกัดต่อย

3.2.4 จำแนกโดยใช้ส่วนของพืชที่นำมาทำเป็นยา แบ่งออกได้ดังนี้คือ ได้จากรากพืช ใบดอก เปลือกไม้ เนื้อไม้ ผลและเมล็ด

3.3 ประโยชน์ของพืชสมุนไพร

3.3.1 ใช้เป็นส่วนผสมของอาหาร และเครื่องดื่ม เป็นเครื่องดื่มที่สกัดจากธรรมชาติที่ยังให้ประโยชน์ในการรักษาโรคควบคู่ไปด้วย

3.3.2 สามารถรักษาโรคบางชนิดได้ ซึ่งใช้เป็นทั้งยารับประทานและยาทาภายนอก

3.3.3 ใช้เป็นยาบำรุงให้ร่างกายมีสุขภาพแข็งแรง

3.3.4 ใช้ในการถนอมอาหาร เช่น ลูกจันทร์ กานพลู เป็นต้น

3.3.5 ใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมสีย้อมผ้า ใช้แต่งสีอาหารต่างๆ อุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง เป็นต้น

3.3.6 ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืช มักเป็นสมุนไพรจำพวกที่มีฤทธิ์เบื่อเมา หรือมีรสขม ข้อดีคือ ไม่มีฤทธิ์ตกค้างที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

3.3.7 ใช้ทำเป็นเครื่องสำอาง โดยนำมาใช้เป็นส่วนผสมของแชมพู ครีมนวดผม โลชั่นบำรุงผิว สบู่ สมุนไพรที่นำใช้ทำเป็นเครื่องสำอาง เช่น ว่านหางจระเข้ อัญชัน เป็นต้น

3.3.8 ใช้บริโภคเป็นอาหาร และเครื่องเทศ สมุนไพรในกลุ่มนี้จัดเป็นพืชผักสมุนไพร สามารถนำมารับประทานให้คุณค่าทางอาหาร เพิ่มรสชาติ ดับกลิ่นคาว และยังช่วยย่อยอาหาร เช่น กระเพรา โหระพา ผักชี สาระแหน่ ขิง ข่า กระชาย เป็นต้น

3.3.9 ใช้สกัดน้ำมันหอมระเหย เช่น ตะไคร้หอม น้ำมันตะไคร้นำมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตสบู่ แชมพู น้ำหอม ไพล น้ำมันไพล ใช้ในผลิตภัณฑ์ครีมทาภายนอก ลดการอักเสบฟกช้ำ กระวาน น้ำมันกระวานใช้แต่งกลิ่นเหล้า เครื่องดื่มต่างๆ และอุตสาหกรรมน้ำหอม

3.3.10 ประหยัด ราคาสมุนไพรถูกกว่ายาแผนปัจจุบันมาก เนื่องจากเป็นทรัพยากรที่มีอยู่แล้ว

3.4 ข้อมูลพืชสมุนไพร

3.4.1 ฝาง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Caesalpinia sappan* Linn.

ชื่ออื่น ฝางเสน หนามโค้ง ฝางแดง ฝางส้ม ง้าย โซบั๊ก

วงศ์ Leguminosae

ลักษณะทางพฤษศาสตร์ ฝางเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 6-9 เมตร ตามลำต้นและกิ่งก้านจะมีหนาม ส่วนใบจะมีลักษณะการเรียงใบคล้ายใบหางนกยูง มีดอกสีเหลือง กลางดอกเป็นสีแดง และผลเป็นฝัก มีลักษณะแบน ผิวมัน เปลือกแข็ง เมล็ดสีน้ำตาล

องค์ประกอบทางเคมี ส่วนที่ใช้ทำเป็นยาคือ เนื้อไม้และแก่น สารที่สำคัญ คือ แก่นฝาง (sappan wood) มีสารสีชมพูส้มถึงแดง (ขึ้นกับปริมาณ) ชื่อ บราซิลลิน (Brazilin) นอกจากนี้ยังพบว่า แก่นฝางมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ชนิดเควิซิทิน (quercetin) เรมเนทิน (rhamnetin) อัมบัน (ombun) (Namikoshi; et al. 1987) สารกลุ่มสเตอร์รอยด์ ชนิดแคมเพสเตอรอล (campesterol) 11.2% เบต้า-ซิโตสเตอรอล (beta-stosterol) 69.9% สทิคมาสเตอรอล (stigma sterol) 18.9% (Oh; et al. 1998) ส่วนเนื้อไม้มีสารฟีนอลที่มีชื่อว่า โฮโมไอโซฟลาโวนอยด์ (homo isofavonoids) ลำต้นและใบมีสารอัลคาลอยด์ (alkaloid) และฟายโตสเตอร์รอยด์ (phytosterol) อยู่ในปริมาณมาก (เกียรติศักดิ์ เจริญสุข; และคณะ. 2554)

สรรพคุณ แก่นฝางมีรสขม ฝาด ใช้ต้มน้ำกินเป็นยาบำรุงโลหิต ขับเสมหะ แก้ร้อนใน แก้ไอ แก้ไข้ แก้หอบ แก้ช้ำ แก้ท้องร่วง ส่วนเนื้อไม้ใช้แก้ท้องเสีย แก้ไข้ แก้บิด ทำให้ประจำเดือนมาปกติ นอกจากนี้ส่วนเปลือก สามารถใช้ต้มรับประทานรักษาโรควัณโรค อาการอักเสบในลำไส้ เป็นยาฝาดสมานและรักษาแผล (นฤพร สุทธิสวัสดิ์. 2549)

3.4.2 ตะไคร้

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.

ชื่ออื่น คาหอม ไคร จะไคร หัวสิงไค เชิดเกรย ตะไครัแกง เหลอะเกรย

วงศ์ Poaceae

ลักษณะทางพฤษศาสตร์ ตะไคร้เป็นพืชล้มลุก มีลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ลำต้นตั้งตรงมีข้อและปล้องสั้นค่อนข้างแข็ง มักขึ้นเป็นกอใหญ่ ใบมีลักษณะเรียวยาว ปลายใบเรียวแหลม ขอบใบมีขนขึ้นเล็กน้อย ก้านใบสีขาวนวลหรือม่วงอ่อนแผ่เป็นกาบ ดอกออกเป็นช่อกระจาย

องค์ประกอบทางเคมี สารที่สำคัญ คือ ซิตรัส (citral) พบในใบและลำต้น ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดคือ ประมาณ 80% นอกจากนี้ยังมีสารยูจีนอล (eugenol) เจอรานิออล (geraniol) ซิโทรเนลลอน (Citronellol) เมอซีน (Myrcene) การบูร (Camphor) (นงค์นุช แตทอง; และคณะ. 2545)

สรรพคุณ ส่วนใบ ลดความดันโลหิต แก้ไข้ ส่วนต้น ขับลม แก้โรคทางเดินปัสสาวะ แก้นิ่ว ดับกลิ่นคาว เหง้า แก้กษัย ขับลมในลำไส้ แก้นิ่ว (สถาบันการแพทย์แผนไทย. 2542) นอกจากนี้ยังบำรุงหัวใจ บำรุงไต แก้ไอ้ แก้อาการอ่อนเพลีย แก้หืด มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิด (นันทนา ศรีพันลม; และคณะ. 2547)

3.4.3 หญ้าหวาน

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Stevia rebaudiana* Bertoni.

ชื่ออื่น -

ชื่อวงศ์ Asteraccac

ลักษณะทางพฤษศาสตร์ หญ้าหวานเป็นพืชล้มลุก สูงประมาณ 30-90 เซนติเมตร ลำต้นแข็ง กิ่งก้านแตกเป็นพุ่ม ใบเป็นใบเดี่ยว ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย ดอกเป็นดอกช่อ กลีบดอกสีขาว ผลเป็นผลแห้ง มีเมล็ดสีดำ มีขนปุย

องค์ประกอบทางเคมี หญ้าหวานมีสารสำคัญคือ สตีวิออล (steviol) สตีวิออลไบโอไซด์ (steviolbioside) สตีวิโอไซด์ (stevioside) รีบาวดิโอไซด์ เอ-เอฟ (rebaudioside A-F) และ ดัลโคไซด์ เอ (dulcoside A) ซึ่งพบว่า สตีวิโอไซด์ เป็นสารที่พบในปริมาณมากที่สุดคือประมาณ 2.0-7.7% ของใบแห้ง รองลงมาคือ รีบาวดิโอไซด์ เอ มีประมาณ 0.8-2.9 % ของใบแห้ง (ด้วง; และคณะ. 2534) ซึ่งสารที่พบในหญ้าหวานเป็นสารให้ความหวาน พบในใบปริมาณสูงกว่าลำต้น มีความหวานมากกว่าน้ำตาล 150-300 เท่า ใช้แทนความหวานของน้ำตาลสำหรับกลุ่มผู้ป่วยเบาหวาน (พิกุล อินต๊ะปาน. 2556)

สรรพคุณ หญ้าหวานเหมาะสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน และโรคไขมันสูงในเลือด เนื่องจากมีสารให้ความหวาน ใช้แทนความหวานของน้ำตาล ไม่ทำให้อ้วน จึงนำมาใช้กับผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ที่ต้องการลดความอ้วน ผสมในอาหารและเครื่องดื่ม (มัทนียา วังประภา. 2548) นอกจากนี้ยังป้องกันโรคฟันผุได้ เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุได้และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ เช่น *Ps. Aeruginosa E. coli* และ *Proteus vulgaris* เป็นต้น (พิกุล อินต๊ะปาน. 2556)

3.4.4 รากสามสิบ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Asparagus racemosus* Willd.

ชื่ออื่น จ๋วงเครือ ผักชีช้าง ผักหนาม สามร้อยราก สามสิบ ชีช้าง จั่นดิน

วงศ์ Asparagaceae

ลักษณะพฤษศาสตร์ รากสามสิบเป็นไม้เลื้อย ลำต้นมีลักษณะสีขาวแกมเหลือง เรียบ ลื่นเป็นมัน เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-5 มิลลิเมตร ใบ เป็นใบเดี่ยว รูปสามเหลี่ยม และมีใบ

เกล็ดอายุสั้น ต่อมาจะแข็งขึ้นและเปลี่ยนเป็นหนาม ส่วนดอกออกเป็นช่อที่ซอกกิ่ง ดอกมีสีขาว ผลสดมีสีแดงหรือแดงอมม่วง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-8 มิลลิเมตร

องค์ประกอบทางเคมี สารสำคัญที่พบมากในรากสามสิบคือ ซาโปนิน (saponins) สารนี้มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสามารถลดการเกิดกระดูกพรุน โรคระบบหลอดเลือดและหัวใจ และความเสี่ยงของโรคมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสารไฟโตสเตอรอล (phytosterols) ฟลาโวนอยด์ โพลีฟีนอล และชาทาวาริน (shatavarin) (รากสามสิบ. ม.ป.ป.ออนไลน์)

สรรพคุณ ส่วนราก ช่วยบำรุงเด็กในครรภ์ รักษาอาการประจำเดือนผิดปกติของสตรี เป็นยาบำรุงกำลัง บำรุงตับ ปอด ช่วยขับปัสสาวะ กระตุ้นประสาท ลดความดันโลหิต ลดไขมันในเลือด ลดระดับน้ำตาลในเลือด รักษาโรคคอพอก แก้ไอ ช่วยขับเสมหะ ช่วยขับลม แก้บิด ช่วยลดกรดในกระเพาะอาหาร แก้อาการท้องเสีย ป้องกันโรคมะเร็ง ส่วนใบ ใช้เป็นยาระบาย

3.4.5 เหงือกปลาหมอ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Acanthus ebracteatus* Vahl.

ชื่ออื่น แก้มหมอเล จะเกร็ง นางเกร็ง

วงศ์ *Acanthaceae*

ลักษณะพฤษศาสตร์ ไม้พุ่ม ลำต้นตั้งตรง สูง 0.5-1.25 เมตร ลำต้นกลมเรียบแข็ง สีเขียวแกมเทา มักมีหนามตามข้อๆ ปลายใบและโคนใบแหลมขอบใบหยักแบบขนนกที่ใบเป็นหนาม ดอกออกเป็นช่อตามยอด

องค์ประกอบทางเคมี สารสำคัญในเหงือกปลาหมอคือ อะแคนทิซิโฟลีน (acanthicifoline)

สรรพคุณ ราก แก้ไอ รักษามะเร็ง ลำต้น แก้โรคผิวหนัง แก้ฝีหรือแผลเรื้อรัง ส่วนใบ เป็นยาประคบแก้ไขข้ออักเสบ แก้ปวดต่างๆ รักษาโรคผิวหนัง แก้อาการคัน รักษาหอบหืด ผล ใช้ถอนพิษ ขับโลหิตระดู

พืชสมุนไพรเหล่านี้ต่างก็มีประโยชน์หรือสรรพคุณที่แตกต่างกัน สำหรับในการตรวจวัดกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดในพืชสมุนไพรเหล่านี้ยังไม่มีการรายงานในการตรวจวัด อย่างไรก็ตาม พบว่า มีงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษาในสมุนไพรเหล่านี้ ตัวอย่างเช่น (อังคารักษ์ ไชยเจริญ; และคณะ. 2557) ได้ทำการศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรฝางเสน เพื่อช่วยนำไปยืดอายุผลิตภัณฑ์น้ำพริก

พบว่า ฝาง 1 กรัม สามารถยืดอายุในการเก็บรักษาน้ำพริกได้ 3 วัน เนื่องจากฝางมีสารแซบพานิน (sappanin) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อโรคหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เมื่อเติมลงไปในน้ำพริกจึงทำให้น้ำพริกนั้นสามารถเก็บไว้ได้นานขึ้น นอกจากนี้ (นฤพร สุทธสวัสดิ์; และคณะ. 2549) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์กันเสียของฝาง (*Caesalpinia Sappan* L.) ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทน้ำพริก ซึ่งได้ทำการศึกษาผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพชนิดต่างๆ ได้แก่ *S.aures* ATCC 6538 *E.coil* ATCC 2592 *S.typhimurium* ATCC 13311 และ *C.albicans* ATCC 10231 ซึ่งการวิเคราะห์ส่วนประกอบและปริมาณของสารสำคัญของสารสกัดของฝางนั้นวิเคราะห์ด้วยวิธีทินแลร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography) และสเปคโตโฟโตเมทรี (Spectro photometry) จากการศึกษาพบว่า ในตัวอย่างฝาง 1 กรัม มีปริมาณของสารบราซิลลิน 1.68 ไมโครกรัม และ สารสกัดจากฝางสามารถลดปริมาณแบคทีเรียและเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ทำให้สีและกลิ่นของน้ำพริกตัวอย่างเปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงสามารถนำสารสกัดฝางมาใช้เป็นวัตถุกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปประเภทน้ำพริกได้

ในปี ค.ศ. 2005 เสี่ยวลิ้ง และคณะ (Xiaoling; et al. 2005) ได้ทำการวิเคราะห์สารบราซิลลินในฝาง โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งตัวอย่างฝางได้ทำสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์ (Refluxed) โดยใช้เอทานอลเข้มข้น 95% เป็นสารสกัด จากการศึกษาพบว่า ฝางมีสารบราซิลลินเท่ากับ 31.2 มิลลิกรัมต่อกรัม

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวกับสมุนไพรตะไคร้ พบรายงานในปี ค.ศ. 2008 แอดดี้ และคณะ (Edi; et al. 2008) ได้ทำการตรวจวัดปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบตะไคร้ โดยตัวอย่างใบตะไคร้ได้ทำการสกัดด้วยเฮกเซนและเมทานอล จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยเฮกเซนและเมทานอลมีปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 72.55 และ 66.94 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 3.53 และ 3.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ในปี ค.ศ. 2014 ก๊อดวิน และคณะ (Godwin; et al. 2014) ได้ทำการตรวจวัดแร่ธาตุ สารฟีนอลิกสารต้านออกซิเดชัน และสารฟลาโวนอยด์ในตะไคร้ ผลจากการศึกษาพบว่า ในตะไคร้มีแร่ธาตุโพแทสเซียม (K) คลอรีน (Cl) แคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg) ในปริมาณที่สูง ส่วนสารฟีนอลิก สารต้านออกซิเดชัน และสารฟลาโวนอยด์ได้ทำการตรวจวัดในปริมาณโดยรวมทั้งหมด ซึ่งพบว่า ในตะไคร้มีปริมาณสารฟีนอลิกโดยรวมทั้งหมดเท่ากับ 1.3-7.3 มิลลิกรัมต่อกรัม สารต้านออกซิเดชันโดยรวมทั้งหมดเท่ากับ 65.4-81.3% และปริมาณสารฟลาโวนอยด์โดยรวมทั้งหมดเท่ากับ 6.9-12.9 ไมโครกรัมต่อกรัม

การวิจัยในสมุนไพรหญ้าหวาน ในปี ค.ศ. 2013 เปาล่า และคณะ (Paola; et al. 2013) ได้ทำการศึกษาสารสตีวิออลไกลโคไซด์ (steviol glycosides) ในหญ้าหวาน โดยใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งทำการศึกษาสารสตีวิออล ไกลโคไซด์ 6 ชนิด คือ สตีวิโอไซด์ (stevioside) รีบาวดิโอไซด์ เอ (rebaudioside A) รีบาวดิโอไซด์ บี (rebaudioside B) สตีวิออลไบโอไซด์ (steviolbioside) รีบาวดิโอไซด์ ซี (rebaudioside C) และสตีวิออล โดยตัวอย่างหญ้าหวานทำการสกัดด้วยน้ำต่อเอทานอลในอัตราส่วน 50:50 ซึ่งทำการสกัดโดยทำการผสมสารด้วย vortex นาน 30 นาที จากการศึกษาพบว่า ตัวอย่างหญ้าหวานมีปริมาณของสตีวิโอไซด์ รีบาวดิโอไซด์ เอ รีบาวดิโอไซด์ บี สตีวิออลไบโอไซด์ และรีบาวดิโอไซด์ ซี เท่ากับ 2.12-15.73 2.13-3.26 0.08-0.80 0.2-1.6 และ 2.45-7.98 %ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนสารสตีวิออลนั้นไม่พบในหญ้าหวาน

(ราณี บุรีรักษ์. 2549) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดหญ้าหวานต่อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคฟันผุ จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากหญ้าหวาน คือ สตีวิโอไซด์นั้นไม่เป็นสารอาหารของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ (เชื้อ Streptococcus mutans 3 เชื้อ เชื้อ Streptococcus sanguis 3 เชื้อ และเชื้อ Streptococus mitis 5 เชื้อ) และมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคฟันผุเหล่านี้ นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเมื่อใช้สารสตีวิโอไซด์และน้ำตาลซูโครสในความหวานที่เท่ากันในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งพบว่า สารสตีวิโอไซด์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าน้ำตาลซูโครส

สำหรับสมุนไพรรากสามสิบ (นัทธ์หทัย วิบูลย์พันธุ์. 2539) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของรากสามสิบ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากการศึกษาพบว่ารากสามสิบมีสารดังนี้ 4,5-ไดไฮดรอกซี-1,7-ไดเมทอกซี-8-เมทิล-9,10-ไดไฮโดรฟีแนนทรีน (4,5-dihydroxy-1,7-dimethoxy-8-methyl-9,10-dihydrophenanthrene) 6-ไฮดรอกซี-2-(3'-ไฮดรอกซี-5'-เมทอกซี-2',4'-ไดเมทิลฟีนิล)เบโซฟูแรน (6-hydroxy-2-(3'-hydroxy-5'-methoxy-2'4'-dimethyl phenyl)benzofuran) และนอกจากนี้ยังพบสารสติกมาสเตอรอล (stigmasterol) และแอสพารากามีน เอ (asparagamine A) ซึ่งสารแอสพารากามีน เอ นั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งฮอร์โมนออกซิโทซิน (oxytocin) (ทวีชัย ลี้ยุทธานนท์. 2538) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสามสิบต่อกล้ามเนื้อเรียบ จากการศึกษาพบว่า สารสกัด 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกหนูขาวได้ และสารสกัด 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้ส่วนไอเลียม (ileum) ของหนูตะเภาได้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสมุนไพรสามสิบนั้นสามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบอวัยวะต่างๆ ได้

สำหรับเหงือกปลาหมอ (Sudjaroen; et al. 2012) ได้ทำการศึกษาหาปริมาณเบต้าแคโรทีน (β-carotene) วิตามินซี (vitamin C) แคลเซียม (Calcium) จากการศึกษาพบว่า เหงือกปลาหมอมีปริมาณเบต้าแคโรทีน วิตามินซี และแคลเซียม เท่ากับ 1117.52 ไมโครกรัม/100 กรัม 20.03 ไมโครกรัม/100 กรัม และ 3261.14 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ และนอกจากนี้ได้ทำการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของเหงือกปลาหมอ เช่น ปริมาณน้ำ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น

(ผ่องพรรณ ศิริพงษ์; และคณะ) ได้ทำการศึกษาศักยภาพการต้านเซลลมะเร็งของสมุนไพรเหงือกปลาหมอ จากการทดลองพบว่า ในสมุนไพรเหงือกปลาหมอมีสารประกอบดังนี้ sulphur, stigmasterol , β-sitosterol, lupeol และสารจำพวก polysaccharide และทำการศึกษาศักยภาพการต้านเซลล์มะเร็งของสารประกอบข้างต้นต่อเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ มะเร็งเยื่อบุช่องปากของคน (human epidermoid carcinoma, KB) และมะเร็งลิวคีเมียของหนู (P-388 mouse lymphocytic leukemia, P-388) จากการศึกษาพบว่า สารประกอบดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิด KB และ P-388 ซึ่งสมุนไพรเหงือกปลาหมออาจจะไม่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้โดยตรง แต่น่าจะมีผลทางอ้อมโดยช่วยเสริมฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้

4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบสารในกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก

ในปี ค.ศ. 1992 เฮนดริค แวน และคณะ (Hendrik van; et al. 1992) ได้ทำการศึกษาส่วนประกอบของตัวอย่างน้ำลูกพรุน 5 ชนิด ซึ่งทำการศึกษาสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน น้ำตาล กรดอินทรีย์ สารประกอบฟีนอลิก และกรดอะมิโน โดยใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สำหรับในการตรวจวัดของสารประกอบฟีนอลิกนั้นใช้ตัวตรวจวัดเป็นยูวีวิสิเบิล คอลัมน์ใช้ C18 ขนาด 25×0.4 เซนติเมตร ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์แอมโมเนียมฟอตเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (phase A) และเมทานอล 80% (phase B) ใช้ระบบการไหลแบบเกรเดียนท์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากการศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำลูกพรุนทั้ง 5 ชนิด พบว่า ส่วนใหญ่มีกรดคลอโรจีนิกสูงสุด (2.8-37.9 mg/100ml)

ในปี ค.ศ. 1996 สิริเนียช และคณะ (Siranoush; et al. 1996: 223-231) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกในน้ำผลไม้ ซึ่งตรวจวัดในตัวอย่างน้ำผลไม้ 3 ชนิด คือ น้ำเชอรี่ น้ำองุ่นเขียว น้ำองุ่นดำ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ C18 ขนาด 120×4 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 5 ไมครอน ซึ่งวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำต่อเอทิลอะซีเตท

ต่อกรดแอซีติก (95.6:4.1:0.3, v/v) ควบคุมอัตราการไหลที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 320 นาโนเมตร ส่วนการตรวจวัดเอลลาจิก จะใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำต่อเมทานอลต่อกรดฟอสฟอริก (62.40:37.45:0.15,v/v) ควบคุมอัตราการไหลที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 252 และ 360 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่า น้ำเชอรี่มีกรดคลอโรจีนิกสูงสุดที่ 85 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำองุ่นเขียวและน้ำองุ่นดำมีแกลลิกสูงสุดที่ 1.45 และ 5.24 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในปี ค.ศ. 2000 โยชิอากิ และคณะ (Yoshiaki; et al. 2000: 183-188) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนอลิกคือ กรดแกลลิก กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดเอลลาจิก และกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างน้ำผลไม้ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งตรวจวัดในตัวอย่างน้ำผลไม้ 4 ชนิด คือ น้ำแอปเปิ้ล น้ำองุ่น น้ำทับทิม และน้ำลูกพรุน โดยใช้ตัวตรวจวัดเป็นโฟโตไดโอดแอเรย์ คอลัมน์ที่ใช้ ODS ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 5 ไมครอน ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายโพแทสเซียม ไดไฮโดรฟอตเฟตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (pH 2.5) ต่ออะซีโตไนไตรล์ (41:9, v/v) ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 360 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าส่วนใหญ่ในตัวอย่างน้ำผลไม้ทั้ง 4 ชนิด มีปริมาณกรดคลอโรจีนิกสูงสุด น้ำลูกพรุนมีกรดคลอโรจีนิกเท่ากับ 190.2 ไมโครกรัมต่อกรัม

ในปี ค.ศ. 2009 ฮาสซิม และคณะ (Hasim; et al. 2009: 187-192) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ น้ำตาล สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ในตัวอย่างน้ำส้มและไวน์ส้ม โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สำหรับในการตรวจวัดของสารประกอบฟีนอลิกนั้น ใช้ตัวตรวจวัดเป็นไดโอดแอเรย์ คอลัมน์ที่ใช้ Backman Ultrasphere ODS ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 5 ไมครอน ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำต่อกรดฟอร์มิก (95:5, v/v) (phase A) และอะซีโตไนไตรล์ต่อกรดฟอร์มิก 95% (60:40, v/v) (phase B) ใช้ระบบการไหลแบบเกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำส้มและไวน์ส้ม พบว่า ในกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิกนั้นมีปริมาณกรดเฟอร์รูริกสูงสุดทั้งในตัวอย่างน้ำส้มและไวน์ส้ม คือ 24.06 และ 9.91 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2011 ยงจุน และคณะ (Yong-chun; et al. 2011: 5630-5631) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารโอเรียนทิน ไอโซโอเรียนทิน วิทีซีน ไอโซวิทีซีน กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก และกรดเฟอร์รูริกในตัวอย่างใบไผ่ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

โดยใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอร์เรย์ การเตรียมตัวอย่างนั้นทำการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคอัตราโซนิค ทำการสกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 70% แล้วทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ C18 ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 5 ไมครอน ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นอะซีโตรไนไตรล์(phase A) และกรดแอซีติกเข้มข้น 0.8% ใช้ระบบการไหลแบบเกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าในตัวอย่างใบไผ่มีปริมาณของสารโอเรียนทินสูงสุด

ในปี ค.ศ. 2012 เนวีน่า และคณะ (Nevena; et al. 2012: 2518-2528) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดคลอโรจีนิกในชา โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอร์เรย์ คอลัมน์ C18 ขนาด 150×4.6 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 5 ไมครอน ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นกรดแอซีติกเข้มข้น 1.5% ต่อเมทานอล (85:15) ควบคุมอัตราการไหลที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่า ชามีปริมาณกรดคลอโรจีนิกในช่วง 0.21-1.66 g/100g

ในปี ค.ศ. 2012 วีโอเลต้า และคณะ (Violeta; et al. 2012: 1-8) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และจูโกลนในตัวอย่างใบถั่ว โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอร์เรย์ ตัวอย่างทำการเตรียมโดยนำตัวอย่างทำการสกัดด้วยเมทานอลด้วยเครื่องอัตราโซนิค แล้วนำไปเหวี่ยงแยก นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ต่อ โดยทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ C18 ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 5 ไมครอน ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นกรดแอซีติกเข้มข้น 1% (phase A) และเมทานอล (phase B) ใช้ระบบการไหลแบบเกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 278 และ 300 นาโนเมตร

ในปี ค.ศ. 2013 อะบีฟ และคณะ (Abebe; et al. 2013: 78-91) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดคลอโรจีนิกในกาแฟ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ตัวตรวจวัดเป็นโฟโตไดโอดแอร์เรย์ ตัวอย่างนั้นทำการเตรียมโดยนำกาแฟมาต้มเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการกรอง ทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ C18 ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำต่อกรดแอซีติกต่อเมทานอล (799:1:200 มิลลิลิตร) ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าในตัวอย่างกาแฟมีกรดคลอโรจีนิก 0.981-46.144 มิลลิกรัมต่อกรัม

ในปี ค.ศ. 2013 นัททยา และคณะ (Nattaya; et al. 2013) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลไม้จากประเทศไทย ซึ่งทำการศึกษาผลไม้ 4 ชนิด คือ กล้วย กีวี่ มะม่วงและส้ม โดยใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ตัวตรวจวัดเป็นยูวีวิสิเบิลเป็นดีเทคเตอร์ คอลัมน์ที่ใช้ C18 ขนาด 200×4.6 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 5 ไมครอน ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นกรดแอซีติกเข้มข้น 2% ต่อเมทานอล (82:18, v/v) ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280-320 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่า กล้วยและส้มมีกรดเฟอร์รูลิกสูงสุด คือ 219.5 และ 335.8 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ส่วนกีวี่มีกรดไฮดรอกซิลเบนโซอิกสูงสุดที่ 50.5 ไมโครกรัมต่อกรัม และมะม่วงมีกรดแกลลิกสูงสุดที่ 542 ไมโครกรัมต่อกรัม

จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่า มีการวิเคราะห์ปริมาณสารในกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินามิกในตัวอย่างพืชต่างๆ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ส่วนใหญ่มุ่งเน้นตรวจวิเคราะห์เป็นสารฟีนอลิกทั่วไป และเน้นการตรวจกรดคลอโรจีนิก กรดเฟอร์รูลิก แต่ยังไม่มีการรายงานการตรวจวัดเฉพาะกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด คือ กรดคลอโรจีนิก กรดพาราคูมาริก กรดคาเฟอิก และกรดเฟอร์รูลิก ในตัวอย่างพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดข้างต้น ดังนั้นจึงน่าสนใจที่ทำการศึกษาการตรวจวัดปริมาณสารในกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร ทั้งนี้จะได้ข้อมูลเสริมแก่พืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ในด้านสารกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก และยังสามารถนำผลการศึกษาทางด้านเทคนิคทางเคมีไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยในพืชอื่นๆ ต่อไป

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตรวจวัดแบบไดโอดแอร์เรย์ (diode array detector) จากบริษัท Hewlett-Packard รุ่น HP 1100
- คอลัมน์ C18 (pHendure 5 ไมโครเมตร ขนาด 250×4.60 มิลลิเมตร) จากบริษัท VertiSep
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น AB104-S) จากบริษัท Mettler Toledo
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออนรุ่น LaboStar จากบริษัท Siemens
- ชุดกรองวัฏภาคเคลื่อนที่ขนาด 1000 มิลลิลิตร จากบริษัท Altech
- ไซรินจ์ฟิลเตอร์ (syringe filters) ชนิดไนลอน (nylon) ขนาด 0.45 ไมครอน จากบริษัท Vertical
- กระบอกฉีดยา ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากบริษัท Nitro
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Zentrifugen EBA 8S จากบริษัท Hettich
- เครื่องเขย่า (vortex) รุ่น Vortex-genie 2 จากบริษัท Scientific Industries

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- สารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดเฟอร์รูลิก กรดคาเฟอิก และกรดพาราคูมาริก จากบริษัท Sigma-Aldrich
- กรดแอซีติก (Acetic acid, AR grade) จากบริษัท Merck
- เมทานอล (Methanol, AR grade) จากบริษัท Merck
- เอทานอล (Ethanol, AR grade) จากบริษัท Merck
- อะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile, AR grade) จากบริษัท Merck
- ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- เมทานอล (Methanol , HPLC grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents

- อะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile , HPLC grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- ซิลิกา จากบริษัท Merck
- อะลูมินา จากบริษัท Merck
- เบนโทไนท์ จากบริษัท Fluka
- ออกตะเดคซิล จากบริษัท Vertical

3. ตัวอย่างพืชสมุนไพร

ฝางเสน (เนื้อไม้) ตะไคร้ (ลำต้นและใบ) หญ้าหวาน (ใบ) รากสามสิบ (ราก) และเหงือกปลาหมอ (ใบ) พืชทั้งหมดนี้เป็นพืชสมุนไพรโอท๊อปที่จำหน่ายโดยศูนย์จำหน่ายผลิตภัณฑ์โอ๊ทอปเลียบทางด่วนรามอินทรา เขตบางเขน แขวงอนุสาวรีย์ กรุงเทพมหานคร

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการศึกษาดังนี้ ศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่และศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยใช้สารละลายมาตรฐานผสมกรดคลอโรจีนิก กรดพาราคูมาริก กรดคาเฟอิก และกรดเฟอร์รูลิกที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และกำหนดสภาวะต่างๆ ดังนี้ คอลัมน์ C18 (pHendure 5 ไมโครเมตร ขนาด 250×4.60 มิลลิเมตร) ตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอร์เรย์ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 324 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3) และบันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์

1.1 ศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

โดยทำการศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่ 2 สภาวะ คือ

สภาวะที่ 1 : กรดแอซีติกความเข้มข้น 5% ต่อเมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 80:20 75:25 70:30 65:35 และ 60:40 โดยปริมาตร

สภาวะที่ 2 : กรดแอซีติกความเข้มข้น 5% ต่ออะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วนร้อยละ 90:10 86:14 85.15 85.5:14.5 และ 80:20 โดยปริมาตร

1.2 ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

การศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่จะใช้ชนิดและอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมตามที่ได้จากการศึกษาจากหัวข้อ 1.1 โดยทำการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ดังนี้ 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 และ 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที

ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซินนามิก

2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดพาราคูมาริก กรดคาเฟอิก และกรดเฟอร์รูลิกที่ความเข้มข้ม 2-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรองสารละลายมาตรฐานที่ได้ด้วยไซรินจ์ฟิลเตอร์ไนลอนเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน

2.1.2 ฉีดสารละลายมาตรฐานปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการฉีดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง และบันทึกโครมาโทแกรม

2.1.3 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดพาราคูมาริก กรดคาเฟอิก และกรดเฟอร์รูลิก

2.2 ศึกษาค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection, LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of quantitation, LOQ)

นำสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดเฟอร์รูลิก กรดคาเฟอิก และกรดพาราคูมาริกมาทำการเจือจาง แล้วกรองด้วยไซรินจ์ฟิลเตอร์ไนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน และนำไปตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม ทำการเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่มีสัดส่วนของสัญญาณของสารที่วัดได้เป็น 3 และ 10 เท่า ของสัญญาณรบกวน (noise) ซึ่งเป็นความเข้มข้นของค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ตามลำดับ

2.3 ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

2.3.1 บดตัวอย่างให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง 0.25xx กรัม เติมวัฏภาคของแข็ง 0.5xxx กรัม (สารผสมระหว่างออกตะเดคซิลและซิลิกา อัตราส่วน 1:1) เติมสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม 80% เมทานอลปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที

2.3.2 นำสารผสมจากข้อ 2.3.1 มาบรรจุลงในกระบอกฉีดยา

2.3.3 ทำการชะสารด้วย 80% เมทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2.3.4 เก็บสารละลายและนำสารละลายที่ได้กรองผ่านไซรินจ์ฟิลเตอร์ไนลอนเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำการตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง บันทึกโครมาโทแกรม และคำนวณร้อยละการกลับคืน (% recovery) ดังสมการที่ 1

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{((C_{\text{in sample}} + C_{\text{added}}) - C_{\text{in sample}})) \times 100}{C_{\text{added}}} \quad \text{..... (1)}$$

เมื่อ $C_{\text{in sample}}$ คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่าง

C_{added} คือ ความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

2.4 ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision)

2.4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดพาราคูมาริก กรดคาเฟอิก และกรดเฟอร์รูลิกที่ความเข้มข้น 2 50 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำสารละลายที่ได้กรองผ่านไซรินจ์ฟิลเตอร์ไนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน

2.4.2 ฉีดสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม

2.4.3 คำนวณค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)

- intra-day คือ การทำการทดลองซ้ำภายในวันเดียวกัน โดยทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง
- inter-day คือ การทำการทดลองซ้ำกันระหว่างวันเป็นเวลา 3 วัน โดยทำการทดลองซ้ำวันละ 10 ครั้ง

ตอนที่ 3 ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

3.1 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD)

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมตัวอย่างของวิธีการสกัดวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion ได้ทำการศึกษาดังนี้ ชนิดของวัฏภาคของแข็ง

อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็ง เวลาในการบด ชนิดของตัวชะสาร และปริมาตรของตัวชะสาร

3.1.1 ศึกษาชนิดของวัฏภาคของแข็ง

3.1.1.1 บดตัวอย่างให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างมา 0.25xx กรัม เติมวัฏภาคของแข็ง 0.5xxx กรัม เติมสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม 80% เมทานอลปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที โดยวัฏภาคของแข็งที่ทำการศึกษามี 5 ชนิด ได้แก่ ออกตะเดคซิล เบนโทไนท์ ซิลิกา อะลูมินา และสารผสมระหว่างออกตะเดคซิลและซิลิกา อัตราส่วน 1:1

3.1.1.2 นำสารผสมจากข้อ 3.1.1.1 มาบรรจุใส่ในกระบอกฉีดยา

3.1.1.3 ทำการชะสารด้วย 80% เมทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

3.1.1.4 เก็บสารละลาย แล้วนำสารละลายกรองผ่านไซรินท์ฟิลเตอร์ไนลอน เมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำการตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และทำการบันทึกโครมาโทแกรม

3.1.2 ศึกษาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็ง

การศึกษาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็งทำการศึกษาเหมือนหัวข้อ 3.1.1 โดยทำการศึกษาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็งดังนี้ 1:1 1:2 1:4 และ 1:0.5 และใช้วัฏภาคของแข็งที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.1.1

3.1.3 ศึกษาเวลาในการบด

การศึกษาเวลาในการบดตัวอย่างนั้นทำการศึกษาเหมือนหัวข้อ 3.1.1 แต่เปลี่ยนเวลาในการบดจาก 30 วินาที เป็น 10 60 180 และ 300 วินาที และใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.1.1 และ 3.1.2

3.1.4 ศึกษาชนิดของตัวชะสาร

การศึกษาชนิดของตัวชะสารนั้นทำการศึกษาเหมือนหัวข้อ 3.1.1 แต่เปลี่ยนชนิดของตัวชะสารจาก 80% เมทานอล เป็น 80% เอทานอล และกรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่ออะซีโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 85.5:14.5 โดยปริมาตร และใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.1.1 - 3.1.3

3.1.5 ศึกษาปริมาตรของตัวชะสาร

การศึกษาปริมาตรของตัวชะสารนั้นทำการศึกษาเหมือนหัวข้อ 3.1.1 แต่เปลี่ยนปริมาตรของตัวชะสารจาก 3 มิลลิลิตร เป็น 1 2 5 และ 10 มิลลิลิตร และใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.1.1 – 3.1.4

3.2 การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD) ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลว (LLE) และวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลวแล้วตามด้วยวิธีการสกัดแบบดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน (LLE-DLLME)

3.2.1 วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion

3.2.1.1 นำตัวอย่างมา 0.25xx กรัม เติมวัฏภาคของแข็ง 0.5xxx กรัม (สารผสมระหว่างออกตะเดคซิลและซิลิกา อัตราส่วน 1:1) แล้วเติมสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม 80% เมทานอลปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที

3.1.1.2 นำสารผสมจากข้อ 3.2.1.1 มาบรรจุใส่ในกระบอกฉีดยา

3.1.1.3 ทำการชะสารด้วย 80% เมทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

3.1.1.4 เก็บสารละลาย แล้วนำสารละลายกรองผ่านไซรินท์ฟิลเตอร์ไนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำการตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและทำการบันทึกโครมาโทแกรม

3.2.2 วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลว

3.2.2.1 นำตัวอย่าง 0.25xx กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติม 80% เมทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเขย่าเป็นเวลา 1 นาที

3.2.2.2 เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3.2.2.3 นำสารละลายกรองผ่านไซรินท์ฟิลเตอร์ไนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำการตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และทำการบันทึกโครมาโทแกรม

3.2.3 วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลวแล้วตามด้วยวิธีการสกัดแบบดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน

3.2.3.1 วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลว

นำตัวอย่าง 0.25xx กรัม ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติม 80% เมทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 นาที และเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายตัวอย่างที่ได้สกัดต่อด้วยวิธีการสกัดแบบดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน

3.2.3.2 นำสารละลายจากข้อ 3.2.3.1 มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมตัวทำละลายสกัด (ไดคลอโรมีเทน) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมตัวทำละลายการกระจาย (อะซีโตไนไตรล์) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วฉีดน้ำปราศจากไอออนลงไปอย่างรวดเร็วปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

3.2.3.3 ทำการผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 วินาที และนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3.2.3.4 นำสารละลายชั้นล่างมาระเหย แล้วละลายสารด้วยโมบายเฟสปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำสารละลายกรองผ่านไซรินท์ฟิลเตอร์ไนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำการตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และทำการบันทึกโครมาโทแกรม

ตอนที่ 4 การศึกษาผลของสารรบกวนของการวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซินนามิก

ผลการรบกวนของสารประกอบฟีนอลิก

4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของกรดคลอโรจีนิก กรดเฟอร์รูลิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก กรดแกลลิก กรดแทนนิก และคาเทชินที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2 นำสารละลายกรองผ่านไซรินจ์ฟิลเตอร์ไนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการบันทึกโครมาโทแกรม

ตอนที่ 5 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

5.1 บดตัวอย่างแต่ละชนิดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง 0.25xx กรัม เติมวัฏภาคของแข็ง 0.5xxx กรัม (สารผสมระหว่างออกตะเดคซิลและซิลิกา อัตราส่วน 1:1) และเติม 80% เมทานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที

5.2 นำสารผสมจากข้อ 5.1 มาบรรจุลงในกระบอกฉีดยา

5.3 ทำการชะสารด้วย 80% เมทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

5.4 เก็บสารละลาย และนำสารละลายที่ได้กรองผ่านไซรินจ์ฟิลเตอร์ไนลอนเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำการตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง บันทึกโครมาโทแกรม

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอนำเสนอผลการวิจัยตามลำดับดังนี้

ตอนที่ 1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

ตอนที่ 3 ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

ตอนที่ 4 ศึกษาผลของสารรบกวนของการวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซินนามิก

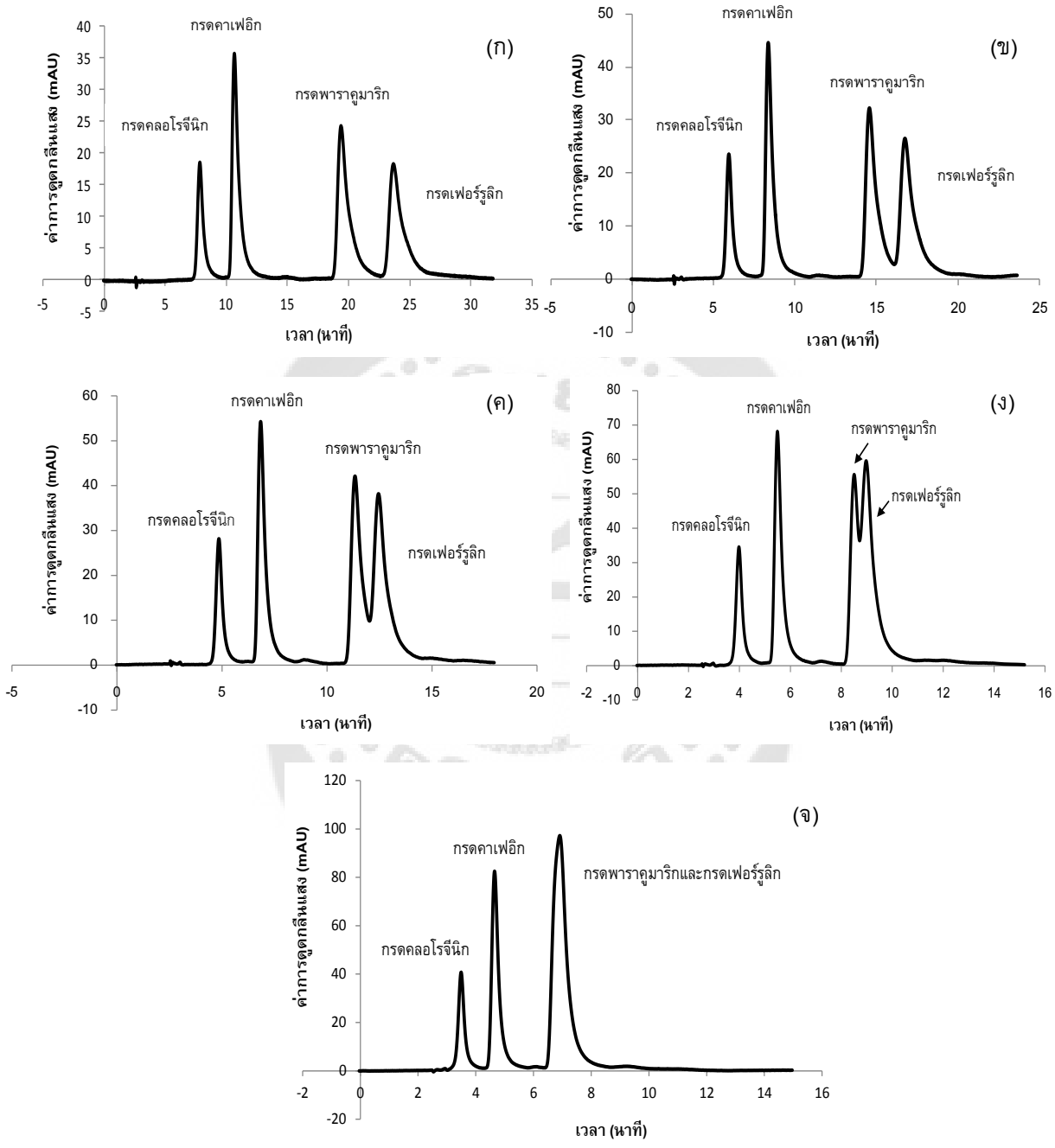
ตอนที่ 5 วิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.1 ศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

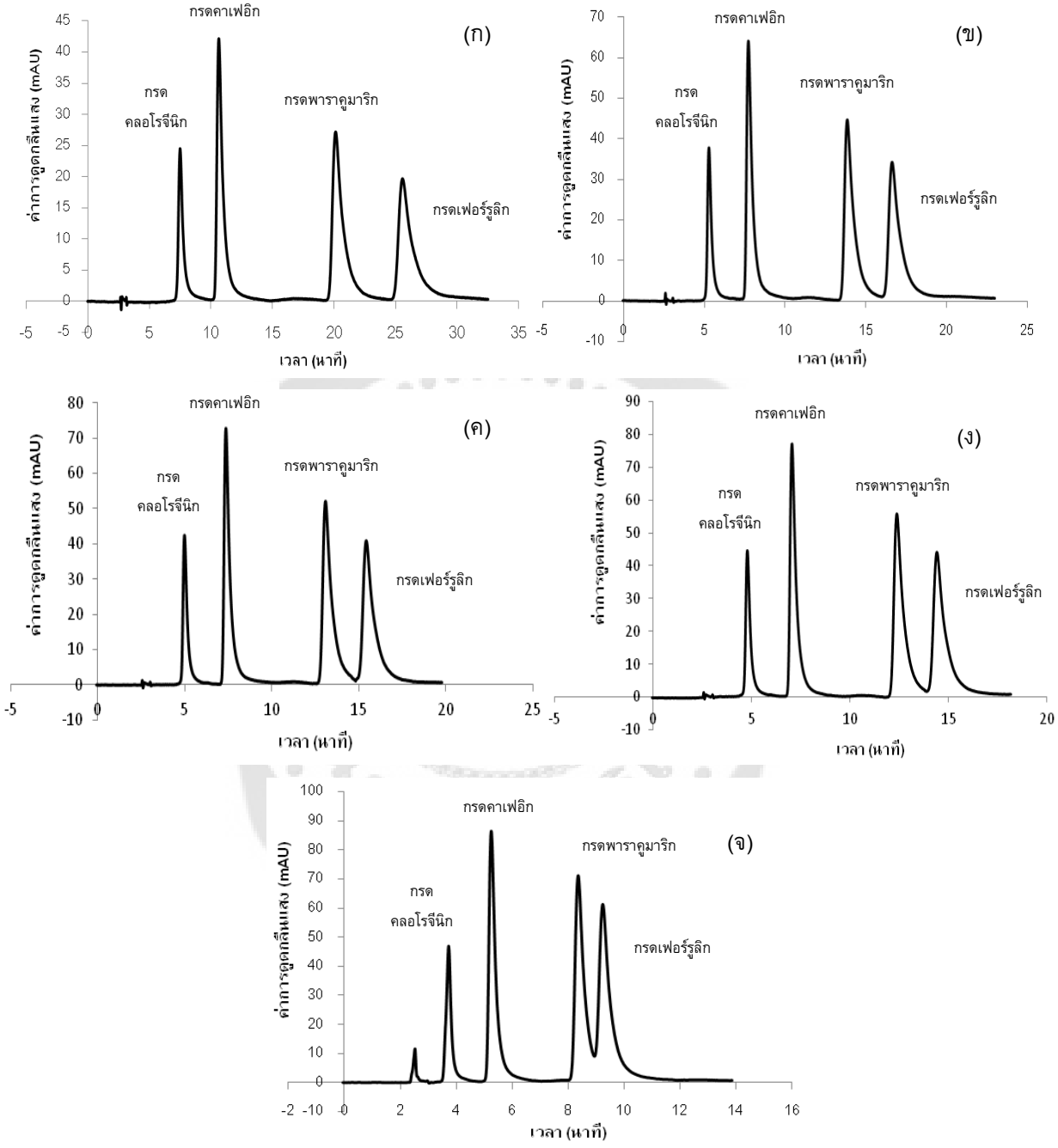
ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ 2 สภาวะ ดังนี้ สภาวะที่ 1 กรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่อเมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 80:20 75:25 70:30 65:35 และ 60:40 โดยปริมาตร สภาวะที่ 2 กรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่ออะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วนร้อยละ 90:10 86:14 85.15 85.5:14.5 และ 80:20 โดยปริมาตร โดยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบตัวทำละลายอินทรีย์ระหว่างเมทานอลและอะซีโตไนไตรล์ สำหรับการศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นกรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่อเมทานอล ผลแสดงดังภาพประกอบ 9 พบว่า เมื่อเลือกใช้สภาวะกรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่อเมทานอลในอัตราส่วนร้อยละ 80:20 โดยปริมาตร นั้นทำให้สามารถแยกกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดอย่างชัดเจน โดยมีค่าระยะเวลารีเทนชันของกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกเท่ากับ 7.8 10.6 19.3 และ 23.6 นาที ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์คือเมทานอลนั้นจะทำให้ระยะเวลารีเทนชันนั้นมีค่าลดลง เป็นการลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ แต่ถ้าเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์มากเกินไปจะทำให้กรดพาราคูมาริกและกรดเฟอร์รูลิกไม่สามารถแยกออกจากกันได้ (ใน

อัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนกรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่อเมทานอล เท่ากับ 75:25 70:30 65:35 และ 60:40 โดยปริมาตร) และในอัตราส่วนร้อยละ 60:40 โดยปริมาตร กรดพาราคูมาริกและกรดเฟอร์รูลิกเกิดการรวมกัน



ภาพประกอบ 9 โครมาโทแกรมของกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด วัฏภาคเคลื่อนที่คือ กรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่อเมทานอล ที่อัตราส่วนร้อยละ (ก) 80:20 โดยปริมาตร (ข) 75:25 โดยปริมาตร (ค) 70:30 โดยปริมาตร (ง) 65:35 โดยปริมาตร และ (จ) 60:40 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

สำหรับการศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นกรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่ออะซีโตไนไตรล์ ผลแสดงดังภาพประกอบ 10

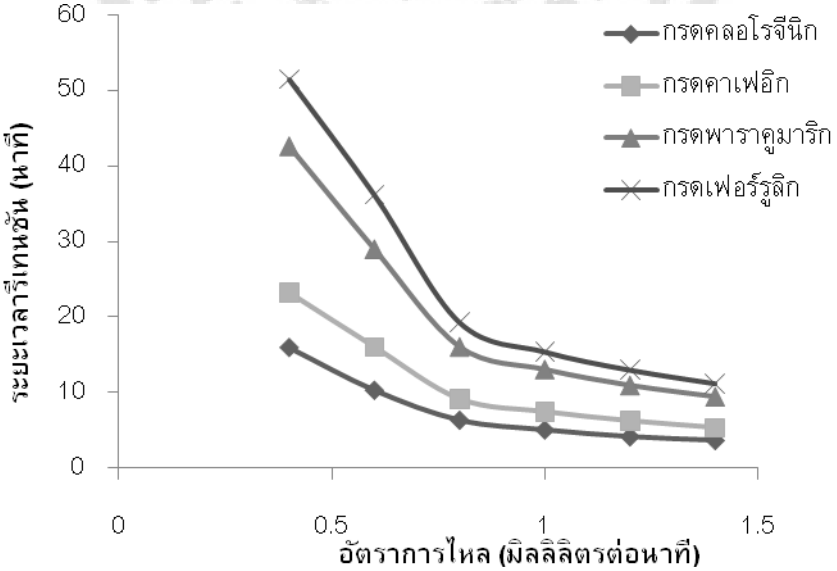


ภาพประกอบ 10 โครมาโทแกรมของกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด วัฏภาคเคลื่อนที่คือ กรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่ออะซีโตไนไตรล์ ที่อัตราส่วนร้อยละ (ก) 90:10 โดยปริมาตร (ข) 86:14 โดยปริมาตร (ค) 85.5:14.5 โดยปริมาตร (ง) 85:15 โดยปริมาตร และ (จ) 80:20 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

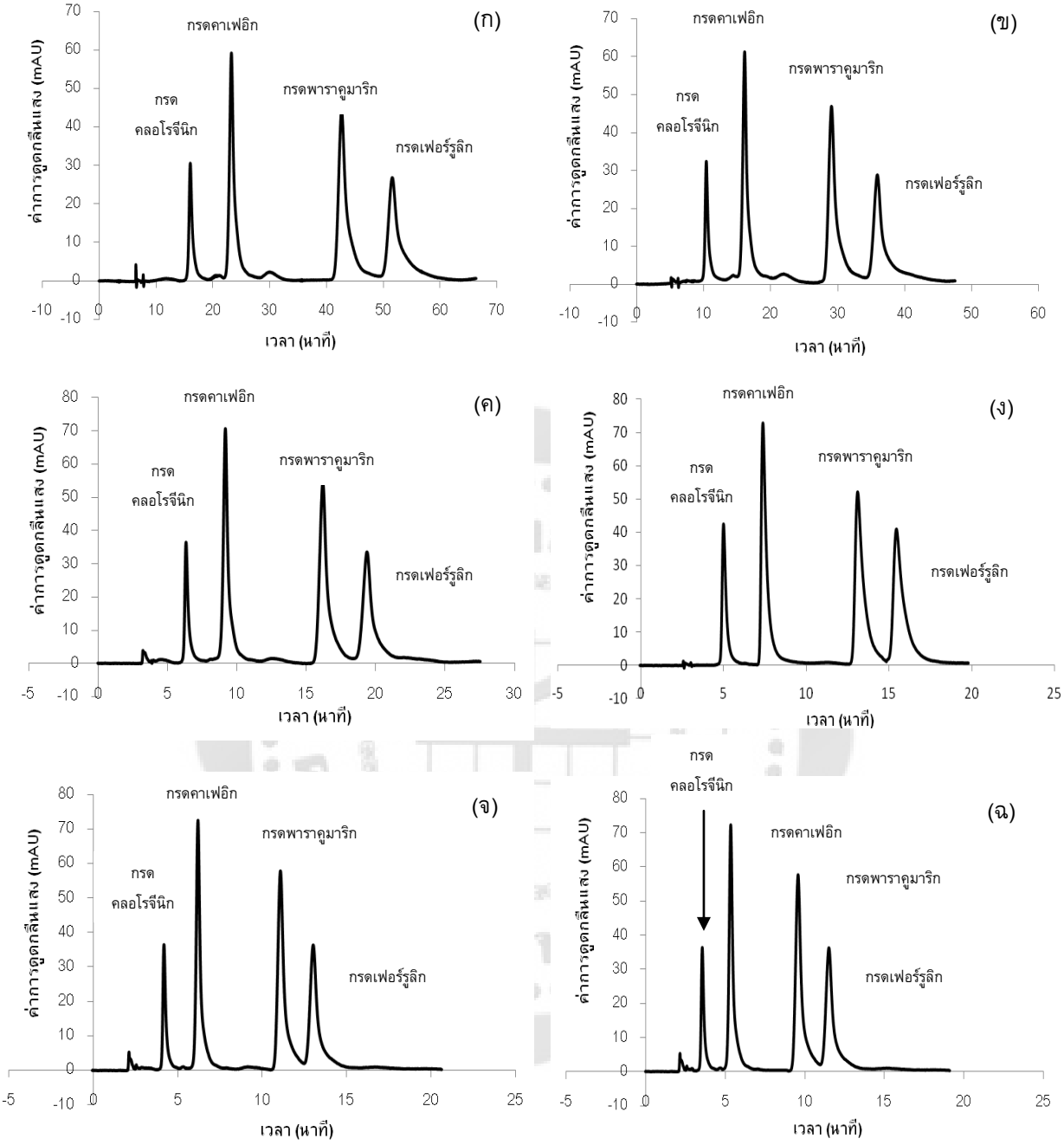
จากภาพประกอบ 10 พบว่า ให้ผลในทำนองเดียวกันคือ เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้ระยะเวลารีเทนชันนั้นมีค่าลดลง ส่งผลให้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ลดลง ซึ่งพบว่าทุกอัตราส่วนสามารถแยกกรดไฮดรอกซีซินนามิกได้อย่างชัดเจน ยกเว้นในอัตราส่วนร้อยละ 85:15 และ 80:20 โดยปริมาตร เมื่อเปรียบเทียบการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกันจะเห็นได้ว่า เมื่อเลือกใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นกรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่ออะซีโตไนไตรล์นั้นสามารถวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดได้เร็วกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นกรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่อเมทานอล ดังนั้นเพื่อลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ และลดปริมาณการใช้ของตัวทำละลายอินทรีย์ให้น้อยลง ในงานวิจัยนี้จึงเลือกวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นกรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่ออะซีโตไนไตรล์ ซึ่งเมื่อพิจารณาดังภาพประกอบ 10 พบว่า ในอัตราส่วนร้อยละ 85.5:14.5 โดยปริมาตร เหมาะสมที่สุด โดยมีค่าระยะเวลารีเทนชันกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกเท่ากับ 5.0 7.3 13.1 และ 15.4 นาที ตามลำดับ

1.2 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

การศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ทำการศึกษาอัตราการไหลที่ 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 และ 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที และมีองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่คือ กรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่ออะซีโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 85.5:14.5 โดยปริมาตร ผลแสดงดังภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 ผลการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่



ภาพประกอบ 12 โครมาโทแกรมของกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด วัฏภาคเคลื่อนที่คือ กรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่ออะซีโตไนไตรล์ (85.5:14.5 โดยปริมาตร) ที่อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ (ก) 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที (ข) 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที (ค) 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที (ง) 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที (จ) 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที และ (ฉ) 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที

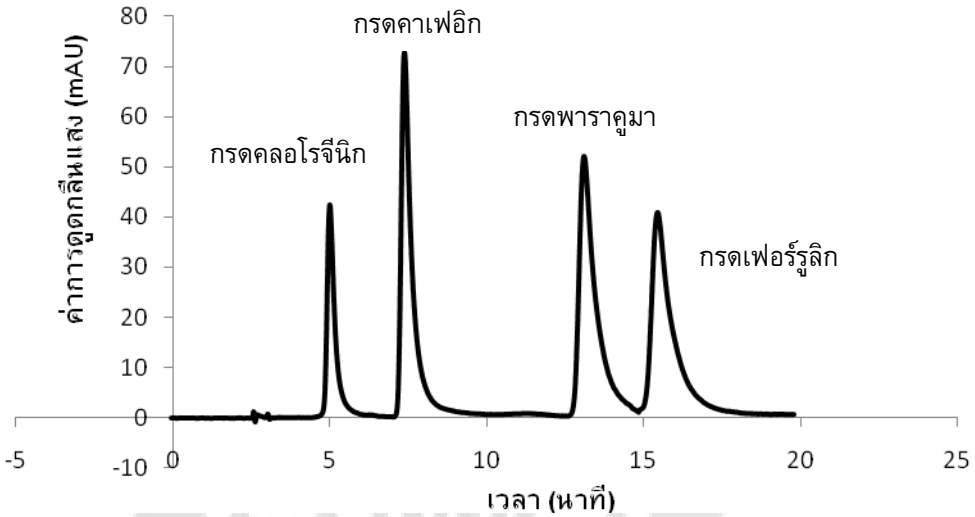
จากภาพประกอบ 11 และ 12 พบว่า การเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ ก็จะทำให้สารถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น ทำให้ระยะเวลารีเทนชันของสารลดลง แต่ถ้าอัตราการไหลสูงเกินไปจะทำให้อนุภาคของสารเกิดการถ่ายโอนมวลสารระหว่างวัฏภาคนิ่งกับวัฏภาคเคลื่อนที่ลดลง ทำให้สมดุลของอัตรากิริยาการกระจายตัวระหว่างโมเลกุลของสารกับวัฏภาคนิ่งและวัฏภาคเคลื่อนที่ลดลง ส่งผลให้ค่าการแยก (Resolution) ลดลงต่ำด้วย (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ. 2553) และอาจจะส่งผลต่อคอลัมน์เพราะเนื่องจากยิ่งเพิ่มอัตราการไหลยิ่งทำให้แรงดันภายในระบบสูงขึ้น อาจทำให้คอลัมน์เกิดความเสียหายได้ ภาพประกอบ 12 เมื่อทำการเปรียบเทียบความสูงของพีกและพื้นที่พีกพบว่า อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ 1.0 เหมาะสมที่สุด เนื่องจาก อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที มีความสูงของพีกและพื้นที่พีกมากที่สุด และสามารถแยกกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดได้ชัดเจน และมีระยะเวลารีเทนชันของสารเหมาะสม อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ 1.2 และ 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดได้เร็วกว่าอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที แต่พบว่ากรดพาราคูมาริกและกรดเฟอร์รูลิกนั้นไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผลแสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกกรดไฮดรอกซีซินนามิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ตัวแปร	สภาวะที่ใช้ในการทดลอง
คอลัมน์	คอลัมน์ C18 ขนาด 5 ไมโครเมตร, 250×4.60 มิลลิเมตร
องค์ประกอบวัฏภาคเคลื่อนที่	กรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่ออะซีโตไนไตรล์ อัตราส่วนร้อยละ 85.5:14.5 โดยปริมาตร
อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
ตัวตรวจวัด	ไดโอดแอร์เรย์
ความยาวคลื่น	324 นาโนเมตร

จากการใช้สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด แสดงดังภาพประกอบ 13



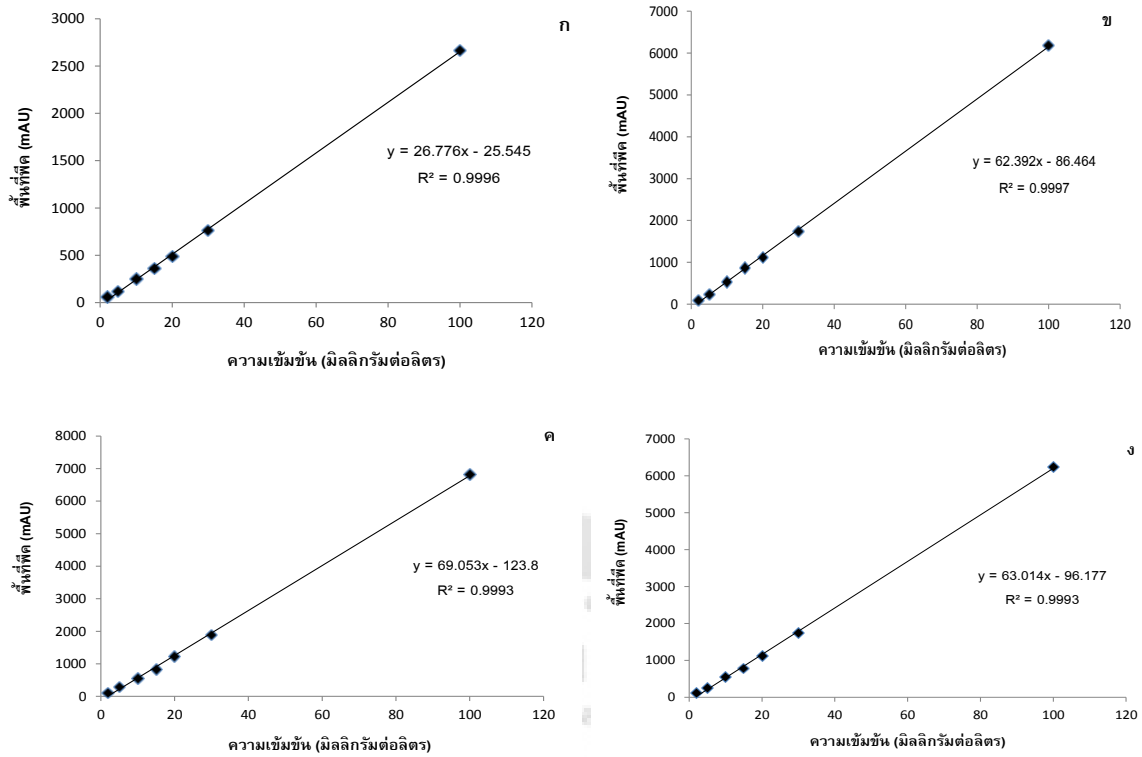
ภาพประกอบ 13 แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก (วัฏภาคเคลื่อนที่ : กรดแอซีติกเข้มข้น 5% ต่ออะซีโตไนไตรล์ อัตราส่วน 85.5:14.5 โดยปริมาตร, อัตราการไหล : 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 324 นาโนเมตร)

จากภาพประกอบ 12 กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกมีค่าระยะเวลารีเทนชันเท่ากับ 5.0 7.3 13.1 และ 15.4 นาที ตามลำดับ

ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

2.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง ได้ทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 2-100 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน y แทนพื้นที่ใต้พีค (mAU) และแกน x แทนความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซินนามิก (มิลลิกรัมต่อลิตร) แสดงดังภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 14 กราฟมาตรฐานของกรดไฮดรอกซีซินนามิก (ก) กรดคลอโรจีนิก (ข) กรดคาเฟอิก (ค) กรดพาราคูมาริก (ง) กรดเฟอร์รูลิก

จากภาพประกอบ 14 พบว่า กราฟมาตรฐานที่ได้มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง ($R^2 \approx 0.9993$-0.9997) ผลแสดงดังตาราง 2

ตาราง 2 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

กรดไฮดรอกซีซินนามิก	ช่วงความเป็นเส้นตรง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สมการเส้นตรง	R^{2*}
กรดคลอโรจีนิก	2-100	y = 26.776x – 25.545	0.9996
กรดคาเฟอิก	2-100	y = 62.392x – 86.464	0.9997
กรดพาราคูมาริก	2-100	y = 69.053x – 123.8	0.9993
กรดเฟอร์รูลิก	2-100	y = 69.014x – 96.177	0.9993

* ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

2.2 ศึกษาค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection, LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of quantitation, LOQ)

การศึกษาค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD, 3S/N) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ, 10S/N) ของกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด ผลแสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ)

กรดไฮดรอกซีซินนามิก	ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
กรดคลอโรจีนิก	0.08	0.26
กรดคาเฟอิก	0.06	0.20
กรดพาราคูมาริก	0.10	0.33
กรดเฟอร์รูลิก	0.15	0.50

2.3 ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์นั้นแสดงผลเป็นค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ผลแสดงดังตาราง 4

ตาราง 4 ค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ในตัวอย่างพืชสมุนไพร

ตัวอย่าง	ค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery±SD)			
	กรดคลอโรจีนิก	กรดคาเฟอิก	กรดพาราคูมาริก	กรดเฟอร์รูลิก
ฝาง	87.35±0.95	nd	nd	nd
ตะไคร้	83.54±1.01	nd	90.26±0.87	92.13±0.92
หญ้าหวาน	85.23±0.89	87.48±1.10	nd	nd
รากสามสิบ	nd	89.03±1.32	nd	nd
เหงือกปลาหมอ	90.32±1.05	92.12±1.24	96.45±0.98	95.44±1.02

จากตาราง 4 พบว่า ค่าร้อยละการคืนกลับของกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก และกรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกอยู่ในช่วง 83.54±1.01-90.32±1.05 87.48±1.10-92.12±1.24 90.26±0.84 - 96.45±0.98 และ 92.13±0.92 - 95.44±1.02 ตามลำดับ

2.4 ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

การศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ พบว่าความแม่นยำสำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน และความแม่นยำสำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน พบว่าให้ค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.49 -1.41 และ 0.50 – 1.45 ตามลำดับ ผลแสดงดังตาราง 5

ตาราง 5 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

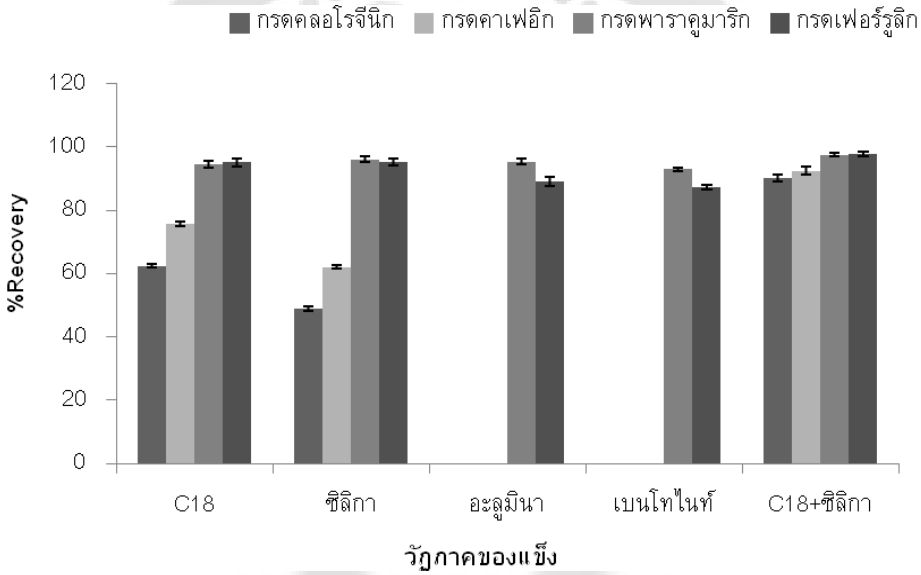
การทดลอง	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	%RSD (n=10)			
		กรดคลอโรจีนิก	กรดคาเฟอิก	กรดพาราคูมาริก	กรดเฟอร์รูลิก
วันเดียวกัน	2	1.08	1.41	0.89	0.89
	50	0.98	1.18	0.51	0.69
	100	0.92	1.05	0.49	0.87
ระหว่างวัน	2	1.10	1.45	0.92	0.94
	50	1.01	1.23	0.56	0.73
	100	0.98	1.09	0.50	0.90

ตอนที่ 3 ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

3.1 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD)

3.1.1 ศึกษาชนิดของวัฏภาคของแข็ง

การศึกษาชนิดของวัฏภาคของแข็งได้ทำการศึกษาวัฏภาคของแข็ง 5 ชนิด ได้แก่ ออกตะเดคซิล ซิลิกา อะลูมินา เบนโทไนท์ และสารผสมระหว่างออกตะเดคซิลและซิลิกาในอัตราส่วน 1:1 ผลแสดงดังภาพประกอบ 15



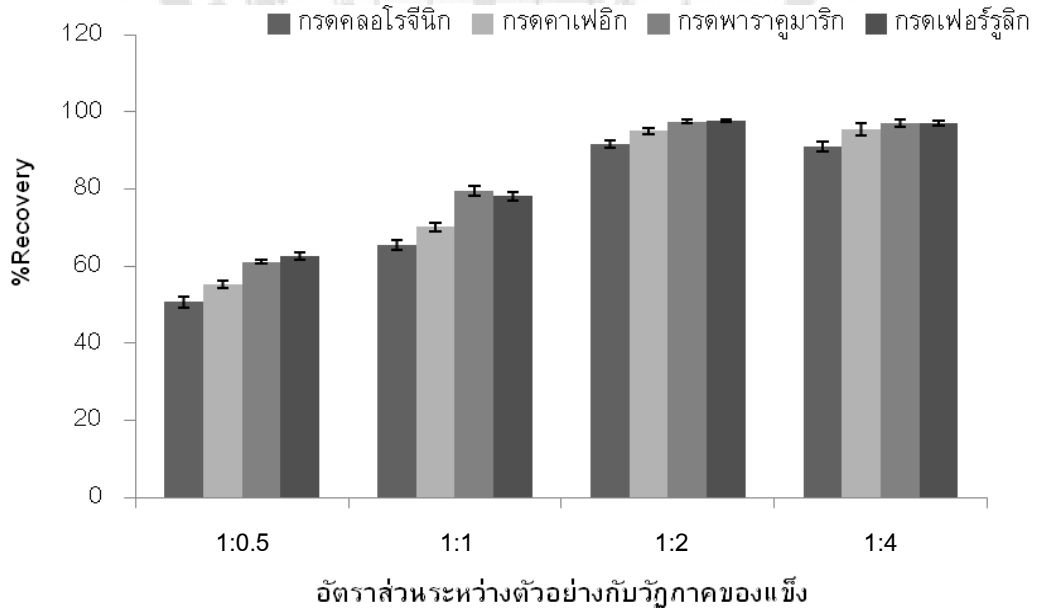
ภาพประกอบ 15 ผลการศึกษาชนิดของวัฏภาคของแข็ง

จากภาพประกอบ 15 พบว่า การใช้วัฏภาคของแข็งออกตะเดคซิลนั้นให้ประสิทธิภาพในการสกัดกรดพาราคูมาริกและกรดเฟอร์รูลิกสูง เพราะเนื่องจากกรดพาราคูมาริกและกรดเฟอร์รูลิกนั้นมีความมีขั้วต่ำกว่ากรดคลอโรจีนิกและกรดคาเฟอิก ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้สารชะเป็น 80% เมทานอล ซึ่งค่อนข้างมีความมีขั้วต่ำ ดังนั้นจึงสามารถที่จะชะกรดพาราคูมาริกและกรดเฟอร์รูลิกได้ดีกว่ากรดคลอโรจีนิกและกรดพาราคูมาลิก ส่วนการใช้วัฏภาคของแข็งเป็นซิลิกา ผลที่ได้คล้ายกับการใช้วัฏภาคของแข็งเป็นออกตะเดคซิล คือสามารถชะกรดพาราคูมาริกและกรดเฟอร์รูลิกได้ดี และเนื่องจากซิลิกามีความมีขั้วสูงกว่าออกตะเดคซิล ทำให้กรดคลอโรจีนิกและกรดคาเฟอิก

สามารถดูดซับบนผิวซิลิกาได้ดีกว่าออกตะเดคซิล จึงทำให้ประสิทธิภาพของการสกัดกรดคลอโรจีนิกและกรดคาเฟอิกต่ำกว่าการใช้วัฏภาคของแข็งเป็นออกตะเดคซิล สำหรับการใช้วัฏภาคของแข็งเป็นอะลูมินาและเบนโทไนท์ พบว่า ได้ผลการทดลองเหมือนกัน คือสามารถมีประสิทธิภาพในการสกัดกรดพาราคูมาริกและกรดเฟอร์รูลิกสูง แต่เนื่องจากอะลูมินาและเบนโทไนท์มีคุณสมบัติความมีขั้วสูงมากจึงเป็นผลทำให้กรดคลอโรจีนิกและกรดคาเฟอิกดูดซับบนผิวของอะลูมินาและเบนโทไนท์ได้ดี ทำให้การชะกรดทั้ง 2 ออกจากพื้นผิวของอะลูมินาและเบนโทไนท์นั้นเกิดได้ยาก เมื่อนำวัฏภาคของแข็งที่เป็นออกตะเดคซิลและซิลิกามาผสมกัน พบว่า ประสิทธิภาพการสกัดของกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดนั้นสูง เนื่องจากกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดสามารถเกาะบนผิวของวัฏภาคของแข็งมากขึ้น จึงทำให้แยกกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดได้ดีขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูง ดังนั้น วัฏภาคของแข็งที่เหมาะสมคือ สารผสมระหว่างออกตะเดคซิลและซิลิกาในอัตราส่วน 1:1

3.1.2 ศึกษาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็ง

การศึกษาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็งได้ทำการศึกษา 4 สภาวะ ได้แก่ 1:0.5 1:1 1:2 และ 1:4 ตามลำดับ ผลแสดงดังภาพประกอบ 16

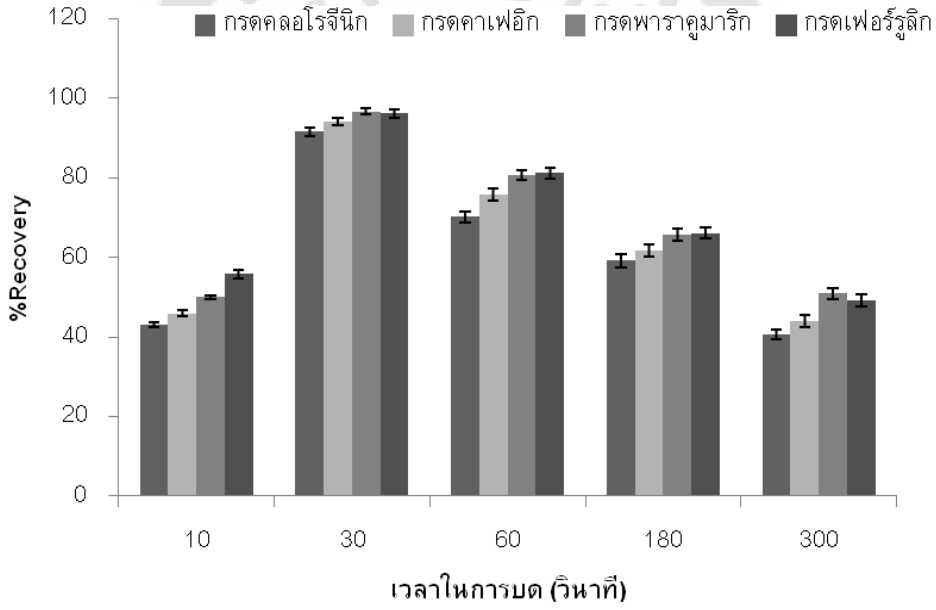


ภาพประกอบ 16 ผลการศึกษาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็ง

การทดลองอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็งนั้นใช้วัฏภาคของแข็งที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 3.1.1 คือ สารผสมระหว่างออกตะเดคซิลกับซิลิกาในอัตราส่วน 1:1 และใช้ตัวชะเป็น 80% เมทานอล จากภาพประกอบ 16 พบว่า การเพิ่มอัตราส่วนของวัฏภาคของแข็งในอัตราส่วน 1:2 และ 1:4 นั้นให้ค่าร้อยละการกลับคืนสูงและคงที่ โดยให้ค่าร้อยละการกลับคืนของกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดในช่วง 91.02-97.55 ดังนั้น อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็งที่เหมาะสมคือ 1:2

3.1.3 ศึกษาเวลาในการผสม

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเวลาในการบดตัวอย่างผสมกับวัฏภาคของแข็ง ดังนี้ 10 30 60 180 และ 300 วินาที ผลแสดงดังภาพประกอบ 17



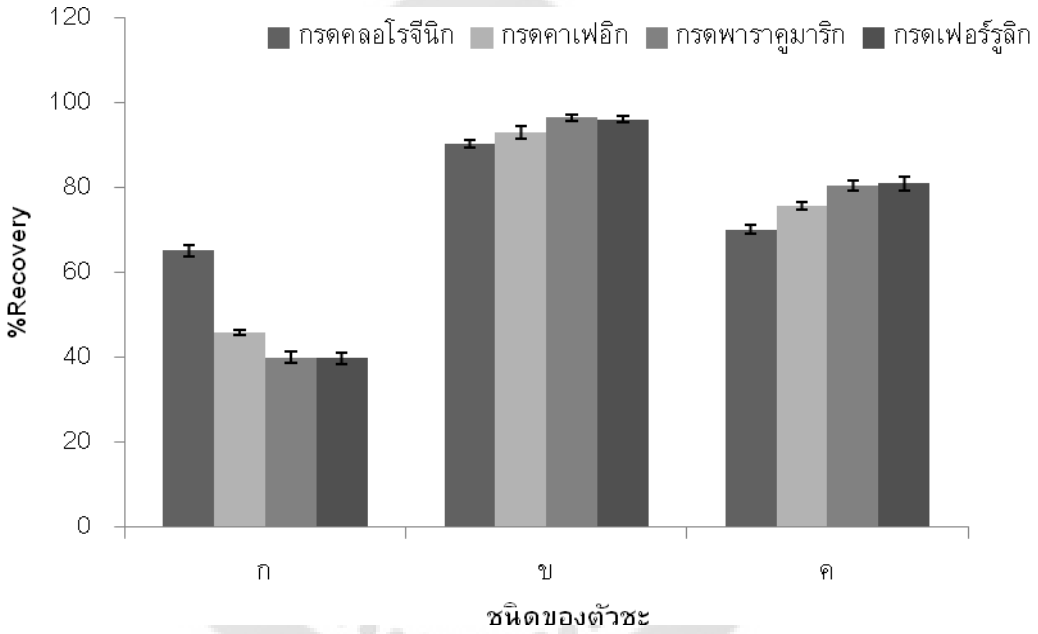
ภาพประกอบ 17 ผลการศึกษาเวลาในการบดตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็ง

จากภาพประกอบ 17 พบว่า เมื่อเพิ่มเวลาในการบดตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็งจาก 10 วินาที เป็น 30 วินาที ทำให้ค่าร้อยละการกลับคืนเพิ่มมากขึ้น แต่หลังจาก 30 วินาที ค่าร้อยละการกลับคืนเริ่มลดลง ซึ่งเมื่อยิ่งเพิ่มเวลาในการบดตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็งก็จะทำให้ค่าร้อยละการกลับคืนของกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด มีแนวโน้มลดลง ซึ่งอาจเป็นเพราะการใช้เวลาในการบดตัวอย่างนานเกินไปอาจจะทำให้สารสลายตัวได้เพราะเนื่องจากเกิดความร้อนขึ้นจาก

การเสียดสี ซึ่งไม่ควรทำการบดตัวอย่างนานเกินไป ดังนั้นเวลาในการบดตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็งที่เหมาะสมคือ 30 วินาที

3.1.4 ศึกษาชนิดของตัวชะสาร

การศึกษาชนิดตัวชะสารกรดไฮดรอกซีซินนามิกได้ทำการศึกษาตัวชะ 3 ชนิด คือ กรดแอซีติกเข้มข้น 5% และอะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 85.5:14.5 80%เมทานอล และ 80% เอทานอล ผลแสดงภาพประกอบ 18



ภาพประกอบ 18 ผลการศึกษาชนิดตัวชะสาร

ก แทน กรดแอซีติกเข้มข้น 5% และอะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 85.5:14.5

ข แทน 80%เมทานอล

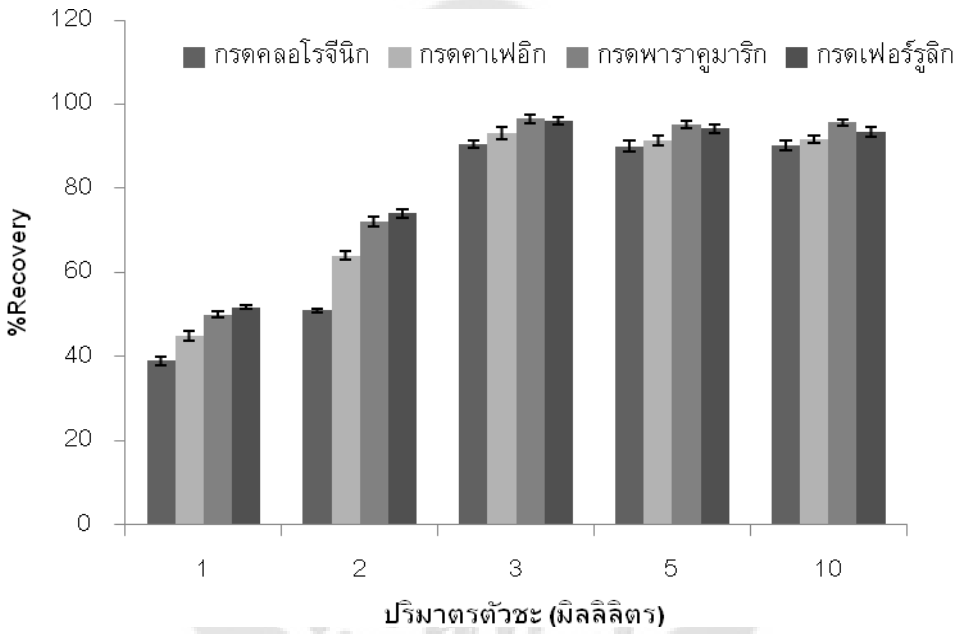
ค แทน 80% เอทานอล

จากภาพประกอบ 18 พบว่า สารที่ให้ค่าร้อยละกลับคืนสูงสุดคือ 80% เมทานอล เนื่องจาก หากเรียงลำดับความมีขั้วของสารตัวชะจากมากไปน้อย ได้ดังนี้ ก > ข > ค ซึ่งในการชะสารนั้นอาศัยหลักการสารที่มีคุณสมบัติความมีขั้วเหมือนกันย่อมละลายซึ่งกันและกันได้ดี โดยสารตัวชะชนิด ก นั้นมีความมีขั้วมากจึงทำให้ชะกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดออกมาได้น้อย ส่วน

สารชะ ก และ ข ความมีขั้วใกล้เคียงกัน แต่สารชะ ข นั้นมีความมีขั้วมากกว่าจึงสามารถชะกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดออกมาได้ดีกว่า ดังนั้น ชนิดตัวชะที่เหมาะสมคือ 80%เมทานอล

3.1.5 ศึกษาปริมาตรของตัวชะสาร

การศึกษาปริมาตรของตัวชะสารได้ทำการศึกษานั้นใช้ 80% เมทานอลเป็นตัวชะกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด โดยทำการศึกษา 5 สภาวะ ได้แก่ 1 2 3 5 และ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลแสดงดังภาพประกอบ 19



ภาพประกอบ 19 ผลการศึกษาปริมาตรของตัวชะ

จากภาพประกอบ 19 พบว่า การใช้ปริมาตรตัวชะเท่ากับ 3 5 และ 10 มิลลิลิตร นั้นให้ค่าร้อยละการกลับคืนสูง ซึ่งให้ค่าร้อยละการกลับคืนของกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด ใกล้เคียงกัน ซึ่งให้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 90.05-96.58 ดังนั้น ปริมาตรที่เหมาะสมของ 80% เมทานอลสำหรับชะกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดคือ 3 มิลลิลิตร

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD) สำหรับการสกัดกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิก สภาวะที่เหมาะสมมีดังนี้

ชนิดของวัฏภาคของแข็ง คือ สารผสมระหว่างออกตะเดคซิลและซิลิกา

อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็ง คือ 1:2

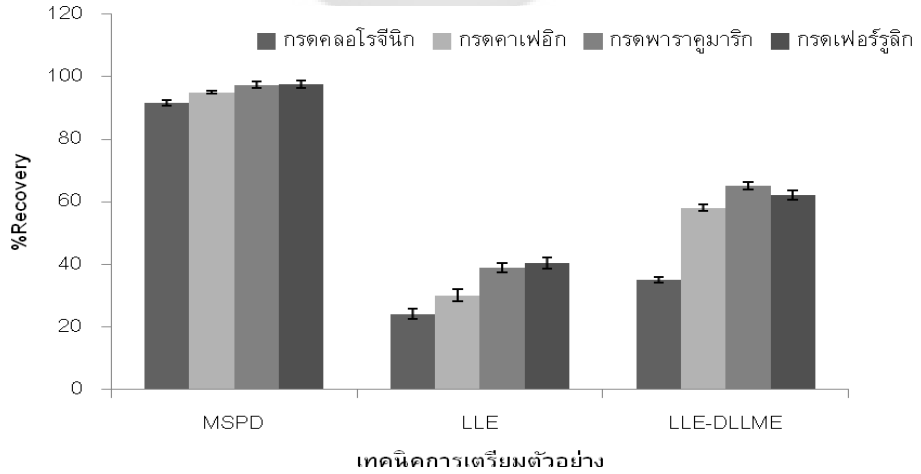
เวลาในการผสมตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็ง คือ 30 วินาที

ชนิดของตัวชะสาร คือ 80% เมทานอล

ปริมาตรของตัวชะสาร คือ 3 มิลลิลิตร

3.2 การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD) ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลว (LLE) และวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลวแล้วตามด้วยวิธีการสกัดแบบดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน (LLE-DLLME)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่าง 3 วิธี ได้แก่ วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD) ที่พัฒนาขึ้น กับวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลว (LLE) และวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลวแล้วตามด้วยวิธีการสกัดแบบดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน (LLE-DLLME) ผลแสดงดังภาพประกอบ 20

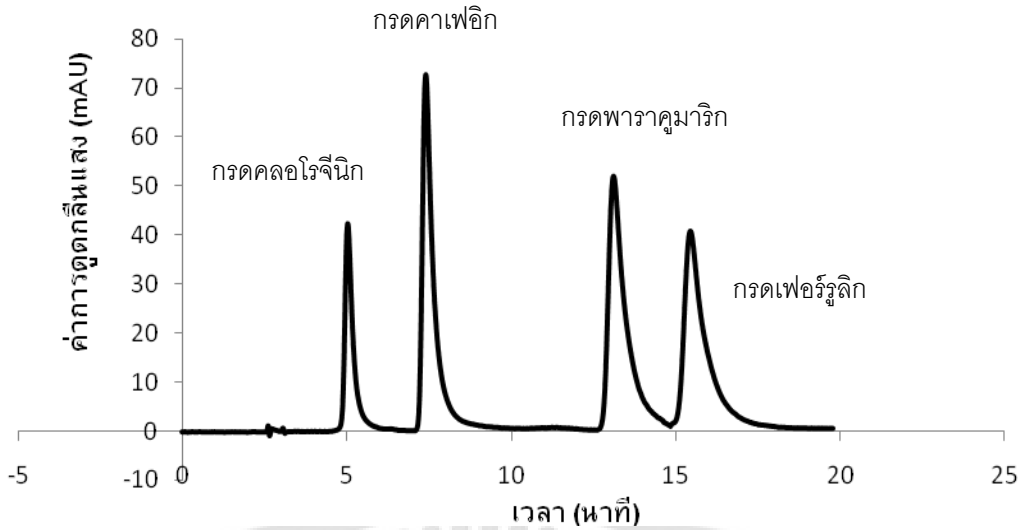


ภาพประกอบ 20 ผลการศึกษาการเปรียบเทียบเทคนิคการเตรียมตัวอย่าง

ภาพประกอบ 20 พบว่า วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion นั้นมีค่าร้อยละการคืนกลับสูงกว่าวิธีการสกัดวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลว และวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลวแล้วตามด้วยวิธีการสกัดแบบดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน เนื่องจาก วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลวนั้นมีข้อด้อย คือ จะต้องใช้ปริมาณสารสกัดในปริมาณมาก ทำให้การสกัดกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด ออกมาได้น้อย และให้ค่าร้อยละการกลับคืนต่ำ ส่วนวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลวแล้วตามด้วยวิธีการสกัดแบบดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชันนั้นพบว่า ให้ค่าร้อยละการกลับคืนต่ำ ซึ่งถึงแม้วิธีการสกัดแบบดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชันนั้นมีข้อดีมากมาย เช่น ใช้ปริมาณสารสกัดในปริมาณน้อย ทำได้ง่าย ราคาถูก เป็นต้น แต่การสกัดด้วยวิธีนี้ก็มีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการสกัด เช่น ชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ชนิดตัวทำละลายการกระจาย ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตัวทำละลายการกระจาย และเวลาที่ใช้ในการสกัด เป็นต้น ซึ่งถ้าหากปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวนั้นไม่เหมาะสมก็จะทำให้ได้ประสิทธิภาพในการสกัดต่ำ

ตอนที่ 4 การศึกษาผลของสารรบกวนของการวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซินนามิก

การศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่างพืชสมุนไพร โดยได้ทำการศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิก ที่อาจจะมีผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกที่ศึกษา ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแทนนิก และคาเทชิน โดยทำการเติมตัวรบกวนทั้ง 3 ชนิดลงในสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิก แล้วนำไปตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ความยาวคลื่น 324 นาโนเมตร ผลแสดงดังภาพประกอบ 21



ภาพประกอบ 21 โครมาโทแกรมของสารละลามาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกที่เติมสารรบกวน 3 ชนิด

จากภาพประกอบ 21 พบว่าสารรบกวนทั้ง 3 ชนิด ไม่รบกวนสัญญาณของกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิก ซึ่งสารรบกวนทั้ง 3 ชนิดนั้นไม่ปรากฏสัญญาณพีคและไม่ทำให้สัญญาณการวิเคราะห์กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกเปลี่ยนแปลง

ตอนที่ 5 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก (กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิก) ในตัวอย่างพืชสมุนไพร ได้ทำการศึกษาพืชสมุนไพร 5 ชนิด คือ ฝางตะไคร้ หญ้าหวาน รากสามสิบ และเหงือกปลาหมอ โดยได้ทำการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD) ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นและทำการตรวจวัดหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ด้วยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด แสดงดังตาราง 6

ตาราง 6 ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

ตัวอย่าง	กรดไฮดรอกซีซินนามิก (mg/L±SD)			
	กรดคลอโรจีนิก	กรดคาเฟอิก	กรดพาราคูมาริก	กรดเฟอร์รูลิก
ฝาง	125.23±0.88	nd	nd	nd
ตะไคร้	28.54±0.21	nd	14.27±0.34	8.41±0.93
หญ้าหวาน	1114.55±0.70	37.98±0.36	nd	nd
รากสามสิบ	nd	44.04±1.01	nd	nd
เหงือกปลาหมอ	42.76±0.40	12.86±0.53	10.49±0.71	56.17±0.89

หมายเหตุ nd หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบด้วยวิธีที่ทดลองในงานวิจัย

จากตาราง 6 พบว่า ในพืชสมุนไพรส่วนใหญ่จะมีกรดคลอโรจีนิก ซึ่งพบในพืชสมุนไพร ฝาง ตะไคร้ หญ้าหวาน และเหงือกปลาหมอ ซึ่งกรดคลอโนจีนิกมีมากที่สุดในหญ้าหวาน (1114.55 ±0.70 มิลลิกรัมต่อลิตร) และพืชสมุนไพรที่พบกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดคือ เหงือกปลาหมอ โดยมีกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกเท่ากับ 42.76±0.40 12.86±0.53 10.49±0.71 และ 56.17±0.89 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพรบางชนิดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง มีดังนี้

1.1 ศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

1.2 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด (กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิก) คือ วัฏภาคเคลื่อนที่ใช้เป็นกรดแอซีติกเข้มข้น 1% ต่ออะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วนร้อยละ 85.5:14.5 โดยปริมาตร และใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิก มีค่าระยะเวลารีเทนชันเท่ากับ 5.0 7.3 13.1 และ 15.4 นาที ตามลำดับ

2. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ มีดังนี้

2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของกรดไฮดรอกซีซินนามิก

2.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection, LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of quantitation, LOQ)

2.3 ค่าความถูกต้อง (% recovery)

2.4 ค่าความแม่นยำ (% RSD)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์พบว่า กราฟมาตรฐานของกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิด (กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิก) นั้นในช่วงความเข้มข้น 2-100 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง (R^2 ≈ 0.9993-0.9997) ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ของกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกเท่ากับ 0.08 0.06 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ เท่ากับ 0.26 0.20 0.30 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้ค่าร้อยละร้อยละการกลับคืน (%recovery) ของกรดคลอโร

จีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริกและกรดเฟอร์รูลิกอยู่ในช่วง 83.54±1.01-90.32±1.05 87.48±1.10 - 92.12±1.24 90.26±0.87 - 96.45±0.98 และ 92.13±0.92 - 95.44±1.02 ตามลำดับ มีความแม่นยำของการวิเคราะห์โดยให้ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ในวันเดียวกัน และระหว่างวันอยู่ในช่วง 0.49 -1.41 และ 0.50 – 1.45 ตามลำดับ

3. ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร มีดังนี้

3.1 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD)

จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมมีดังนี้

3.1.1 ชนิดของวัฏภาคของแข็ง คือ สารผสมระหว่างออกตะเดคซิลและซิลิกา

3.1.2 อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับวัฏภาคของแข็ง คือ 1:2

3.1.3 เวลาในการบด คือ 30 วินาที

3.1.4 ชนิดของตัวชะสาร คือ 80% เมทานอล

3.1.5 ปริมาตรของตัวชะสาร คือ 3 มิลลิลิตร

3.2 การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD) ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลว (LLE) และวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลวแล้วตามด้วยวิธีการสกัดแบบดิสเพอร์ซีพ ลิควิด-ลิควิด ไมโครเอ็กแทรคชัน (LLE-DLLME)

จากการศึกษาพบว่า การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี matrix solid phase dispersion (MSPD) ที่พัฒนาขึ้นนั้นให้ค่าร้อยละการกลับคืนที่สูงกว่าการเตรียมตัวอย่างทั้ง 2 วิธีข้างต้น

4. การศึกษาผลของสารรบกวนของการวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซินนามิก

การศึกษาผลของสารรบกวนของการวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซินนามิกได้ทำการศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแทนนิก และคาเทชิน พบว่า สารรบกวนทั้ง 3 ชนิด ไม่รบกวนสัญญาณของกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิก ซึ่งสารรบกวนทั้ง 3 ชนิดนั้นไม่ปรากฏสัญญาณพีคและไม่ทำให้สัญญาณการวิเคราะห์กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกเปลี่ยนแปลง

5. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก (กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิก) ในตัวอย่างพืชสมุนไพร ได้ทำการศึกษาพืชสมุนไพร 5 ชนิด คือ ฝาง ตะไคร้ หญ้าหวาน รากสามสิบ และเหงือกปลาหมอ พบว่า ในพืชสมุนไพรส่วนใหญ่จะมีกรดคลอโรจีนิก ซึ่งพบในพืชสมุนไพรฝาง ตะไคร้ หญ้าหวาน และเหงือกปลาหมอ ซึ่งกรดคลอโนจีนิกมีมากที่สุดในหญ้าหวาน (1114.55±0.70 มิลลิกรัมต่อลิตร) และพืชสมุนไพรที่พบกรดไฮดรอกซีซินนามิกทั้ง 4 ชนิดคือ เหงือกปลาหมอ โดยมีกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิกเท่ากับ 42.76±0.40 12.86±0.53 10.49±0.71 และ 56.17±0.89 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. การวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอร์รูลิก ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอื่นๆ ได้

2. วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD) ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอื่นๆ ที่มีลักษณะของแข็งหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลวได้

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กาญจนา ทรัพย์ประเสริฐ; และคนอื่นๆ. (2546). *การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของน้ำหมักสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อราโรคพืช*. สืบค้นเมื่อ 5 พฤษภาคม 2558, จาก http://tdc.thailis.or.th/tdc/basic.php.

เกียรติศักดิ์ เจริญสุข; และคนอื่นๆ. (2554). *ผลการเสริมสมุนไพรขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ดอกคำฝอยและฝางในอาหารไก่ไข่ต่อสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพไข่ไก่.* สืบค้นเมื่อ 5 พฤษภาคม 2558,จาก http://tdc.thailis.or.th/tdc/basic.php.

การสกัดด้วยตัวทำละลาย. (ม.ป.ป.). สืบค้นเมื่อ 28 มิถุนายน 2558 จาก http://www.e-book.ram.edu/e-book/c/CM334/CM334/-2.pdf.

จุฑามาศ สูนแดง. (2544). *การสกัดและวิเคราะห์กรดเฟอร์รูริกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.* วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เคมีอุตสาหกรรม). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. ถ่ายเอกสาร.

ณัฐภรณ์ ไม่อ่อนมือ. (2552). *การศึกษาเชิงเปรียบเทียบปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดและกรดฟีนอลิกในเปลือก เนื้อและเมล็ดในมะม่วงดิบ และสุกสายพันธุ์ต่างๆ.* วิทยานิพนธ์ วท.ม. (วิทยาศาสตร์การอาหาร). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง. ถ่ายเอกสาร.

ทวีชัย ลี้ยุทธานนท์. (2538). *การศึกษาผลของสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากสมุนไพรสามสิบต่อกล้ามเนื้อเรียบ*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เภสัชวิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

นัทธ์หทัย วิบูลย์. (2539). *องค์ประกอบทางเคมีของรากสามสิบ (Asparagus racemosus Willd)*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

นงค์นุช แตทอง; และคนอื่นๆ. (2546). *การศึกษาผลของตำรับเจลล้างมือจากน้ำมันตะไคร้ต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด.* วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยาประยุกต์). นครปฐม: บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันราชภัฏนครปฐม. ถ่ายเอกสาร.

นันทนา ศรีพันลม; และคนอื่นๆ. (2547). *การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากผักในเขตเทศบาลเมืองนครปฐม.* รายงานการวิจัย นครปฐม: สถาบันราชภัฏนครปฐม. ถ่ายเอกสาร.

นฤพร สุทธิ์สวัสดิ์; และคนอื่นๆ. (2549). *ฤทธิ์กันเสียของฝาง* (*Caesalpinia sappan* L.) *ในการผลิตภัณฑ์อาหารประเภทน้ำพริก.* โครงการพิเศษ ภ.บ. (เภสัชศาสตร์). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยมหิดล. ถ่ายเอกสาร.

น้ำสมุนไพร. (ม.ป.ป). สืบค้นเมื่อ 6 พฤษภาคม 2558, จาก http://www.fisheries.go.th/sf- ratburi/drink1/drink.htm

เบญจภรณ์ ปาวิน. (2555). *การบ่งชี้และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในชาสดและชาหมักโดยใช้โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง-แมสสเปกโทรเมตรี.* วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เคมี). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ถ่ายเอกสาร.

ปอกระปิด. (ม.ป.ป). สืบค้นเมื่อ 6 พฤษภาคม 2558, จาก http://www.zoneza.com/view10039.htm.

ปราณี มีทรัพย์หลาก; และคนอื่นๆ. (2549). *สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลูโลสจากน้ำสมุนไพรโดย Acetobacter xylinum TISTR 975*. สืบค้นเมื่อ 5 พฤษภาคม 2558, จาก http://tdc.thailis.or.th/tdc/basic.php.

ปริญดา แข็งขัน; และคนอื่นๆ. (2555). *การวิเคราะห์ปริมาณและฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบหม่อนไทย*. สืบค้นเมื่อ 5 พฤษภาคม 2558, จาก http://tdc.thailis.or.th/tdc/basic.php.

ผ่องพรรณ ศิริพงษ์; และคนอื่นๆ. *ศักยภาพการต้านเซลล์มะเร็งของสมุนไพรเหงือกปลาหมอ*. สืบค้นเมื่อ 6 ตุลาคม 2558, จาก http://www.thaiscience.info.

พิกุล อินต๊ะปาน. (2556). *ผลของสารสกัดจากหญ้าหวาน และพืชสมุนไพรพื้นบ้านในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร.*สืบค้นเมื่อ 5 พฤษภาคม 2558, จาก http://tdc.thailis.or.th/tdc/basic.php.

มัทนียา วังประภา. (2548). *การผลิตสารสารสตีวิโอไซด์โดยการเพาะเลี้ยงหญ้าหวานในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ.* สืบค้นเมื่อ 6 พฤษภาคม 2548, จาก http://tdc.thailis.or.th/tdc/basic.php.

แม้น อมรสิทธิ์; และคนอื่นๆ. (2553). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ: ชวนพิมพ์.

ราณี บุรีรักษ์. (2529). *ผลของสารสกัดจากหญ้าหวาน (Stevia rebsudiana Bertoni) ต่อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคฟันผุ. การค้นคว้าแบบอิสระเชิงวิทยานิพนธ์ วท.ม. (การสอนชีววิทยา)*. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ถ่ายเอกสาร.

รากสามสิบ.(ม.ป.ป). สืบค้นเมื่อ 7 พฤษภาคม 2558, จาก http://shatavari2012. Blogspot.com /2012/03/blog-post_3080.html.

วิไลพร ปองเพียร. (2551). *การศึกษาคุณสมบัติของสารอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในฟักแม้ว*. สืบค้นเมื่อ 7 พฤษภาคม 2558, จาก http://tdc.thailis.or.th/tdc/basic. php.

วทันยา ลิมปพยอม. (2556). *สารให้ความหวานชนิดไซรัปจากหญ้าหวาน*. สืบค้นเมื่อ 6 พฤษภาคม 2558, จาก http://tdc.thailis.or.th/tdc/basic.php.

อินทร์ตา ขานพรหม. (2548). *การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ต้านอนุมูลอิสระในใบหม่อน*. สืบค้นเมื่อ 6 พฤษภาคม 2558, จาก http://tdc.thailis.or.th/tdc/basic.php.

อังคารักษ์ ไชยเจริญ; และคนอื่นๆ. (2557). *สารสกัดฝางยืดอายุผลิตภัณฑ์น้ำพริก*. สืบค้นเมื่อ 20 มิถุนายน 2558, จาก http://tdc.thailis.or.th/tdc/basic.php.

Abebe, A.; & Kebba S. (2013). Determination of Chlorogenic Acids (CGA) in Coffee Beans using HPLC. *American Journal of Research Communication*. 1(2): 78-91.

Devan.; & Luthria. (2006). Influene of sample preparation the assay of phytochemicals. สืบค้นเมื่อ 22 มิถุนายน 2558, จาก http://www.americanlaboratory.com.

Edgar, N.; et al. (2013). Determination of chlorogenic acid in Coffee Products According to DIN 10767. สืบค้นเมื่อ 20 มิถุนายน 2558, จาก http://www.chem.agilent.com Library/applications/5991-2852EN.pdf.

Rodriguez-Gonzalez, N.; Gonzalez-Castro, M.J.; Beceiro-Gonzalez, E.; Muniategui-Lorenzo.; D & Prada-Rodriguez, D. (2014). Determination of triazine herbicides in seaweeds: Devolopment of a sample preparation method based on Matrix Solid Phase Dispersion and Solid Phase Extraction Clean-up. *Tanlanta*: 194-198.

Godwin, A.; Daniel, G.A.; Shadrack, D.; Elom, S.A.; Nana Afua, K.; Godsway, B.; Joseph, K.G.; Sackitey, N.O.; Isaak K.B.; & Wisdom, A. (2014). Determination of elemental, phenolic, antioxidant and flavonoid properties of Lemon grass (Cymbo *pogon citratus Stapf*). *International Food Research Journal*. 21(5): 1971-1979.

Hendrik van, G.; Chingying, L.; Eduardo, L.K.; Mirgam, S.; & Adel, A.K. (1992). Compositional Characterization of Prune Juice. *J. Agric. Food Chem*. 40: 784-789.

Hasim, K.; Serkan, S.; Ahmet, C.; & Turgut, C. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemica*. 91: 187-192.

Hung-Ju, C.; Baskaran Stephen, I.; & Bing-Huei, C. (2012). Determination of Phenolic acid and Flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. *Int J Mol Sci*. 13(1): 260-285.

Leonora, M.; Betty, M.; Maria, J.A.; Mauricro, I.; Gaston, S.; Milena, C.; & Ricardo, M. (2011). Characterization of phenolic acid profile from Chilean red wines by high liquid chromatography. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 56: 688-691.

Mojtaba, S.; Nazir, F.; Yaghou, b.; Marzie, h.; & Kiomars, S. (2014). Speciation of As(III) and As (V) in water sample by graphite furnace atomic absorption spectrometry after solid phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop. *Talanta*. 130: 26-32.

Nevena, G.; Zika, L.; Branislava, S.; Jelena, V.; & Jan, S. (2012). Effects of Different Extraction Methods and Conditions on the Phenolic Composition of Mate Tea Extracts. *Molecules*. 17: 2518-2528.

Nattaya, O.; Supathra, L.; Kornkanok, A.; Akkarach, B.; & Kanit, K. (2013). Phenolic Acids Content and Antioxidant Capacity of Fruit Extracts from Thailand. *Chiang Mai J. Sci.* 40(4): 636-642.

Paola, M.; Ilaria, M.; Mariateresa, M.; Lucia, C.; Sonia, P.; Cosimo, P.; & Mario, M. (2013). Determination of six steviol glycosides of *Stevia rebaudiana* (Bevtoni) from different geographical origin by LC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*. 141: 745-753.

Siranoush, S.; & Irmgard, B. (1996). Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* 741: 223-231.

Sudjaroen, Y.; et al. (2012). Evaluation of ethnobotanical vegetables and herb is Samut Songkram province. *Procedia Engineering*. 32: 160-165.

Violeta, N.; Ion, T.; & Sin, C. (2012). HPLC Determination of Phenolic Acids, Flavonoids and Juglone in Walnut Leaves. *Journal of Chromatographic Science*: 1-8.

Waksmundzka-Hajnos, M.; Oniszczuk, A.; Szewczyk, K.; & Wianowska, D. (2007). Effect of sample-preparation methods on the HPLC quantitation of some phenolic acid in plant. *Acta Chromatographica*. 19: 227-237.

Xiaoling, Y.; Wei, W.; Dongming, X.; Yunan, Z.; & Lijun, Du. (2005). Development and optimization of a method for the analysis of Brazilein by HPLC with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*. 1077: 44-48.

Yoshiaki, A.; Mai, O.; Sumiko, T.; & Yasuhide, T. (2000). Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 891: 183–188.

Yohg-chun, J.; Hua-liang, L.; & Ke, Y. (2011). Simultaneous determination of seven effective constituents in the leaves of bamboo by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Journal of Medicinal Plants*. 5(23): 5630-5635.

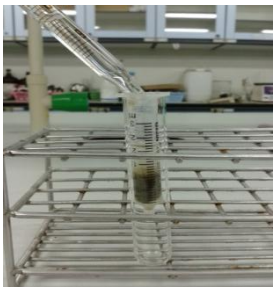
Ying, L.; Si-Wang, W.; Hong-Hai, T.; & Wei, C. (2013). Simultaneous quantification of six main active constituents in Chinese Angelica by high-performance liquid chromato graphy with photodiode array detevtor. *Pharmacoqn Mag*. 9(34): 114-119.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

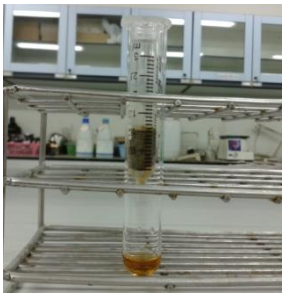
การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD)

1. นำตัวอย่างมา 0.25xx กรัม และวัฏภาคของแข็ง (สารผสมระหว่างออกตะเดคซิลและซิลิกา, 1:1) 0.5xxx กรัม

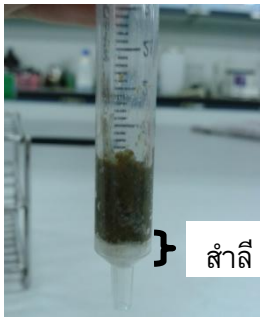


4. ชะสารด้วย 80% เมทานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2. เติม 80% เมทานอลปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วทำการบดสารผสมเป็นเวลา 30 วินาที ได้สารผสมดังภาพ ก



5. เก็บสารละลาย

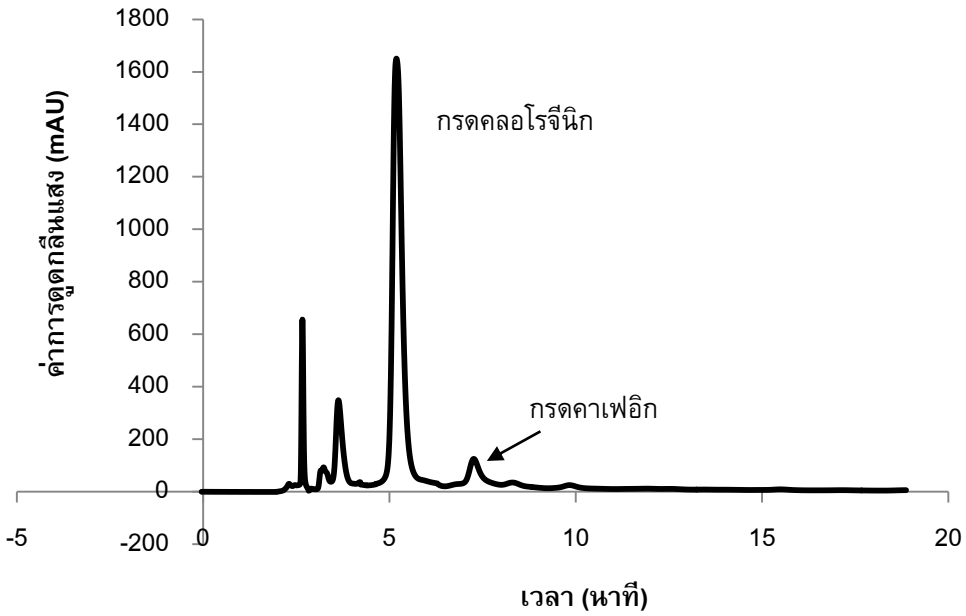


3. นำสารผสมที่ได้ (ภาพ ก) บรรจุใส่ในกระบอกฉีดยา

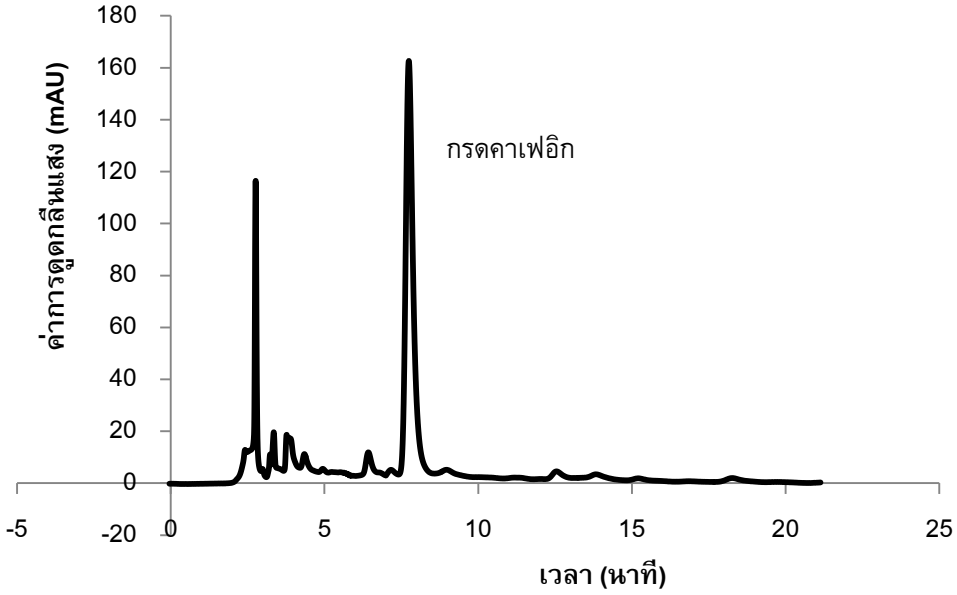
ภาพประกอบ 22 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งแบบ matrix solid phase dispersion (MSPD)

ภาคผนวก ข

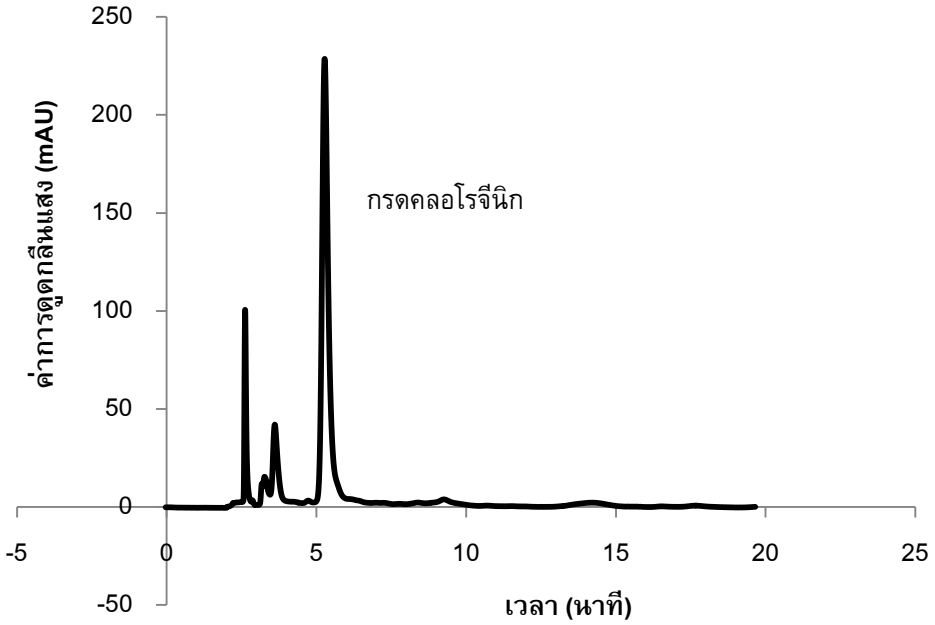
โครมาโทแกรมตัวอย่างพืชสมุนไพร



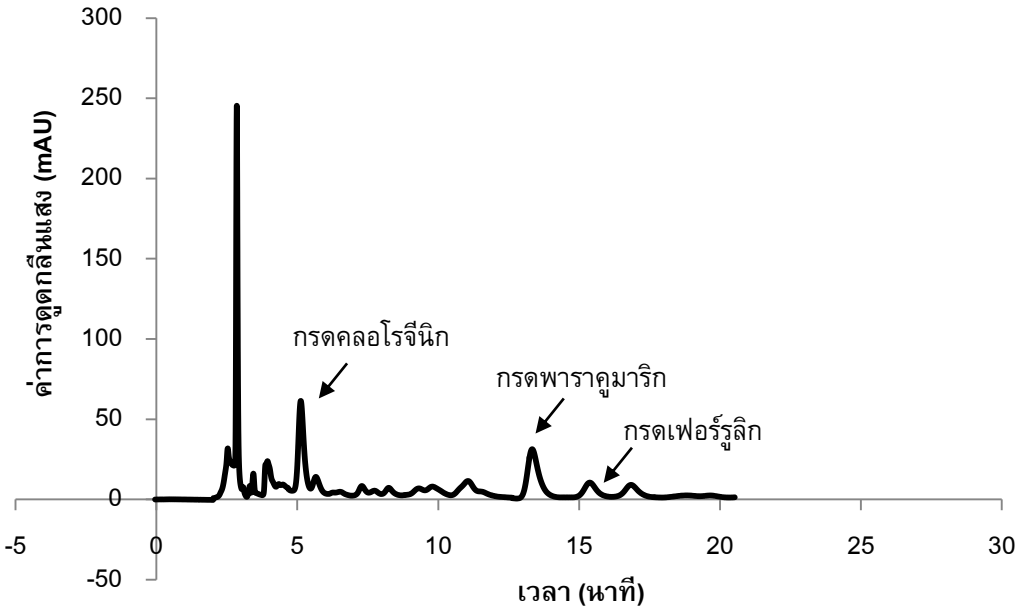
ภาพประกอบ 23 โครมาโทแกรมตัวอย่างหญ้าหวาน



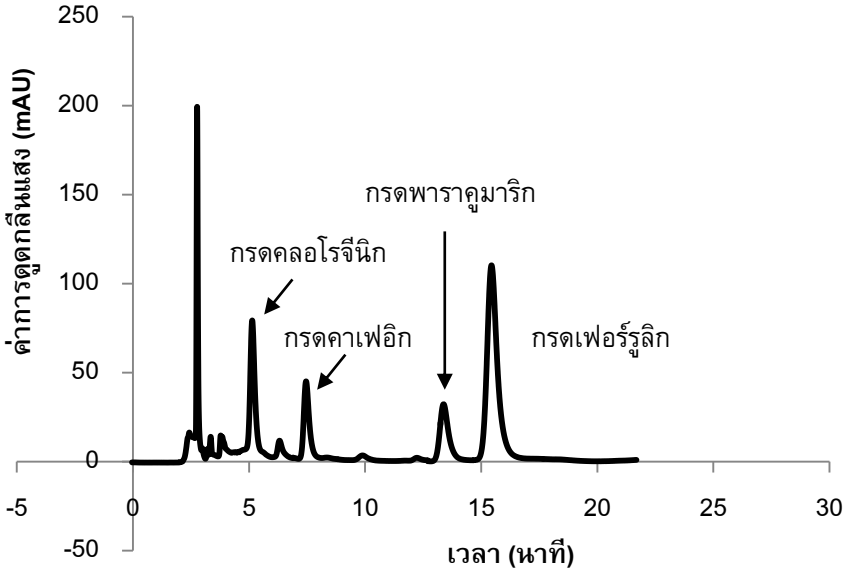
ภาพประกอบ 24 โครมาโทแกรมตัวอย่างรากสามสิบ



ภาพประกอบ 25 โครมาโทแกรมตัวอย่างฝาง



ภาพประกอบ 26 โครมาโทแกรมตัวอย่างตะไคร้



ภาพประกอบ 27 โครมาโทแกรมเหงือกปลาหมอ

ภาคผนวก ค
เครื่องมือและอุปกรณ์

ภาพประกอบ 28 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอร์เรย์ (จากบริษัท Hewlett-Packard รุ่น HP 1100)

ภาพประกอบ 29 เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน

ภาพประกอบ 30 เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาววชิราพรรณ บวรชาติ
วันเดือนปีเกิด	20 ธันวาคม 2532
สถานที่เกิด	บ้านเลขที่ 61 หมู่ที่ 16 ตำบลหูทำนบ อำเภอปะคำ จังหวัดบุรีรัมย์ 31220
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2548	มัธยมศึกษาตอนต้น จาก โรงเรียนนางรองพิทยาคม จังหวัดบุรีรัมย์
พ.ศ. 2551	มัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนนางรอง จังหวัดบุรีรัมย์
พ.ศ. 2555	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี จาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2559	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร