

การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืช
และผลไม้บางชนิด โดยใช้เทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

กรกฎาคม 2558

การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืช
และผลไม้บางชนิด โดยใช้เทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กรกฎาคม 2558
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืช
และผลไม้บางชนิด โดยใช้เทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กรกฎาคม 2558

สิริมา เดชะ. (2558). การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด โดยใช้เทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย.

กรดแทนนิก จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกซึ่งเป็นกลุ่มของสารอินทรีย์ที่พบมากในพืชและผลไม้ โดยในทางการแพทย์ได้นำกรดแทนนิกมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรค เช่น โรคท้องร่วง โรคบิด และสมานแผลที่เกิดจากไฟไหม้ งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้ ด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) ทั้งนี้ได้ศึกษาตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อการสกัด รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ จากการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ ควรใช้ตัวทำละลายในการสกัด คือ 1-บิวทานอล และตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัวคือ เอทานอล ด้วยอัตราส่วนของสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายในอัตราส่วน 1:1 (v/v) โดยใช้สารละลายผสมที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ที่ pH ของสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 4 ซึ่งควบคุม pH ของสารละลายตัวอย่างโดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.3 โมลาร์ ใช้เวลาในการผสมสาร 3 นาที ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ในการเพิ่มความแรงไอออนิกของสารละลายที่ความเข้มข้น 4%w/w และใช้เวลาในการหมุนเหวี่ยงที่ 4000 rpm 2 นาที ตามลำดับ ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกด้วยเทคนิคเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) ต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 85:15 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ควบคุมอัตราการไหลที่ 0.90 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ พบว่าค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าร้อยละการกลับคืน 92.40 ± 5.92 ถึง 100.16 ± 4.62 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 1.40 ± 0.30 ผลการนำวิธีที่พัฒนานี้ตรวจปริมาณกรดแทนนิกในพืชและผลไม้บางชนิด พบว่าสามารถตรวจพบปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างได้ในช่วง 9.52 ± 0.09 ถึง 1.04 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ง่าย สะดวกในการวิเคราะห์และใช้สารปริมาณน้อย ทั้งยังสามารถนำงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้

DEVELOPMENT OF PREPARATION METHOD FOR ANALYSIS OF TANNIC ACID IN
SOME PLANTS AND FRUITS USING DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION

AN ABSTRACT

BY

SIRIMA DECHA



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University

July 2015

Sirima Decha. (2015). *Development of preparation method for analysis of tannic acid in some plants and fruits using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME)*. Master Thesis M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University.
Thesis Advisor: Associate Professor Dr. Pornpimol Muangthai

Tannic acid is a natural phenolic compound which can be found in plants and fruits. Tannic acid is also used as additive in medicinal industry, and used for treatment of burns and diarrhea. The aim of this work was to develop sample preparation method for analysis of tannic acid in some plants and fruits using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME). The validation method was optimized in this study. The results showed that the optimum extraction conditions for sample preparation were using the extraction solvent : dispersive solvent (1-butanol : ethanol as 1:1 v/v), 300 μ L of mixture solvent, the pH of sample solution was 4 by using 0.3M of HCl, the mixing time was 3 minutes, using 4%w/w of NaCl and centrifuge at 4000 rpm for 2 minutes. The optimization condition for tannic acid analysis by high performance liquid chromatography technique was as follows the mobile phase system as 1% (v/v) acetic acid : MeOH = 85:15 with controlled flow rate at 0.90 mL/min. The limits of detections (LOD) for analysis of tannic acid was 1.00 mg/L. The limit of quantitation (LOQ) was 3 mg/L. The recoveries percentage was in the range of 92.40 $\pm$ 5.92 to 100.16 $\pm$ 4.62. The relative standard deviations (%RSD) was 1.40 $\pm$ 0.30. The results in analysis of tannic acid in plants and fruits samples by the optimal condition showed tannic acid in the range of 9.52 $\pm$ 0.09 to 1.04 $\pm$ 0.04 mg/100g. This proposed method for sample preparation showed more effective, fast, and require smaller amounts of organic solvents, high accuracy and precision data with reasonable quantization limits. Finally, the developed method showed the applicability to extract and analysis of the tannic acid in plant and fruit samples.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บาง
ชนิด โดยใช้เทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว
ของ
สิริมา เดชะ

ได้รับการอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2558

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

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

..... ประธาน
(อาจารย์ ดร.วินัย อวงพิพัฒน์)

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

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี ผู้วิจัยได้รับคำแนะนำ ความช่วยเหลือ และความอนุเคราะห์จากคณาจารย์ในภาควิชาเคมี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย อาจารย์ที่ปรึกษานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา ชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ และแก้ไข ปัญหาในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร. วินัย อวงพิพัฒน์ ประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และ ดร. เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์ กรรมการควบคุมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนชี้แนะข้อบกพร่อง เพื่อให้ปริญญานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ทางเคมี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมีทุกคน ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัย

ผู้วิจัยน้อมรำลึกถึงพระคุณของบิดา มารดาและญาติสนิททุกท่านที่ให้คำแนะนำ และกำลังใจ รวมถึงสนับสนุนผู้วิจัยในด้านการศึกษา และขอบพระคุณทุกท่านที่มีได้กล่าวนามใน ณ ที่นี้ ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จลุล่วงด้วยดี

สิริมา เดชะ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	2
ความสำคัญของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
กรดแทนนิก.....	5
พืช.....	8
ผลไม้.....	10
การเตรียมตัวอย่าง.....	12
การสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว.....	14
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16
3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	22
อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	22
ตอนที่ 1 การศึกษาผลของตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วย เทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว.....	24
ตอนที่ 2 การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยใช้วิธีการสกัดตัวอย่าง ด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัว ระหว่างชั้นของเหลวที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็ง และวัฏภาคของเหลว.....	28

สารบัญ (ต่อ)

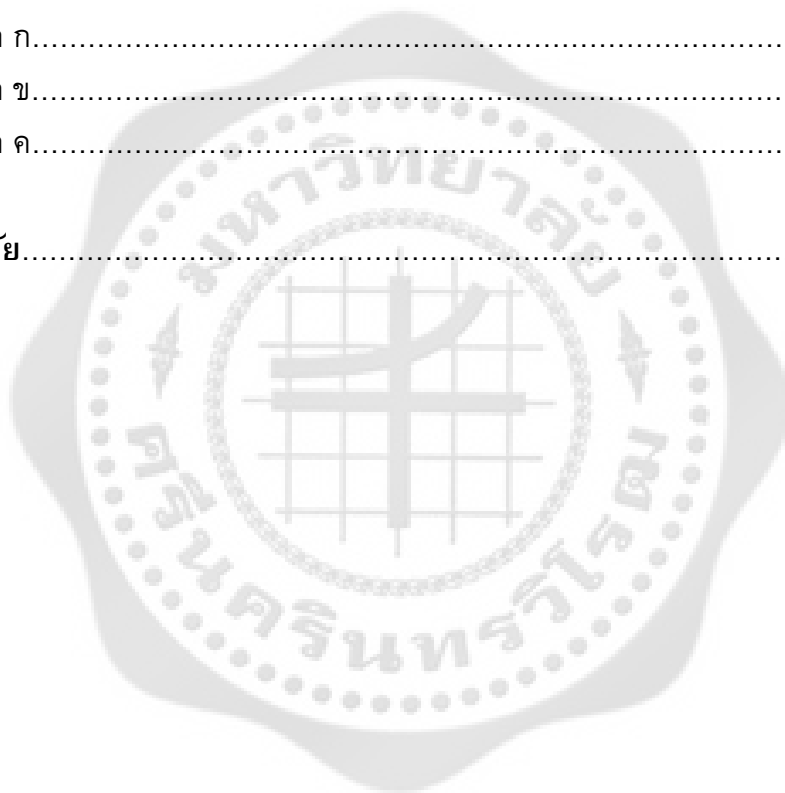
บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
ตอนที่ 3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	30
ตอนที่ 4 ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกที่พัฒนาขึ้น.....	31
ตอนที่ 5 ศึกษาผลของสารบกกวนในตัวอย่าง.....	34
ตอนที่ 6 วิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด.....	35
4 ผลการทดลอง.....	36
ตอนที่ 1 การศึกษาผลของตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว.....	36
ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและตัวทำละลายกระจายที่ใช้กระจาย.....	37
ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตัวกระจายที่ใช้ในการกระจาย.....	38
ผลการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายผสมที่เหมาะสม.....	39
ผลการศึกษาที่pHที่เหมาะสม.....	40
ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรคลอริกที่เหมาะสม.....	41
ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการผสมสารที่เหมาะสม.....	42
ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม.....	43
ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยงที่เหมาะสม.....	44

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 (ต่อ)	
ตอนที่ 2 ผลการเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยใช้วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งและวัฏภาคของเหลว.....	45
ตอนที่ 3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	46
ผลการศึกษาชนิด และองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่.....	48
ผลการศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่.....	52
ตอนที่ 4 ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกที่พัฒนาขึ้น.....	54
ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์.....	54
ผลการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD).....	55
ผลการศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)...	56
ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy).....	56
ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ (precision).....	58
ตอนที่ 5 ผลการศึกษาผลของสารรบกวนในตัวอย่าง.....	58
ตอนที่ 6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด.....	60
5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	63

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม.....	67
ภาคผนวก.....	72
ภาคผนวก ก.....	73
ภาคผนวก ข.....	81
ภาคผนวก ค.....	84
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	87



บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ปริมาณและชนิดขององค์ประกอบทางเคมีที่พบในพืช.....	9
2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกกรดแทนนิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง.....	54
3 ระยะเวลาที่ทนชั้นของฟีดโครมาแกรมของกรดแทนนิก กรดแกลลิก กรดเฟอร์รูริก คาเทชิน กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก และกรดซิตริก.....	59
4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด.....	61



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดแทนนิก.....	6
2 การสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลว.....	13
3 การสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็ง.....	14
4 กระบวนการสกัดโดยวิธี DLLME.....	15
5 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและตัวทำละลายกระจายที่ใช้ กระจาย.....	37
6 ผลการศึกษ้อัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายที่ ใช้ในการสกัดและตัวกระจายที่ใช้ในการกระจาย.....	38
7 ผลการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายผสมที่เหมาะสม.....	39
8 ผลการศึกษาศักยภาพ pH ที่เหมาะสม.....	40
9 ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรคลอริกที่เหมาะสม.....	41
10 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการผสมสารที่เหมาะสม.....	42
11 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม.....	43
12 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยงที่เหมาะสม.....	44
13 ศึกษาเปรียบเทียบเทคนิคการสกัด.....	45
14 โครมาโทแกรมจากผลการศึกษาชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ ปริมาณกรดแทนนิก.....	49
15 โครมาโทแกรมจากผลการศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ในการ วิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก.....	50
16 ผลของระยะเวลาที่ทนชั้นต่ออัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่.....	55
17 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีค (mAU/s) กับความเข้มข้น ของกรดแทนนิก (µg/mL).....	56
18 แสดงโครมาโทแกรมของกรดแทนนิกที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน กรดแทนนิกเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรลงไป.....	56

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
19 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกที่เติมสารละลายผสมของสาร รบกวน 6 ชนิด.....	60
20 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	74
21 โครมาโทแกรมของตัวอย่างใบหูกวางที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น.....	75
22 โครมาโทแกรมของตัวอย่างเปลือกของเมล็ดหูกวางที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น.....	75
23 โครมาโทแกรมของตัวอย่างใบยอที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น.....	76
24 โครมาโทแกรมของตัวอย่างเปลือกของลูกยอที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น.....	76
25 โครมาโทแกรมของตัวอย่างใบฝรั่งที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น.....	77
26 โครมาโทแกรมของตัวอย่างเปลือกฝรั่งที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น.....	77
27 โครมาโทแกรมของตัวอย่างใบกระท้อนที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น.....	78
28 โครมาโทแกรมของตัวอย่างเปลือกกระท้อนที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น.....	78
โครมาโทแกรมของตัวอย่างใบมะยมที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ	
29 DLLME ที่พัฒนาขึ้น.....	79
30 โครมาโทแกรมของตัวอย่างลูกมะยมที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น.....	79

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
31 โครมาโทแกรมของตัวอย่างใบละมุดที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น.....	80
32 โครมาโทแกรมของตัวอย่างเปลือกละมุดที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น.....	80 82
33 ตัวอย่างใบหูกวาง.....	82
34 ตัวอย่างใบยอและลูกยอ.....	82
35 ตัวอย่างใบฝรั่งและผลฝรั่ง.....	82
36 ตัวอย่างใบกระทอนและผลกระทอน.....	82
37 ตัวอย่างใบมะยมและลูกมะยม.....	82
38 ตัวอย่างใบละมุดและผลละมุด.....	82
39 ลักษณะตัวอย่างก่อนทำการสกัดด้วยวิธี DLLME.....	83
40 การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี DLLME.....	83
42 เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง.....	85
43 เครื่อง Vortex.....	85
44 เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน.....	86
45 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC).....	86

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

กรดแทนนิก จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มของกรดฟีนอลิก (phenolic acid) ที่มีโครงสร้างซับซ้อน ภายในโมเลกุลประกอบด้วยกรดแกลลิก 9 โมเลกุลและน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล พืชหรือผลไม้ที่มีกรดแทนนิกเป็นองค์ประกอบจะมีรสชาติฝาดและขม กรดแทนนิกสามารถพบได้ทั้งในส่วนของใบ พืชและผลไม้หลายชนิด เช่น ใบชา ใบฝรั่ง ใบพลู ใบหูกวาง พบในผลไม้ดิบ เช่น องุ่น มะนาว ส้ม แคนตาลูป ฝรั่ง แตงโม ลูกแพร์ และมังคุด เป็นต้น หรือสามารถพบได้แม้กระทั่งในส่วนของเปลือกและเมล็ด โดยในทางการแพทย์ได้นำกรดแทนนิกมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรค เช่น โรคท้องร่วง โรคบิด และสมานแผลที่เกิดจากไฟไหม้ นอกจากนี้กรดแทนนิกยังมีฤทธิ์ในการตกตะกอนโปรตีน ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราอีกด้วย อย่างไรก็ตามกรดแทนนิกก็นับว่าอาจเป็นสารที่ให้โทษได้ซึ่งพบว่า จากคุณสมบัติของกรดแทนนิกที่สามารถทำปฏิกิริยากับโลหะในน้ำ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของกรดแทนนิก ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบนิเวศของน้ำและเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะน้ำเน่าเสีย การวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกจึงจัดว่ามีความสำคัญมากในงานที่มีความเกี่ยวข้องกับกรดนี้ สำหรับการตรวจสอบปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างนั้น พบว่า ขั้นตอนที่สำคัญที่จะทำให้การวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกมีความถูกต้องสูง คือ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ด้วยเหตุนี้การศึกษาหาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง (พิมพ์เพ็ญ; และคณะ. 2555)

วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดแทนนิกโดยใช้วิธีการสกัด ซึ่งวิธีการสกัดอย่างง่ายที่นิยมนำมาใช้ในการเตรียมมีอยู่หลายวิธีได้แก่ การสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว (liquid-liquid extraction, LLE) การสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง (solid-phase extraction, SPE) การสกัดแบบจุดขุ่น (cloud-point extraction, CPE) และการสกัดแบบกรด-เบส (acid/base extraction) เป็นต้น แต่ในปัจจุบันวิธีการสกัดสารที่สนใจจะตรวจสอบได้ถูกพัฒนาขึ้นมากโดยการนำเทคนิคใหม่ๆ เข้ามาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดให้ดีขึ้นกว่าการใช้วิธีแบบเดิมโดยวิธีการสกัดที่พัฒนาขึ้นได้แก่ การสกัดระดับไมโคร ได้แก่ การสกัดระดับไมโครด้วยวัฏภาคของเหลว (liquid-liquid microextraction, LLME) การสกัดระดับไมโครด้วยวัฏภาคของแข็ง (solid-phase microextraction, SPME) และการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)

งานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะศึกษาเพื่อเปรียบเทียบวิธีเตรียมสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกที่มีประสิทธิภาพในตัวอย่างพืช เนื่องจากวิธีการเตรียมสารหรือการแยกสารที่จะวิเคราะห์จากพืชจัดเป็นสิ่งที่มีความสำคัญมาก โดยนอกจากการศึกษาหาวิธีที่มีประสิทธิภาพแล้วยังทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดแทนนิก แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) รวมถึงศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก ทั้งนี้เพื่อเป็นการช่วยพัฒนาเทคนิคการสกัดกรดแทนนิกจากพืชและผลไม้ ผลจากการวิจัยนี้จะได้นำไปประยุกต์ใช้เตรียมสารตัวอย่างกรดแทนนิกจากพืชและผลไม้ในกลุ่มตัวอย่างที่น่าสนใจเพื่อเป็นข้อมูลในการประเมินประสิทธิภาพของพืชและผลไม้ในการเป็นแหล่งของกรดแทนนิก

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดแทนนิกด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อวิธีการสกัดและการวิเคราะห์กรดแทนนิก
3. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก
4. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทำให้ทราบถึงวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์กรดแทนนิก
2. ทำให้ทราบถึงปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดและการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิก
3. ทำให้ทราบปริมาณกรดแทนนิกที่มีอยู่ในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด
4. ทำให้ประเมินประสิทธิภาพของพืชและผลไม้ในการเป็นแหล่งของกรดแทนนิกได้

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว ที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดแทนนิก

1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตัวกระจายที่ใช้ในการกระจาย

1.2 ศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตัวกระจายที่ใช้ในการกระจาย

1.3 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายผสมที่เหมาะสม

1.4 ศึกษา pH ที่เหมาะสม

1.5 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรคลอริกที่เหมาะสม

1.6 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการผสมสาร (vortex) ที่เหมาะสม

1.7 ศึกษาผลของความแรงของไอออนิก (ionic strength) ของสารละลาย

1.8 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยงที่เหมาะสม

2. การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งและวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว

2.1 วิธีการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว

2.2 วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็ง

2.3 วิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.1 ศึกษาชนิด และองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

3.2 ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

4. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกที่พัฒนาขึ้น

4.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์

4.2 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

4.3 ศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

4.4 ศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy)

4.5 ศึกษาความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ (precision)

5. ศึกษาผลของสารรบกวนในตัวอย่าง
 - 5.1 ศึกษาผลของการรบกวนจากสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่นๆ
 - 5.2 ศึกษาผลของการรบกวนจากกรดอินทรีย์
6. วิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว ที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดแทนนิก
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
3. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกที่พัฒนาขึ้น
4. ศึกษาผลของสารรบกวนในตัวอย่าง
5. วิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด

บทที่ 2

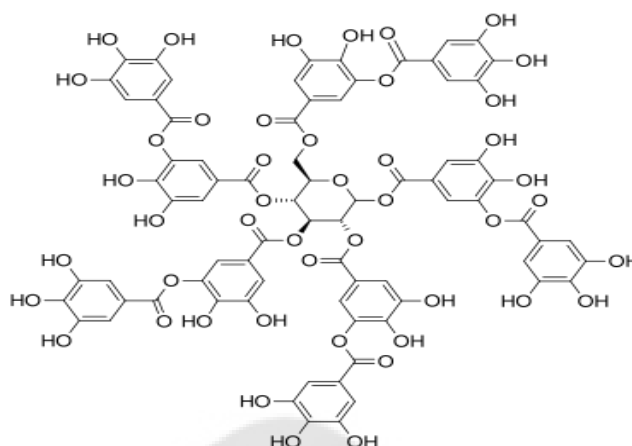
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและตัวอย่างผลไม้บางชนิดด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว (DLLME) โดยผู้ทำการวิจัยได้ทำการศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ตามหัวข้อดังต่อไปนี้

- กรดแทนนิก
- พืช
- ผลไม้
- การเตรียมตัวอย่าง
- การสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว (DLLME)
- งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กรดแทนนิก

กรดแทนนิก (tannic acid) เป็นสารให้รสฝาด (astringency) และรสขม (bitter) จัดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และโครงสร้างที่ซับซ้อนภายในโครงสร้างประกอบด้วยกรดแกลลิก 9 โมเลกุลและน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เป็นสารประกอบแทนนินชนิดสารไฮโดรไลซ์แทนนิน (hydrolysable tannins) คือ แทนนินชนิดที่สามารถถูกแยกออกเป็นโมเลกุลเล็กๆ ได้ นอกจากนี้กรดแทนนิกยังสามารถจับกับโปรตีนและสารไบโอพอลิเมอร์ (biopolymer) เช่น เซลลูโลส และเพคติน พบมากที่ออร์แกนเนลล์ต่างๆ ของเซลล์พืชหรือผนังเซลล์ชั้นปฐมภูมิและชั้นทุติยภูมิ รวมทั้งเนื้อไม้ (Zucker. 1983) โดยมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดแทนนิก

คุณสมบัติทางเคมี

ชื่อวิทยาศาสตร์	Gallotonic acid
สูตรโครงสร้างทางเคมี	$C_{76}H_{52}O_{46}$
มวลโมเลกุล	1701.23 g/mol
จุดหลอมเหลว	218 °C
ค่า pK_a	10
การละลาย	ละลายได้ดีในน้ำ อะซิโตน และ เอทิลแอลกอฮอล์
ลักษณะทางกายภาพ	มีลักษณะเป็นผงละเอียด สีน้ำตาล

บทบาทที่สำคัญของกรดแทนนิก

1. คุณสมบัติเป็นสารคีเลต (chelating agent) ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์

กรดแทนนิก สามารถทำปฏิกิริยากับธาตุเหล็กเกิดเป็นสารประกอบคีเลต (chelate) มีคุณสมบัติดังกล่าวคล้ายกับการสร้างสารซิเดอโรฟอรัส (siderophores) ของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีความสำคัญและจำเป็นในการจับกับธาตุเหล็ก เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการต่างๆ โดยเฉพาะในกระบวนการสังเคราะห์ไรโบนิวคลีโอไทด์ (ribonucleotide) ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) และการสร้างฮีโม (heme) ของแบคทีเรีย (Scalbert, 1991) ดังนั้นการเกิดคีเลตระหว่างกรดแทนนิกกับธาตุเหล็กจึงเป็นการขัดขวางแบคทีเรียไม่ให้นำธาตุเหล็กไปใช้ประโยชน์ได้ หรือทำให้การใช้ประโยชน์ได้ของธาตุเหล็กลดลง อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพกตินเนส (pectinase) เซลลูเลส (cellulase) และเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ที่จุลินทรีย์ปล่อยออกมาจากเซลล์

ทำให้เอนไซม์ดังกล่าวทำงานได้น้อยลง ส่งผลให้จุลินทรีย์มีรูปร่างและการเจริญเติบโตผิดปกติ (Mila; et al. 1996)

2. คุณสมบัติการตกตะกอนกับโปรตีน

กรดแทนนิก มีผลโดยตรงต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเข้าทำปฏิกิริยากับ โปรโตพลาสมาของจุลินทรีย์ทำให้เกิดการตกตะกอน หรือไปขัดขวางกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสโฟริเลชัน (oxidative phosphorylation) ที่เกิดขึ้นภายในไมโทคอนเดรีย (Scalbert. 1991) แต่การออกฤทธิ์ของกรดแทนนิกไม่ได้จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อจุลินทรีย์เท่านั้น แต่ยังสามารถทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อได้ นอกจากนี้กรดแทนนิก ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โดยสามารถรวมกับเอนไซม์ ปริมาณของกรดแทนนิกและเอนไซม์ต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสม คือ มีกรดแทนนิก 20 โมเลกุลต่อเอนไซม์ 1 โมเลกุล (Goldstein and Swain, 1965) ในพืชบางชนิดที่มีกรดแทนนิกเป็นส่วนประกอบอาจมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากสัตว์ที่กินพืชเป็นอาหาร โดยเกิดจากความสามารถของกรดแทนนิกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ที่สัตว์ปล่อยออกมา (Ryan; et al. 1974)

ประโยชน์

กรดแทนนิก มีสมบัติเป็นสารตกตะกอนโปรตีน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราได้ ในทางการแพทย์จึงนำไปใช้เป็นยารักษาโรค ใช้เป็นยาแก้ท้องร่วง แก้บิด สมานแผล แผลเปื่อย แผลไฟไหม้ เป็นต้น สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (enzymatic browning reaction) ของผลไม้ มีฤทธิ์เป็นสารกันเสีย (preservative) ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

แหล่งที่พบ

สามารถพบได้ในพืชและผลไม้หลายชนิด เช่น ใบชา ใบฝรั่ง ใบพลู ใบชุมเห็ด พบในผลไม้ดิบ เช่น กล้วยดิบ (นิธิยา. 2550) ในเปลือกและเมล็ดของผลไม้ เช่น เปลือกมังคุด องุ่น เม็ดในของมะขาม เปลือกมะพร้าวอ่อน และพบในไวน์แดง นอกจากนี้กรดแทนนิกยังพบมากในผลไม้ชนิดอื่นๆ เช่น มะนาว มะนาวเหลือง ส้ม แคนตาลูป ฝรั่ง แดงโม ลูกแพร์ สับปะรด โดยเมื่อผลไม้เหล่านี้สุก ระดับของกรดแทนนิกก็จะลดลงแต่ปริมาณน้ำตาลฟรักโทสจะเพิ่มขึ้น อีกทั้งการปลอกเปลือกผลไม้สดจะเป็นการลดปริมาณ กรดแทนนิกลงไปอีกด้วย หรือผลไม้ที่มาจากพืชยืนต้นต่างๆ เช่น แอปเปิ้ล ท้อ องุ่น พลับ เป็นต้น และอาจพบได้ในธัญพืชต่างๆอีกด้วย (พิมพ์เพ็ญ. 2552)

พืชและผลไม้หลายชนิดจัดเป็นสิ่งที่มีความสำคัญอีกทั้งยังเป็นที่ยอมรับโรคกันทั่วไป เนื่องจากผู้คนในปัจจุบันหันมาใส่ใจดูแลสุขภาพกันอย่างมากขึ้น อีกทั้งในพืชและผลไม้ยังมีสารอาหารที่มีประโยชน์ เช่นกากใยที่ช่วยในเรื่องการขับถ่าย การฟื้นฟูร่างกายในการเจ็บป่วย และมีองค์ประกอบทางเคมีซึ่งช่วยให้การทำงานของระบบต่างๆภายในร่างกายดีขึ้น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันโรคมะเร็ง เช่น กรดแกลลิก กรดเอลลาจิก ส่วนในเปลือกผลไม้หรือในใบไม้ก็จะมีกรดแทนนิกอยู่ โดยกรดเหล่านี้มีความสำคัญมากกับร่างกายของมนุษย์ (ปรีชาญ. 2555)

พืช

การดำรงชีวิตของมนุษย์ต่างก็มีความผูกพันใกล้ชิดกับพืชมาตั้งแต่เกิด มนุษย์พยายามคิดวิธีต่างๆเพื่อนำพืชมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากที่สุด โดยเฉพาะการนำพืชมาใช้ในด้านสุขภาพและความงาม มีการเลือกบริโภคอาหารที่มีประโยชน์โดยเฉพาะพืช ผัก และผลไม้ และอาจมีการใช้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อป้องกันโรคร้ายต่างๆ นอกจากนี้ยังนิยมใช้เครื่องสำอางมีส่วนผสมสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ รวมทั้งการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคกันอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม ในอาหารจำพวกผักผลไม้ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เครื่องสำอาง หรือยาสมุนไพรดังกล่าวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากธรรมชาติ ล้วนแล้วแต่มีสารไฟโตนิวเทรียนท์ (phytonutrients) เป็นองค์ประกอบ โดยในพืชนั้นมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญที่ช่วยในการสร้างภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย ซึ่งจะเรียกองค์ประกอบทางเคมีในพืชว่า สารพฤกษเคมี ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบเฉพาะในพืช สารกลุ่มนี้อาจเป็นสารที่ทำให้พืชผักชนิดนั้นๆ มีสี กลิ่นหรือรสชาติที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว สามารถพบได้ในอาหารประเภทพืชผักต่าง ๆ สารพฤกษเคมีนั้นไม่ใช่สารอาหารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต แต่พบว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพอย่างมาก เช่น ช่วยป้องกันโรค และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการลดความเสี่ยงของโรคเรื้อรังต่างๆ ได้ (นิจศิริ. 2539)

ส่วนประกอบหลักของพืช ได้แก่ น้ำ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารพฤกษเคมีที่สำคัญ ได้แก่ โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน แคโรทีนอยด์ ไลโคพีน ลูทีน ซีแซนทีน เป็นต้น ซึ่งปริมาณขององค์ประกอบต่างๆแตกต่างกันไปตามชนิดพันธุ์พืช และแหล่งที่ปลูก (แสดงในตาราง 1) โดยจะกล่าวถึงองค์ประกอบของพืชเฉพาะส่วนที่สำคัญๆแต่ละส่วนประกอบพอสังเขป

ตาราง 1 ปริมาณและชนิดขององค์ประกอบทางเคมีที่พบในพืช

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ
เถ้า	25.76
Cellulose	41.93
Lignin	7.21
Pentosan	3.79
Alkaloid	3.95
Flavonoid	0.76
Saponin	1.38
Sterol	1.54
Tannin	12.67
Triterpenoid	0.23

ที่มา: Chen. P; et al. (1996:115-112).

น้ำ เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในพืช มีปริมาณมากกว่าร้อยละ 70 ของน้ำหนักทั้งหมด ความแตกต่างของปริมาณน้ำในพืชจะขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของพืช (นิตยา รัตนปนนท์. 2557: 335-381)

คาร์โบไฮเดรต เป็นสารประกอบที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช จากโมเลกุลของน้ำ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งถูกสร้างเป็นโมเลกุลของน้ำตาลและสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides)

ไขมัน เป็นแหล่งของสารเบต้า-ซิโทสเตอรอล (β -sitosterol) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตยา สเตียรอยด์ สารเลซิทีน (lecithin) ที่พบเป็นปริมาณมากในน้ำมันถั่วลิสงช่วยทำหน้าที่ในการย่อยอาหาร นอกจากนี้ไขมันพืชยังถูกใช้เป็นตัวทำละลายสารจำพวกวิตามินและยาปฏิชีวนะ น้ำมันมะกอกและน้ำมันอัลมอนด์ถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง

กรดอะมิโน มีกรดอะมิโนเพียงไม่กี่ชนิดที่พบว่ามีคุณสมบัติเป็นยารักษาโรค ได้แก่ คิวเคอร์บิทิน (cucurbitine) บางชนิดพบว่าเป็นสารพิษได้แก่ มิโมซีน (mimosine) ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิกในสัตว์เคี้ยวเอื้องทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตช้า

สารประกอบฟีนอล(simple phenolic compounds) โมเลกุลเป็นรูปร่างวงหกเหลี่ยมเพียงวงเดียว ที่มีหมู่แอลกอฮอล์ หรือหมู่แอลดีไฮด์ หรือหมู่คาร์บอกซิลิกมาเชื่อมต่อกับวงแหวนรูปหกเหลี่ยมนี้ ได้แก่ แคปไซซิน (capsicin) ที่พบในพริก วานิลลา (vanillin) ที่พบในผลของวานิลลา

แทนนิน (tannins) เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลซับซ้อน มักเป็นสารผสมของสารจำพวกโพลีฟีนอล(polyphenols) ประกอบด้วยเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดแกลลิก (gallic acid) หรือสารประกอบโพลีไฮดรริก(polyhydric compound) จับกับน้ำตาลกลูโคสหรือเกิดจากสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) สารในกลุ่มนี้ เช่น กรดแทนนิก จะช่วยในเรื่องของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราได้ ใช้เป็นยาแก้ท้องร่วง แก้บิด สมานแผล แผลเปื่อย

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารประกอบที่ให้สีส้มของดอกไม้ ผลไม้ และใบไม้หลายชนิดด้วยกันนอกจากนี้ยังช่วยป้องกันอันตรายจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต(UV) จากดวงอาทิตย์ด้วย สีสีนจากสารสี(pigment) บนกลีบดอกยังทำหน้าที่ล่อแมลงให้มาช่วยในการถ่ายเรณูอีกด้วย การสร้างสารกลุ่มนี้ในพืช

ผลไม้

เป็นที่ทราบกันดีว่าผักและผลไม้เหล่านั้นมีประโยชน์มากมายมหาศาล เพราะเป็นแหล่งของวิตามินและแร่ธาตุหลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และมีคุณสมบัติของการเป็นแหล่งใยอาหาร ซึ่งเป็นสารที่ช่วยลดการดูดซึมของคอเลสเตอรอลและไขมัน และยังช่วยทำให้ระบบการย่อย ระบบการขับถ่ายทำงานได้อย่างปกติอีกด้วย นอกจากนี้ผักและผลไม้บางชนิดยังมีสารพิเศษที่ช่วยทำหน้าที่คล้ายยาป้องกันและรักษาโรคบางชนิด ซึ่งในผลไม้จะมีสารประกอบทางเคมีที่สำคัญ เรียกว่า สารไฟโตนิวเทรียนท์ (phytonutrients) เป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับพืช ไฟโตนิวเทรียนท์ (phytonutrients) หรือเรียกอีกชื่อว่า สารพฤษเคมี (phytochemicals) ทั้งสองคำนี้ หมายถึง สารประกอบอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ และนิวเคลียสที่อาจได้รับจากสิ่งแวดล้อม เช่น ป้องกันอันตรายจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต นอกจากนี้สารนี้จัดเป็นสารอาหารตามธรรมชาติที่มนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้จะต้องได้รับการบริโภคอาหารเท่านั้น โดยสารเหล่านี้มักมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น ต่อด้านหรือป้องกันโรคบางชนิดได้ และยังเป็นสารที่ทำให้ผลไม้มีสี สีสัน รสชาติ และกลิ่นหอมที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวอีกด้วย กลไกการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มไฟโตนิวเทรียนท์ มีหลาย

รูปแบบขึ้นอยู่กับชนิดของสาร เช่น ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน โดยเฉพาะการต้านอนุมูลอิสระ ลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้ลดการเกิดโรคมะเร็งได้, เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน, ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์, ต่อต้านการอักเสบ หรือแม้กระทั่งฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคบางชนิดได้ (วีระยุทธ. 2013: 87-97)

ส่วนประกอบหลักของผลไม้ ได้แก่ น้ำ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และวิตามิน นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารไฟโตนิวเทรียนท์ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และเส้นใย เป็นต้น ซึ่งปริมาณขององค์ประกอบต่างๆ แตกต่างไปตามชนิดพันธุ์พืช และแหล่งที่ปลูก โดยจะกล่าวถึงองค์ประกอบของพืชเฉพาะส่วนที่สำคัญๆ แต่ละส่วนประกอบพอสังเขป

น้ำ เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในผลไม้ เนื่องจากในผลไม้มีความชื้นสูงจึงทำให้มีปริมาณมากกว่าร้อยละ 80 ของน้ำหนักทั้งหมด ทำให้ผลไม้เน่าเสียได้ง่ายเนื่องจากจุลินทรีย์ (วีระยุทธ. 2013: 87-97)

คาร์โบไฮเดรต ในผลไม้เมื่อยังดิบอยู่ในรูปของสตาร์ช (starch) เมื่อผลไม้สุกจะเปลี่ยนเป็นน้ำตาล ทำให้ผลไม้สุกมีรสหวาน น้ำตาลในผลไม้ ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ฟรุกโทส น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น ซูโครส

ไขมัน ผลไม้ส่วนใหญ่มีปริมาณไขมันต่ำแต่มีบางชนิดที่มีไขมันสูง เช่น ทูเรียน อาโวคาโด

วิตามิน ผลไม้เป็นแหล่งสำคัญของวิตามิน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง วิตามินซี

แคโรทีนอยด์ (carotenoids) เป็นกลุ่มของรงควัตถุ หรือเม็ดสีที่ละลายได้ในไขมันที่พบในพืชซึ่งมีมากกว่า 600 ชนิดจะมีสีเหลือง สีส้ม จนถึงแดง มีโครงสร้างจะเป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่ไม่อิ่มตัว สารกลุ่มนี้ที่พบได้บ่อยและรู้จักกันเป็นอย่างดี ได้แก่ แคโรทีน (carotene) ไลโคปีน (lycopene) ลูทีน (lutein) ซึ่งพบมากในผักผลไม้ที่มีสีแดง ส้ม เหลือง และสามารถพบได้ในผักสีเขียว และสาหร่ายบางชนิด สารกลุ่มดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด และยับยั้งเซลล์มะเร็ง

สารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) หรือโพลีฟีนอล (polyphenol) เป็นสารจากธรรมชาติที่มีรสขม และพบในอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิด จะมีสีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้าง ได้แก่ สีขาว สีส้ม สีเหลือง สีแดง สีม่วง และสีน้ำเงิน สามารถแบ่งกลุ่มได้ถึง 12 กลุ่มมีตั้งแต่โครงสร้างอย่างง่ายที่มีมวลโมเลกุลน้อย จนถึงสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนและมวลโมเลกุลมาก เช่น กรดฟีนอล (phenol acid)

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และแทนนิน ซึ่งสารเหล่านี้สามารถพบได้มากใน พืชตระกูลถั่ว ผักและผลไม้ นอกจากนี้ยังพบได้ในไวน์แดง โกโก้ ชาเขียว และธัญพืช มีรายงานว่าสารกลุ่มดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น สารต้านอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบในโรคหัวใจและหลอดเลือด ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง

เส้นใยอาหาร (dietary fibers) เป็นสารกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) ซึ่งรวมถึงผนังเซลล์ของพืชและผลไม้ที่มีสารลิกนินเป็นองค์ประกอบซึ่งสารกลุ่มนี้ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ใยอาหารชนิดละลายน้ำ (soluble dietary fiber) เช่น เพคติน (pectin) อินูลิน (inulin) และเบต้ากลูแคน (β -glucan) มีคุณสมบัติช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย และต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดความเสี่ยงของภาวะไขมันและระดับน้ำตาลในเลือดสูง ส่วนใยอาหารอีกประเภทหนึ่ง คือใยอาหารชนิดไม่ละลายน้ำ (insoluble dietary fiber) ซึ่งสามารถพบได้ในข้าวซ้อมมือ ผักและผลไม้ทั่วไป มีคุณสมบัติช่วยในการขับถ่าย บรรเทาอาการท้องผูก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่

การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมสารตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์

ในการวิเคราะห์ทางเคมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือของการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ดังนั้นการเตรียมตัวอย่างจึงเป็นเรื่องที่มีความสำคัญ เพราะก่อนจะนำสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ ควรทำสารตัวอย่างให้บริสุทธิ์ก่อนโดยการแยกหรือกำจัดสิ่งปนเปื้อนออกจากสารตัวอย่างเพื่อลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้น นอกจากนี้การเตรียมสารตัวอย่างยังต้องคำนึงถึงสถานะของสารให้มีความเหมาะสมกับวิธีการวิเคราะห์ด้วย เช่น ระดับความเข้มข้น ปริมาตร สถานะและรูปแบบของสารประกอบ (ศิริพร จันทรศิริ. 2556: 67)

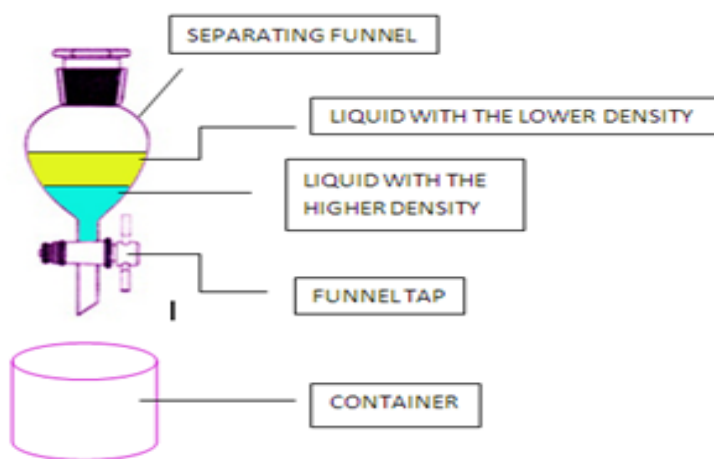
วิธีการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์

วิธีในการเตรียมตัวอย่างอาจเกี่ยวข้องกับการแยกโดยใช้วิธีการสกัด การกลั่น การแลกเปลี่ยนไอออน หรือใช้วิธีการทางโครมาโทกราฟี การเลือกใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างนั้นจะต้องเหมาะสมกับเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ วิธีการสกัดที่นิยมใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง คือวิธีการสกัดตัวอย่าง เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการแยกสาร โดยจะช่วยกำจัดสารรบกวนออกไปและช่วยเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (แมน อมรสิทธิ์; และคณะ. 2553: 182-185)

การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดเป็นวิธีการแยกสารที่สนใจจะวิเคราะห์จากตัวทำละลายหนึ่งไปอีกตัวทำละลายหนึ่ง โดยที่ตัวทำละลายทั้งสองชนิดไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน เทคนิคการสกัดสามารถแบ่งย่อยได้ตามสถานะของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสาร ดังนี้ (ศิริพร จันทรศิริ. 2556: 81)

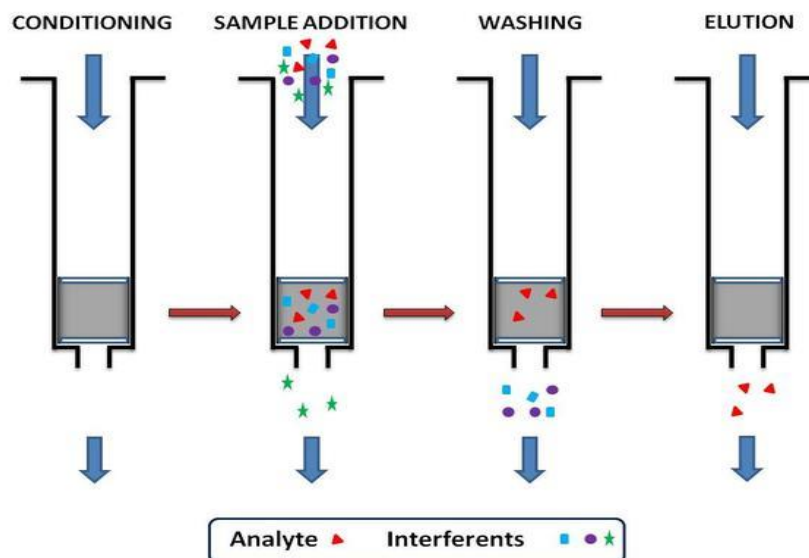
1. การสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว เป็นการสกัดสารละลายด้วยสารละลาย อาศัยความสัมพันธ์ในการกระจายตัวที่แตกต่างกันของตัวถูกละลายระหว่างสารละลาย 2 ชนิด ซึ่งไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน สารละลายที่นิยมใช้คือ น้ำและสารละลายอินทรีย์ โดยสารละลายอินทรีย์นอกจากต้องมีคุณสมบัติไม่รวมตัวกับน้ำแล้ว ควรมีจุดเดือดที่ไม่สูงมากจนเกินไปเนื่องจากบางครั้งหลังการสกัดอาจมีการระเหยตัวทำละลายออก และตัวทำละลายต้องมีความสามารถในการละลายสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ดีกว่าน้ำ โดยแสดงขั้นตอนการสกัดดังภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 การสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลว

ที่มา: Aumi. M; et al. (2553: ออนไลน์).

2. การสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง เป็นการสกัดแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์จากสารละลายตัวอย่าง โดยใช้สารสกัดที่เป็นของแข็ง เรียกว่า ตัวดูดซับ (absorbent) ซึ่งส่วนใหญ่จะถูกบรรจุในคอลัมน์หรือประยุกต์ทำเป็นแผ่นกลม (disk) โดยแสดงขั้นตอนการสกัดดังภาพประกอบ 3



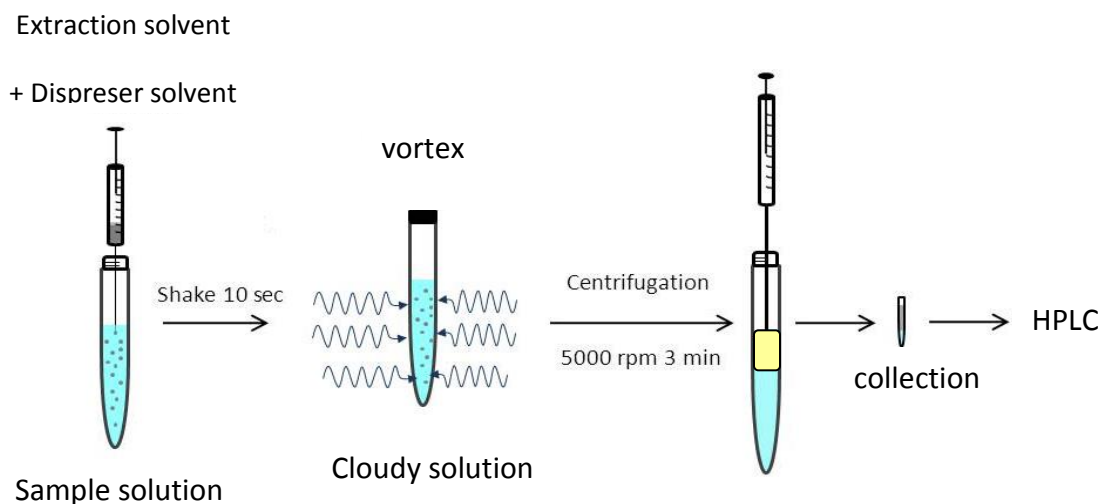
ภาพประกอบ 3 การสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลว

ที่มา: Jinya D; et al. (2011: 35-48).

การสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว

วิธีการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวเป็นวิธีการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายในปริมาณน้อย โดยในขั้นตอนการสกัดนั้นจะใช้สารละลาย 2 ชนิด คือ ตัวทำละลายสกัด (extraction solvent) ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำโดยอาจเป็นตัวทำละลายที่มีความหนาแน่นมากกว่าหรือน้อยกว่าน้ำก็ได้ (water immiscible solvent) ทั้งนี้ชนิดของตัวทำละลายสกัดที่เลือกต้องพิจารณาจากสมบัติความมีขั้ว โดยควรเลือกตัวทำละลายสกัดชนิดที่มีขั้วใกล้เคียงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งจะเป็นไปตามกฎ like dissolves like ก็คือ ตัวถูกละลายที่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว เพราะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลมีขั้วเป็นแรงไดโพล-ไดโพล (dipole-dipole) แต่จะไม่สามารถละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เอทานอล ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) ละลายในน้ำ (H_2O) แต่ไม่ละลายในเฮกเซน (C_6H_{14}) ในทางตรงข้าม ตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เพราะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลไม่มีขั้วเป็นแรงแวนเดอร์วาลส์ (van der waals force) เหมือนกัน แต่จะไม่สามารถละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) ละลายในเบนซีน (C_6H_6) ไม่ละลายในน้ำ แต่ถ้าในกรณีที่สารหนึ่งมีขั้วน้อยกว่าอีกสารตัวหนึ่ง ความสามารถในการละลายก็ลดลง หรืออาจจะกล่าวอีกนัยคือละลายได้เพียงบางส่วนเท่านั้นและตัวทำละลายกระจาย (dispersive solvent) ที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำ (water miscible solvent) ส่งผลให้สารละลายที่สกัดได้จากการสกัดวิธีนี้มีลักษณะขุ่น เนื่องจาก

การเกิดหยดของตัวทำละลายอินทรีย์เล็กๆ ลอยอยู่ในเฟสน้ำ โดยรวมจึงเรียกว่า สารละลายคาวดี (cloudy solution) ซึ่งการเกิดนี้จะทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายมวล (mass transfer) โดยจะทำให้เกิดการสัมผัสที่บริเวณผิวหน้าของวัฏภาค จากนั้นสารที่สนใจทำการวิเคราะห์จะเคลื่อนที่เข้าสู่ชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นการเกิดคาวดี โซลูชัน จึงเป็นผลจากการฉีดตัวทำละลายกระจายอย่างรุนแรงเพื่อให้เฟส 2 เฟส สามารถเคลื่อนที่เข้าหากันได้อย่างดี ทั้งนี้เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด ดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 กระบวนการสกัดโดยวิธี DLLME

ที่มา: ดัดแปลงจาก Pin. H; et al. (2013).

จากเทคนิคการเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลาย ดังกล่าวข้างต้นพบว่า การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว จัดเป็นวิธีการสกัดแบบใหม่ที่ใช้ตัวทำละลายในปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งจากเหตุผลดังกล่าวจึงมีการนำเอาวิธีการสกัดมาประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและตัวอย่างผลไม้บางชนิด

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 1995 เอช เคอมาซา และคณะ (Kermasha. X; et al. 1995: 245-252) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์กรดฟีนอลิกและสารประกอบฟีนอลในตัวอย่างน้ำแอปเปิ้ลเข้มข้นและไม่เข้มข้น ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ไดโอดแอรเรย์ อเล็กโตรเคมีคอลเป็นตัวตรวจวัด สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ผู้วิจัยได้นำตัวอย่างที่ซื้อจากแหล่งต่างๆมากรอง จากนั้นทำการแยกด้วยคอลัมน์ Econosil C₁₈ ขนาด 150×4.6 มิลลิเมตร ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นอะซิโตนไตรล (เฟส A) ต่อ 0.75% กรดไตรคลอโรอะซิติก (เฟส B) ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 , 320 นาโนเมตร และค่าศักย์ไฟฟ้า 600 มิลลิโวลต์ จากการทำการศึกษาและตรวจวิเคราะห์กรดฟีนอลิกและสารประกอบฟีนอลในตัวอย่างน้ำแอปเปิ้ลเข้มข้น พบว่า วิธีทดลองนี้มีค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 และ 320 นาโนเมตร และค่าศักย์ไฟฟ้า 600 มิลลิโวลต์ เท่ากับ 0.100, 0.050 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในปี ค.ศ. 2000 แอนด์เรียเซนส์ และคณะ (Andreasen; et al., 2000: 2837-2842) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนอลิก และกรดฟีนอลิกดีไฮโดรไดเมอร์ในตัวอย่างข้าวไรน์ (*Secale cereal L.*) จำนวน 17 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโกปีเป็นตัวตรวจวัด และเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีอัลคาไลน์ไฮโดรไลซิส โดยการนำตัวอย่างไปทำปฏิกิริยากับเมทานอลเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นทำการปรับ pH ให้มีค่า pH น้อยกว่า 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลาร์จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกเป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใส (supernatant) มาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ปริมาตร 350 มิลลิลิตร และนำไปเหวี่ยงแยกอีก 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 นาที เก็บชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ เติมน้ำโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส และนำมาระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันและอุณหภูมิ 30°C ละลายคราบที่เหลือด้วยเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.02 โมลาร์ (pH 2.15) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วทำการแยกสารที่สนใจด้วยคอลัมน์ LiCroCART C₁₈ ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ,pH 2.15 (เฟส A) และเมทานอลต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.02 โมลาร์ (40:60, v/v), pH 2.15 (เฟส B) ใช้ระบบการไหลเป็นแบบเกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากการทำการศึกษาผู้วิจัยพบว่าข้าวไรน์ในสายพันธุ์ *Ponsi* และ *Nikita* เป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณกรดฟีนอลิก และกรดฟีนอลิกดีไฮโดรไดเมอร์มากที่สุด

ในปี ค.ศ. 2002 โล เจียงโฮ และคณะ (Gauangho; L. et al. 2002: 89-96) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์และกรดฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำผลไม้พร้อมดื่ม โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิด

ของเหลวประสิทธิภาพสูง ใช้ไดโอดแอเรย์ดีเทคเตอร์เป็นตัวตรวจวัด ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตรแล้วทำการแยกสารที่สนใจด้วยคอลัมน์ C_{18} ขนาด 150×4.6 มิลลิเมตร บรรจุขนาดอนุภาค 5 ไมครอน เฟสเคลื่อนที่ 0.2% กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) และ อะซิโทไนไตรล์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที จากการทำการศึกษานี้พบว่า ค่าร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยกว่า 5

ในปี ค.ศ. 2007 วีรศักดิ์ และคณะ (Weerasak; et al. 2000: 131-137) ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแกลลิก กรดเอลลาจิก และเคออสติน ในตัวอย่างดอกจำปี ดอกหางนกยูง และดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโกปีเป็นตัวตรวจวัด และเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดแบบ liquid-liquid extraction แล้วทำการแยกสารที่สนใจด้วยคอลัมน์ Luna C_{18} reverse-phase ขนาด 150×4.6 มิลลิเมตร บรรจุขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำต่อกรดอะซิติก (25:1, v/v) (ตัวทำละลาย A) และเมทานอล (ตัวทำละลาย B) ใช้ระบบการไหลเป็นแบบเกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากการทำการศึกษานี้พบว่า ได้ค่าร้อยละการกลับคืนของสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกทั้ง 3 ชนิด อยู่ในช่วง 96.34 - 102.56 และ ค่าร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าน้อยกว่า 2 และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.9994 - 0.9999

ในปี ค.ศ. 2008 จิตวรรณ และคณะ (Jittawan; et al. 2008: 881-890) ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแทนนิก แคททีชิน กรดคูมาริก กรดเฟอรูลิก และกรดเบนโซอิก ในตัวอย่างน้ำเต้า ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ไดโอดอาร์เรย์เป็นตัวตรวจวัด และเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดแบบ liquid-liquid extraction โดยใช้เอทิลอะซิเตท ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นทำการสกัดโดยเก็บชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง ระเหยตัวทำละลายและละลายคราบที่เหลือด้วยเมทานอลต่อน้ำ ที่อัตราส่วน 50:50 (v/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วทำการแยกสารที่สนใจด้วยคอลัมน์ Luna C_{18} reverse-phase ขนาด 150×4.6 มิลลิเมตร บรรจุขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 3% กรดอะซิติก (ตัวทำละลาย A) และน้ำต่อกรดอะซิติกต่ออะซิโทไนไตรล์ อัตราส่วน 72:3:25 (v/v/v) (ตัวทำละลาย B) ใช้ระบบการไหลเป็นแบบเกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

278 นาโนเมตร จากการทำการศึกษาผู้วิจัยพบว่า ได้ค่าร้อยละการกลับคืนของสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกทั้ง 6 ชนิด มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.948

ในปี ค.ศ. 2009 เอช ฟาราจิ และคณะ (Faraji; H. et al. 2009: 8569-8574) ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำและเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำโดยใช้เทคนิคการสกัดแบบ liquid-liquid microextraction (LLME) นำสารตัวอย่างใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมโพแทสเซียมคาร์บอเนต และอะซิติกแอซิไดรเรย์ ตามลำดับ ทำการเขย่า จากนั้นเติม 1-undecanol ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายที่ใช้สำหรับการสกัด คนให้เข้ากัน เพื่อให้แต่ละวัฏภาคของสารละลายเกิดการสัมผัสกัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี แล้วทำการแยกด้วยแคปิลลารีคอลัมน์ HP-5 MS ขนาด 30×0.25 มิลลิเมตร โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา จากการศึกษพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเตรียมตัวอย่างตัววิธีการสกัดแบบ LLME คือ การใช้โพแทสเซียมคาร์บอเนต และอะซิติกแอซิไดรเรย์ เป็นรีเอเจนต์ในการทำอนุพันธ์ และ 1-undecanol เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ซึ่งทำให้ได้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ เท่ากับ 0.0005-0.68 ไมโครกรัมต่อลิตร และให้ค่าร้อยละการคืนกลับมากกว่า 84

ในปี ค.ศ. 2010 โรแมน และคณะ (Rohman; et al. 2010: 97-106) ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ในตัวอย่าง *Pandanus conoideus* Lam โดยใช้ Folin Ciocalteu reagent และเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดแบบ liquid-liquid extraction ใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลายที่ใช้สำหรับสกัด จากนั้นตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร จากการทำการศึกษาผู้วิจัยพบว่า ได้ค่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่เท่ากับ 0.645 และมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 5.25-53.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในปี ค.ศ. 2011 เจียนเหว่ย และคณะ (Jianwei; et al. 2011: 102-111) ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์กรดแทนนิกในตัวอย่างน้ำ โดยใช้ซีโอไลต์ที่ปรับแปรด้วยเซอร์แฟคแทนท์ (surfactant-modified zeolite) เป็นตัวดูดซับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณและศึกษาคุณสมบัติของตัวดูดซับก่อนและหลังทำการปรับแปรซีโอไลต์ (modified zeolite) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตรด้วยและศึกษาการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคเอกซเรย์ ดิฟแฟรคชัน (X-ray diffraction , XRD) และเทคนิคฟูเรียร์ ทรานฟอร์ม อินฟราเรด (Fourier transform infrared , FT-IR) จากการทำการศึกษาผู้วิจัยพบว่า ได้ค่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่เท่ากับ 0.9910

ในปี ค.ศ. 2011 อีส์ล่า และคณะ (Esra; et al. 2011: 145-154) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนอลิกทั้ง 12 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก แคททีชิน อีพิกาทีกัตชิน กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก ไชริจิก กรดแคฟเฟอิก กรดคูมาริก รุทีน เรสเวอราทรอล ไมริซิทิน เควอซิทิน และแคมพ์เฟอร์อล ในตัวอย่างไวน์แดง ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโกปีและฟลูออเรสเซนซ์เป็นตัวตรวจวัด และเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดแบบ liquid-liquid extraction โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3 โมลาร์ จากนั้นทำการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากัน นาน 1 นาที และปั่นเหวี่ยงอีก 5 นาที จากนั้นเก็บสารละลายส่วนใสและนำสารละลายในชั้นน้ำมาสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง เก็บสารละลายส่วนใสมารวมกันและนำไประเหยเอาตัวทำละลายออก ละลายคราบที่เหลือด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นทำการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบ solid phase extraction ซึ่งใช้ชนิดเฟสของแข็งที่แตกต่างกัน ทำการเตรียมสภาวะให้เหมาะสมด้วยอะซิโตนไตรล 2.5 มิลลิลิตร เมทานอล 2.5 มิลลิลิตร และน้ำ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับ pH ของสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3 โมลาร์ จากนั้นทำการชะด้วยอะซิโตนไตรล ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรและเมทานอล ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้จากการชะไประเหยเอาตัวทำละลายออก ละลายคราบที่เหลือด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วทำการแยกสารที่สนใจด้วยคอลัมน์ Eclipse XDB C₁₈ ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นกรดฟอร์มิก (เฟส A) ต่อเมทานอล (เฟส B) ต่อน้ำ (เฟส C) อัตราส่วน 0.2:35:64.8 (v/v/v) ใช้ระบบการไหลเป็นแบบเกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254, 280 และ 323 นาโนเมตร จากการศึกษาผู้วิจัยพบว่าวิธีการสกัดสารแบบ liquid-liquid extraction เป็นวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีการสกัดสารแบบ solid phase extraction เนื่องจากวิธีการสกัดสารแบบ liquid-liquid extraction ให้ค่าร้อยละการกลับคืนของสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกทั้ง 12 ชนิดสูงกว่าวิธีการสกัดสารแบบ solid phase extraction โดยให้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 75.70 -103.3 และค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าน้อยกว่า 3 และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.9935-0.9998

ในปี ค.ศ. 2011 ซีฟีรีโน และคณะ (Ceferino; et al. 2011: 100-104) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกในตัวอย่างองุ่น โดยใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างแบบการสกัดโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonically assisted extraction) ใช้น้ำต่อเมทานอล อัตราส่วน 50:50 (v/v) เป็น

ตัวทำละลายที่ใช้สำหรับสกัด ปรับ pH ของสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก นำไปสกัดโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิกเป็นระยะเวลา 3-15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสเพื่อนำไปตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากการทำการศึกษาผู้วิจัยพบว่าวิธีการสกัดดังกล่าวมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าน้อยกว่า 2 และให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ เท่ากับ 0.06 และ 0.19 มิลลิกรัมต่อกรัม และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ (limits of quantitation, LOQ) เท่ากับ 0.12 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อกรัม

ในปี ค.ศ. 2012 กุปป์ทา และคณะ (Gupta; et al. 2012: 162-167) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารมาตรฐานในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้ง 12 ชนิด ได้แก่ กรดเอลลาจิก แคทีคอล กรดแกลลิก เควอซิติน รีซอร์ซินอล กรดแทนนิก วานิลีน กรดซาลิไซลิก กรดอะซิทิลซาลิไซลิก กรดเบนโซอิก ฟลอโรกลูซินอล และกรดแอสคอร์บิก ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโกปีเป็นตัวตรวจวัด เตรียมสารละลายมาตรฐานทั้ง 12 ชนิด โดยนำสารมาตรฐานแต่ละชนิดมาละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรองสารละลายมาตรฐานด้วยไนลอนเมมเบรน แล้วทำการแยกสารที่สนใจด้วยคอลัมน์ Luna C₁₈ reverse-phase ขนาด 150×4.6 มิลลิเมตร บรรจุขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของวัฏภาคเคลื่อนทั้งหมด 4 ระบบ ได้แก่ ระบบที่ 1 เมทานอล (ตัวทำละลาย A) และ กรดอะซิติกในน้ำ(1:25)(ตัวทำละลาย B) ระบบที่ 2 เมทานอล (ตัวทำละลาย A) และ 1% กรดอะซิติกในน้ำ(1:25) (ตัวทำละลาย B) ระบบที่ 3 อะซิโตนไตรล์ (ตัวทำละลาย A) และ 0.1%กรดฟอร์มิก (ตัวทำละลาย B) และระบบที่ 4 ระบบที่ 3 อะซิโตนไตรล์ (ตัวทำละลาย A) และ 0.1%กรดฟอร์มิก (ตัวทำละลาย B) แล้วทำการแยกสารละลายมาตรฐานที่สนใจด้วยคอลัมน์ Symmetry C₁₈ ขนาด 150×4.6 มิลลิเมตร บรรจุขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ใช้ระบบการไหลเป็นแบบเกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อ นาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 และ 360 นาโนเมตร เพื่อหาชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้เป็นยารักษาโรค (medicinal plants)ต่อไป จากการศึกษพบว่าชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้วิเคราะห์สารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก คือ ระบบที่ 1 เมทานอล (ตัวทำละลาย A) และ กรดอะซิติกในน้ำ (1:25)(ตัวทำละลาย B) เนื่องจากใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย ลักษณะพีคที่ได้มีลักษณะ shape เมื่อเปรียบเทียบกับระบบอื่นที่นำมาศึกษาวิเคราะห์

ในปี ค.ศ. 2012 ลูคา และคณะ (Luca; et al. 2014: 9-15) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำผิวดิน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ยูวีวิสิเบิลสเปกโทรสโกปีเป็นตัวตรวจวัด และเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดแบบ dispersive liquid-liquid extraction โดยนำตัวอย่างน้ำผิวดินปริมาณ 10 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองเติมแอมโมเนียมซัลเฟตหนัก 3 กรัม จากนั้นปรับ pH ของสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล เติมหคลอโรฟอร์ม 450 ไมโครลิตร เป็นตัวสกัดและใช้ Me_2CO ปริมาตร 750 ไมโครลิตร เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัว จากนั้นทำการสกัดโดยเก็บชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง ระเหยตัวทำละลายและละลายคราบที่เหลือด้วยเมทานอลต่ออัตราส่วน 1:4 (v/v) 100 ไมโครลิตร แล้วทำการแยกสารที่สนใจด้วยคอลัมน์ Fast Gradient C_{18} ขนาด 50×2 มิลลิเมตร ใช้ระบบการไหลเป็นแบบเกรเดียนต์ ควบคุมอัตราการไหลที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 265, 290, 330 และ 370 นาโนเมตร โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 0.1%กรดฟอร์มิก (ตัวทำละลาย A) และเมทานอล (ตัวทำละลาย B) จากการทำการศึกษาผู้วิจัยพบว่าวิธีการสกัดสารแบบ dispersive liquid-liquid extraction ให้ค่าร้อยละการกลับคืนมีค่ามากกว่า 70 และ ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าน้อยกว่า 10 และมีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้เท่ากับ 1.4-12 ส่วนในพันล้านส่วน (parts per billion, ppb) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณเท่ากับ 4.7-40 นาโนต่อกรัม

เนื่องจากยังไม่พบรายงานสำหรับการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิดด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว (DLLME) แต่จากการศึกษาหาข้อมูลเบื้องต้นพบว่า มีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกชนิดต่างๆ ในตัวอย่างที่แตกต่างกันไปด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้วิธีการสกัดแบบ DLLME ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาและวิจัยเพื่อพัฒนาให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างชนิดอื่นๆต่อไปได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ไดโอดอาร์เรย์ ของบริษัท Hewlett-Packard รุ่น HP 1100 เป็นตัวตรวจวัด

- คอลัมน์ C₁₈ (VertiSep GES ขนาด 5 ไมโครเมตร , 250x 4.6 มิลลิเมตร) ของบริษัท Phenomenex

- เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-2401 PC ของบริษัท Shimadzu

- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น AB104-S) ของบริษัท Mettlerg

- ชุดกรองวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) ขนาด 1000 มิลลิลิตร ของบริษัท Altech

- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออนรุ่น LaboStar ของบริษัท Siemens

- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Zentrifugen EBA 8S ของบริษัท Hettich

- เครื่องเขย่า รุ่น Vortex-genie 2 ของบริษัท Scientific Industries

- เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter) ของบริษัท Mettler Toledo

- ไซริงค์ฟิลเตอร์ (syringe filters) ชนิด NYLON ขนาด 0.45 ไมครอน ของบริษัท

Vertical

- ไมโครปิเปตขนาด 100 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Socorex

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- สารมาตรฐานกรดแทนนิก (Tannic acid , AR grade) ของบริษัท Sigma Aldrich
- กรดกลาเซียอะซิติก (Glacial acetic acid , AR grade) ของบริษัท Quality Reagent
- อะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile , HPLC grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- เมทานอล (Methanol , HPLC grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- เอทานอล (Methanol , HPLC grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate , AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform , AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- 1-บิวทานอล (1-Butanol , AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- เพนทานอล (Pentanol , AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride , AR grade) จากบริษัท RCL Lab San
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide , AR grade) จากบริษัท RCL Lab San

3. ตัวอย่างพืชและผลไม้

กลุ่มใบพืช ได้แก่ ใบहुกวาง ใบยอ ใบฝรั่ง ใบกระท้อน ใบชมพู ใบมะยม ใบละมุด
ใบน้อยหน่า ใบหว่า

กลุ่มผลไม้ ได้แก่ ผลहुกวาง ผลยอ ผลฝรั่ง ผลกระท้อน ผลชมพู ผลมะยม ผลละมุด
ผลน้อยหน่า ผลหว่า ผลกล้วย

กลุ่มเปลือกผลไม้ ได้แก่ เปลือกผลहुกวาง เปลือกผลยอ เปลือกผลฝรั่ง เปลือกกระท้อน
เปลือกผลละมุด เปลือกกล้วย เปลือกน้อยหน่า เปลือกผลหว่า

หมายเหตุ ตัวอย่างข้างต้นได้จากแหล่งของพืชและผลไม้จาก บริเวณอำเภอเมือง
จังหวัดอ่างทอง

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว(**dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME**) ที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดแทนนิก

1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตัวกระจายที่ใช้ในการกระจาย

ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่นำมาใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม 1-บิวทานอล และ เพนทานอล โดยทำการทดลองดังนี้

1.1.1 นำตัวอย่างมา 5.xxxx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

1.1.2 จากนั้นบีบอัดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดเอทิลอะซิเตทและตัวทำละลายกระจายตัวเอทานอล ที่อัตราส่วน 1:1 (v/v)

1.1.3 ทำการปรับสภาพของสารละลายตัวอย่างให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ตรวจวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัดพีเอช

1.1.4 จากนั้นนำไปทำให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 3 นาที เติมสารละลายเกลืออิ่มตัวลงไปในสารละลายตัวอย่าง และนำไปเขย่าเพื่อทำให้เข้ากันอีก 1 ครั้ง และนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

1.1.5 เก็บสารละลายส่วนใสที่อยู่ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ (ชั้นบน) ลงในปิпетต์สะอาด ทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ละลายคราบที่เหลือในปิпетต์ด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.1.6 กรองสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ด้วยโซรินจ์ฟิลเตอร์เมมเบรนชนิดเซลลูโลสอะซิเตดขนาด 0.45 ไมครอน และฉีดสารละลายเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง)

1.1.7 ในทำนองเดียวกันทำการทดลองตามวิธีข้างต้น โดยเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเป็น ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม 1-บิวทานอล และ เพนทานอล ตามลำดับ เพื่อศึกษาหาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่เหมาะสม

1.2 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัวทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล อะซิโตน และ อะซิโตนไนไตรล์

1.2.1 นำตัวอย่างมา 5.xxxx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 4

1.2.2 จากนั้นบีบเปิดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 1-บิวทานอล และตัวทำละลายกระจายเอทานอล ที่อัตราส่วน 1:1 (v/v) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1.3-1.1.6

1.2.3 ในทำนองเดียวกันทำการทดลองตามวิธีข้างต้น โดยเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัวเป็น อะซิโตน และ อะซิโตนไนไตรล์ ตามลำดับ เพื่อศึกษาหาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัวที่เหมาะสม

1.3 ศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตัวกระจายที่ใช้ในการกระจาย

ทำการศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจาย ที่อัตราส่วน 1:0.5 1:1 1:2 1:3 และ 1:4 โดยทำการทดลองดังนี้

1.3.1 นำตัวอย่างมา 5.xxxx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

1.3.2 จากนั้นบีบเปิดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 1-บิวทานอล และตัวทำละลายกระจายเอทานอล ที่อัตราส่วน 1:0.5 1:1 1:2 1:3 และ 1:4 (v/v) ตามลำดับ ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1.3-1.1.6

1.4 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายผสมที่เหมาะสม

ทำการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายผสม ที่ปริมาตร 100 150 200 250 300 350 และ 400 ไมโครลิตร โดยทำการทดลองดังนี้

1.4.1 นำตัวอย่างมา 5.xxxx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

1.4.2 จากนั้นบีบเปิดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 1-บิวทานอล และตัวทำละลายกระจายเอทานอล อัตราส่วน 1:1 ที่ปริมาตร 100 150 200 250 300 350 และ 400 ไมโครลิตร ตามลำดับ ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1.3-1.1.6

1.5 ศึกษา pH ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาค่า pH ของสารละลายที่เหมาะสม ที่ pH 3 4 5 6 7 8 และ 9 โดยทำการทดลองดังนี้

1.5.1 นำตัวอย่างมา 5.xxxx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

1.5.2 จากนั้นบีบเปิดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 1-บิวทานอล และตัวทำละลายกระจายเอทานอล อัตราส่วน 1:1 ที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

1.5.3 ทำการปรับสภาวะของสารละลายตัวอย่างให้มี pH เท่ากับ 3 4 5 6 7 8 และ 9 ตามลำดับ ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ตรวจวัดค่า pH ด้วยพีเอชมิเตอร์ ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1.4-1.1.6

1.6 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เหมาะสม

ทำการศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 โมลาร์ โดยทำการทดลองดังนี้

1.6.1 นำตัวอย่างมา 5.xxxx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

1.6.2 จากนั้นบีบเปิดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 1-บิวทานอล และตัวทำละลายกระจายเอทานอล อัตราส่วน 1:1 ที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

1.6.3 ทำการปรับสภาวะของสารละลายตัวอย่างให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วยสารละลายสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ โดยตรวจวัดค่า pH และ ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1.4-1.1.1.

1.7 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการผสมสาร (vortex) ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการผสมสารที่เหมาะสม ที่เวลา 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 นาที โดยทำการทดลองดังนี้

1.7.1 นำตัวอย่างมา 5.xxxx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

1.7.2 จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 1-บิวทานอล และตัวทำละลายกระจายเอทานอล อัตราส่วน 1:1 ที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

1.7.3 ทำการปรับสภาวะของสารละลายตัวอย่างให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยตรวจวัดค่า pH ด้วยพีเอชมิเตอร์

1.7.4 จากนั้นนำไปทำให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ที่เวลา 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 นาที เติมสารละลายเกลืออิ่มตัวลงไปในการละลายตัวอย่าง และนำไปเขย่าเพื่อทำให้เข้ากันอีก 1 ครั้ง แล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที และทดลองตามข้อ 1.1.5-1.1.6

1.8 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10%w/w โดยทำการทดลองดังนี้

1.8.1 นำตัวอย่างมา 5.xxxx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

1.8.2 จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 1-บิวทานอล และตัวทำละลายกระจายเอทานอล อัตราส่วน 1:1 ที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

1.8.3 ทำการปรับสภาวะของสารละลายตัวอย่างให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.3 โมลาร์ และตรวจวัดค่า pH

1.8.4 จากนั้นนำไปทำให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ที่เวลา 3.0 นาที เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10%w/w ตามลำดับ และนำไปเขย่าเพื่อทำให้เข้ากันอีก 1

ครั้ง แล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2.0 นาที และทดลองต่อตามข้อ 1.1.5-1.1.6

1.9 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยงที่เหมาะสม

ทำการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการหมุนเหวี่ยงที่เหมาะสม ที่เวลา 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 นาที โดยทำการทดลองดังนี้

1.9.1 นำตัวอย่างมา 5.xxxx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

1.9.2 จากนั้นเปิดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 1-บิวทานอล และตัวทำละลายกระจายเอทานอล อัตราส่วน 1:1 ที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

1.9.3 ทำการปรับสภาพของสารละลายตัวอย่างให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยตรวจวัดค่า pH ด้วยพีเอชมิเตอร์

1.9.4 จากนั้นนำไปทำให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ที่เวลา 3.0 นาที เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 4%w/w ตามลำดับ และนำไปเขย่าเพื่อทำให้เข้ากันอีก 1 ครั้ง แล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ที่เวลา 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 นาที ตามลำดับ และทดลองต่อตามข้อ 1.1.5-1.1.6

ตอนที่ 2 การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็ง และวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว

2.1 วิธีการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)

2.1.1 นำตัวอย่างมา 5.xxxx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

2.1.2 จากนั้นเปิดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 1-บิวทานอล และตัวทำละลายกระจายเอทานอล อัตราส่วน 1:1 ที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

2.1.3 ทำการปรับสภาวะของสารละลายตัวอย่างให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยตรวจวัดค่า pH ด้วยพีเอชมิเตอร์

2.1.4 จากนั้นนำไปทำให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย้าสาร ที่เวลา 3.0 นาที เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 4%w/w ตามลำดับ และนำไปเขย้าเพื่อทำให้เข้ากันอีก 1 ครั้ง แล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2.0 นาที

2.1.5 เก็บสารละลายส่วนใสที่อยู่ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ (ชั้นบน) ลงในบีกเกอร์สะอาด ทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ละลายคราบที่เหลือในบีกเกอร์ด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.1.6 กรองสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ด้วยไซรินจ์ฟิลเตอร์เมมเบรนชนิดเซลลูโลสอะซิเตดขนาด 0.45 ไมครอน และฉีดสารละลายเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง)

2.2 วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็ง

2.2.1 นำตัวอย่างมา 5.xxxx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

2.2.2 จากนั้นเป็ดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรลงไป ทำการปรับสภาวะของสารละลายตัวอย่างให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.3 โมลาร์ จากนั้นโหลดสารตัวอย่างลงใน C-18 cartridge

2.2.3 ใช้สารละลายผสมระหว่าง 1-บิวทานอลกับเอทานอล อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ชะกรดแทนนิกออกจาก C-18 cartridge

2.2.4 เก็บสารละลายที่ออกจาก C-18 cartridge ลงในบีกเกอร์สะอาด ทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ละลายคราบที่เหลือในบีกเกอร์ด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.2.5 กรองสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ด้วยไซรินจ์ฟิลเตอร์เมมเบรนชนิดเซลลูโลสอะซิเตดขนาด 0.45 ไมครอน และฉีดสารละลายเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง)

2.3 วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของเหลว

2.3.1 นำตัวอย่างมา 5.xxxx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

2.3.2 จากนั้นบีบอัดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติมตัวทำละลายสกัด เอทิลอะซิเตท ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

2.3.3 ทำการปรับสภาวะของสารละลายตัวอย่างให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วยสารละลายกรด ไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยตรวจวัดค่า pH ด้วยพีเอชมิเตอร์ แล้วทดลองตาม ข้อ 2.2.4-2.2.6

ตอนที่ 3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.1 ศึกษาชนิด และองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยนำกรดแทนนิกที่มีความเข้มข้น 1000 ppm มาใช้ในการทดลอง เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่นำมาใช้ในการศึกษา มีดังนี้

3.1.1 ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่กรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล และอัตราส่วนที่มีผลต่อการแยกกรดแทนนิก

ทำการศึกษาที่สภาวะดังต่อไปนี้

- คอลัมน์ VertiSep GES C18 ขนาด 5 μ m (250 mm $\times$ 4.6 mm)
- ตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- อุณหภูมิห้อง (ควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)
- ทำการศึกษาที่อัตราส่วน 90:10 85:15 80:20 60:40 และ 65:35
- อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.90 มิลลิลิตรต่อนาที
- ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง (n=5)

3.1.2 ศึกษาวัฏภาคเคลื่อนที่กรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และอะซิโตไนไตรล์ และอัตราส่วนที่มีผลต่อการแยกกรดแทนนิก

- คอลัมน์ VertiSep GES C18 ขนาด 5 μm (250 mm $\times$ 4.6 mm)
- ตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- ควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
- ทำการศึกษาที่อัตราส่วน 90:10 85:15 80:20 60:40 และ 65:35
- อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.90 มิลลิลิตรต่อนาที
- ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง (n=5)

3.2 ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

ทำการศึกษหาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ที่ 0.7 0.8 0.9 1.0 และ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยกำหนดสภาวะต่างๆดังนี้

- คอลัมน์ VertiSep GES C18 ขนาด 5 μm (250 mm $\times$ 4.6 mm)
- ตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- ควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
- อัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ตามที่ได้จากการทดลองจากข้อ 3.1.1 หรือ 3.1.2
- อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ 0.7 0.8 0.9 1.0 และ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที
- ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง (n=5)

ตอนที่ 4 ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกที่พัฒนาขึ้น

4.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์

4.1.1 เตรียมสารมาตรฐานกรดแทนนิกที่ 10 ความเข้มข้น คือ 0.0 20.0 50.0 100.0 200.0 300.0 400.0 600.0 และ 1000.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.1.2 นำสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก ที่เตรียมได้ไปกรองผ่านไซรินจ์ฟิลเตอร์ เมมเบรน ชนิดเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน

4.1.3 นำสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกที่เตรียมทุกระดับความเข้มข้น ฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

4.2 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ

4.2.1 เตรียมสารมาตรฐานกรดแทนนิกที่ความเข้มข้น คือ 0.10 0.50 1.00 2.00 และ 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2.2 นำสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกที่เตรียมทุกระดับความเข้มข้นไปทำการสกัด ด้วยวิธีการสกัด DLLME ที่พัฒนาขึ้น

4.2.3 กรองสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก ที่ผ่านกระบวนการสกัดไปกรองผ่านไซริงค์ฟิลเตอร์เมมเบรน ชนิดเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูงปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณหาค่า LOD โดยค่า LOD จะให้สัญญาณเป็น 3 เท่า ของสัญญาณ noise (S/N) จากนั้นคำนวณหาค่า LOD ดังสมการที่ 1

$$LOD = 3S/N \quad \dots\dots\dots (1)$$

4.3 ศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

4.2.1 เตรียมสารมาตรฐานกรดแทนนิกที่ความเข้มข้น คือ 0.10 0.50 1.00 2.00 และ 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2.2 นำสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกที่เตรียมทุกระดับความเข้มข้นไปทำการสกัด ด้วยวิธีการสกัด DLLME ที่พัฒนาขึ้น

4.2.3 กรองสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก ที่ผ่านกระบวนการสกัดไปกรองผ่านไซริงค์ฟิลเตอร์เมมเบรน ชนิดเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูงปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณหาค่า LOQ โดยค่า LOQ จะให้สัญญาณเป็น 10 เท่า ของสัญญาณ noise (S/N) จากนั้นคำนวณหาค่า LOQ ดังสมการที่ 2

$$LOQ = 10S/N \quad \dots\dots\dots (2)$$

4.4 ศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy)

การศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทำการศึกษาโดยการหาค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ทำการทดลองดังนี้

4.4.1 นำตัวอย่างมา 5.xxxx กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตรกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

4.4.2 จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 10 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

แล้วเติมสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 1-บิวทานอล และตัวทำละลายกระจายเอทานอล อัตราส่วน 1:1 ที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

4.4.3 ทำการปรับสภาวะของสารละลายตัวอย่างให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วยสารละลายกรด ไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยตรวจวัดค่า pH ด้วยพีเอชมิเตอร์

4.4.4 จากนั้นนำไปทำให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ที่เวลา 3.0 นาที เติมสารละลาย โซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 4%w/w ตามลำดับ และนำไปเขย่าเพื่อให้เข้ากันอีก 1 ครั้ง แล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ที่เวลา 2.0 นาที

4.4.5 เก็บสารละลายส่วนใสที่อยู่ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ (ชั้นบน) ลงในบีกเกอร์ สะอาด ทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ละลายคราบที่เหลือในบีกเกอร์ด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4.4.6 กรองสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ด้วยไซรินจ์ฟิลเตอร์เมมเบรนชนิดเซลลูโลสอะ ซิตเดขนาด 0.45 ไมครอน และฉีดสารละลายเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง) จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ดังสมการที่ 3

$$\text{ร้อยละการคืนกลับ} = \frac{[(C_{\text{in sample}} + C_{\text{added}}) - C_{\text{in sample}}]}{C_{\text{added}}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

เมื่อ $C_{\text{in sample}}$ คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์
 C_{added} คือ ความเข้มข้นที่เติมลงไปในตัวอย่าง

4.5 ศึกษาความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์

ทำการศึกษาความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ โดยการทำการทดลองซ้ำภายในวัน เดียวกัน (intra-day) จำนวน 10 ซ้ำ และทำการทดลองซ้ำระหว่างวันเป็นระยะเวลา 3 วัน (inter-day) ซึ่งทำการทดลองซ้ำวันละ 10 ซ้ำ โดยทำการทดลองดังนี้

4.5.1 นำตัวอย่างมา 5.0000 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตรกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

4.5.2 จากนั้นเปิดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเติม

สารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 1-บิวทานอล และตัวทำละลายกระจายเอทานอล อัตราส่วน 1:1 ที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

4.5.3 ทำการปรับสภาวะของสารละลายตัวอย่างให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วยสารละลายกรด ไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยตรวจวัดค่า pH ด้วยพีเอชมิเตอร์

4.5.4 จากนั้นนำไปทำให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ที่เวลา 3.0 นาที เติมสารละลาย โซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 4%w/w ตามลำดับ และนำไปเขย่าเพื่อทำให้เข้ากันอีก 1 ครั้ง แล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ที่เวลา 2.0 นาที

4.5.5 เก็บสารละลายส่วนใสที่อยู่ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ (ชั้นบน) ลงในบีกเกอร์ สะอาด ทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ละลายคราบที่เหลือในบีกเกอร์ด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4.5.6 กรองสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์เมมเบรนชนิดเซลลูโลสอะ ซิตเตชขนาด 0.45 ไมครอน และฉีดสารละลายเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง) จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (% relative standard deviation , %RSD) ดังสมการที่ 4

$$\text{ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน} = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ย}} \dots\dots\dots (4)$$

ตอนที่ 5 ศึกษาผลของสารรบกวนในตัวอย่าง

5.1 ศึกษาผลของการรบกวนจากสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น ๆ

5.1.1 เตรียมสารมาตรฐานกรดแทนนิกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมสาร รบกวน ได้แก่ กรดแกลลิก กรดเฟอรูลิก และคาเทชิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.1.1 นำสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก กรดแกลลิก กรดเฟอรูลิก คาเทชิน ที่ เตรียมได้ไปทำการสกัดด้วยเทคนิค DLLME ที่พัฒนาขึ้น จากนั้นกรองผ่านไซริงค์ฟิลเตอร์เมมเบรนชนิด เซลลูโลสอะซิตเตชขนาด 0.45 ไมครอน

5.1.1 นำสารละลายฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

5.2 ศึกษาผลของการรบกวนจากกรดอินทรีย์

5.2.1 เตรียมสารมาตรฐานกรดแทนนิกเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมสารรบกวนกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก และกรดซิตริก เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.2.1 นำสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก และกรดซิตริก ที่เตรียมได้ไปทำการสกัดด้วยเทคนิค DLLME ที่พัฒนาขึ้น จากนั้นกรองผ่านไซริงจ์ฟิลเตอร์เมมเบรนชนิดเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน

5.2.1 นำสารละลายฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

ตอนที่ 6 วิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด

6.1 นำตัวอย่างแต่ละชนิดมาบดให้ละเอียด จากนั้นชั่งตัวอย่างหนัก 5.0000 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 15 มิลลิลิตรกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

6.2 จากนั้นเปิดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 1-บิวทานอล และตัวทำละลายกระจายเอทานอล อัตราส่วน 1:1 ที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

6.3 ทำการปรับสภาพของสารละลายตัวอย่างให้มี pH เท่ากับ 4 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยตรวจวัดค่า pH ด้วยพีเอชมิเตอร์

6.4 จากนั้นนำไปทำให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ที่เวลา 3.0 นาที เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 4%w/w ตามลำดับ และนำไป vortex เพื่อทำให้เข้ากันอีก 1 ครั้ง แล้วนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ที่เวลา 2.0 นาที

6.5 เก็บสารละลายส่วนใสที่อยู่ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ (ชั้นบน) ลงในปิпетเตอร์สะอาด ทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ละลายคราบที่เหลือในปิпетเตอร์ด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6.6 กรองสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ด้วยไซริงจ์ฟิลเตอร์เมมเบรนชนิดเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน และฉีดสารละลายเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง) จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานและคำนวณหาปริมาณกรดแทนนิก

บทที่ 4

ผลการทดลอง

สำหรับการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอเสนอผลการวิจัยตามลำดับดังนี้

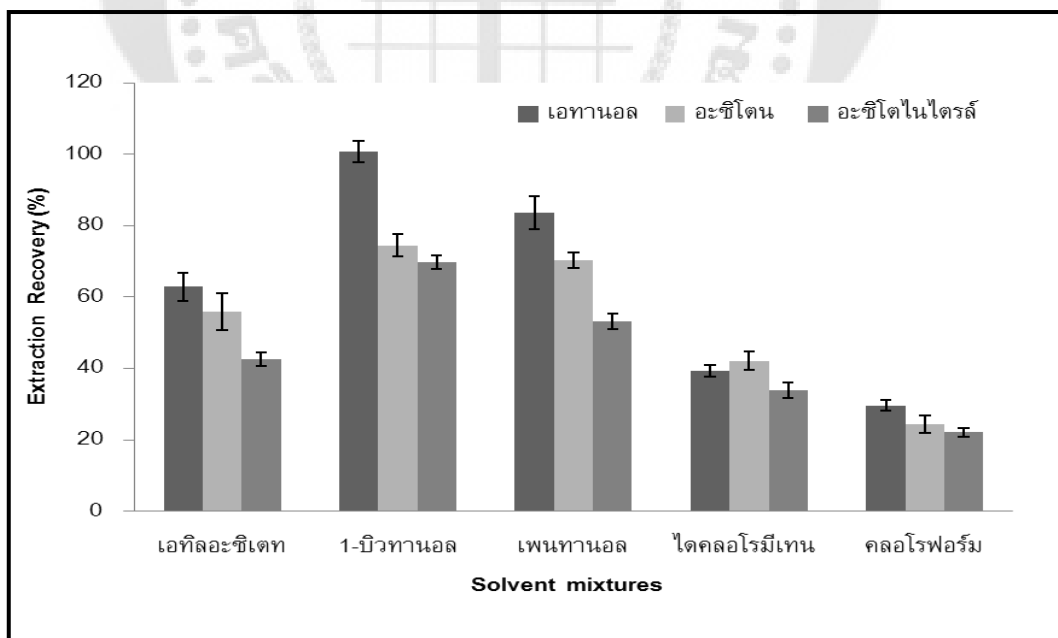
1. ผลการศึกษาผลของตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว ที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดแทนนิก
2. ผลการเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็ง และวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว
3. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
4. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกที่พัฒนาขึ้น
5. ผลการศึกษาผลของสารรบกวนในตัวอย่าง
6. ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด

ตอนที่ 1 การศึกษาผลของตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) ที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดแทนนิก

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อวิธีการเตรียมตัวอย่าง ได้แก่ ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและตัวทำละลายที่ใช้กระจาย อัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายที่ใช้สกัดและตัวทำละลายที่ใช้กระจาย ปริมาตรของตัวทำละลายผสม ค่า pH ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เวลาที่ใช้ในการเขย่า ที่เหมาะสม ค่าความแรงของไอออนของสารละลาย (ionic strength) และเวลาที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยงที่เหมาะสม

1.1 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและตัวทำละลายกระจายที่ใช้กระจาย

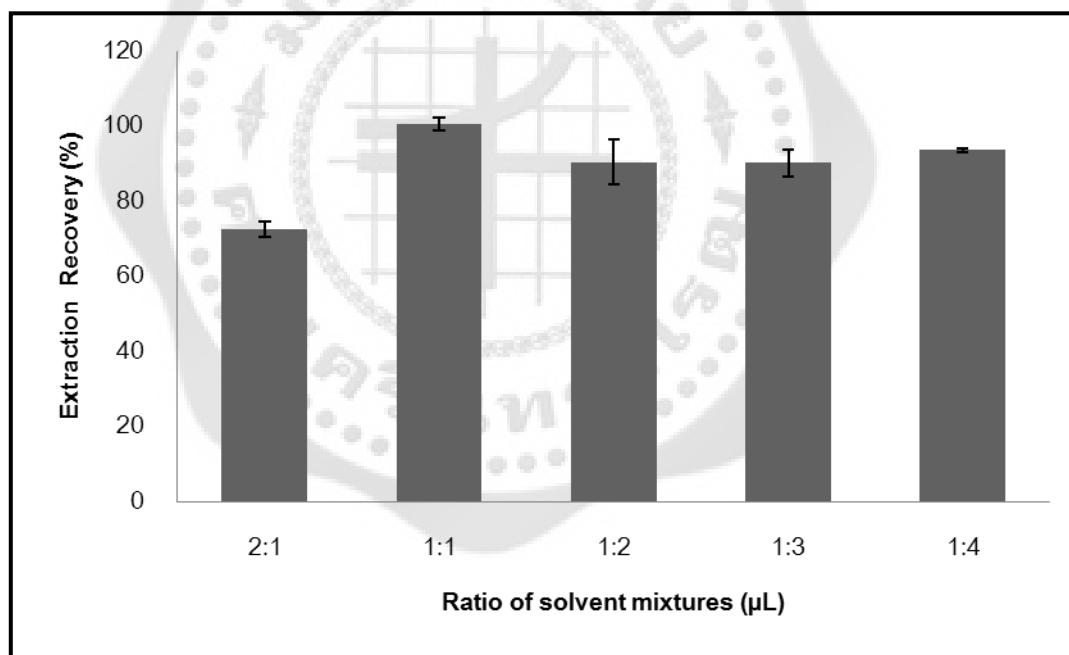
การเลือกชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายจัดเป็นขั้นตอนที่สำคัญของการพัฒนาวิธีการสกัด เนื่องจากตัวแปรดังกล่าวเป็นตัวแปรที่สามารถกำหนดปริมาณสารที่เราสนใจทำการวิเคราะห์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกพิจารณาตัวทำละลายที่ใช้สกัด 5 ชนิด ประกอบด้วย ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ (low density solvent) ได้แก่ เอทิลอะซิเตท 1-บิวทานอล และ เพนทานอล ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความหนาแน่นมากกว่าน้ำ (high density solvent) ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และเลือกพิจารณาตัวทำละลายกระจาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล อะซิโตน และอะซิโตนไนไตรล์ โดยจากภาพประกอบ 5 เป็นการแสดงผลการทดลองการสกัดโดยใช้สารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายในอัตราส่วน 1:1 โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยวิธี DLLME ที่พัฒนาขึ้น พบว่า สารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิด 1-บิวทานอลและตัวทำละลายกระจายชนิดเอทานอลให้ประสิทธิภาพร้อยละการได้กลับคืนดีกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นที่ทำการศึกษา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ตัวทำละลายสกัดชนิด 1-บิวทานอลและตัวทำละลายกระจายชนิดเอทานอลในการสกัดกรดแทนนิก



ภาพประกอบ 5 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและตัวทำละลายกระจายที่ใช้กระจาย

1.2 ผลการศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจาย

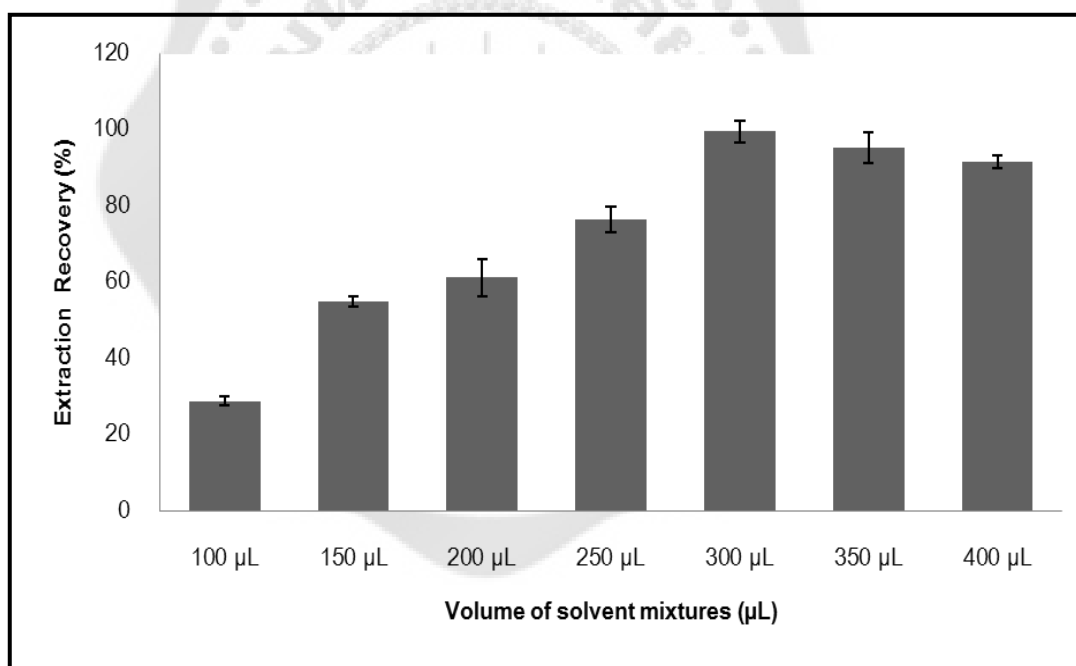
ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายที่ใช้สกัดและตัวทำละลายที่ใช้กระจายที่ใช้ในการสกัดกรดแทนนิก ซึ่งได้ทำการศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่อัตราส่วน 1:0.5 1:1 1:2 1:3 และ 1:4 ตามลำดับ โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยวิธี DLLME ที่พัฒนาขึ้น พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิด 1-บิวทานอล และตัวทำละลายกระจายชนิดเอทานอล คือ อัตราส่วน 1:1 เนื่องจากที่อัตราส่วน 1:1 ให้ประสิทธิภาพร้อยละการได้กลับคืนดีกว่าอัตราส่วนอื่นๆที่ทำการศึกษา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิด 1-บิวทานอลและตัวทำละลายกระจายชนิดเอทานอล ที่อัตราส่วน 1:1 เพื่อใช้ในการสกัดกรดแทนนิก ดังแสดงในภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจาย

1.3 ผลการศึกษาปริมาณของตัวทำละลายผสมที่เหมาะสม

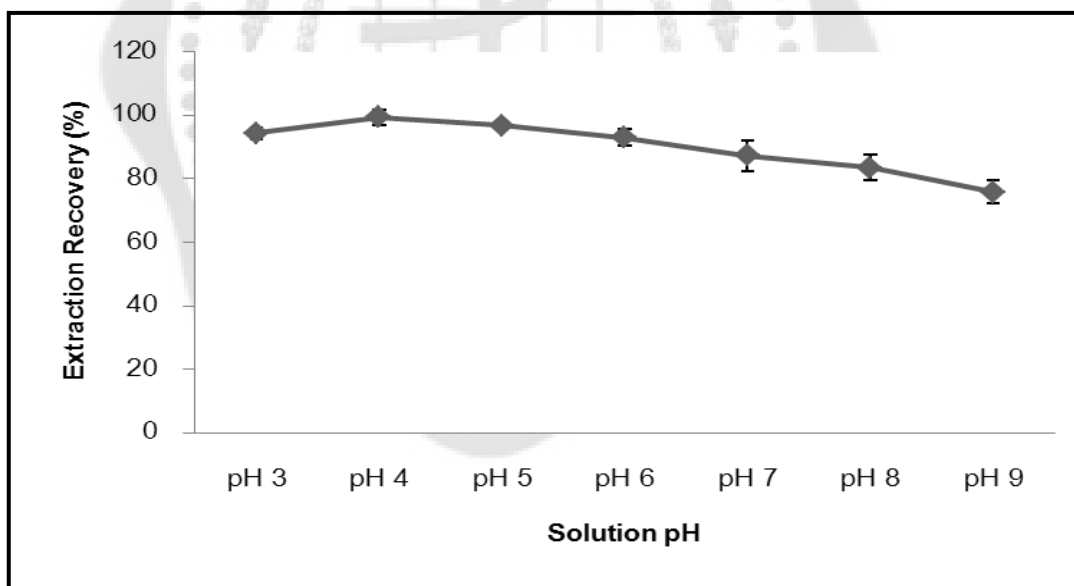
การศึกษาปริมาณของตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิด 1-บิวทานอลและตัวทำละลายกระจายชนิดเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัดกรดแทนนิก โดยทำการศึกษาปริมาณของตัวทำละลายผสม ที่ปริมาตร 100 150 200 250 300 และ 350 ไมโครลิตร ตามลำดับ โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยวิธี DLLME ที่พัฒนาขึ้น จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อปริมาตรของสารละลายผสมเพิ่มขึ้น ค่าร้อยละการกลับคืนจะเพิ่มขึ้นจนถึงที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จะให้ค่าร้อยละการได้กลับคืนสูงสุด แต่เมื่อเพิ่มปริมาตรของสารละลายผสมมากกว่า 300 ไมโครลิตร จะพบว่าค่าร้อยละการได้กลับคืนจะค่อยๆ ลดลง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายผสมของตัวทำละลายสกัดชนิด 1-บิวทานอลและตัวทำละลายกระจายชนิดเอทานอล ที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการสกัดกรดแทนนิก ดังแสดงในภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 ผลการศึกษาปริมาณของตัวทำละลายผสมที่เหมาะสม

1.4 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสม

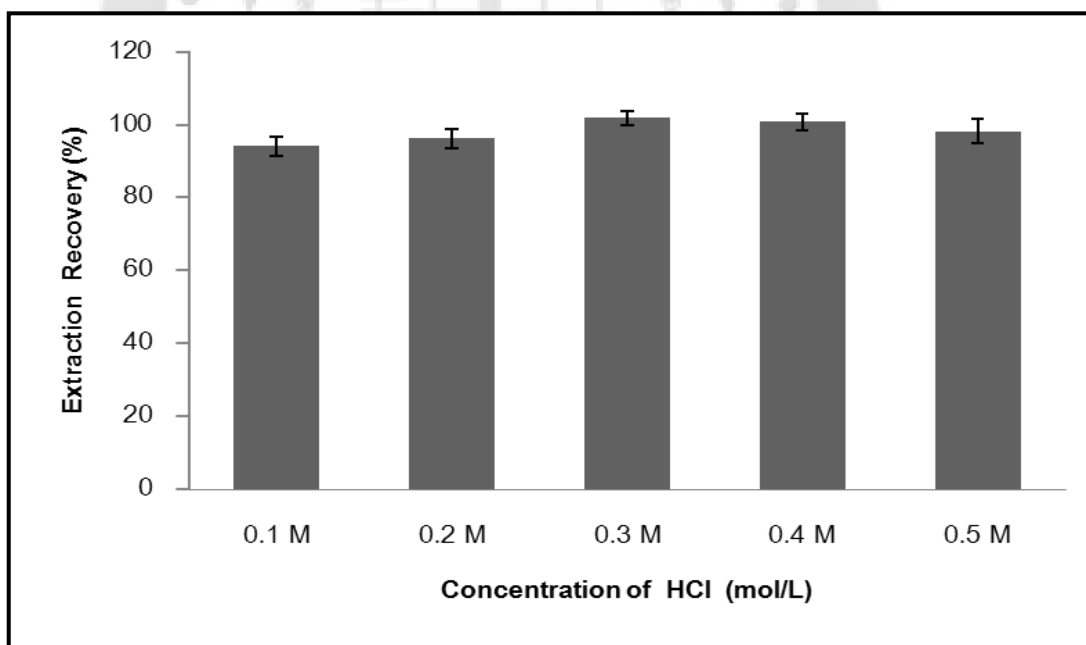
โดยปกติทั่วไปแล้วการปรับค่า pH ในสารละลายตัวอย่างให้เหมาะสมกับ pH ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ซึ่งแสดงให้เห็นถึงบทบาทที่สำคัญของของ pH ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการสกัด โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาค่า pH ของสารละลายที่เหมาะสม ที่ pH 3 4 5 6 7 8 และ 9 ตามลำดับ โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยวิธี DLLME ที่พัฒนาขึ้น จากผลการศึกษาพบว่าค่าร้อยละการคืนกลับจะเพิ่มขึ้นในช่วง pH 3-4 และจะลดลงในช่วง pH 5-9 โดยที่ pH 4 จะให้ค่าร้อยละการคืนกลับสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับค่า pH อื่นๆที่ทำการศึกษา ดังแสดงในภาพประกอบ 8 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ pH 4 เพื่อใช้ในการสกัดกรดแทนนิก ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jianwei และคณะ โดยที่ pH 4 ให้ประสิทธิภาพร้อยละการคืนกลับดีที่สุดเนื่องจาก ที่ pH 4 กรดแทนนิกจะอยู่ในรูปที่ไม่สามารถแตกตัวได้ (neutral form) จึงส่งผลให้สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่ชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ได้เป็นอย่างดี (Jianwei ; et al. 2011: 102-111)



ภาพประกอบ 8 ผลการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม

1.5 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรคลอริกที่เหมาะสม

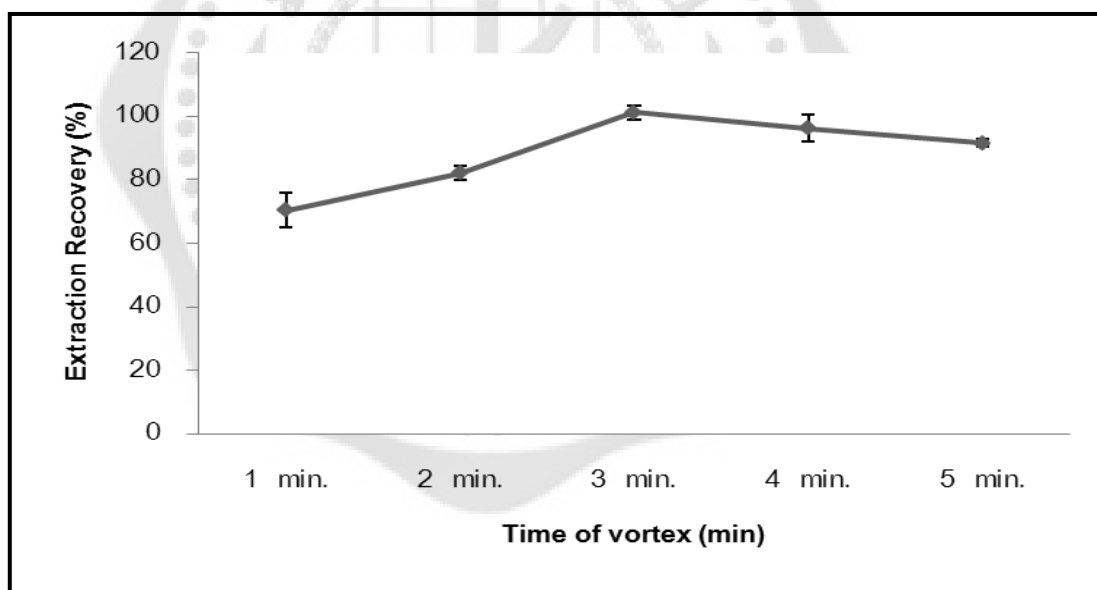
จากการศึกษาหาค่า pH ที่เหมาะสมโดยการใช้สารละลายไฮโดรคลอริกเป็นตัวควบคุม pH เนื่องจากต้องปรับสภาวะของสารละลายตัวอย่างให้อยู่ในรูปของสารละลายที่มีคุณสมบัติเป็นกรด (acidic solution sample) ส่งผลให้สารที่ต้องการวิเคราะห์อยู่ในรูปที่ไม่สามารถแตกตัวได้และสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่ชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรคลอริกที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยวิธี DLLME ที่พัฒนาขึ้น จากผลการศึกษาพบว่าค่าร้อยละการคืนกลับจะเพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้น 0.1-0.3 โมลาร์ และจะลดลงในช่วง 0.4-0.5 โมลาร์ โดยความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรคลอริกเท่ากับ 0.3 โมลาร์ จะให้ค่าร้อยละการคืนกลับสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ ที่ทำการศึกษา ดังแสดงในภาพประกอบ 9 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรคลอริกเท่ากับ 0.3 โมลาร์ เพื่อใช้ในการสกัดกรดแทนนิก



ภาพประกอบ 9 ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรคลอริกที่เหมาะสม

1.6 ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการผสมสารที่เหมาะสม

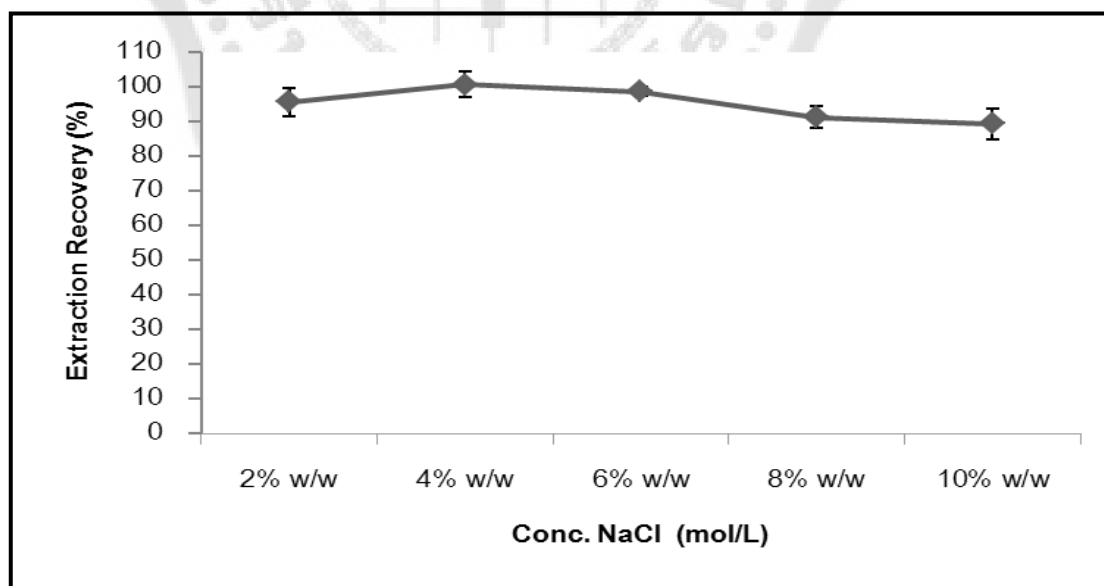
การทำการศึกษเวลาที่ใช้ในการผสมสารที่เหมาะสม เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการผสมสาร เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อกระบวนการสกัด เพราะการผสมสารจะทำให้สารละลายตัวอย่างภายในระบบที่ละลายอยู่ในชั้นน้ำเกิดการสัมผัสกับชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์และเกิดการถ่ายโอนมวล โดยหากมีระยะเวลาในการเขย่าที่เหมาะสมจะส่งผลให้สารที่ต้องการวิเคราะห์สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่ชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาระยะเวลาในการผสมสาร ที่เวลา 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 นาที ตามลำดับ โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยวิธี DLLME ที่พัฒนาขึ้น จากผลการศึกษาพบว่าค่าร้อยละการคืนกลับจะเพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 1.0-3.0 นาทีและจะลดลงในช่วงเวลา 4.0-5.0 นาที โดยที่เวลา 3.0 นาที จะให้ค่าร้อยละการกลับคืนสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาอื่นๆที่ทำการศึกษา ดังแสดงในภาพประกอบ 10 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกเวลาในการเขย่า ที่เวลา 3.0 นาที



ภาพประกอบ 10 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการผสมสารด้วยเครื่อง vortex ที่เหมาะสม

1.7 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม

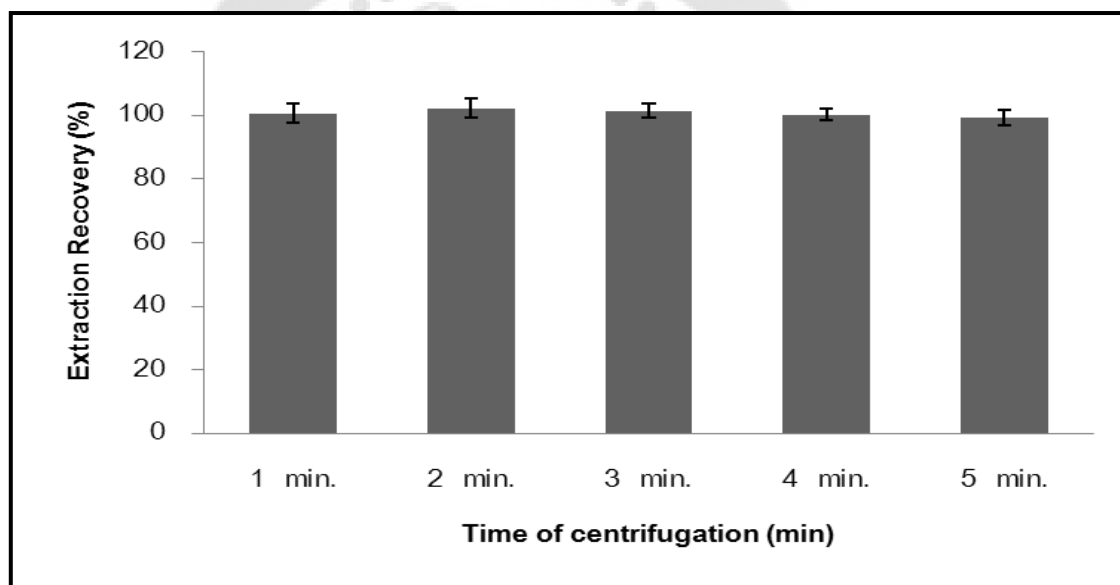
การเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ลงในสารละลายตัวอย่าง โดยทั่วไปแล้วจะเติมลงไปเพื่อเป็นการลดการละลายของสารประกอบอินทรีย์ ที่ละลายอยู่ในชั้นน้ำที่เรียกว่า salting out effect ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายโดยถูกนำมาใช้เพื่อเป็นการเพิ่มค่าร้อยละการคืนกลับของสารที่ต้องการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังเป็นการป้องกันการเกิดสภาวะอิมัลชันโดยการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ลงในสารละลายตัวอย่างจะช่วยเพิ่มความหนาแน่นของน้ำและเปลี่ยนแปลงความแรงไอออนิก (ionic strength) ทำให้สามารถสังเกตเห็นการแยกชั้นของของเหลวได้อย่างชัดเจน ส่งผลให้สามารถทำการสกัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 4 6 8 และ 10 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยวิธี DLLME ที่พัฒนาขึ้น จากผลการศึกษาพบว่าค่าร้อยละการคืนกลับจะเพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 2-4 และจะลดลงในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 8-10 โดยที่ความเข้มข้นร้อยละ 4-6 จะให้ค่าร้อยละการคืนกลับที่สูงและมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน (ดังแสดงในภาพประกอบ 11) ดังนั้นเพื่อความรวดเร็วในการวิเคราะห์ จึงเลือกความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก



ภาพประกอบ 11 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม

1.8 ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยงที่เหมาะสม

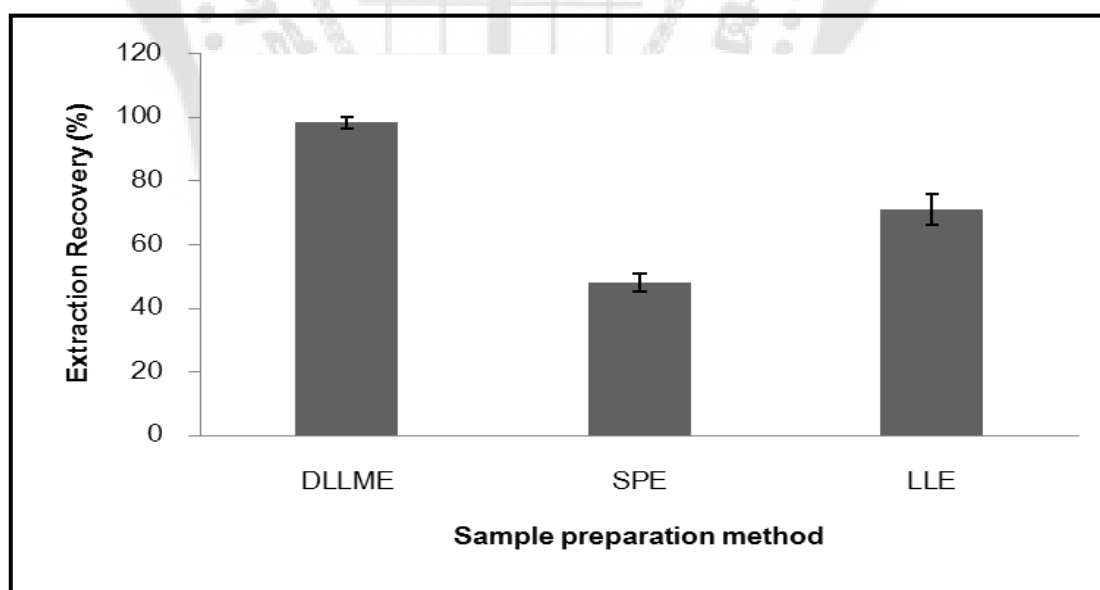
การหมุนเหวี่ยงเป็นปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการสกัดอีกปัจจัยหนึ่ง ถ้าเวลาที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยงไม่เพียงพอจะส่งผลให้สารที่ต้องการทำการวิเคราะห์ไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่ชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเวลาที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยงที่เวลา 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 นาที ตามลำดับ โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยวิธี DLLME ที่พัฒนาขึ้น จากผลการศึกษาพบว่า การหมุนเหวี่ยงที่เวลา 1.00-5.00 นาที นั้นให้ค่าร้อยละการกลับคืนที่สูงและมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน (ดังแสดงในภาพประกอบ 12) ดังนั้นเพื่อความรวดเร็วในการวิเคราะห์ จึงเลือกเวลาที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยงที่เวลา 2.0 นาที



ภาพประกอบ 12 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยงที่เหมาะสม

ตอนที่ 2 การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็งและวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว

ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ทางเคมีส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เนื่องจากสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ส่วนใหญ่เป็นสารผสม โดยที่สารที่ผสมอยู่ในตัวอย่างอาจรบกวนการวิเคราะห์ได้ ดังนั้นก่อนนำสารตัวอย่างไปวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ควรทำสารตัวอย่างให้บริสุทธิ์ก่อนโดยการแยกหรือกำจัดสิ่งปนเปื้อนออกจากสารตัวอย่าง ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้น ซึ่งวิธีการเตรียมตัวอย่างที่งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาประกอบด้วย 3 วิธีที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในการแยกสาร ได้แก่ วิธีการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่พัฒนาขึ้น กับวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว และวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง แสดงผลการวิเคราะห์ดังภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 13 ผลการเปรียบเทียบเทคนิคในการสกัดกรดแทนนิก

จากการศึกษาพบว่าวิธีการสกัดวิธีการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว ที่พัฒนาขึ้นให้ค่าร้อยละการกลับคืนที่สูงสุดเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว และวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง ตามลำดับ เนื่องจากวิธีวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลวเป็นวิธีที่มีข้อด้อย กล่าวคือการสกัดสารด้วยวิธีดังกล่าวไม่สามารถทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์เคลื่อนที่เข้าสู่ชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจากไม่มี ตัวทำละลายที่ช่วยในการกระจายตัว อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดในปริมาณมาก จึงทำให้ได้ค่าร้อยละการกลับคืนน้อย เช่นเดียวกับวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งที่ความแรงของตัวทำละลายที่ใช้ในการชะไม่มากพอที่จะชะสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากพื้นผิวของวัฏภาคของแข็ง ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดระดับ ไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว ขึ้นมาเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้น โดยผลการวิจัยนั้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liang และคณะ ที่ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่าง พบว่าการใช้วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) ให้ค่าประสิทธิภาพการสกัดที่สูงกว่าวิธีการสกัดแบบวัฏภาคของเหลวและวิธีการสกัดแบบวัฏภาคของแข็ง (Liang; et al. 2013: 24-30)

ตอนที่ 3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

กระบวนการวิเคราะห์ปริมาณสารโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เป็นกระบวนการที่ประกอบด้วย การแยกโมเลกุลของสารละลายตัวอย่างโดยวัฏภาคเคลื่อนที่ และวัฏภาคหนึ่งซึ่งวัฏภาคหนึ่งจะถูกบรรจุไว้ในคอลัมน์ ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคหนึ่งโดยอาศัยปั๊มเป็นตัวขับเคลื่อน โมเลกุลของสารละลายตัวอย่างที่ประกอบด้วยสององค์ประกอบจะมีการเคลื่อนที่ต่างกันในวัฏภาคหนึ่ง โมเลกุลของสารที่ยึดติดกับวัฏภาคหนึ่งอย่างแน่นจะเคลื่อนตัวไปกับการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ช้า ในขณะที่โมเลกุลของสารอื่นที่ยึดกับวัฏภาคหนึ่งอย่างหลวมๆก็จะเคลื่อนตัวได้เร็วกว่า กล่าวคือจะมีความแตกต่างกันในการเคลื่อนที่ของสารต่างๆจึงทำให้เกิดการแยกออกเป็นแถบ ซึ่งทำให้สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและในเชิงปริมาณได้

ในการศึกษาทางโครมาโทกราฟีจะมีความเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของคอลัมน์ซึ่งแสดงในเทอมของ H (Height equivalent to a theoretical plate) หรือที่เรียกว่า ทฤษฎีเพลต (plate theory) โดยทฤษฎีเพลต ได้อธิบายไว้ว่าอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับความ

สูงของเพลต ถ้ามีจำนวนเพลตที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์มากประสิทธิภาพการแยกก็จะได้ ซึ่งจำนวนเพลตจะแปรผันตรงกับความยาวของคอลัมน์ โดยทฤษฎีดังกล่าวนี้ไม่สามารถอธิบายได้ครอบคลุม ดังนั้นจึงต้องอาศัยทฤษฎีอัตรา (rate theory) ที่สามารถอธิบายพฤติกรรมทางโครมาโทกราฟีได้อย่างครอบคลุมมากกว่า ซึ่งสามารถอธิบายเกี่ยวกับการเกิดแบนด์กว้างในกระบวนการชะสารได้ โดยในกระบวนการชะสารนั้นจะมีกลไกของการเกิดการแพร่กระจาย ได้แก่ การแพร่กระจายแบบเอ็ดดี้ (eddy diffusion) การแพร่กระจายแบบลองจิจูดินอล (longitudinal diffusion) และการเคลื่อนมวลโดยการส่งผ่าน (mass transfer effect) ซึ่งกลไกดังกล่าวจะอธิบายผลของ ตัวแปรทั้ง 3 ออกเป็นเทอมต่างๆ ทั้งสิ้น 3 เทอม ที่มีความสัมพันธ์กับค่า H ตามสมการของ Van Deemter ในสมการที่ 4

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C \cdot \mu \quad \dots\dots\dots (4)$$

H = HETP

A = eddy diffusion

B = longitudinal diffusion

C = mass transfer effect

μ = linear velocity

จากสมการ Van Deemter จะเห็นว่า ถ้าอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (μ) มีค่าน้อย จะทำให้เทอม B มีค่ามาก ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการแยกต่ำ เพราะตัวถูกละลายแพร่กระจายอยู่ในคอลัมน์ได้นานมากขึ้น ดังนั้นจึงควรเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ให้มากขึ้น เพื่อลดเทอม B แต่ในทางกลับกันถ้าอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (μ) มีค่ามากขึ้น จะทำให้เทอม C มากขึ้นด้วย เนื่องจากตัวถูกละลายมีการแพร่ยังไม่ถึงสมดุลระหว่างเฟสอยู่กับที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้ H มากตาม ประสิทธิภาพการแยกลดลง ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (μ) และประสิทธิภาพของคอลัมน์ (H) ในทางโครมาโทกราฟี จะทำให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ เมทานอล

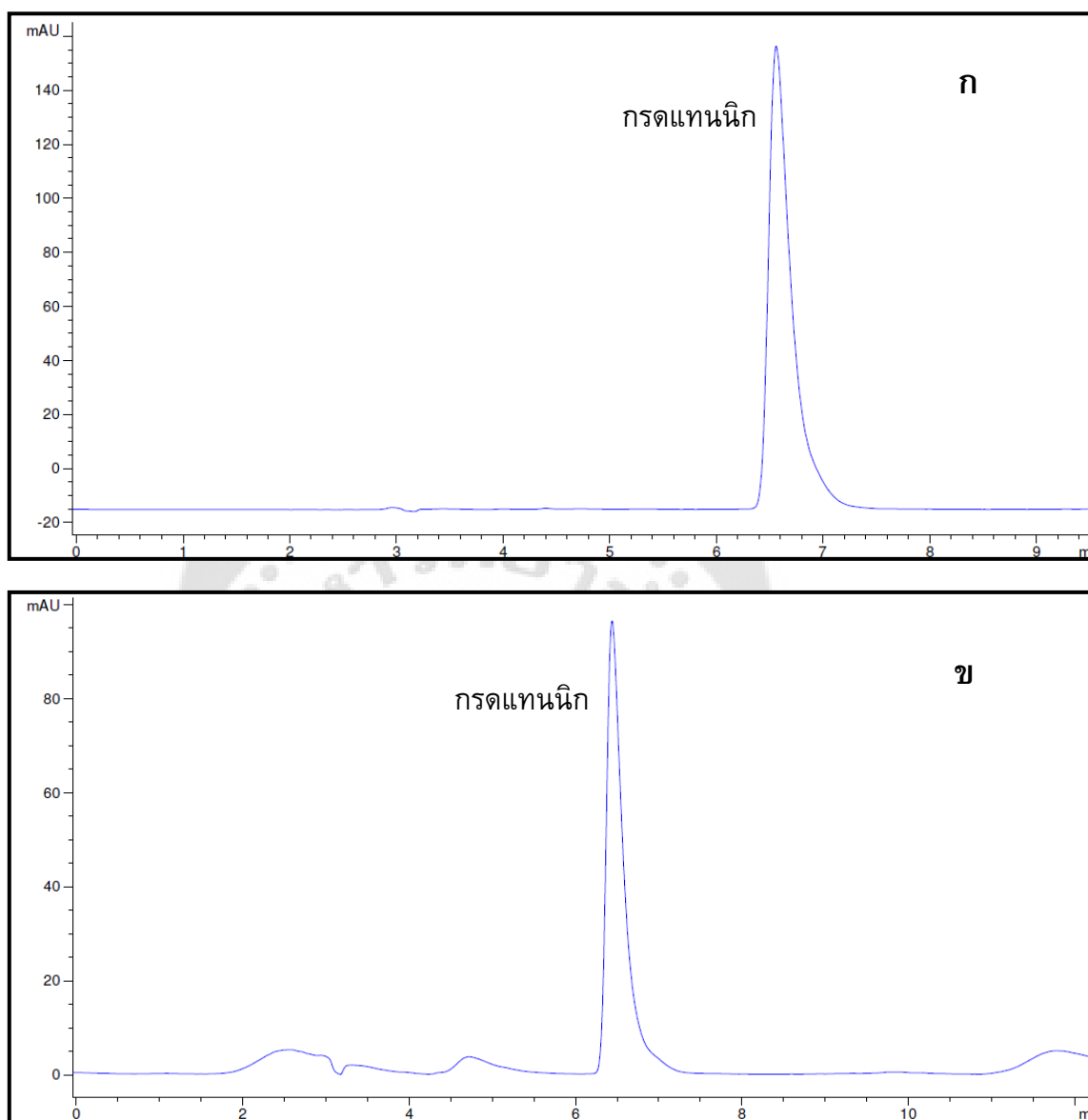
และอะซิโตนไไตรล์ อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่และอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อการแยกกรดแทนนิก

3.1 ผลการศึกษาชนิด และองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

3.1.1 ผลการศึกษาชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่

สิ่งสำคัญที่จะทำให้เกิดการแยกของสาร คือ การเลือกชนิดของตัวทำละลายที่นำมาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ให้มีความเฉพาะต่อระบบ ดังนั้นชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่จึงเป็นตัวแปรที่มีความสำคัญมากในการกระบวนการแยกสารในเทคนิคทางด้านโครมาโทกราฟี ส่งผลต่อความสามารถในการแยก และรูปร่างของของพีกในโครมาโทแกรม ซึ่งพบว่าการใช้ชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ต่างกัน ส่งผลทำให้ระยะเวลาที่เเทนชัน (retention time) ลักษณะของพีก เช่น ความกว้าง และความแคบของสัญญาณต่างกัน ดังนั้นการศึกษาผลของชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่จึงมีความสำคัญต่อระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษานิตของวัฏภาคเคลื่อนที่ 2 สภาวะ ดังนี้ สภาวะที่ 1 การศึกษาการแยกกรดแทนนิกโดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1% โดยปริมาตร และเมทานอล (Gupta; et al. 2012: 162-167) และสภาวะที่ 2 โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1% โดยปริมาตร และอะซิโตนไไตรล์ ที่อัตราส่วน 85:15 (v/v) ที่ความเข้มข้นของกรดแทนนิกเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Jittawan; et al. 2008: 881-890) จากผลการศึกษาพบว่าชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่นั้นส่งผลต่อระยะเวลาที่เเทนชัน ลักษณะของพีกที่เกิดขึ้นในโครมาโทแกรมอย่างชัดเจน โดยพบว่าการใช้สภาวะสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1% โดยปริมาตร ต่ออะซิโตนไไตรล์ ใช้ระยะเวลาในการกระบวนการแยกน้อยกว่าสภาวะที่ 1 โดยสามารถแยกกรดแทนนิก ที่ระยะเวลาที่เเทนชันเท่ากับ 6.50 นาที แต่สภาวะดังกล่าวนี้มีสัญญาณของสารรบกวนเกิดขึ้นในโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก ซึ่งในสภาวะสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1% โดยปริมาตร ต่อเมทานอล ที่อัตราส่วน 85:15 (v/v) นั้นใช้ระยะเวลาในการกระบวนการแยกกรดแทนนิก ที่ระยะเวลาที่เเทนชันเท่ากับ 6.6 นาที ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้สภาวะที่ 1 ใช้ระยะเวลาในการแยกนานกว่าสภาวะที่ 2 ไม่มากนัก และสภาวะดังกล่าวนี้ไม่ปรากฏสัญญาณของสารรบกวนที่เกิดขึ้นในโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก และให้สัญญาณในการตรวจวิเคราะห์สูงกว่าสภาวะที่ 2 ตลอดจนสามารถแยกพีกของกรดแทนนิกได้อย่างชัดเจน ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดแทนนิก คือ สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1% โดยปริมาตร ต่อเมทานอล ที่อัตราส่วน 85:15 (v/v) แสดงดังภาพประกอบ 14



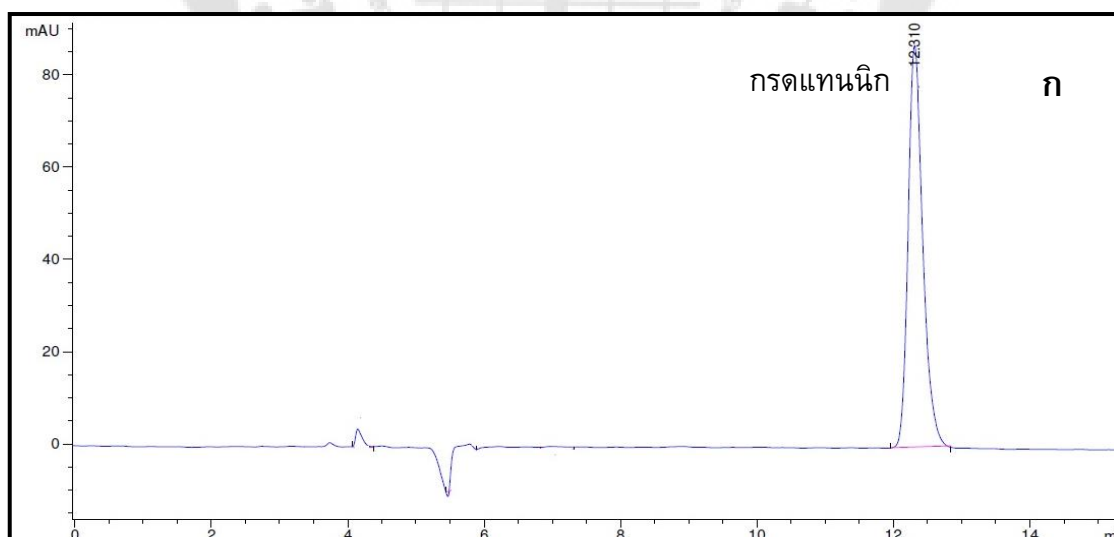
ภาพประกอบ 14 โครมาโทแกรมจากผลการศึกษานิตของวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ ปริมาณกรดแทนนิก

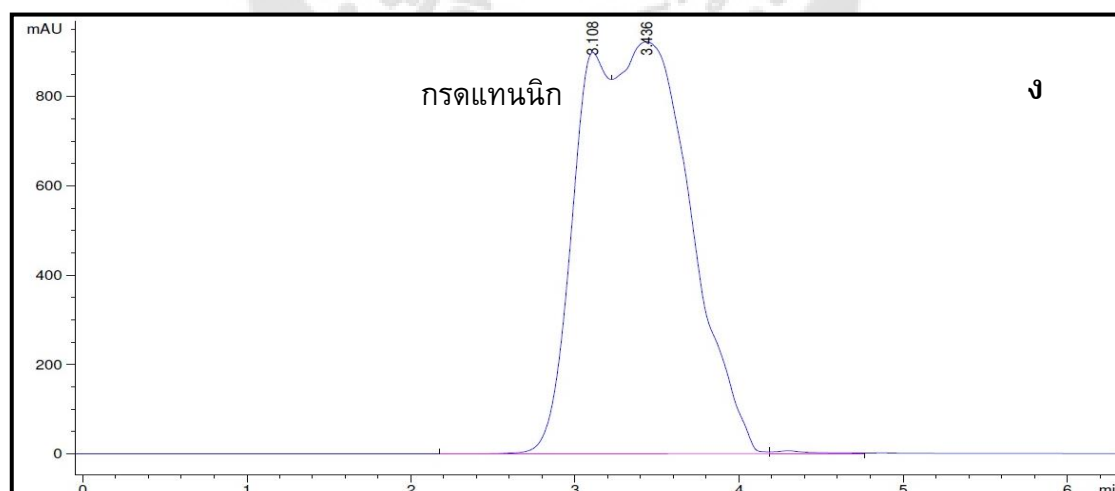
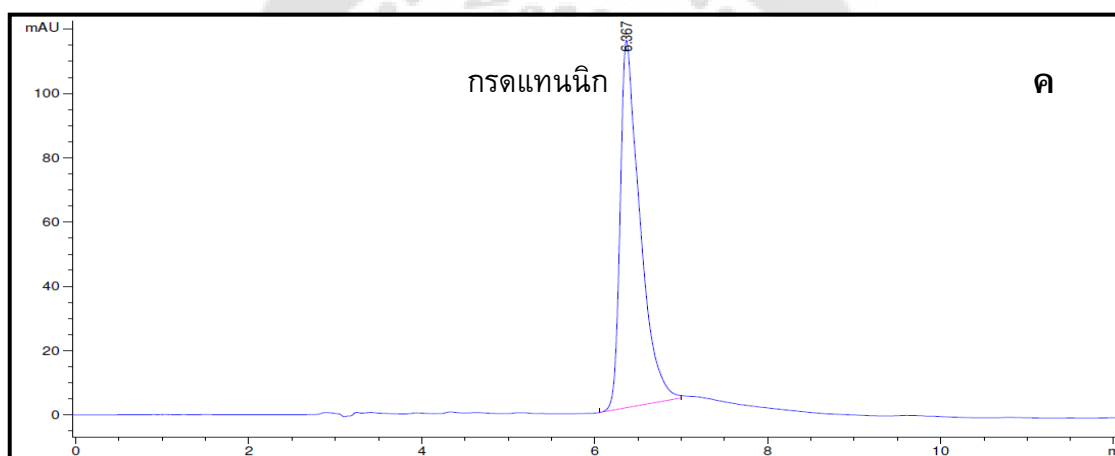
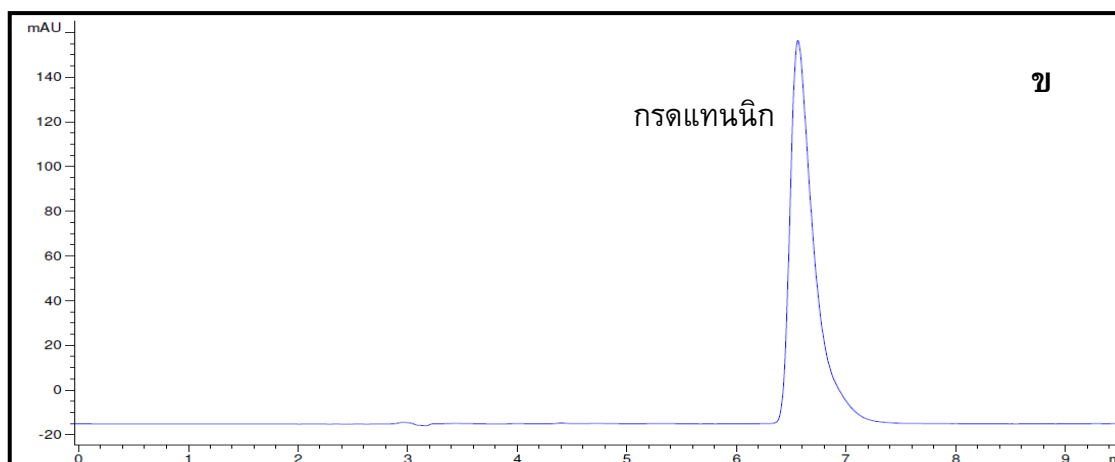
ก แทน สารละลายกรดอะซิดิกเข้มข้นร้อยละ 1% โดยปริมาตร ต่อเมทานอล อัตราส่วน 85:15

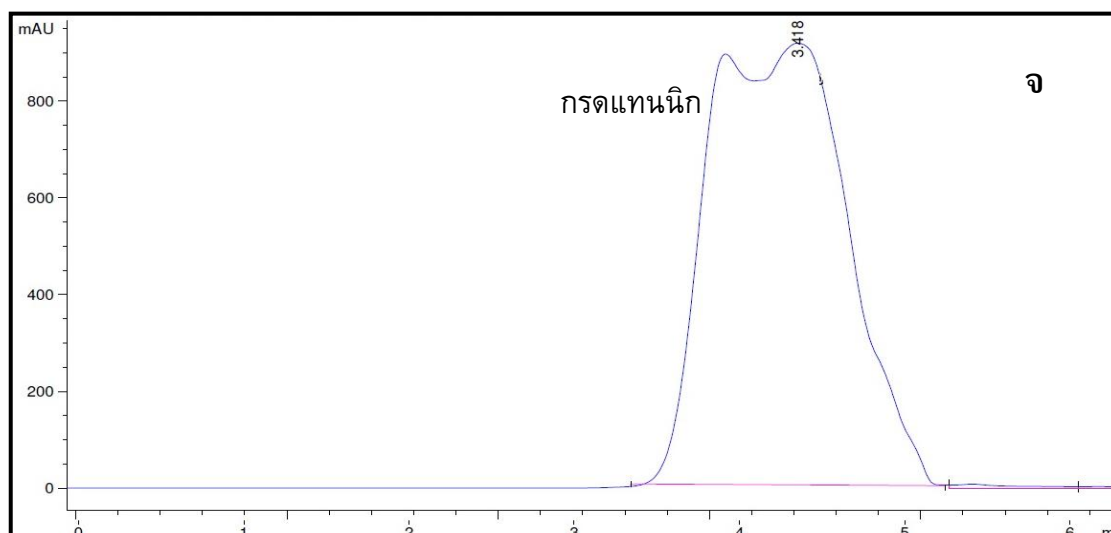
ข แทน สารละลายกรดอะซิดิกเข้มข้นร้อยละ 1% โดยปริมาตร ต่ออะซิโตนไนโตรล อัตราส่วน 85:15

3.1.2 ผลการศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

การศึกษาการแยกกรดแทนนิกโดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และเมทานอล ที่อัตราส่วน 90:10 85:15 80:20 60:40 และ 65:35 (v/v) ที่ความเข้มข้นของกรดแทนนิกเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผลจากการศึกษาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1% โดยปริมาตร และเมทานอล ที่อัตราส่วนดังกล่าวพบว่าให้ผลการทดลองดังแสดงในภาพประกอบ 15 และพบว่าที่อัตราส่วน 85:15 ให้พีคที่มีความสมมาตร เกิดการแยกได้ดี โดยกรดแทนนิกจะถูกหน่วงในคอลัมน์ไม่นาน และใช้เวลาในการแยก 6.6 นาที และเมื่อเปลี่ยนอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1% โดยปริมาตร และเมทานอล เป็น 90:10 80:20 85:15 65:35 และ 60:40 (v/v) พบว่าพีคที่ได้มีลักษณะเป็นแถบกว้าง ดังนั้นจึงเลือกใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1% โดยปริมาตร และเมทานอล ที่อัตราส่วน 85:15 ดังทฤษฎีที่เมื่อการแพร่กระจายถึงจุดสมดุลระหว่างเฟสทั้งสอง คือเฟสที่อยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ทำให้มีประสิทธิภาพการแยกที่ดี







ภาพประกอบ 15 โครมาโทแกรมจากผลการศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก

ก แทน องค์ประกอบของสารละลายกรดอะซิติก ต่อเมทานอล 90:10 (v/v)

ข แทน องค์ประกอบของสารละลายกรดอะซิติก ต่อเมทานอล 85:15 (v/v)

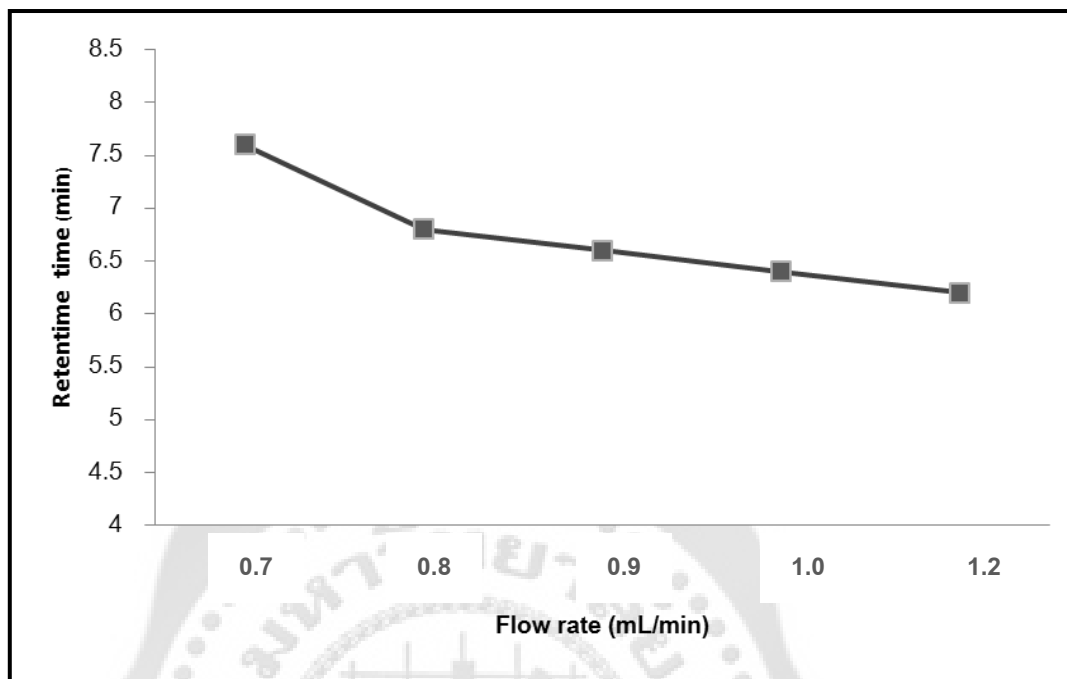
ค แทน องค์ประกอบของสารละลายกรดอะซิติก ต่อเมทานอล 80:20 (v/v)

ง แทน องค์ประกอบของสารละลายกรดอะซิติก ต่อเมทานอล 65:35 (v/v)

จ แทน องค์ประกอบของสารละลายกรดอะซิติก ต่อเมทานอล 60:40 (v/v)

3.2 ผลการศึกษาผลของอัตราการใช้ของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาหาอัตราการใช้ของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่ 0.7 0.8 0.9 1.0 และ 1.20 มิลลิลิตรต่อนาที โดยพิจารณาจากระยะเวลารีเทนชันของกรดแทนนิก ดังแสดงในภาพประกอบ 16



ภาพประกอบ 16 ผลของระยะเวลาที่เทรนชันต่ออัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่มีผลต่อระยะเวลาที่เทรนชันของสาร เนื่องจากการเพิ่มอัตราการไหลจะทำให้สารถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น ทำให้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ลดลง โดยทำการทดลองด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1% โดยปริมาตร และเมทานอล ที่อัตราส่วน 85:15 (v/v) โดยใช้ อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 0.7 mL/min พบว่าสารถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ระยะเวลา 7.6 นาที จากนั้นเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 0.8 0.9 1.0 และ 1.2 mL/min พบว่าสารถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ระยะเวลา 6.8 6.6 6.4 และ 6.2 นาที ตามลำดับ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.9 mL/min เพราะเป็นอัตราการไหลที่มีความเหมาะสมต่อการแยกและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสาร และเนื่องจากที่อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.8 และ 0.7 mL/min นั้นใช้เวลาของการถูกชะของสารออกจากคอลัมน์นานกว่าการใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.9 mL/min และการใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มากกว่า 0.9 mL/min นั้นอาจมีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณ ซึ่งในตัวอย่างนั้นอาจจะมีสารรบกวนการวิเคราะห์ เช่น สารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่นๆ ปะปนและอาจทำให้เกิดการซ้อนทับระหว่างพีคของกรดแทนนิกกับสารรบกวนอื่นๆอีกด้วย

จากการศึกษาการแยกกรดแทนนิกด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (v/v) และตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ เมทานอล และอะซิโตนไตรัล อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่และอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อการแยกกรดแทนนิก ซึ่งพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกกรดแทนนิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สามารถสรุปได้ตารางที่ 2

ตาราง 2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกกรดแทนนิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

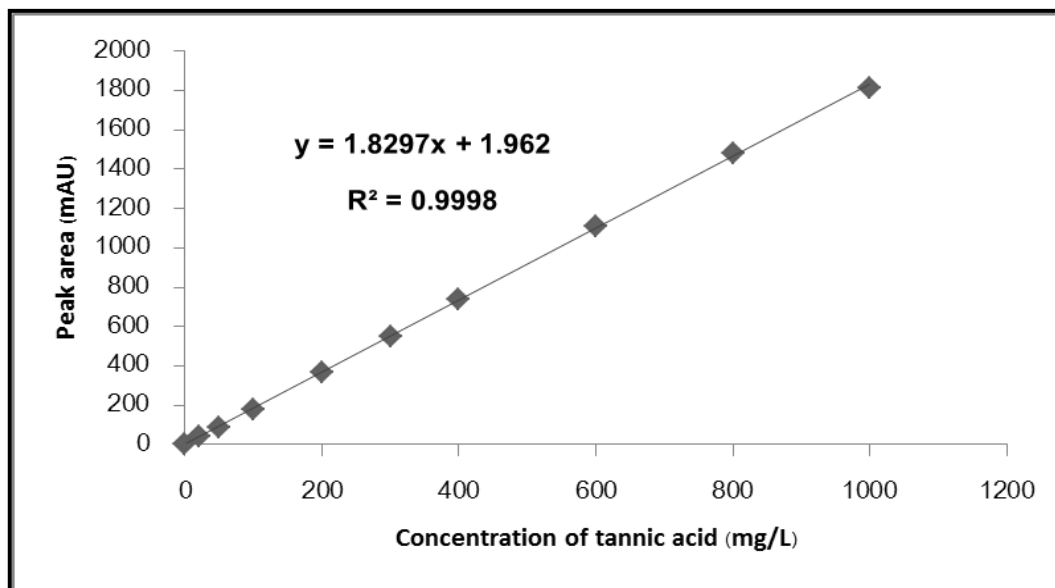
ตัวแปร	สภาวะที่ใช้ในการทดลอง
ระบบการแยก	ไอโซเครติก
คอลัมน์	C ₁₈ ขนาด 5 ไมครอน (250 mm x 4.6 mm)
วัฏภาคเคลื่อนที่	1%กรดอะซิติก ต่อ เมทานอล
อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่	85:15 ปริมาตร / ปริมาตร
อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่	0.9 มิลลิลิตร ต่อ นาที
เครื่องตรวจจับ	ไดโอดอาร์เรย์
ความยาวคลื่น	280 นาโนเมตร

ตอนที่ 4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกที่พัฒนาขึ้น

4.1 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์

การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์โดยการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก(แกนนอน) กับ พื้นที่พีค (แกนตั้ง) เพื่อบอกความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลการวิเคราะห์เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดแทนนิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สามารถนำสภาวะดังกล่าวนั้นมาใช้วิเคราะห์เพื่อหาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิดโดยการคำนวณหาปริมาณกรดแทนนิกจากสมการเส้นตรง $y = 1.8297x + 1.962$ ดังแสดงในภาพที่ 17 ในการวิเคราะห์ปริมาณในสารตัวอย่างจะนิยมใช้

วิธีเทียบกับกราฟมาตรฐานเพราะมีความสะดวกและให้ความถูกต้อง ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกที่ความเข้มข้น 0 – 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากกราฟเส้นตรงพบว่าให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9998 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 ทำให้สามารถสรุปได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ



ภาพประกอบ 17 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีค (mAU/s) กับความเข้มข้นของกรดแทนนิก (mg/mL)

4.2 ผลการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

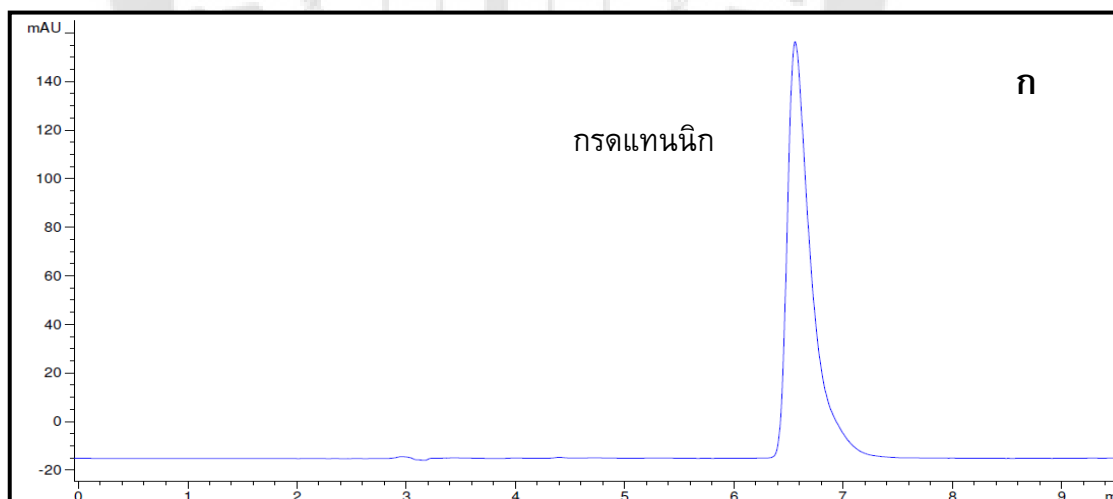
ผลการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ทำโดยเตรียมสารมาตรฐานกรดแทนนิกเข้มข้น 0.10 - 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นวัดค่าด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ ($n=10$) แล้วคำนวณหาค่า LOD โดยค่า LOD ให้สัญญาณเป็น 3 เท่าของสัญญาณ noise (S/N) พบว่า ให้ค่า LOD เท่ากับ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

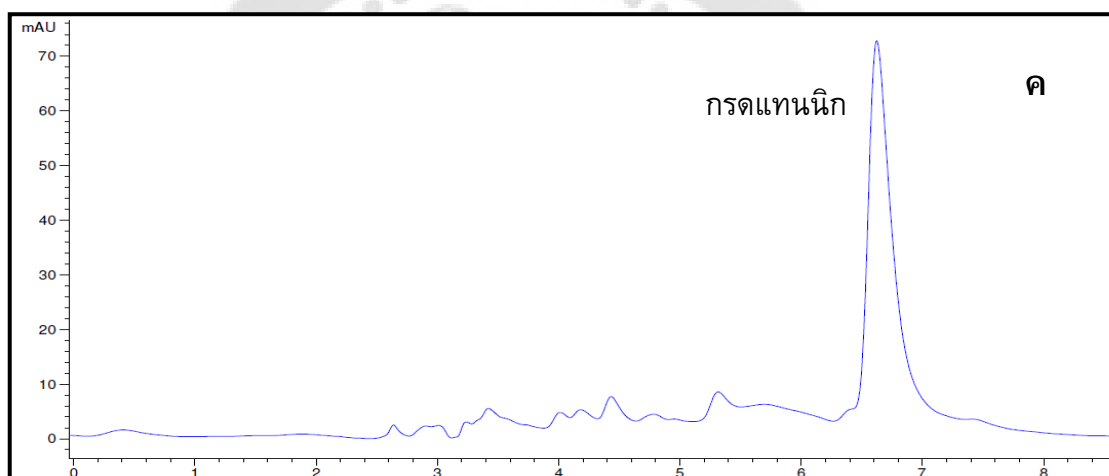
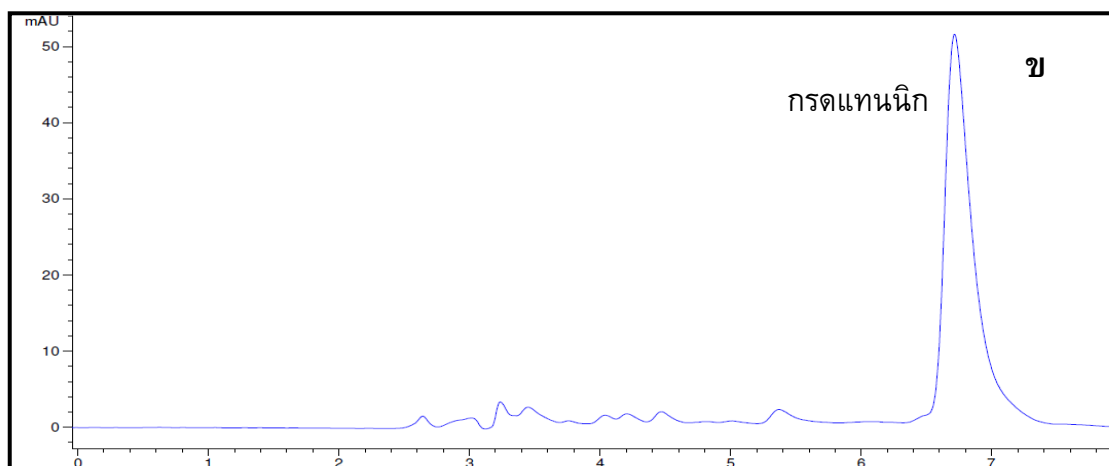
4.3 ผลการศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ผลการศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) ทำโดยเตรียมสารมาตรฐานกรดแทนนิกเข้มข้น 0.10 - 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นวัดค่าด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ (n=10) แล้วคำนวณหาค่า LOQ โดยค่า LOQ ให้สัญญาณเป็น 10 เท่าของสัญญาณ noise (S/N) พบว่า ให้ค่า LOQ เท่ากับ 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.4 ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy)

ความถูกต้อง (accuracy) หมายถึง ความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่วัดในสารตัวอย่าง ได้ออกมาตรงกับหรือใกล้เคียงค่าที่แท้จริงมากที่สุด จะรายงานเป็นค่าร้อยละการคืนกลับ (percentage recovery) ซึ่งการคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับคืนทำการทดสอบโดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแทนนิกที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนลงไปในตัวอย่าง เพื่อดูค่าคืนกลับของสารมาตรฐานนั้นๆ แสดงดังภาพประกอบ 18 ซึ่งจากการทดลองพบว่าค่าร้อยละการคืนกลับเฉลี่ยของกรดแทนนิกอยู่ในช่วง 92.40 ± 5.92 ถึง 100.16 ± 4.62 ซึ่งสอดคล้องกับ AOAC, 2002 ซึ่งให้ค่าร้อยละการคืนกลับคืนอยู่ในช่วง 80-115





ภาพประกอบ 18 แสดงโครมาโทแกรม ดังนี้

ก แทน โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก

ข แทนโครมาโทแกรมของตัวอย่างใบหูกวาง ที่ผ่านการสกัดตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)

ค แทนโครมาโทแกรมของตัวอย่างใบหูกวาง ที่เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกลงไป และผ่านการสกัดตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)

4.5 ผลการศึกษาความเที่ยงยำของวิธีการวิเคราะห์ (precision)

การตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยการศึกษาความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (intra-day precision) และความแม่นยำระหว่างวัน (inter-day precision) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองโดยนำสารละลายตัวอย่างใบหูกวางมา 1.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วทำการทดลองตามสภาวะที่เหมาะสม โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ ($n=10$) จากนั้นคำนวณหาค่า %RSD (% relative standard deviation) จากการศึกษาความแม่นยำภายในวันเดียวกัน และความแม่นยำระหว่างวัน ในตัวอย่างใบหูกวางพบว่าให้ค่า %RSD เท่ากับ 1.40 ± 0.30 และ 2.30 ± 0.59 ตามลำดับ

ตอนที่ 5 ผลการศึกษาผลของสารรบกวนในตัวอย่าง

5.1 ผลการศึกษาผลของการรบกวนจากสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น ๆ

จากการศึกษาผลของสารรบกวนจากสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่นๆ ได้แก่ กรดแกลลิก กรดเฟอรูลิก คาเทชิน ซึ่งทำการทดลองโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5

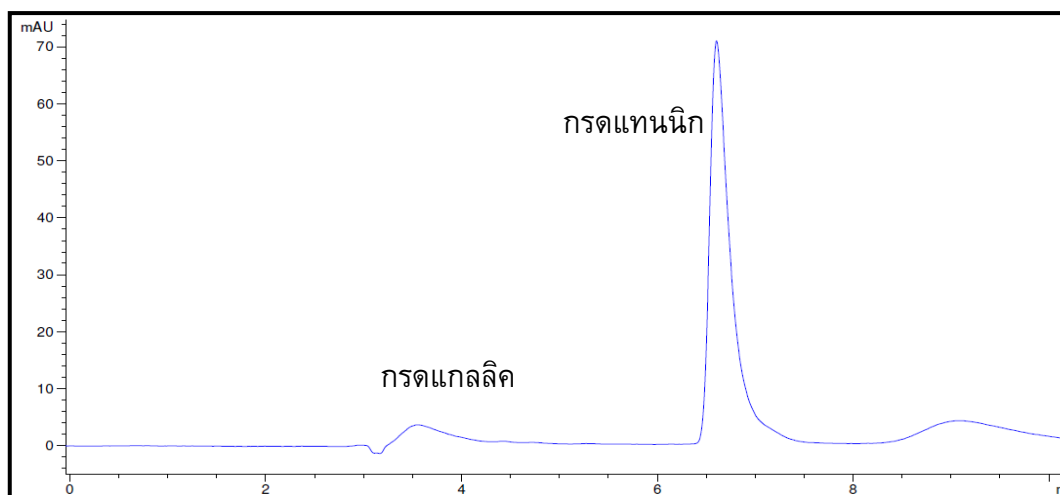
5.2 ผลการศึกษาผลของการรบกวนจากกรดอินทรีย์

จากการศึกษาผลของสารรบกวนจากกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก และกรดซิตริก ซึ่งทำการทดลองโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยให้ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ระยะเวลารีเทนชันของพีคโครมาแกรมของกรดแทนนิก กรดแกลลิก กรดเฟอร์รูริก คาเทชิน กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก และกรดซิตริก

ชนิดของสารรบกวน	สารรบกวน	เวลารีเทนชัน (นาที)
สารประกอบฟีนอลิก	กรดแกลลิก	3.550
กรดอินทรีย์	กรดเฟอร์รูริก	ไม่พบ
	คาเทชิน	ไม่พบ
	กรดทาร์ทาริก	ไม่พบ
	กรดมาลิก	ไม่พบ
สารที่วิเคราะห์	กรดซิตริก	ไม่พบ
	กรดแทนนิก	6.605

จากตาราง 3 จะเห็นว่าพีคโครมาแกรมของกรดแกลลิก กรดเฟอร์รูริก คาเทชิน กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก และกรดซิตริก ให้ระยะเวลารีเทนชันที่ต่างจากพีคโครมาแกรมของกรดแทนนิก ซึ่งแสดงให้เห็นชัดเจนว่าสารรบกวนเหล่านี้ไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก ดังแสดงในภาพประกอบ 19



ภาพประกอบ 19 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก ที่เติมสารละลายผสมของสาร
รบกวน 6 ชนิด

ตอนที่ 6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด

ในการวิเคราะห์สารทางเคมี การเตรียมตัวอย่างจัดเป็นส่วนที่สำคัญของการทำการวิเคราะห์ ทั้งนี้เพื่อความเหมาะสมต่อวิธีการวิเคราะห์จึงจำเป็นต้องเลือกวิธีการเตรียมตัวอย่างให้มีความเหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์มากที่สุด ซึ่งพบว่ามีวิธีการเตรียมตัวอย่างหลากหลายวิธีที่นิยมใช้กันทั่วไป ได้แก่ วิธีการละลาย การย่อยสาร การหลอมสาร การกลั่น การตกตะกอน และวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นต้น โดยงานวิจัยนี้สนใจทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างจำพวกพืชและผลไม้ ดังนั้นจึงต้องมีการเตรียมตัวอย่างเพื่อให้ตัวอย่างมีความสะอาดและมีสารอื่นๆเจือปนน้อยที่สุดเนื่องจากในตัวอย่างพืชและผลไม้มีสารรบกวนอื่นๆ เจือปนอยู่ เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดอะมิโน กรดผลไม้ และอื่นๆเป็นจำนวนมาก จึงไม่เหมาะที่จะทำการวิเคราะห์โดยตรงด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว ซึ่งเป็นทั้งกระบวนการสกัดสารที่ต้องการวิเคราะห์และกำจัดสารรบกวนอื่นๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงต่อไป

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง โดยใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว ตลอดจนการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณของกรดแทนนิก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น เท่ากับ 280 นาโนเมตร ทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมและมี

ประสิทธิภาพเพียงพอที่จะมาประยุกต์ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง และวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างพืชและผลไม้ที่มีขายในท้องตลาด โดยแสดงผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกดังตาราง 4

ตาราง 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปริมาณกรดแทนนิก (mg/100g±SD)
S1	ใบหูกวาง	9.52±0.09
S2	ใบยอ	5.61±0.62
S3	ใบฝรั่ง	6.37±0.75
S4	ใบกระท้อน	8.00±0.38
S5	ใบชมพู	1.67±0.10
S6	ใบมะยม	3.84±0.05
S7	ใบละมุด	7.70±0.21
S8	ใบน้อยหน่า	1.28±0.52
S9	ใบหว่า	4.48±0.32
S10	ผลหูกวาง	1.26±0.04
S11	ผลยอ	1.94±0.09
S12	ผลฝรั่ง	2.86±0.12
S13	ผลกระท้อน	1.53±0.13
S14	ผลชมพู	1.67±0.10
S15	ลูกมะยม	3.50±0.13
S16	ลูกละมุด	2.33±0.15
S17	ผลน้อยหน่า	1.07±0.04
S18	ลูกหว่า	3.77±0.22

ตาราง 4 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่าง	ปริมาณกรดแทนนิก (mg/100g±SD)
S19	ผลกล้วย	10.33±0.46
S20	เปลือกลูกยอ	5.14±0.20
S21	เปลือกผลฝรั่ง	1.04±0.04
S22	เปลือกผลกระท้อน	6.03±.15
S23	เปลือกผลชมพู	3.66±0.31
S24	เปลือกลูกละมุด	2.70±0.07
S25	เปลือกผลน้อยหน่า	1.18±0.09
S26	เปลือกลูกหว่า	4.28±0.16
S27	เปลือกกล้วย	6.83±0.19

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้พบว่า มีปริมาณ กรดแทนนิกอยู่ในช่วง 9.52 ± 0.09 ถึง 1.04 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งส่วนของพืชและผลไม้ที่ให้ปริมาณกรดแทนนิกสูงคือ ส่วนของใบ เปลือก และผล ตามลำดับ โดยผลการวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของจิตตะวัน และคณะ ที่ได้ทำการวิเคราะห์หาสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกในตัวอย่างใบ ลำต้น และผลของน้ำเต้า โดยพบว่าส่วนของน้ำเต้านั้นให้ปริมาณสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกสูงโดยเฉพาะปริมาณกรดแทนนิก(Jittawan; et al. 2008: 881-890)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษาพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว ในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด ซึ่งทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว ตลอดจนศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด ทั้งนี้ยังสามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างชนิดอื่นๆต่อไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาการวิจัย สรุปผลได้ดังนี้

1. ศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดแทนนิก ดังนี้
 - 1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตัวกระจายที่ใช้ในการกระจาย
 - 1.2 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตัวกระจายที่ใช้ในการกระจาย
 - 1.3 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายผสมที่เหมาะสม
 - 1.4 ศึกษา pH ที่เหมาะสม
 - 1.5 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรคลอริกที่เหมาะสม
 - 1.6 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการผสมสาร (vortex) ที่เหมาะสม
 - 1.7 ศึกษาผลของค่าความแรงของไอออนิก ของสารละลาย
 - 1.8 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยงที่เหมาะสม

จากตัวแปรดังกล่าวข้างต้น พบว่าชนิด อัตราส่วน และปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและตัวทำละลายที่ใช้กระจาย ค่า pH ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรคลอริก เวลาที่ใช้ในการผสมสาร ความแรงของไอออนิก ของสารละลายและเวลาในการหมุนเหวี่ยง ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการ

เตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก คือ ตัวทำละลายสกัดชนิด 1-บิวทานอลและตัวทำละลายกระจายชนิดเอทานอล ด้วยอัตราส่วนของสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายในอัตราส่วน 1:1 (v/v) โดยใช้สารละลายผสมที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ที่ pH4 ควบคุม pH ของสารละลายตัวอย่างโดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.3 โมลาร์ ใช้เวลาในการผสมสาร 3 นาที ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ในการเพิ่มความแรงไอออนิกของสารละลายที่ความเข้มข้น 4%w/w และใช้เวลาในการหมุนเหวี่ยงที่ 4000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ตามลำดับ

2. การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว ที่พัฒนาขึ้นกับวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็ง และวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว

- 2.1 วิธีการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว
- 2.2 วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็ง
- 2.3 วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวัฏภาคของแข็ง

จากการศึกษาพบว่าวิธีการสกัดวิธีการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว ที่พัฒนาขึ้นให้ค่าร้อยละการคืนกลับสูงเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว และวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง ตามลำดับ

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

- 3.1 ศึกษาชนิด และองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่
- 3.2 ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาพบว่าวัฏภาคเคลื่อนที่กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร และตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ เมทานอลและอะซิโตนในไตรล์ อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ และอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อการแยกกรดแทนนิกที่ได้ คือ วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร และเมทานอล ที่อัตราส่วน 85:15(v/v) ที่อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.9 มิลลิลิตร ต่อนาที ตามลำดับ โดยที่กรดแทนนิกจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ที่ระยะเวลา 6.6 นาที

4. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกที่พัฒนาขึ้น

- 4.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์
- 4.2 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ
- 4.3 ศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ
- 4.4 ศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์
- 4.5 ศึกษาความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์

จากการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ พบว่าจากการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกเข้มข้นในช่วง 0–1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้สมการเส้นตรง $y = 1.8297x + 1.962$ ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9998 ให้ขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 1.00 และ 3.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และให้ค่าร้อยละการกลับคืน ของตัวอย่างใบหูกวางช่วง 92.40 ± 5.92 ถึง 100.16 ± 4.62 และจากการศึกษาความแม่นยำภายในวันเดียวกันและความแม่นยำระหว่างวันในตัวอย่างใบหูกวางพบว่าให้ค่า %RSD เท่ากับ 1.40 ± 0.30 และ 2.30 ± 0.59 ตามลำดับ

5. ศึกษาผลของสารรบกวนในตัวอย่าง

- 5.1 ศึกษาผลของการรบกวนจากสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่นๆ
- 5.2 ศึกษาผลของการรบกวนจากกรดอินทรีย์

จากการศึกษาพบว่ากรดแกลลิก กรดเฟอรูลิก คาเทชิน กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก และกรดกรดซิตริก ไม่มีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก เนื่องจากสารรบกวนเหล่านี้ไม่ได้เกิดการซ้อนทับกันกับพีคโครมาโทแกรมของกรดแทนนิก และสัญญาณของกรดแทนนิกที่ได้จากการวิเคราะห์นั้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงทำให้สามารถสรุปได้ว่าวิธีการสกัดที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่มีความจำเพาะต่อการวิเคราะห์กรดแทนนิก

6. วิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้บางชนิด

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้พบว่า มีปริมาณกรดแทนนิกอยู่ในช่วง 9.52 ± 0.09 ถึง 1.04 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งส่วนของพืชและผลไม้ที่ให้ปริมาณกรดแทนนิกสูงคือ ส่วนของใบ เปลือก และผล ตามลำดับ

จากการศึกษาพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว ทำให้สามารถประเมินประสิทธิภาพของพืชและผลไม้ในการเป็นแหล่งของกรดแทนนิกได้ตลอดจนสามารถนำไป

ประยุกต์ใช้กับตัวอย่างพืชและผลไม้ได้อีกหลากหลายชนิด เนื่องจากขั้นตอนการสกัดนั้นเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาหาชนิดของภูมิภาคเคลื่อนที่อื่นๆ ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดการใช้ตัวทำละลายโดยสิ้นเปลือง
2. ก่อนทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดทุกครั้ง ควรนิตสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกทุกครั้งเพื่อดูระยะเวลารีเทนชันและพื้นที่พีค เนื่องจากในการวิเคราะห์แต่ละครั้งความดันของเครื่อง HPLC ไม่เท่ากันมีผลทำให้ระยะรีเทนชันเคลื่อนไปจากเดิม
3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างพืชและผลไม้ชนิดอื่นๆได้





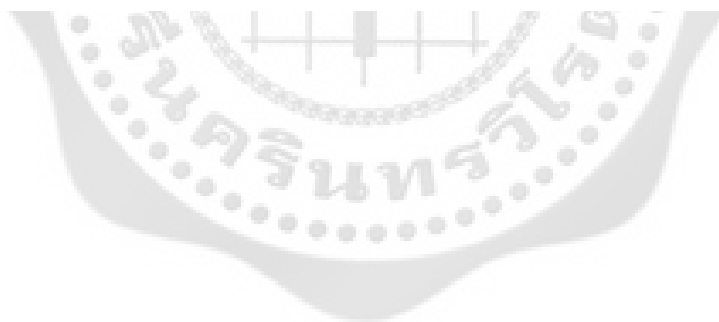
บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- เกษตร วิรุฬห์. (2547). ผักพื้นบ้าน 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน.
- จันทิมา นามโชค. (2555). *ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ*. ปรินญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต(สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป). ปทุมธานี: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์. ถ่ายเอกสาร.
- นิตดา หงส์วิวัฒน์. (2007). *ผลไม้ 111 ชนิด*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: แสงแดด. สนพ.
- นิจศิริ เรืองรังษี. (2539). หูกวาง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สาขาวิทยาการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิตยา รัตนพนนท์. (2550). *ปริมาณสารประกอบฟีนอลและกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส ในมะเขือ*. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- นิตยา รัตนพนนท์. (2557). *เคมีอาหาร*. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: โอเอสพรีนติ้งเฮ้าส์.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงษ์. (2552). *แทนนิน*. สืบค้นเมื่อ 20 ตุลาคม 2557 , จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/แทนนิน>
- พัฒนา เหล่าไพบูลย์. (2554). *โครมาโทกราฟีของเหลวแรงดันสูงและการประยุกต์ใช้*. พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น: ขอนแก่นการพิมพ์.
- แม่น อมรสิทธิ์ และคณะ. (2553). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์ 50.
- ศิริพร จันทรศิริ. (2557). *เคมีวิเคราะห์*. พิมพ์ครั้งที่ 4. สงขลา: นำศิลป์โฆษณา.
- ศุภลักษณ์ ศรีจรรย์. (2552). *โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง*. พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สมุนไพรรักษาบ้าน. (2544). *สถาบันวิจัยสมุนไพร*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- สวนพฤกษศาสตร์. (2551). *ตามพระราชเสาวนีย์ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช*. สืบค้นเมื่อ 25 สิงหาคม 2557, จาก www.dnp.go.th/pattani_botany/

- Andreasen M.F.; et al. (2000). Content of phenolic acid and ferulic acid dehydrodimers in 17 rye (*Secale cereal* L.) varieties. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 46: 2837-2842.
- AOAC International. (2002). AOAC guideline for single laboratory validation of chemical Method for dietary supplement and botanicals. from www.aoac.org/official_method/slv_guideline.pdf.
- Ceferino C; et al. (2011). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Journal of Analytica Chimica Acta*. 732: 100–104.
- Esra P; & Ebru B. (2011). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Journal of Food Research International*. 45: 145–154.
- Faraji H; et al. (2009). Pre-concentration of phenolic compound in water samples by novel Liquid-liquid microextraction and determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1216: 8569-8574.
- Gauangho S; & Leong. (2006). Separation and determination of organic acids and phenolic compounds of fruit juices and drinks by high-Performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 977: 89-96.
- Gupta M; et al. (2012). HPLC profiles of standard phenolic compounds present in medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 4(3): 162-167.
- Jianwei L; et al, (2011). Adsorption of tannic acid from aqueous solution onto surfactant-modified zeolite. *Journal of Hazardous Materials*. 193: 102–111.
- Jittawan K; & Sirithon S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Journal of Food Chemistry*. 110: 881–890.
- Kermasha; et al. (1995). Analyses of phenolic and furfural compound in concentrated and non – concentrated apple juices. *Food Research International*. 28: 245-252

- Konaté K; et al, (2011). Antibacterial potential of aqueous acetone extracts from five medicinal plants used traditionally to treat infectious diseases in Burkina Faso. *Journal of Biological Sciences*. 3(5): 435-442.
- Magdalena K; (2007). FE(II), CU(II) AND ZN(II) chelating activity of buckwheat and buckwheat Groats tannin fraction. *Journal of Food and Nutrition Science*. 57: 357–362.
- Ozkan G; and N.G. (2006). A direct RP-HPLC determination of phenolic compound in Turkish red wines. *Department of Food Engineering Suleyman Demirel University*. 19: 229-234.
- Rohman A; et al. (2010). Antioxidant activity, total phenolic, and total flavaonoid of extracts and fractions of red fruit (*Pandanus conoideus* Lam). *Journal of International Food Research*. 17: 97-106.
- Weerasak S. & Suwanna V. (2007). Simultaneous of gallic acid, catechin, rutin, ellaguc acid and quercetin in flower extracts of *Michelia alba*, *Caesalpinia pulcherrima* and *Nelumbo nucifera* by HPLC. *Journal of Thai Pharmaceutical and Health Science*. 2(2): 131-137.



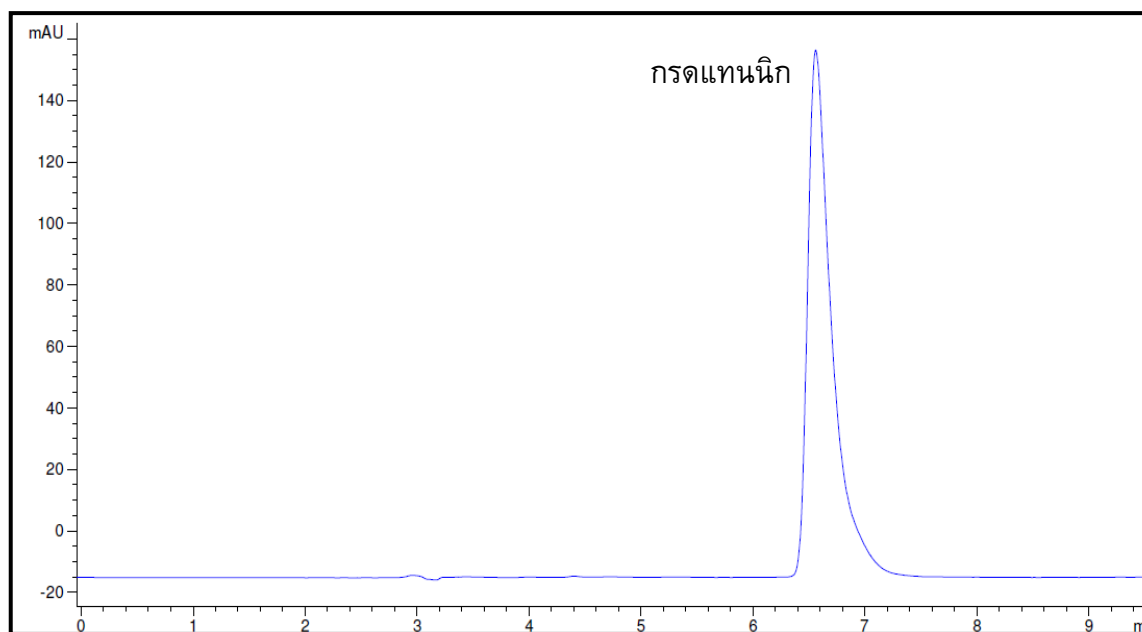


ภาคผนวก

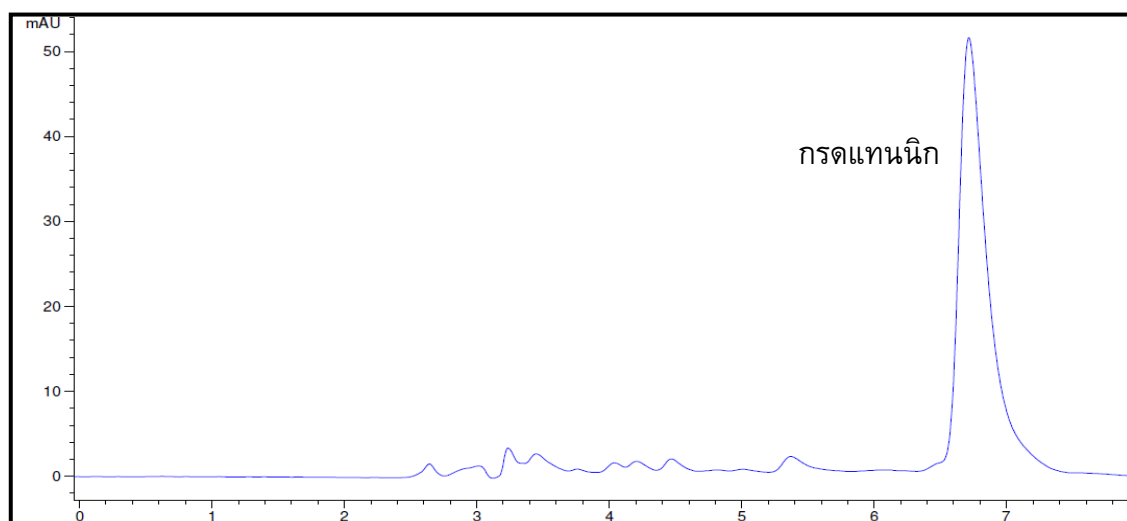


ภาคผนวก ก

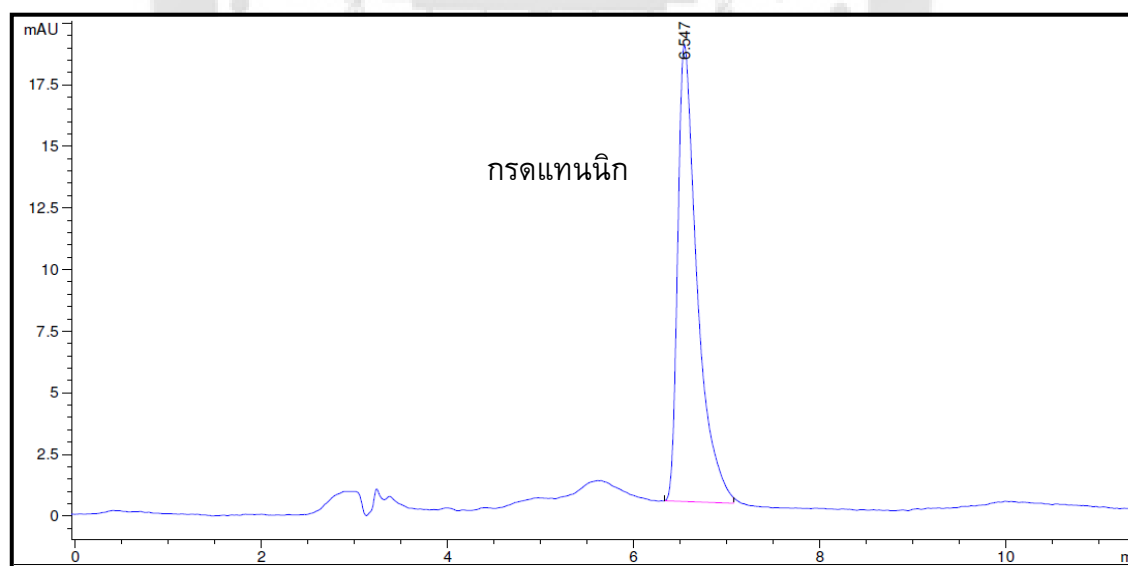
โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง



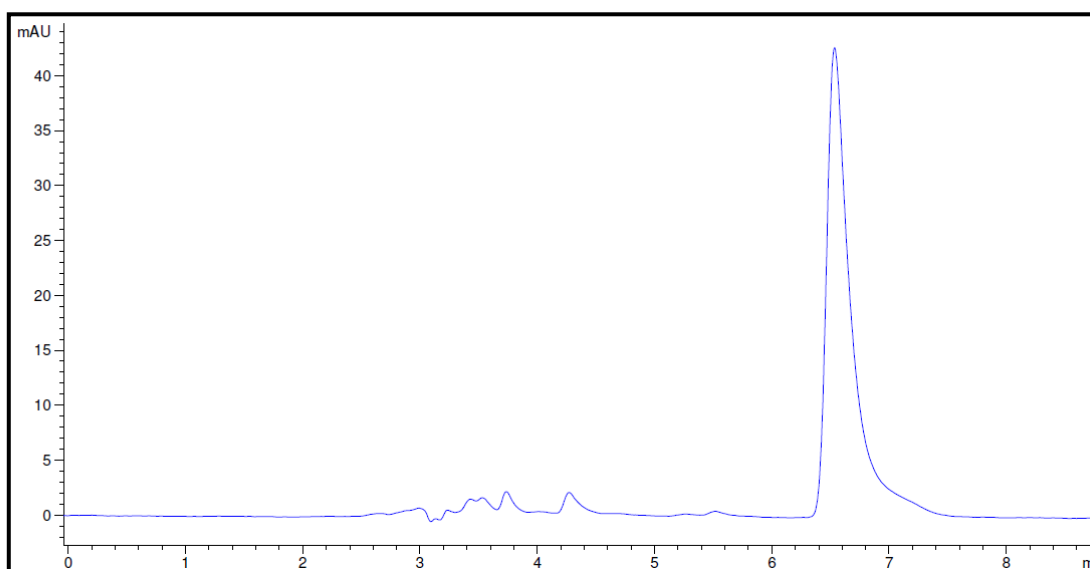
ภาพประกอบ 20 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก เข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร



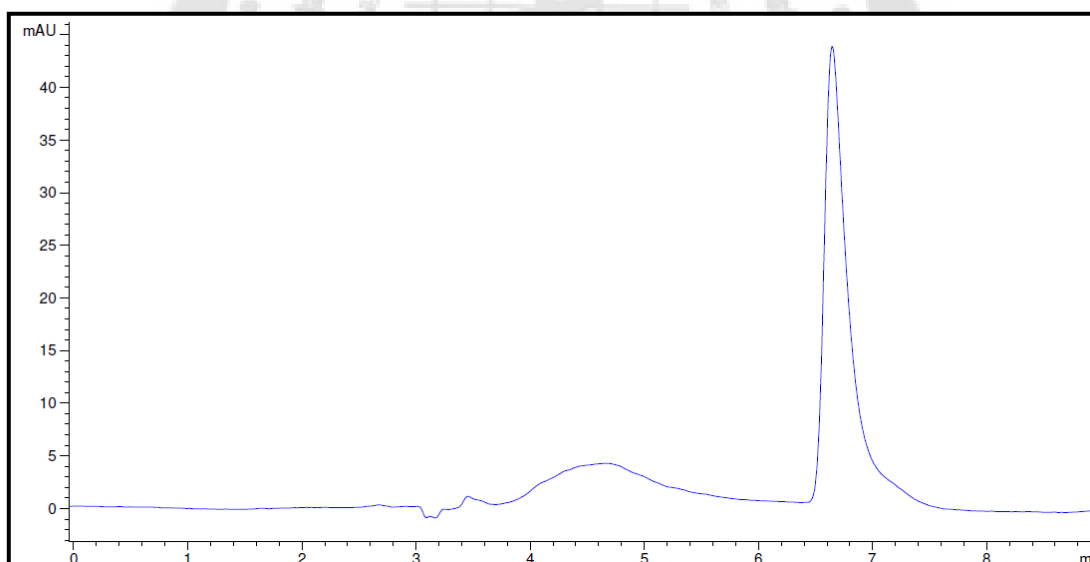
ภาพประกอบ 21 โครมาโทแกรมของตัวอย่างใบหูกวางที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น



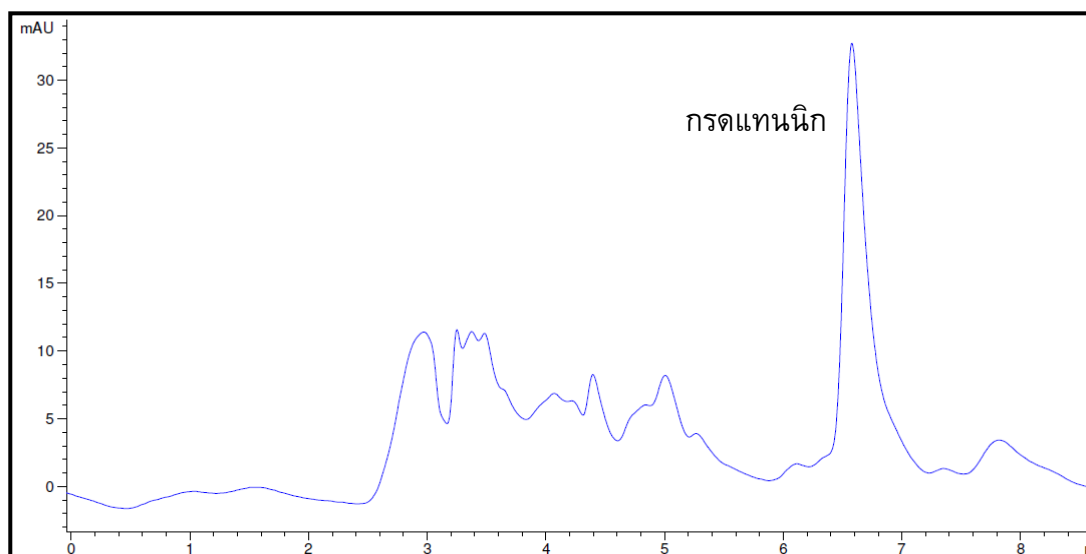
ภาพประกอบ 22 โครมาโทแกรมของตัวอย่างเปลือกของเมล็ดหูกวางที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น



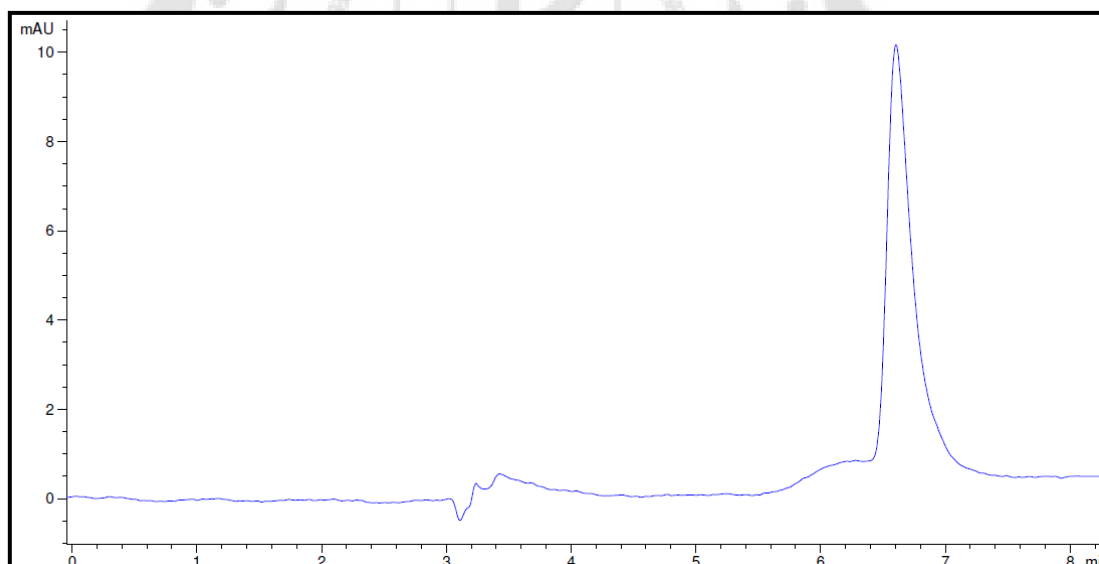
ภาพประกอบ 23 โครมาโทแกรมของตัวอย่างใบยอที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น



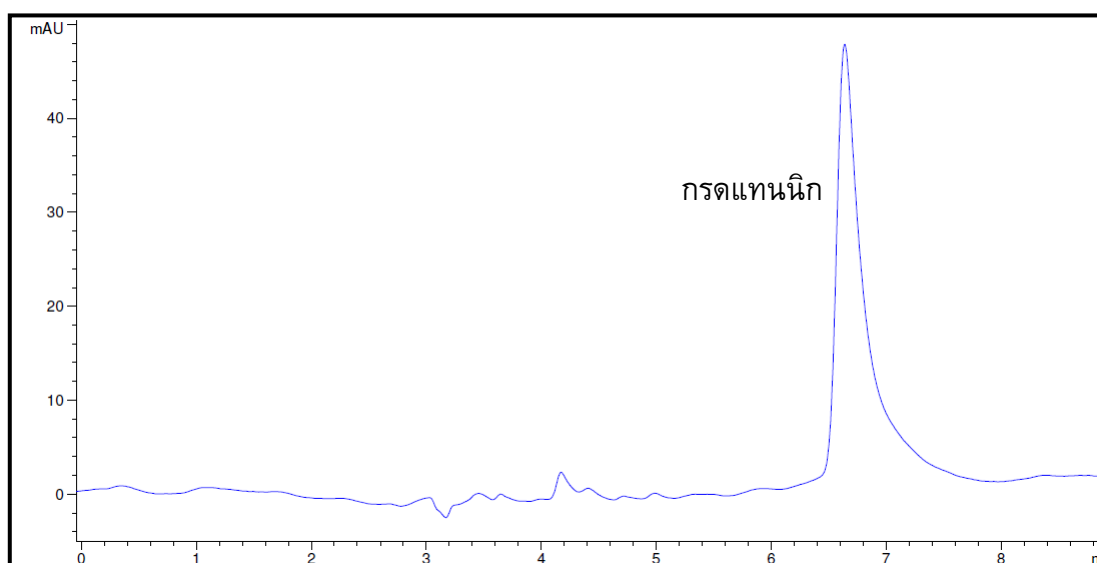
ภาพประกอบ 24 โครมาโทแกรมของตัวอย่างเปลือกของลูกยอที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME
ที่พัฒนาขึ้น



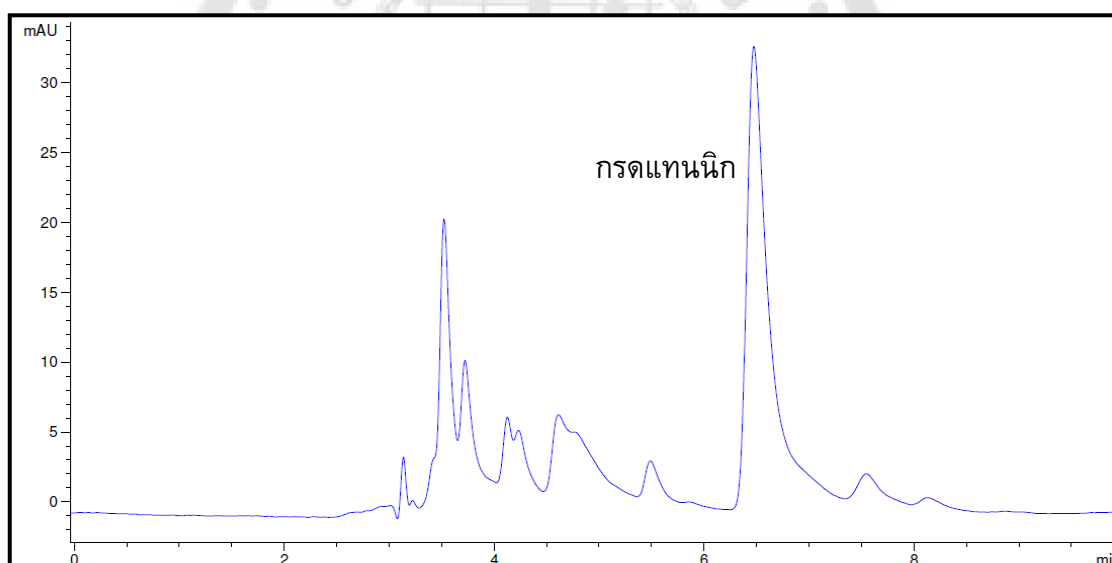
ภาพประกอบ 25 โครมาโทแกรมของตัวอย่างใบฝรั่งที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น



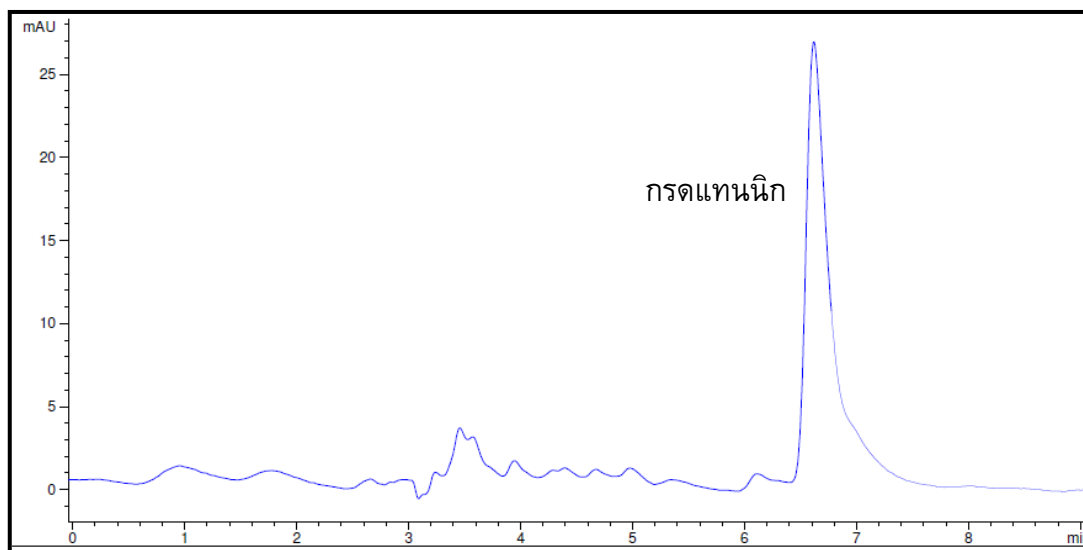
ภาพประกอบ 26 โครมาโทแกรมของตัวอย่างเปลือกฝรั่งที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น



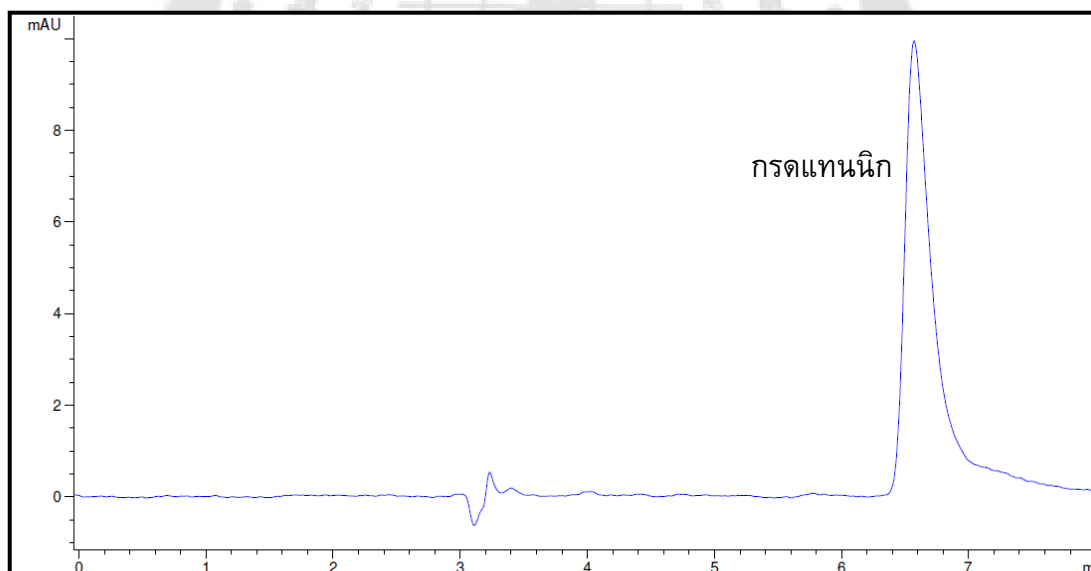
ภาพประกอบ 27 โครมาโทแกรมของตัวอย่างใบกระท้อนที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น



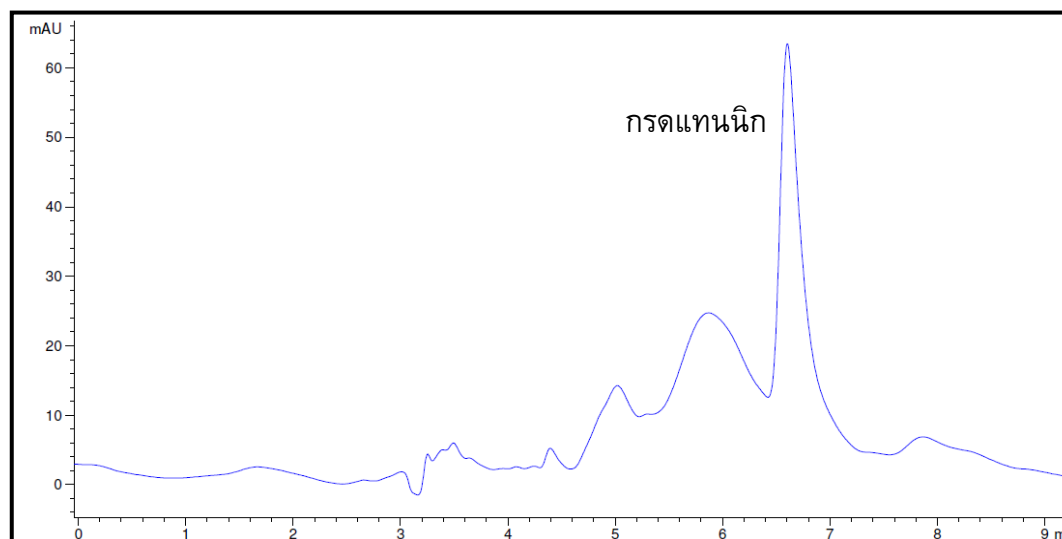
ภาพประกอบ 28 โครมาโทแกรมของตัวอย่างเปลือกกระท้อนที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น



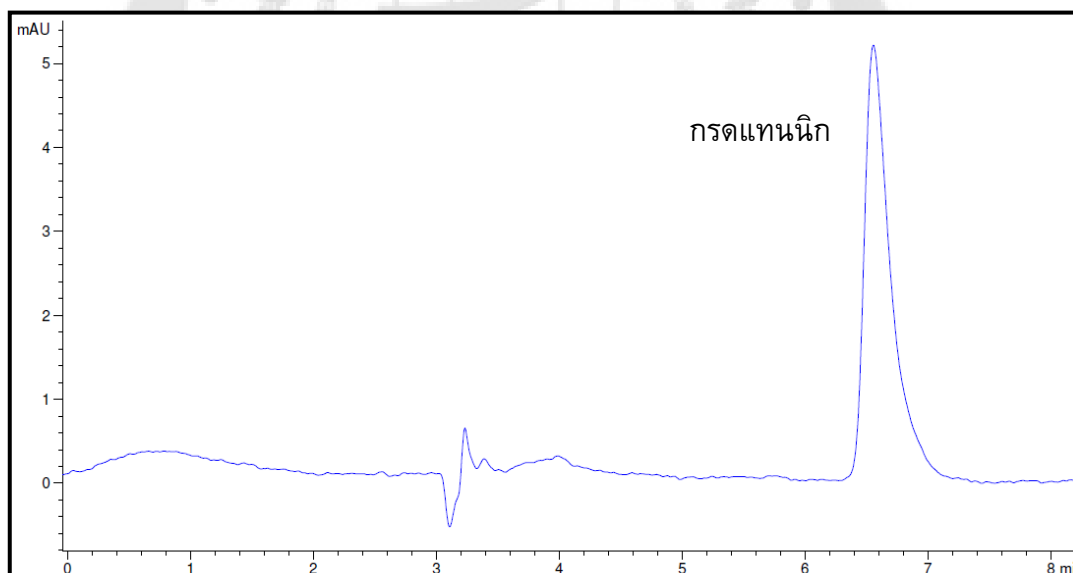
ภาพประกอบ 29 โครมาโทแกรมของตัวอย่างใบมะยมที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น



ภาพประกอบ 30 โครมาโทแกรมของตัวอย่างลูกมะยมที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น



ภาพประกอบ 31 โครมาโทแกรมของตัวอย่างใบสะมุตที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น



ภาพประกอบ 32 โครมาโทแกรมของตัวอย่างเปลือกกะมุตที่ผ่านวิธีการสกัดแบบ DLLME ที่พัฒนาขึ้น

ภาคผนวก ข

รูปตัวอย่างบางชนิด และการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจาย
ตัวระหว่างชั้นของเหลว (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)

ในตัวอย่างพืชและผลไม้



ภาพประกอบ 33 ตัวอย่างใบหูกวาง



ภาพประกอบ 34 ตัวอย่างใบยอและลูกยอ



ภาพประกอบ 35 ตัวอย่างใบฝรั่งและผลฝรั่ง



ภาพประกอบ 36 ตัวอย่างใบกระท้อนและผลกระท้อน



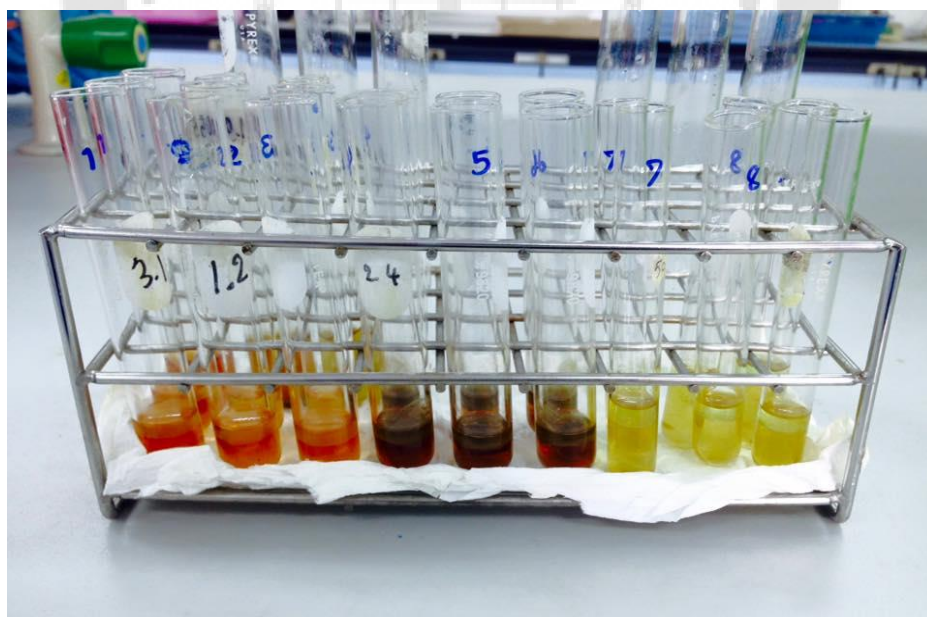
ภาพประกอบ 37 ตัวอย่างใบมะยมและลูกมะยม



ภาพประกอบ 38 ตัวอย่างใบละมุดและผลละมุด



ภาพประกอบ 39 ลักษณะตัวอย่างก่อนทำการสกัดด้วยวิธี DLLME



ภาพประกอบ 40 การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี DLLME



ภาคผนวก ค

เครื่องมือและอุปกรณ์



ภาพประกอบ 41 เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง



ภาพประกอบ 42 เครื่องผสมสาร (vortex)



ภาพประกอบ 43 เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน



ภาพประกอบ 44 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ประวัติย่อผู้วิจัย



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวสิริมา เดชะ
วันเดือนปีเกิด	4 มกราคม 2533
สถานที่เกิด	บ้านเลขที่ 47 ถ.ประชาอุทิศ ต.ตลาดหลวง อ.เมือง จังหวัดอ่างทอง 14000
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 47 ถ.ประชาอุทิศ ต.ตลาดหลวง อ.เมือง จังหวัดอ่างทอง 14000

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2551	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนอ่างทองปัทมโรจน์วิทยาคม อ่างทอง
พ.ศ. 2555	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2558	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร

