

การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลพร้อมกัน  
ในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิดด้วยเทคนิค DLLME-SFO



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี  
กุมภาพันธ์ 2560

การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลพร้อมกัน  
ในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิดด้วยเทคนิค DLLME-SFO



ปริญญาานิพนธ์  
ของ  
พัชรพรรณ ดิษยมณฑรี

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี  
กุมภาพันธ์ 2560  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ

การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลพร้อมกัน  
ในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิดด้วยเทคนิค DLLME-SFO



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี  
กุมภาพันธ์ 2560


พัชรพรรณ ดิษยมนตรี. (2560). การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลพร้อมกันในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิดด้วยเทคนิค DLLME-SFO.

ปริญญาานิพนธ์ วท.ม.(เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์: รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิดโดยทำการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอร์เรย์ ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและน้ำปราศจากไอออน ในอัตราส่วน 63 : 37 โดยปริมาตร ความคุมอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ผลการประเมินความใช้ได้ของวิธีการทดลอง พบว่า ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลเท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) ของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลเท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีความแม่นยำของการวิเคราะห์โดยค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ภายในวันเดียวกันของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลได้แก่ 0.96 และ 0.13 ตามลำดับ และ ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ระหว่างวันของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลได้แก่ 1.33 และ 0.19 ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ศึกษาและพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล โดยใช้เทคนิค DLLME-SFO และทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยทำการศึกษาตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างดังนี้ ชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว ปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว ผลกระทบของความเข้มข้นของเกลือและเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้ตัวทำละลายสกัดแห้งตัวเมื่อนำเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นมาวิเคราะห์ยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้าน พบว่าพบปริมาณยูจีนอลในตัวอย่างยาต้องเหล้าในช่วงความเข้มข้น 2.07-2.15 มิลลิกรัมต่อลิตร และยาแก้ไอในช่วงความเข้มข้น 34.22-95.84 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบปริมาณไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาต้องเหล้าเพียงชนิดเดียวที่ความเข้มข้น 3.11 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) สำหรับวิธีวิเคราะห์ยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านในช่วงร้อยละ 96.32-102.09 และ 98.00-104.83 ตามลำดับ

THE DEVELOPMENT OF SAMPLE PREPARATION FOR SIMULTANEOUS ANALYSIS  
OF EUGENOL AND ISOEUGENOL CONTENT IN SOME THAI TRADITIONAL DRUGS  
USING DLLME-SFO



AN ABSTRACT  
BY  
PHATCHARAPHAN DITSAYAMONTRI

Presented in Partial Fulfillment of the Requirement for the  
Master of Science Degree in Chemistry  
at Srinakharinwirot University  
February 2017

Phatcharaphan Ditsayamontri. (2017). *The development of sample preparation for simultaneous analysis of eugenol and isoeugenol content in Thai traditional drugs using DLLME-SFO*. Master thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee. Associate Professor Dr.Pornpimol Muangthai.

The objective of this research was the development of a sample preparation for the simultaneous analysis of eugenol and isoeugenol content in Thai traditional drugs using DLLME-SFO. This was determined by high performance liquid chromatography coupled with a diode array detector. The optimization of the experiment was the mobile phase system, which was determined to be methanol and water with ratio of 63:37 v/v, a controlled flow rate of 1.0 ml/min and a detection wavelength of 280 nm. In the validation of the proposed method, it was found that the limit of detection (LOD) for eugenol and isoeugenol were 0.005 mg/L and 0.001 mg/L and that the limit of quantitation (LOQ) for eugenol and isoeugenol were 0.02 mg/L and 0.01 mg/L, respectively. The relative standard deviations (%RSD) intra-day of eugenol and isoeugenol were 0.96 and 0.13, respectively. The relative standard deviations inter-day of eugenol and isoeugenol were 1.33 and 0.19, respectively. Several experimental parameters affecting extraction efficiency, such as the type of extraction solvent and disperser solvent, the volume of extraction solvent and disperser solvent in the DLLME stage, the effects of the addition of salt in DLLME stage and the solidification time of floating organic drops. The method developed was also applied to analyze eugenol and isoeugenol content in Thai traditional drugs and revealed that the eugenol content in Thai whisky was in the range of 2.07-2.15 mg/L and cough medicine in the range of 34.22-95.84 mg/L. It was also found that the isoeugenol content in the concentration of Thai whisky was 3.11 mg/L. The recoveries percentage of eugenol and isoeugenol were in the range of 96.32-102.09% and 98.00-104.83%, respectively.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลพร้อมกัน  
ในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิดด้วยเทคนิค DLLME-SFO

ของ

พัชรพรรณ ดิษยมนตรี

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

วันที่..... เดือน.....พ.ศ. 2560

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ที่ปรึกษา

.....ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย)

(อาจารย์ ดร.ณิชนันท์ เทพสุภรังษีกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.สุจิตรา ศรีสังข์)

## ประกาศคุณูปการ

ปริญญาานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับคำแนะนำ ความอนุเคราะห์ จากคณาจารย์ในภาควิชาเคมี ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ ช่วยแก้ไขปัญหา ในการทำงานวิจัย ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัยและการเขียนปริญญาานิพนธ์นี้แก่ผู้วิจัย เป็นอย่างดี อีกทั้งทำให้ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์ ได้เรียนรู้และเห็นคุณค่าของงานวิจัย

ขอขอบพระคุณดร.ณิชนันท์ เทพศุภรังษิกุล ประธานกรรมการในการสอบปากเปล่า ปริญญาานิพนธ์ และ ดร.สุจิตรา ศรีสังข์ กรรมการควบคุมการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ ที่กรุณา ให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่อง เพื่อให้ปริญญาานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และ ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ทางเคมี ขอขอบคุณ เจ้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมีทุกคน ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัย

ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา และญาติสนิททุกท่านที่ได้อบรมเลี้ยงดู ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัย ขอบพระคุณอาจารย์ รวมถึงผู้มีพระคุณ ทุกๆ ท่านที่มีได้กล่าวรายนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ จนปริญญา นิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พัชรพรรณ ดิษยมนต์วี

## สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ขั้นตอนของการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ยาไทย.....	4
ยูจีนอลและไอโซยูจีนอล.....	6
- แหล่งที่พบยูจีนอล.....	6
- แหล่งที่พบไอโซยูจีนอล.....	11
วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล.....	13
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	23
วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค DLLME-SFO เพื่อวิเคราะห์ยูจีนอลและไอโซยูจีนอล.....	25
ตอนที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ยูจีนอลและไอโซยูจีนอล โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	27
ตอนที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์.....	27
ตอนที่ 4 การศึกษาผลของสารรบกวน.....	30
ตอนที่ 5 การวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่าง ยาไทยพื้นบ้านบางชนิด.....	30
4 ผลการทดลอง.....	31
ตอนที่ 1 ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค DLLME-SFO ที่วิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล.....	31

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
<b>4(ต่อ)</b>	
ชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว.....	31
อัตราส่วนและปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว...	33
ความเข้มข้นของเกลือ.....	35
เวลาที่ทำให้ตัวทำละลายสกัดแข็งตัว.....	36
ตอนที่ 2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลโดยใช้	
เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	37
ศึกษาความเหมาะสมของภูมิภาคเคลื่อนที่.....	37
อัตราการไหลของภูมิภาคเคลื่อนที่.....	40
ตอนที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์.....	43
กราฟมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอล.....	43
ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD).....	44
ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ).....	44
ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy).....	44
ศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision).....	45
ตอนที่ 4 ศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง.....	46
ตอนที่ 5 วิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล	
ในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด.....	47
<b>5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>51</b>
<b>บรรณานุกรม.....</b>	<b>54</b>
<b>ภาคผนวก.....</b>	<b>59</b>
ภาคผนวก ก.....	60
ภาคผนวก ข.....	62
ภาคผนวก ค.....	66
<b>ประวัติย่อผู้วิจัย.....</b>	<b>69</b>

## บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ตัวอย่างสมุนไพรรักษากลุ่มโรคหรืออาการเจ็บป่วย.....	5
2 น้ำมันหอมระเหยกลุ่มที่มียูจีนอลเป็นองค์ประกอบหลัก.....	8
3 แหล่งที่พบไอโซยูจีนอล.....	11
4 ชนิดของแอลกอฮอล์ไขมันอิ่มตัว.....	18
5 ค่าการแยกของอัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ต่างๆ.....	39
6 ผลการศึกษาอัตราการไหลของภูมิภาคเคลื่อนที่.....	42
7 สภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกยูจีนอลและไอโซยูจีนอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง.....	42
8 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์.....	43
9 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD).....	44
10 ค่าขีดจำกัดค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ).....	44
11 ค่าร้อยละการคืนกลับของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้าน...	45
12 ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด.....	47

## บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่แบ่งตามองค์ประกอบทางเคมี.....	7
2 โครงสร้างทางเคมีของยูจีนอล.....	8
3 ขั้นตอนการเตรียมวานิลลินจากยูจีนอล.....	9
4 การเกิดเมแทบอลิซึมในร่างกายของยูจีนอล.....	10
5 โครงสร้างทางเคมีของไอโซยูจีนอล.....	11
6 การเกิดเมแทบอลิซึมในร่างกายของไอโซยูจีนอล.....	13
7 ขั้นตอนของการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง.....	14
8 ขั้นตอนการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว.....	15
9 ขั้นตอนการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย.....	16
10 ขั้นตอนการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการ แข็งตัวของตัวทำละลายที่ใช้สกัด.....	17
11 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว.....	32
12 ผลการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและ ตัวทำละลายกระจายตัว.....	33
13 ผลการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายผสม.....	35
14 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นเกลือ.....	36
15 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้ตัวทำละลายสกัดแข็งตัว.....	36
16 ผลการศึกษาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่.....	37
17 โครมาโทแกรมจากการศึกษาอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ 63%เมทานอลและ 37%น้ำปราศจากไอออน.....	40
18 ผลการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่.....	40
19 กราฟมาตรฐานของยูจีนอลและไอโซยูจีนอล.....	43
20 โครมาโทแกรมจากผลการศึกษาสารรบกวนในตัวอย่าง.....	46
21 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอล.....	48
22 โครมาโทแกรมของตัวอย่างยาแก้ไอ (S8).....	49
23 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานด้วยวิธีการสกัด DLLME แบบทั่วไป....	50
24 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัด DLLME-SFO.....	61

## บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
25 โครมาโทแกรมตัวอย่างยาตองเหล้า (S2).....	63
26 โครมาโทแกรมตัวอย่างยาธาตุ (S3).....	64
27 โครมาโทแกรมตัวอย่างยาแก้ไอ (S10).....	65
28 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์	67
29 เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน.....	67
30 เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง.....	68
31 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge).....	68



# บทที่ 1

## บทนำ

### ภูมิหลัง

การแพทย์แผนไทยกับยาสมุนไพรไทยมีวิวัฒนาการมาเป็นเวลาช้านานตั้งแต่ยุคก่อนสุโขทัยจนกระทั่งถึงปัจจุบัน ซึ่งมีทั้งช่วงแห่งความเจริญก้าวหน้า การสืบสาน และช่วงการลดน้อยถอยลงอันเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงตามสมัยนิยมเมื่อการแพทย์แผนปัจจุบันได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการรักษาพยาบาล (สมพร ภูติยานนท์. 2542: 1-2) แต่ในปัจจุบันผู้คนทั่วโลกกำลังตื่นตัวในเรื่องผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ วิธีแห่งธรรมชาติบำบัด และการแพทย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพกันมากขึ้น ทำให้ในปัจจุบันธุรกิจยาไทยได้รับความนิยมเป็นอย่างมากโดยในปี พ.ศ. 2555 มีมูลค่าการใช้ภายในประเทศและการส่งออกประมาณ 10,000 ล้านบาทและมีแนวโน้มจะเติบโตมากขึ้นทั้งตลาดในประเทศและตลาดส่งออก นอกจากนี้สมุนไพรถูกนำมาใช้ประโยชน์โดยมีการผลิตผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรออกมามากมายหลายรูปแบบ เช่น เครื่องสำอาง อาหาร เครื่องหอม น้ำมันหอมระเหย และยา เป็นต้น (วันเฉลิม จันทรากุล. 2537: 9) นอกจากนี้สมุนไพรที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์บางชนิดจะให้ น้ำมันหอมระเหยหลายชนิดซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านจุลชีพต่างๆ เป็นต้น (ประภัสสร วีระพันธ์. 2554: 31)

ยูจีนอลและไอโซยูจีนอลเป็นน้ำมันหอมระเหยที่พบได้ทั่วไปในพืชสมุนไพรและเครื่องเทศหลายชนิดเช่น กานพลู อบเชย ใบโหระพา ลูกจันทน์เทศ เป็นต้น (Katja Schulz; et al. 2008: 114) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระหมายถึงสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวในอะตอมหรือโมเลกุล ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่างๆมากมาย เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน โรคแก่ก่อนวัย โรคความจำเสื่อม เป็นต้น (บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. 2556: 226-227) และฤทธิ์ต้านจุลชีพต่างๆ ยูจีนอลและไอโซยูจีนอลมักถูกนำไปเป็นสารแต่งกลิ่นในเครื่องสำอาง อาหาร และเครื่องดื่มที่มีและไม่มีแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้สารทั้งสองเป็นส่วนผสมในตัวยาบางชนิดในรูปของพืชสมุนไพรเช่น แก้วปัดฟัน แก้วปัดท้อง ท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้วไอ เป็นต้น (โชติอนันต์; และคณะ. 2551: 78) เมื่อร่างกายได้รับยูจีนอลและไอโซยูจีนอลจะเกิดเมแทบอลิซึมที่ตับและเปลี่ยนเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำก่อนจะกำจัดออกจากร่างกายในรูปของปัสสาวะ โดยทั่วไปยูจีนอลและไอโซยูจีนอลไม่ก่อให้เกิดพิษต่อร่างกาย (Herbicide Risk Assessment. 2010)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทย โดยใช้เทคนิครีเวอส์เฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และเพื่อให้วิธีการวิเคราะห์มีประสิทธิภาพสูง ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้นำเสนอการพัฒนาวิธีการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) ร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายที่ใช้สกัด (solidification of floating organic drop, SFO) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่าง

และช่วยลดสารรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

### ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัดสำหรับการวิเคราะห์ยูจีนอลและไอโซยูจีนอล
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัด
4. เพื่อประยุกต์ใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัดสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด

### ความสำคัญของการวิจัย

1. ทราบถึงวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัดสำหรับการวิเคราะห์ยูจีนอลและไอโซยูจีนอล
2. ทราบถึงปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล
3. ทราบถึงประสิทธิภาพของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัด
4. ทราบถึงปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่พบในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด

### ขอบเขตของการวิจัย

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยใช้วิธีการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัดที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล
  - 1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว
    - 1.1.1 ชนิดของตัวทำละลายสกัดที่ศึกษาได้แก่ 2-เดคานอล (2-decanol), 1-อุนเดคานอล (1-undecanol) และ 1-โดเดคานอล (1-dodecanol)
    - 1.1.2 ชนิดของตัวทำละลายกระจายตัวที่ศึกษาได้แก่ เมทานอล อะซิโตน และ อะซิโตนไทรล์
  - 1.2 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว

1.2.1 ศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัวได้แก่ 1:1 v/v, 1:2 v/v, 1:3 v/v, 1:4 v/v และ 1:5 v/v

1.2.2 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว ได้แก่ 250, 500, 750, 1000 และ 1500 ไมโครลิตร

1.3 ศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการสกัด

1.4 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้ตัวทำละลายสกัดแห้งตัว ได้แก่ 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณ ยูจีนอลและไอโซยูจีนอลได้แก่ ชนิดตัวภาคเคลื่อนที่ และอัตราการไหลของตัวภาคเคลื่อนที่

3. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ ได้แก่

3.1 กราฟมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

3.2 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

3.3 ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

3.4 ศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

4. ศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง

5. การประยุกต์วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัด สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด

## ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัดที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

4. ศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง

5. วิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเทคนิคการเตรียมสารตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัด เพื่อวิเคราะห์ยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทย โดยผู้วิจัยได้ศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและนำเสนอตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1. ยาไทย
2. แหล่งที่พบยูจีนอลและไอโซยูจีนอล
3. วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์
4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. ยาไทย

ยาไทย หมายถึง ยาแผนโบราณและยาสมุนไพร ตามพระราชบัญญัติยา รวมทั้งยาจากพืช สัตว์ แร่ธาตุ ในลักษณะและวิธีการของการที่แพทย์แผนโบราณปรุงสำหรับคนไข้และการปรุงใช้กันเองในหมู่ประชาชน (สมพร ภูதியานนท์. 2542: 49-51) ในอดีตยาไทยได้ถูกนำมาดูแลสุขภาพ บำบัดรักษาโรค และบรรเทาความเจ็บป่วยของประชาชนแบบดั้งเดิมโดยใช้พืช สัตว์ หรือแร่ธาตุมาใช้ทำเป็นเครื่องยาซึ่งชนิด วิธีการปรุงยาไทย วิธีการใช้ยาไทย และส่วนผสมที่ใช้ ได้มาจากการสะสมและถ่ายทอดประสบการณ์อย่างเป็นระบบโดยการบอกเล่า การสังเกต การบันทึกการวิเคราะห์ และการวิจัย

#### วิธีการปรุงยาไทย (โบราณ)

ในอดีตวิธีการปรุงยาไทยมี 23 วิธี ดังนี้ ยาผง ยาเม็ด ยาต้ม ยาดอง ยาต่าง ยาต้ม ยาอม ยาอบ ยารมไอน้ำ ยาคว่ำ ยาหลาม ยากลิ่น ยาหุงน้ำมัน ยาสูบ ยานัตถุ ยาชะ ยาทา ยาพอก ยาประคบ ยาสูมกระหม่อม ยากวาด ยาสวน ยาเหน็บทวาร แต่วิธีปรุงยาที่ใช้บ่อยได้แก่

- ยาต้ม เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ใช้ได้ทั้งสมุนไพรสดและแห้ง โดยเติมน้ำให้ท่วมยา ใช้น้ำต้มประมาณ 15-20 นาที ส่วนใหญ่จะต้มใส่ น้ำ 3 ส่วน ต้มให้เหลือน้ำเพียง 1 ส่วน

- ยาขง เป็นวิธีที่เตรียมง่ายและสะดวก แต่สกัดสารออกฤทธิ์ได้น้อย เหมาะสำหรับสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์ละลายน้ำได้ดี

- ยาดองเหล้า เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์ละลายน้ำได้น้อย ไม่สามารถเตรียมโดยการต้มหรือขงได้ โดยเติมเหล้าพอท่วม (ใช้เหล้า 25-40 ดีกรี) ทิ้งไว้ 1 เดือน

- ยาลูกกลอน เป็นวิธีการยุ่งยาก เหมาะสำหรับสมุนไพรที่มีกลิ่น รสชาติไม่น่ารับประทาน โดยนำยาผงมาผสมน้ำผึ้ง คลุกจนพอปั้นเป็นเม็ด และอบให้แห้ง

แต่ในปัจจุบันยาไทยได้เปลี่ยนรูปแบบมาเป็นยาตอกหรืออัดเม็ด ยาแคปซูล และยา หลอดบรรจุในขวดยาอย่างดีหรือบรรจุภัณฑ์ที่สวยงามเหมือนยาแผนปัจจุบัน และยกระดับมาตรฐาน ให้เป็นที่ยอมรับทั้งด้านคุณภาพและการผลิต ทำให้เป็นทางเลือกใหม่ของผู้บริโภค (วันเฉลิม จันทรา กุล. 2537: 12)

### วิธีการใช้ยาไทย (โบราณ)

วิธีการใช้ยาไทยมีทั้งหมด 21 วิธีดังนี้ กิน กวาดคอ ดม อมบ้วนปาก อาบน้ำยา ประคบ เป่าเข้าจมูก- คอ ปิดแผล ฟัน ปอก ทา ชะ แช้ ญวนวด เหน็บทวาร หยอด รมควันไฟ สวนทวารหนัก สูญหัวผี สูบเอาควันยา (สมพร ภูதியานนท์. 2542: 343-345)

### ส่วนผสมที่ใช้

ยาไทยแต่ละชนิดจะใช้สมุนไพรเป็นส่วนผสมที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสูตรของยาไทยที่จะปรุงเพื่อนำไปบำบัดรักษาอาการเจ็บป่วย ในปัจจุบันการใช้สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐานมีการส่งเสริมและเผยแพร่ให้ใช้รักษาโรคหรืออาการเบื้องต้นที่พบบ่อยๆ เนื่องจากสมุนไพรหลายชนิดเป็น ผักที่หาง่ายและรับประทานกันในครัวเรือนอยู่เป็นประจำ ซึ่งสมุนไพรแต่ละชนิดจะให้สารออกฤทธิ์ และมีสรรพคุณที่แตกต่างกัน

ตาราง 1 ตัวอย่างสมุนไพรเพื่อรักษากลุ่มโรคหรืออาการเจ็บป่วย

กลุ่มโรคและอาการเจ็บป่วย	อาการเจ็บป่วย	รายการสมุนไพร
ระบบทางเดินอาหาร	-โรคกระเพาะอาหาร -อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ -อาการท้องผูก -อาการท้องเสีย -อาการปวดฟัน	ขมิ้นชัน กล้วยน้ำว่า ขมิ้น ชিং กานพลู กระเทียม ชุมเห็ดเทศ มะขาม แมงลัก ฝรั่ง ฟ้าทะลายโจร กล้วยน้ำว่า แก้ว ผักคราดหัวแหวน ข่อย
ระบบทางเดินหายใจ	-อาการไอ และระคายคอกจาก เสมหะ	ขิง ดีปลี เพกา มะขามป้อม มะนาว มะขาม มะแว้งเครือ
ระบบทางเดินปัสสาวะ	-อาการขัดเบา	กระเจี๊ยบแดง ขลู่ ตะไคร้ สับปะรด หนุ่ยาคา อ้อยแดง
โรคผิวหนัง	-อาการกลาก เกื้อน  -แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก	กระเทียม ข่า ชุมเห็ดเทศ ทองพันชั่ง พลู บัวบก ว่าน ทางจระเข้

ที่มา: ดัดแปลงจาก : สมพร ภูதியานนท์. (2542). ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับแพทย์แผนไทย ว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์แผนไทย. 77-82.

สมุนไพรที่นำมาปรุงยานอกจากจะมีสรรพคุณทางยา ช่วยบำรุงกาย และใช้รักษาอาการเจ็บป่วยต่าง ๆแล้วยังพบว่าในสมุนไพรยังมีสารอื่น ๆที่มีประโยชน์โดยเฉพาะน้ำมันหอมระเหย โดยในสมุนไพรหรือพืชต่าง ๆจะผลิตน้ำมันหอมระเหยเก็บไว้ตามส่วนต่าง ๆเช่น เมล็ด เปลือก ราก ใบ ดอก เนื้อไม้ ยางไม้ เป็นต้น (อรรถ เอกภาพสากล. 2547: 32-33) ซึ่งน้ำมันหอมระเหยบางชนิดมีสรรพคุณทางยาและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น น้ำมันหอมระเหยจากจันทร์เทศ มีคุณสมบัติขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ช่วยบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อและข้อต่อ และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย, น้ำมันจากขิง มีคุณสมบัติช่วยย่อยอาหาร แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ช่วยขับลม และมีฤทธิ์ในการต้านไวรัส , น้ำมันหอมระเหยจากกานพลู มีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่ ช่วยบรรเทาอาการปวดฟัน ใช้เป็นยาขับลม และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (ฐาปนีย์ หงส์รัตนารกิจ. 2550: 178-208) แต่หากนำสมุนไพรมาใช้ผิดวิธี ผิดชนิด ผิดส่วน ปริมาณที่ไม่เหมาะสม หรือใช้ยาไม่ถูกต้องกับโรคอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์และอาจเกิดพิษต่อระบบต่างๆของร่างกายได้ (เพียววี เหมือนวงษ์ญาติ. 2526: 1-2)

## 2.แหล่งที่พบยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

### 2.1 แหล่งที่พบยูจีนอล

การใช้ประโยชน์จากน้ำมันหอมระเหยมีมานานกว่า 5000 ปี เช่น อียิปต์เป็นชาติแรกที่ใช้ประโยชน์จากเครื่องหอม โดยใช้พืชที่มีกลิ่นหอมในรูปแบบต่างๆ ทั้งเครื่องสำอาง น้ำหอม ยา และเครื่องปรุงอาหาร ประเทศอินเดียในคัมภีร์มีบันทึกกล่าวถึงสมุนไพรที่มีกลิ่นหอม และสืบทอดจนถึงปัจจุบัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับพืชกว่า 700 ชนิดเช่น อบเชย ขิง เมอร์ และไม้จันทร์ เป็นต้น (อรรถ เอกภาพสากล. 2547: 17-19)

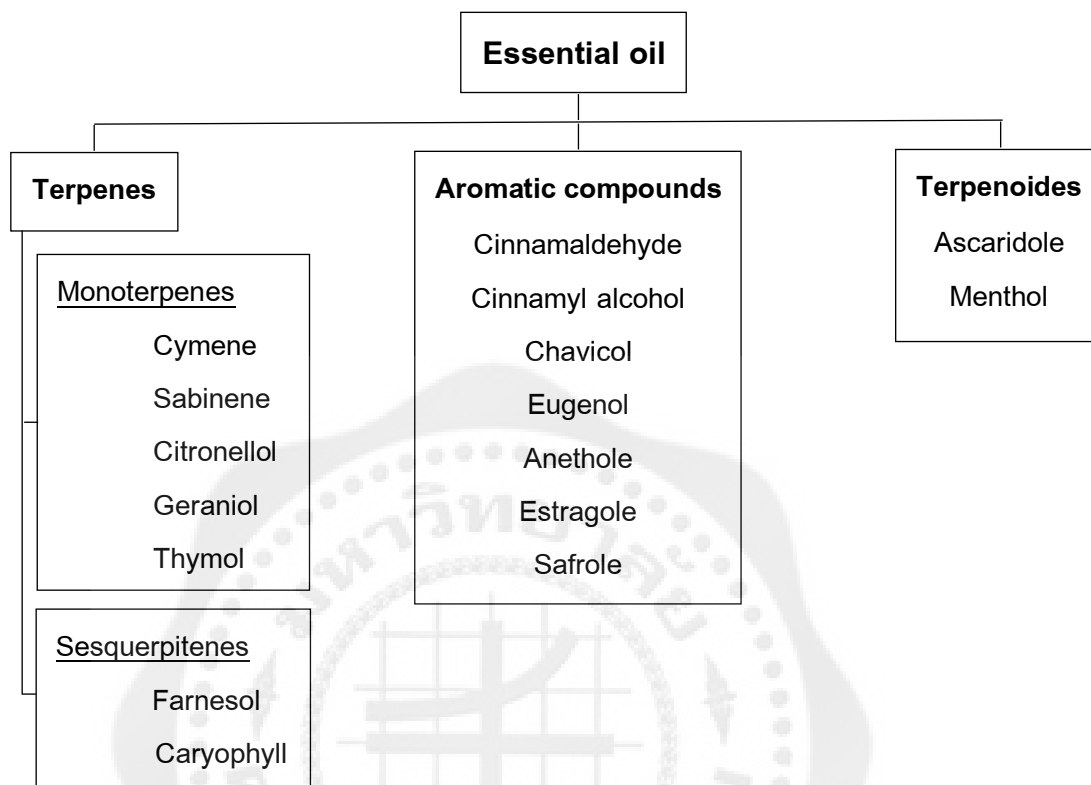
น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีที่มีความหลากหลาย และสามารถแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีได้ 3 ประเภท ดังแสดงในภาพประกอบ 1

น้ำมันหอมระเหยสามารถแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีได้ 3 ประเภท ดังนี้

1. เทอร์พีน (terpenes) มีองค์ประกอบพื้นฐานของน้ำมันหอมระเหยเรียกว่า ไอโซพรีน (isoprene) ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 5 อะตอม เมื่อนำไอโซพรีน 2 หน่วย มาเชื่อมกัน จะเกิดเป็นสารที่มีคาร์บอนจำนวน 10 อะตอมเรียกว่า โมโนเทอร์พีน (monoterpenes) ซึ่งมีทั้งในรูปแบบของสารเรียงตัวแบบเป็นวง เช่น cymene, sabinene, thymol เป็นต้น และเรียงตัวแบบไม่เป็นวง เช่น citronellol, geraniol เป็นต้น

2. สารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) เป็นน้ำมันหอมระเหยอีกกลุ่มหนึ่งที่ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 6 อะตอมและเรียงตัวแบบเป็นวง ซึ่งอาจอยู่ในรูปของวงอะโรมาติก วงเบนซิน หรือ วงฟีนิล ถ้าสารอยู่ในรูปอะโรมาติก และมีสาขาที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 จะเรียกสารกลุ่มนี้ว่า ฟีนิลโพรเพน (phenylpropenes) เช่น ยูจีนอล (ฐาปนีย์ หงส์รัตนารกิจ. 2550: 9-12)

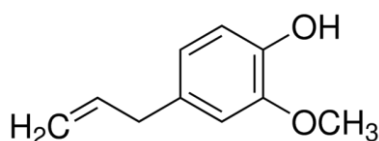
3. เทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นสารประกอบเทอร์พีนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง (Bakkali F.; et al. 2008: 447-449)



ภาพประกอบ 1 ตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่แบ่งตามองค์ประกอบทางเคมี

ที่มา: ดัดแปลงจาก : Bakkali F.; et al. (2008: 447-449).

ยูจีนอลหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า 4-allyl-2-methoxyphenol เป็นน้ำมันหอมระเหยในกลุ่มของสารประกอบอะโรมาติกซึ่งมีสูตรโมเลกุล คือ  $C_{10}H_{12}O_2$  น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 164.20 กรัม/โมล จุดเดือด  $254\text{ }^{\circ}\text{C}$  จุดหลอมเหลว  $-7.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  มีค่า  $pK_a$  เท่ากับ 10.19 ที่  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  แสดงถึงภาพประกอบ 2 และมีลักษณะทางกายภาพ คือ มีลักษณะเป็นของเหลวไม่มีสีจนถึงสีเหลืองสามารถละลายน้ำได้เล็กน้อย ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ และมีกลิ่นคล้ายกานพลู



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างทางเคมีของยูจีนอล

ยูจีนอลเป็นสารที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและเป็นส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยในพืชสมุนไพรและเครื่องเทศหลายชนิดเช่น กานพลู อบเชย ใบเบย์ ใบโหระพา ยี่หระ ลูกจันทน์เทศ โป๊ยกั๊ก ข่า ตะไคร้ เป็นต้น (Katja Schulz; et al. 2008: 113-119) ซึ่งน้ำมันหอมระเหยกลุ่มที่มียูจีนอลเป็นองค์ประกอบหลักแสดงดังตาราง 2

ตาราง 2 แสดงน้ำมันหอมระเหยกลุ่มที่มียูจีนอลเป็นองค์ประกอบหลัก

น้ำมันหอมระเหย	ปริมาณยูจีนอล
ใบกระวาน	38%-75%
ใบพลู	28%-90%
อบเชย	70%-90%
ดอกกานพลู	70%-95%
ก้านดอกกานพลู	70%-95%
ใบของกานพลู	70%-95%
ยี่หระ	12%-20%

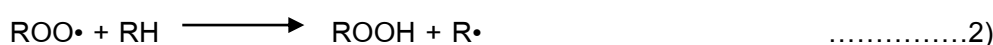
ที่มา: ฐาปนีย์ หงส์รัตนารกิจ. (2550). น้ำมันหอมระเหยและการใช้ในสุนทรบำบัด.

หน้า 98.

นอกจากนี้ยูจีนอลยังถูกนำมาใช้ประโยชน์หลายด้านได้แก่

**ต้านยา** ยูจีนอลมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เป็นสารที่ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อกำจัดหรือยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน โรคแก่ก่อนวัย โรคความจำเสื่อม เป็นต้น (สุกัญญา เขียวสะอาด. 2555: 56-58)

อนุมูลอิสระ คือ สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวในอะตอมหรือโมเลกุล โดยมีการเคลื่อนย้าย อิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก จึงสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหาย ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ดังสมการ 1 และ 2



ยูจีนอลสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยการให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ เกิดอนุมูลอิสระใหม่ที่มีความเสถียรขึ้น เนื่องจากโครงสร้างสามารถเกิดการเรโซแนนซ์ของอิเล็กตรอนได้ ดังสมการที่ 3



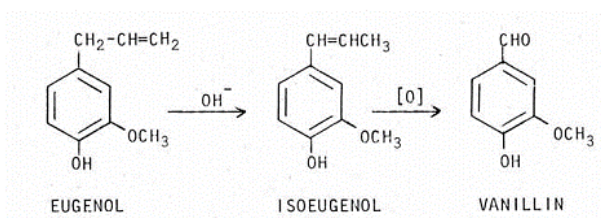
อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภททั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด, โปรตีน, เอนไซม์, ดีเอ็นเอ, อาร์เอ็นเอ, คอลลาเจน เป็นต้น เป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย เกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอ และส่งผลให้เกิดโรคต่าง ๆ (บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. 2556: 226-227)

นอกจากนี้ยูจีนอลยังถูกนำไปเป็นส่วนผสมในตัวยาสมุนไพรหลายชนิดในรูปแบบของพืชสมุนไพรและยูจีนอลจะถูกสกัดออกจากสมุนไพรโดยผ่านกระบวนการปรุงยาในรูปแบบต่างๆ เช่น การต้ม การดองด้วยเหล้า เป็นต้น ยาที่มักมีสมุนไพรที่มียูจีนอลเป็นส่วนผสมได้แก่ ยาแก้ท้องอืดท้องเฟ้อ และแน่นจุกเสียด ยาแก้ไอ ยาแก้ปวดท้อง ยาแก้ปวดฟัน เป็นต้น (โชติอนันต์; และคณะ. 2551: 78)

**ด้านทันตกรรม** มีการใช้ยูจีนอลเป็นยาชาแก้ปวดฟันและเป็นสารยับยั้งเชื้อโรค

**ด้านอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม** มีการใช้ยูจีนอลเพื่อแต่งกลิ่นรสอาหารและเครื่องดื่มบางชนิด เช่น เบเกอรี่ ขนมอบ ไวน์ เบียร์ และเครื่องดื่มที่ไม่ผสมแอลกอฮอล์ เป็นต้น

นอกจากนี้ยูจีนอลยังถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตวานิลลินซึ่งให้กลิ่นวานิลลา และกลิ่นวานิลลามักถูกนำมาแต่งกลิ่นในอาหารหลายประเภทโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารประเภทของหวานและไอศกรีม วานิลลินเป็นกลิ่นที่ได้จากฝักของกล้วยไม้สกุล *Vanilla* มีต้นกำเนิดจากประเทศเม็กซิโก วานิลลินของแท้จะมีราคาสูงมาก จึงได้มีการสังเคราะห์กลิ่นวานิลลาขึ้น เมื่อเริ่มมีการผลิตเพื่อการค้าครั้งแรกได้มีการนำยูจีนอลมาใช้ในการสังเคราะห์ โดยภาพประกอบ 3 แสดงขั้นตอนการผลิตวานิลลินจากยูจีนอล ในขั้นตอนแรกจะนำยูจีนอลมาสังเคราะห์ให้ได้ไอโซยูจีนอลก่อนโดยผ่านกระบวนการไอโซเมอไรเซชันและตามด้วยกระบวนการออกซิเดชันเพื่อให้ได้วานิลลินเป็นผลิตภัณฑ์ (Garry M., Lampman. 1977: 776-778)



ภาพประกอบ 3 ขั้นตอนการเตรียมวานิลลินจากยูจีนอล

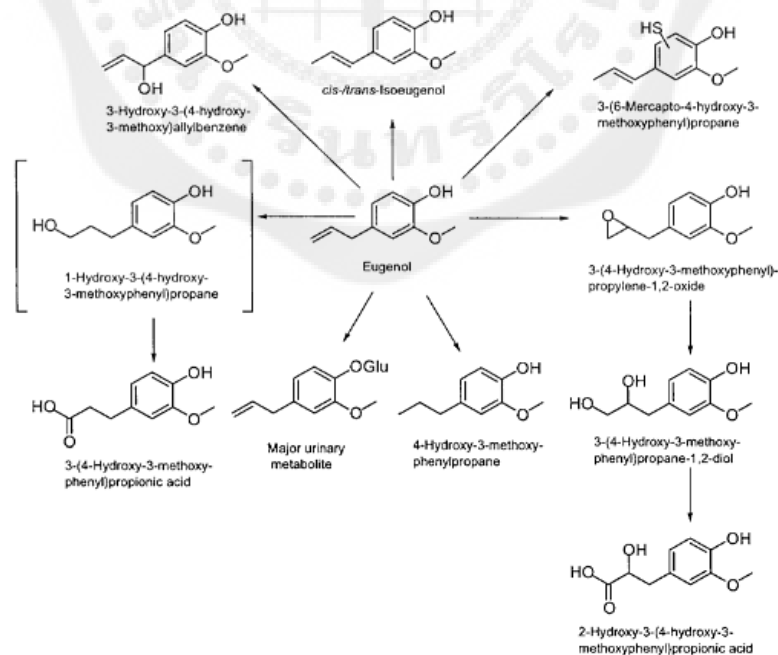
ที่มา: Garry M., Lampman. (1977: 776-778).

**ด้านสุขภาพและความงาม** ยูจีนอลถูกใช้เป็นสารแต่งกลิ่นในเครื่องสำอางและเป็นส่วนผสมที่ถูกรับใช้ในน้ำมันนวดเพื่อสุขภาพ (Geng Y.; et al. 2007: 237)

**ด้านการเกษตร** ยูจีนอลถูกนำมาใช้เป็นยาฆ่าเชื้อราได้หลายชนิดเช่น *Phlyctema vagabunda*, *Penicillium expansum*, *Monilia fructigena*, *Botrytis cinerea* เป็นต้น ซึ่งเชื้อราเหล่านี้มักพบและก่อให้เกิดความเสียหายในผลไม้ โดยเฉพาะแอปเปิ้ล และได้มีการทดสอบนำ ยูจีนอลมาฆ่าเชื้อราเหล่านี้พบว่าการใช้ยูจีนอลเพียง 150 ไมโครลิตรต่อลิตร ก็สามารถกำจัดเชื้อราดังกล่าวได้อย่างสมบูรณ์ (Solmaz Mohammadi Nejad. 2014: 7) นอกจากนี้ยูจีนอลยังถูกใช้เป็นยาสลบในสัตว์น้ำในกระบวนการการผลิตและขนส่งสัตว์น้ำ (นาวิ นมหาวงศ์. 2549: 1)

### การกำจัดยูจีนอล

ตับเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญต่อการเมแทบอลิซึม การผลิตเอนไซม์หลายชนิด การกำจัดสารพิษหรือเปลี่ยนรูปของสารต่าง ๆ ให้มีความเป็นพิษลดลง เมื่อร่างกายได้ยูจีนอล ยูจีนอลจะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็วในระบบทางเดินอาหารและส่วนใหญ่จะถูกเผาผลาญที่ตับโดยจะเกิดปฏิกิริยากับสารเคมีต่างๆในร่างกายเช่น กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) หรือ ซัลเฟตคอนจูเกต (sulfate conjugate) นอกจากนี้ยูจีนอลยังสามารถเกิดเมแทบอลิซึมเกิดเป็นสารอื่นๆ เช่น ยูจีนอลเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-propylene-1,2-oxide ตามด้วยการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดเป็น 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-propane-1,2-diol การเกิดปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชัน เกิดเป็น ไอโซยูจีนอล เป็นต้น ดังแสดงในภาพประกอบ 4 โดยทั่วไป ยูจีนอลจะถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ (Herbicide Risk Assessment. 2010)

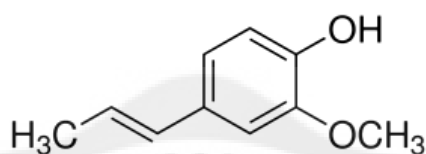


ภาพประกอบ 4 การเกิดเมแทบอลิซึมในร่างกายของยูจีนอล

ที่มา: Herbicide Risk Assessment. (2010).

## 2.2 แหล่งที่พบไอโซยูจีนอล

ไอโซยูจีนอลหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า 4-Hydroxy-3-methoxy-1-propen-1-yl benzene ไอโซยูจีนอลเป็นไอโซเมอร์กับยูจีนอล คือมีสูตรโมเลกุลเหมือนกันแต่มีโครงสร้างทางเคมีต่างกัน ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแสดงดังภาพประกอบ 5 และมีคุณสมบัติดังนี้ สูตรโมเลกุล คือ  $C_{10}H_{12}O_2$  น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 164.20 กรัม/โมล จุดเดือด 266 °C จุดหลอมเหลว -10 °C มีค่า  $pK_a$  เท่ากับ 10.01 ที่ 25 °C โดยทั่วไปไอโซยูจีนอลมีลักษณะทางกายภาพ คือ มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง สามารถละลายน้ำได้เล็กน้อย



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างทางเคมีของไอโซยูจีนอล

ไอโซยูจีนอลพบในพืชสมุนไพรและเครื่องเทศบางชนิดเช่น จันทร์เทศ กานพลู กระดังงา ว่านน้ำ โหระพา ยาสูบ ซ่อนกลิ่น ไม้จันทน์ เมล็ดผักชีฝรั่ง พุดซ้อน ดอกพิทูเนีย เป็นต้น แหล่งที่พบไอโซยูจีนอลแสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 แสดงแหล่งที่พบไอโซยูจีนอล

พืช	ปริมาณไอโซยูจีนอล
ว่านน้ำ	2.5%-25%
ดอกมหาหงส์	18.4%
พลู	0%-10.6%
ดอกซ่อนกลิ่น	2.6%
โหระพา	2.4%
กระดังงา	0%-0.5%
ก้านดอกกานพลู	0.1%-0.4%

ที่มา: ดัดแปลงจาก : Robert Tisserand, Rodney Young. (2014: 575).

ไอโซยูจีนอลถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆมากมาย ได้แก่

**ด้านอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม** มีการใช้ไอโซยูจีนอลเพื่อแต่งกลิ่นรสอาหารเช่น อาหารอบ หมากฝรั่ง เครื่องดื่มไม่มีแอลกอฮอล์บางชนิด และไอโซยูจีนอลยังถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกลิ่นวนิลลาซึ่งเป็นสารแต่งกลิ่นที่ใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน (Maskat. 2015: 1651)

นอกจากนี้ไอโซยูจีนอลยังถูกใช้ในอาหารเพื่อช่วยป้องกันอาหารเน่าเสีย เนื่องจากไอโซยูจีนอลมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียเช่น *Gram-negative Escherichia coli K12* และ *Gram-positive Listeriamonocytogenes* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเน่าเสียในอาหารและอาการเจ็บป่วยที่เกิดจากอาหาร (Christina Krogsgard Nielsen. 2016: 7-8)

**ด้านความงาม** ไอโซยูจีนอลถูกใช้เป็นสารให้กลิ่นหอมในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ครีม โลชั่น สบู่ และน้ำหอม เป็นต้น

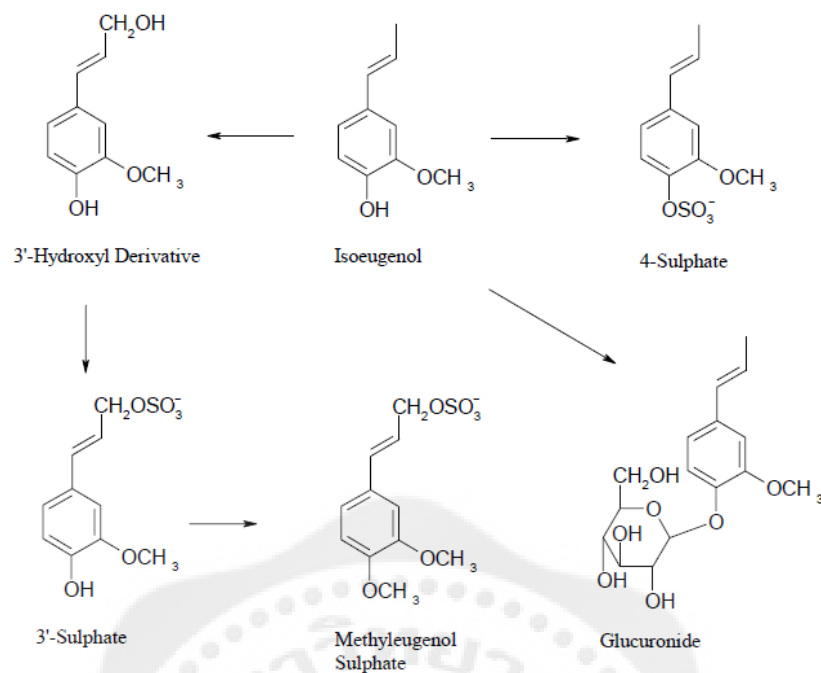
**ด้านการเกษตร** ไอโซยูจีนอลถูกใช้เป็นยาสลบในสัตว์น้ำ เช่น ปลาสร้อย ปลาดุก ปลายี่สกเทศ กุ้งขาวแวนนาไม เป็นต้น ในขั้นตอนการขนส่งสัตว์น้ำชนิดต่างๆ การใช้ยาสลบในสัตว์น้ำจะช่วยให้สัตว์น้ำที่ทำการขนส่งร่างกายไม่บอบช้ำหรือมีบาดแผลในระหว่างการขนส่ง ทำให้การขนย้ายง่ายขึ้นและสามารถขนส่งได้ในปริมาณที่มากกว่าสภาพปกติ (กิตติศักดิ์ ดีมานพ. 2014)

นอกจากนี้ไอโซยูจีนอลถูกนำมาใช้เป็นสารแต่งกลิ่นในอาหารสัตว์ประเภทต่างๆ อย่างแพร่หลายเช่น โคนุน, โคนม, สุกร, ไก่วง, ไก่ขุน, แมว, สุนัข เป็นต้น (European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. 2010: 19)

#### การกำจัดไอโซยูจีนอล

ไอโซยูจีนอลจะเกิดเมแทบอลิซึมที่ตับโดยผ่านปฏิกิริยา sulfation และ glucuronidation ที่บริเวณ phenolic hydroxyl group ไอโซยูจีนอลสามารถเกิดเมแทบอลิซึมในร่างกายดังแสดงในภาพประกอบ 6 โดยทั่วไปไอโซยูจีนอลไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายและสามารถขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะในรูปแบบต่างๆได้แก่ 33.8% ในรูป 4-sulphate , (20%) ในรูป glucuronide และ 19.1% ในรูป 3'-sulphate (HERA Risk Assessment of Isoeugenol: 75)

นอกจากนี้ไอโซยูจีนอลสามารถซึมผ่านผิวหนังได้อย่างรวดเร็ว และเนื่องจากการนำไอโซยูจีนอลมาใช้เป็นสารแต่งกลิ่นในเครื่องสำอางเช่น ครีม โลชั่น สบู่ เป็นต้น จึงมีการทดสอบความเป็นพิษของไอโซยูจีนอลต่อผิวหนังและพบว่าไอโซยูจีนอลมีความเป็นพิษต่อผิวหนังมนุษย์และสัตว์ทดลองในระดับต่ำ (European Food Safety Authority (EFSA). 2012: 1-15)



ภาพประกอบ 6 การเกิดเมแทบอลิซึมในร่างกายของไอโซยูจีนอล

ที่มา: HERA Risk Assessment of Isoeugenol. (2005).

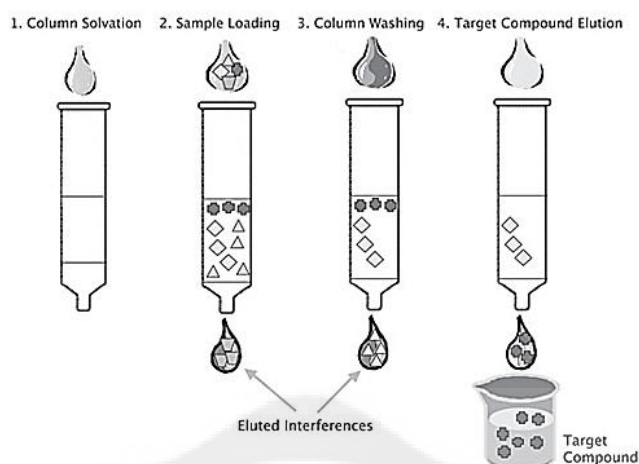
### 3. วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์สารตัวอย่าง ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างมากเนื่องจากเครื่องมือในการวิเคราะห์ส่วนใหญ่ยังคงมีปัญหาจากการรบกวนของสารรบกวนที่พบในตัวอย่าง ดังนั้นขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง อาจทำได้โดยการสกัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสารรบกวนในตัวอย่างและเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ด้วย (อภิญญา นวคุณ. 2557: 228) ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยสนใจศึกษาและวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ ซึ่งการเตรียมตัวอย่างก่อนฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงเป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างที่ดีจะช่วยป้องกันการอุดตันและช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ ในขั้นตอนการเตรียมสารสกัดออกจากตัวอย่างสามารถทำหลายเทคนิค ดังนี้

#### 3.1 วิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง (solid-phase extraction, SPE)

เทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งเป็นการแยกสารปนเปื้อนออกโดยให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ดูดซับบนวัฏภาคหนึ่ง (sorbent) จากนั้นเติมสารละลายเพื่อดึงเอาสารที่สนใจซึ่งเกาะ

กับวัฏภาคหนึ่งออก เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง 4 ขั้นตอน ดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 ขั้นตอนของการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง

ที่มา: Bio-analytical method development, validation and transfer by using LC-MS/MS – A review: online.

ซึ่งการแยกสารนี้มีขั้นตอนการทำงาน ดังนี้

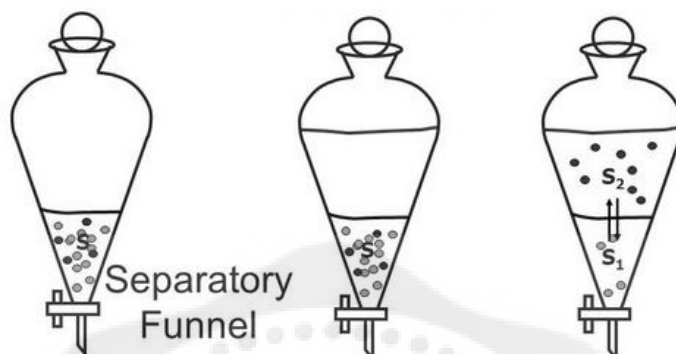
1. การเตรียมตัวดูดซับ (conditioning) เป็นการเตรียมสารดูดซับ ให้พร้อมใช้งาน โดยเติมสารละลายที่เหมาะสม
2. การเติมสารตัวอย่าง (loading) เป็นการเติมตัวอย่างเพื่อให้สารที่ต้องการวิเคราะห์จับกับตัวดูดซับ
3. การล้าง (washing) เป็นขั้นตอนการกำจัดสิ่งรบกวนหรือสารที่จับกับ sorbent ให้น้อยออก
4. การชะ (elution) เป็นขั้นตอนการดึงเอาสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่เกาะกับตัวดูดซับออกเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป โดยใช้สารละลายชะที่เหมาะสมชะสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกมา

วิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งเป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้สกัดสารอย่างแพร่หลาย แต่เทคนิคนี้มีข้อเสียหลายประการ ได้แก่ มีขั้นตอนการสกัดยุ่งยาก ใช้เวลาในการสกัดนาน และผู้วิเคราะห์ต้องมีความเชี่ยวชาญเนื่องจากต้องเลือกสารละลายที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการสกัดแต่ละขั้นตอน

### 3.2 วิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว (liquid-liquid extraction, LLE)

การสกัดด้วยวัฏภาคของเหลวเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารออกจากของผสมโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม เทคนิคนี้นิยมใช้ในการสกัดสารอินทรีย์ซึ่งอาจละลายหรือแขวนลอยอยู่

ในวัฏภาคน้ำ ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ เมื่อตั้งทิ้งไว้จะเกิดการแยกชั้น สารที่อยู่ในของผสมจะละลายอยู่ที่ชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และชั้นน้ำมากน้อยตามความสามารถในการละลายของสารในตัวทำละลายแต่ละชนิด ขั้นตอนการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลวแสดงดังภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 8 ขั้นตอนการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว

ที่มา: Alexis Allen. (2015).

ข้อเสียของวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว คือ ใช้เวลาในการสกัดนาน ใช้ปริมาณตัวอย่างมาก ใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดมากและส่วนใหญ่ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้มีความเป็นพิษทำให้ก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม

### 3.3 วิธีการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)

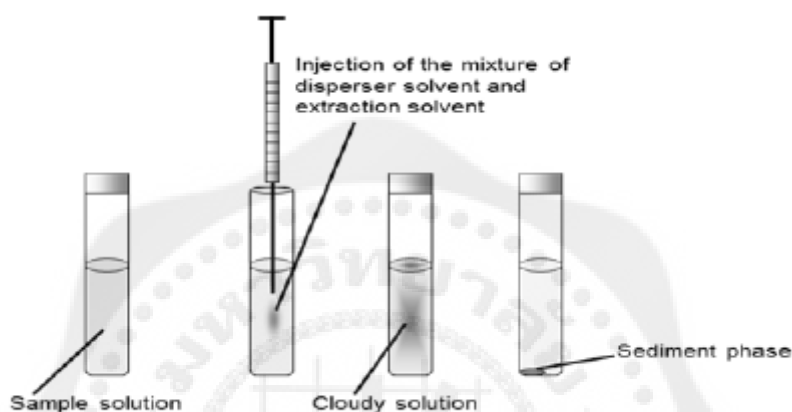
วิธีการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายถูกพัฒนาขึ้นในปีค.ศ. 2006 โดยอาศัยหลักการของระบบตัวทำละลาย 3 ส่วน ได้แก่

1. ตัวทำละลายที่ใช้สกัด (extraction solvent) โดยทั่วไปตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่ดีต้องมีความสามารถในการสกัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้สูง มีค่าการละลายน้ำต่ำ และมีความหนาแน่นมากกว่าน้ำ เช่น คลอโรเบนซีน คลอโรฟอร์ม เตตระคลอโรมีเทน เป็นต้น

2. ตัวทำละลายกระจายตัว (dispersive solvent) เป็นสารที่ช่วยให้ตัวทำละลายที่ใช้สกัดเกิดการแตกตัวเป็นหยดขนาดเล็ก และกระจายตัวในสารละลายตัวอย่างซึ่งมีน้ำเป็นองค์ประกอบ การเกิดหยดขนาดเล็กเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างตัวทำละลายและสารละลายตัวอย่าง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดและลดเวลาในการสกัด ตัวทำละลายกระจายตัวจะต้องละลายได้ดีทั้งในน้ำและตัวทำละลายสกัดเช่น อะซิโตน เมทานอล เอทานอล อะซิโตนไนไตรล์ เป็นต้น

3. สารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ (aqueous solvent)

โดยกระบวนการสกัดจะผสมตัวทำละลายที่ใช้สกัดปริมาณระดับไมโครลิตรกับตัวทำละลายกระจายตัวปริมาณระดับมิลลิลิตรในอัตราส่วนที่เหมาะสม เมื่อฉีดสารละลายผสมเข้าสู่สารละลายตัวอย่างอย่างรวดเร็วจะเกิดเป็นสารละลายขุ่น (cloudy solution) กระจายตัวไปทั่ว สารที่ต้องการสกัดจะเข้าไปในตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดซึ่งกระจายตัวทั่วสารละลายตัวอย่าง หลังจากนั้นนำไปเซนติฟิวจ์ตัวทำละลายที่ใช้สกัดจะแยกชั้นและนำไปวิเคราะห์ต่อไป (อภิญา นวคุณ. 2557: 230-232) ขั้นตอนการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายแสดงดังภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 : ขั้นตอนการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย

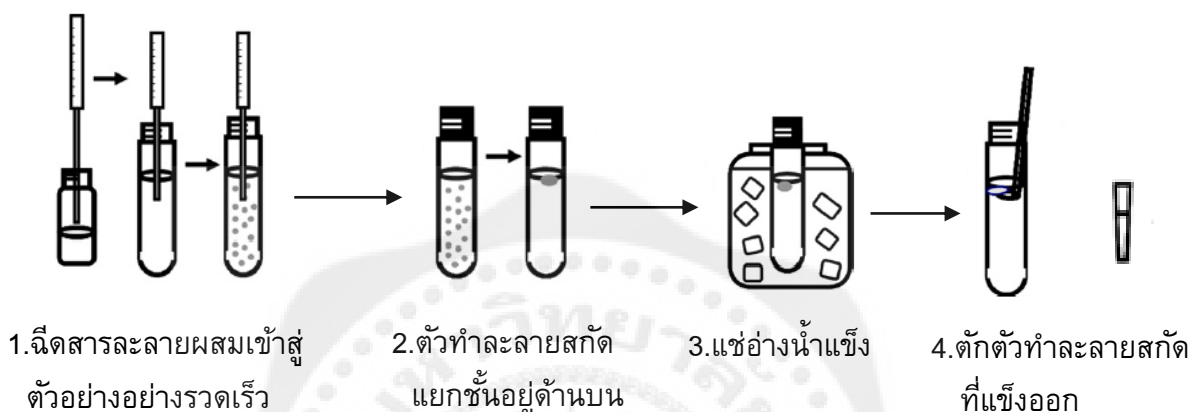
ที่มา: อภิญา นวคุณ. 2557: 231

วิธีการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายเป็นเทคนิคที่ง่าย ราคาถูก ใช้เวลาในการสกัดน้อย ใช้ปริมาณตัวอย่างและปริมาณตัวทำละลายที่ใช้สกัดน้อย แต่ตัวทำละลายที่ใช้สกัดที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษสูง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัดในการเตรียมตัวอย่างก่อนฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอลออกจากสารรบกวนในตัวอย่าง เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ช่วยให้ขั้นตอนการแยกตัวทำละลายที่ใช้สกัดหลังเซนตริฟิวจ์ง่ายขึ้น และลดการใช้ตัวทำละลายสกัดที่มีความเป็นพิษสูง โดยใช้สารกลุ่มแอลกอฮอล์ไขมัน (fatty alcohol) เป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัดแทน

กระบวนการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย ร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัด จะผสมตัวทำละลายที่ใช้สกัดกับตัวทำละลายกระจายตัวในอัตราส่วนที่เหมาะสม และฉีดสารละลายผสมดังกล่าวเข้าสู่สารละลายตัวอย่างอย่างรวดเร็วจะเกิดเป็นสารละลายขุ่นกระจายตัวไปทั่ว (cloudy solution) สารที่ต้องการสกัดจะเข้าไปในตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดซึ่งกระจายตัวทั่วสารละลายตัวอย่าง และนำไปเซนตริฟิวจ์ตัวทำละลายที่

ใช้สก็ดจะแยกชั้นลอยอยู่ด้านบนของสารละลาย จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งตัวทำละลายสก็ดจะเกิดการแข็งตัวเกิดขึ้น และทำการแยกตัวทำละลายสก็ดที่แข็งออกใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ตัวทำละลายที่ใช้สก็ดจะเกิดการหลอมเหลวทันทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายที่หลอมเหลวดังกล่าวไปตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง โดยมีขั้นตอนการสก็ดดังแสดงในภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 : ขั้นตอนการสก็ดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย ร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายที่ใช้สก็ด

ที่มา: ดัดแปลงจาก : Shang-Da Huang. (2008: 9).

ตัวทำละลายที่ใช้สก็ดที่ใช้ในเทคนิคนี้ต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้

1. มีความเป็นพิษต่ำ
2. มีความสามารถสกัดสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้สูง
3. สามารถละลายน้ำได้น้อย
4. มีความหนาแน่นต่ำกว่าน้ำ
5. มีจุดหลอมเหลวต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง



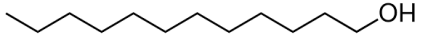
แอลกอฮอล์ไขมัน (fatty alcohol) เป็นวัตถุดิบหลักสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิว แอลกอฮอล์ไขมันมีคุณลักษณะเป็นแอมฟิฟิลิก (amphiphilic) คือมีโครงสร้างโมเลกุล 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ไม่มีขั้วหรือไม่ชอบน้ำเรียกว่า ลิโปฟิลิก (lipophilic) และส่วนที่ขั้วหรือส่วนที่ชอบน้ำ เรียกว่า ไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) แอลกอฮอล์ไขมันสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทตามโครงสร้างดังนี้

1. แอลกอฮอล์ไขมันอิมิตัว จะมีลักษณะเป็นของเหลวไม่มีสี สำหรับแอลกอฮอล์ไขมันอิมิตัวขนาดเล็ก และแอลกอฮอล์ไขมันอิมิตัวที่มีขนาดใหญ่จะมีลักษณะเป็นขี้ผึ้งที่เหนียวข้น มีความหนาแน่นจำเพาะต่ำกว่าน้ำ และกลั่นของแอลกอฮอล์ไขมันอิมิตัวที่มีขนาดใหญ่จะมีกลั่นน้อยกว่าแอลกอฮอล์ไขมันอิมิตัวขนาดเล็ก

2. แอลกอฮอล์ไขมันไม่อิ่มตัว เป็นแอลกอฮอล์ไขมันที่ผลิตได้จากธรรมชาติเท่านั้น ไม่สามารถผลิตจากกระบวนการทางปิโตรเคมีได้ แอลกอฮอล์ไขมันไม่อิ่มตัวจะมีหมู่ hydroxyl function ที่มี olefin อย่างน้อย 1 กลุ่มเพิ่มเข้ามา ทำให้มีจุดหลอมเหลวต่ำกว่าแอลกอฮอล์ไขมันอิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเดียวกันโดยมีอิทธิพลมาจากการจัดรูปแบบของพันธะคู่

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยทำการศึกษาชนิดของแอลกอฮอล์ไขมันอิ่มตัว 3 ชนิด ได้แก่ 2-เดคะนอล (2-decanol), 1-อุนเดคะนอล (1-undecanol) และ 1-โดเดคะนอล (1-dodecanol) ซึ่งแสดงดังตาราง 4 เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัด โดยนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย ร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลาย

ตาราง 4 ชนิดของแอลกอฮอล์ไขมันอิ่มตัว

แอลกอฮอล์ไขมันอิ่มตัว	สูตรโมเลกุล	สูตรโครงสร้าง	จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	ความหนาแน่น (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)
2-decanol	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O		6.4	0.83
1-Undecanol	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O		16	0.83
1-dodecanol	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O		22–24	0.83

ที่มา: ดัดแปลงจาก : Shaodong Jia; et al. (2013: 208).

เมื่อพัฒนาเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย ร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัดในการเตรียมตัวอย่างก่อนฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงจนได้สภาวะที่เหมาะสม ผู้วิจัยได้นำเทคนิคดังกล่าวมาประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด

#### 4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัด

##### 4.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

ในปี ค.ศ. 2004 ยองฮง ลี และคณะ (Yong-Hong Li. 2004: 709-713) ได้วิเคราะห์หาปริมาณวานิลลิน ยูจีนอล และไอโซยูจีนอลพร้อมกัน โดยใช้เครื่องรีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และใช้เมทานอลและสารละลายกรดอะซิติกเป็นเฟสเคลื่อนที่โดยใช้เป็นระบบเกรเดียนท์ (gradient) ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร จากการทดลองพบว่า วานิลลิน ยูจีนอล และไอโซยูจีนอลถูกชะออกจากคอลัมน์ที่เวลา 3.2 นาที, 10.7 นาที และ 14.4 นาที ตามลำดับ มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0-0.8 กรัมต่อลิตร, 0-1.5 กรัมต่อลิตร และ 0-1.0 กรัมต่อลิตร ค่า LOD = 6.79 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 0.51 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.099 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า recovery = 95.3%-99.7%, 95.0%-102.8% และ 96.4%-104.0% ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2012 เซียงเซง และคณะ (Xiang-Sheng. 2012: 1569-1573) ได้วิเคราะห์หาปริมาณ ยูจีนอล (eugenol), ไอโซยูจีนอล (isoeugenol), ไมริสทีซิน (myristicin) และ อีลีไมซิน (elemicin) ในตัวอย่างจันทร์เทศ โดยใช้เทคนิค supersonic fluid ในการสกัด และใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีในการตรวจวัด ซึ่งใช้สภาวะในการตรวจวัดคือ อุณหภูมิบริเวณจุดฉีดเท่ากับ 240 องศาเซลเซียส อุณหภูมิบริเวณตัวตรวจวัดเท่ากับ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิบริเวณคอลัมน์จะเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 40-220 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนความเร็ว 5 องศาเซลเซียสต่อนาที ใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพา ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่อนาที และจากผลการทดลองพบว่า ค่า recovery = 99.4%, 99.3%, 98.2% และ 98.8% ของ ยูจีนอล ไอโซยูจีนอล ไมริสทีซิน และ อีลีไมซิน ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2012 แอลเจิล รืออส และคณะ (Angel Rios. 2012: 7179-7185) ได้พัฒนาเทคนิคแคปิลลารีลิกวิดโครมาโทกราฟี (capillary liquid chromatography) ในการสกัดและวิเคราะห์สารในกลุ่มอัลคิลเบนซิน ทั้งหมด 6 ชนิดได้แก่ ยูจีนอล (eugenol), ไอโซยูจีนอล (isoeugenol), ยูจีนอลเมทิลอีเทอร์ (eugenol methyl ether), ไมริสทีซิน (myristicin), อนิโธล (anethole), เอสตราโกล (estragole) และสารแต่งกลิ่นในอาหาร 2 ชนิดในตัวอย่างอาหารคณะผู้วิจัย

ได้พัฒนาวิธีการสกัดโดยใช้คอลัมน์แคปิลลารี เป็นเฟสอยู่หนึ่งซึ่งสารต่างๆจะถูกแยกและเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของสารไปพร้อมกันก่อนจะถูกตรวจวัด จากผลจากทดลองพบว่าค่า LOD ของสารในกลุ่ม alkenylbenzenes เท่ากับ 97-148 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและค่า LOD ของสารแต่งกลิ่นอาหาร เท่ากับ 9.5-14.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า recovery ในช่วง 92%-110% และค่า RSD ต่ำกว่า 5% ในทุกตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้มีความถูกต้องแม่นยำในการวิเคราะห์สูง

ในปี ค.ศ. 2013 ไคทลิน เอ็น ฮาน และเจอร์มี อาร์ บูเก็ด (Caitlin N. Hahn & Jeremy R. Burkett. 2013: 28-31) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลในตัวอย่างใบกระเพราทั้งแบบสดและแห้ง ด้วยเทคนิคการสกัดแบบไหลย้อนกลับ (reflux) ร่วมกับเทคนิคการกลั่นด้วยไอน้ำในระบบขนาดเล็ก โดยนำตัวอย่างใบกระเพรามาสกัดแบบไหลย้อนกลับก่อน จากนั้นนำมาแยกกากออกและกรองเพื่อสกัดด้วยเทคนิคการกลั่นด้วยไอน้ำในระบบขนาดเล็กอีกครั้ง คณะผู้วิจัยได้วิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดยูจีนอลจากตัวอย่างใบกระเพราสดและแห้ง จากผลการทดลองพบว่า การสกัดยูจีนอลจากตัวอย่างใบกระเพราสดใช้เวลาสกัด 55 นาทีและตัวอย่างใบกระเพราแห้งใช้เวลาสกัด 40 นาทีจะทำให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบปริมาณยูจีนอลในตัวอย่างใบกระเพราแห้งมากกว่าตัวอย่างใบกระเพราสด

ในปี ค.ศ. 2015 ไช เสียน เฟิง และคณะ (Chia-Hsien Feng. 2015: 60-67) ได้พัฒนาวิธีการสกัดหาปริมาณสารในกลุ่ม phenylpropenes 6 ชนิด ประกอบด้วย อนีโทล (anethole), เอสตราโกล (estragole), ยูจีนอล (eugenol), เมทิลยูจีนอล (methyl eugenol), ซาฟรอล (safrole) และ ไมริสทีซิล (myristicin) ในตัวอย่างน้ำมันนวดตัวด้วยวิธีการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายและใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีในการตรวจวัด เนื่องจากการวิเคราะห์หาสาระสำคัญในตัวอย่างน้ำมัน สามารถทำได้ยาก คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายโดยใช้สารแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด และพบว่าการหาปริมาณยูจีนอลด้วยเทคนิคนี้มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 10-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า  $r^2 = 0.998$  ค่า LOD = 3.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า LOQ = 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า %RSD (within-run) = 1.34% - 1.92% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้มีความแม่นยำในการวิเคราะห์

ในปี ค.ศ. 2016 เจเนล อี โอเวน และคณะ (Janel E. Owens. 2016: 186-192) ได้วิเคราะห์หาปริมาณสารให้กลิ่นทั้งหมด 23 ชนิดโดยใช้เทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายในการสกัดควบคู่กับเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีในตัวอย่างเล้าวิสกี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการฉีด 500 ไมโครลิตรน้ำปราศจากไอออนและ 200 ไมโครลิตรคลอโรฟอร์มลงในสารละลายตัวอย่าง 500 ไมโครลิตรจากนั้นนำไปโซนิเคชันเป็นเวลา 5 นาที และนำไปหมุน

เหวี่ยงต่อเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำการแยกชั้นคลอโรฟอร์มไปตรวจวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์

#### 4.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย ร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัด

ในปี ค.ศ. 2013 นาซี เฟตเทฮี และคณะ (Nazir Fattahi. 2013: 378-385) ได้พัฒนาการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย ร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายที่ใช้สกัดในการสกัดยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในตัวอย่างพืชเขตร้อน ได้แก่ แตงกวา แตงโม และเมลอน โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีในการตรวจวัด คณะผู้วิจัยได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทดลองและศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม และจากการทดลองพบว่าให้ค่าความเป็นเส้นตรงในช่วง 5-800 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า LOD ในช่วง 1-4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และค่า recovery ในช่วง 44.0%-61.0% ซึ่งเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นเป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ง่ายและรวดเร็ว

ในปี ค.ศ. 2014 เซียงฮง เฮา และคณะ (Xiaohong Hou. 2014: 123-127) ได้พัฒนาการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย ร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายที่ใช้สกัดในการสกัดยาฆ่าแมลงในกลุ่มไพรีทรอยด์ทั้งหมด 8 ชนิดในตัวอย่างชา และใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีในการตรวจวัด คณะผู้วิจัยได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทดลองดังนี้ ชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายสกัด, ชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายกระจายตัว, เวลาในการสกัด, ค่า pH, และจากการทดลองด้วยสภาวะที่เหมาะสมพบว่าให้ค่า enrichment factors ในช่วง 292-883 สำหรับสารที่ต้องการวิเคราะห์ทั้ง 8 ชนิด, ค่าความเป็นเส้นตรงในช่วง 5-100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม, ค่า recovery ในช่วง 92.1%-99.6% และค่า RSD ต่ำกว่า 6% ซึ่งเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นง่าย รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง

ในปี ค.ศ. 2015 นาซี เฟตเทฮี และคณะ (Nazir Fattahi. 2015: 825-831) ได้พัฒนาวิธีการสกัดอิมิดาโคลพริด (imidacloprid) และไดอะซินอน (diazinon) ในตัวอย่างแอปเปิ้ลและแพร์ โดยพัฒนาเทคนิคโซนิเคชัน (sonication) และการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย ร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายที่ใช้สกัดในการสกัด และใช้เทคนิครีเวอร์สเฟสโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการตรวจวัด จากผลการทดลองพบว่าการสกัดด้วยเทคนิคนี้ให้ค่า extraction recovery = 58%- 67%, ค่าความเป็นเส้นตรงในช่วง 3-600 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม, ค่า LOD = 1-2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RSD (intra-day) = 4.3%-5.2%, ค่า RSD (inter-day)

= 5.5%-6.8%, และค่า recovery = 91.6%- 108% แสดงให้เห็นว่าเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องแม่นยำสูง มีความรวดเร็วในการสกัด และมีขั้นตอนการทดลองที่ง่าย

ในปี ค.ศ. 2016 โรซาเจอเซีย เออร์โรนา และคณะ (RosaGarcia-Arrona. 2016: 171-177) ได้พัฒนาการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย ร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำ ละลายที่ใช้สกัดในการสกัดสารในกลุ่มพาราเลต 5 ชนิดในตัวอย่างภาชนะบรรจุอาหาร และอาหาร และ ตรวจวัดด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี คณะผู้วิจัยได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม และผลการทดลองพบว่าให้ค่า enrichment factors ในช่วง 854-1893, ค่า LOD ในช่วง 0.64-2.82 ไมโครกรัมต่อลิตร และ ค่า RSD ในช่วง 2.7%-9.3%



### บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

### อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

#### 1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์ (diode array detector) จากบริษัท Agilent Technologies รุ่น 1260
- คอลัมน์ C<sub>18</sub> (VertiSep GES 5  $\mu$ m, ขนาด 250×4.60 mm) จากบริษัท Phenomenex
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น AB104-S) จากบริษัท Mettler
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออนรุ่น LaboStar จากบริษัท Siemens
- เครื่องอัลตราโซนิก (ultrasonic) จากบริษัท Mettler electronic
- เครื่องเขย่า (vortex) รุ่น Vortex-genie 2 จากบริษัท Scientific Industries
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Zentrifugen EBA 8S จากบริษัท Hettich
- ไมโครปิเปตขนาด 100 และ 1000 ไมโครลิตร จากบริษัท Socorex
- ชุดกรองแก้วภาคเคลื่อนที่ ขนาด 1000 มิลลิลิตร จากบริษัท Alltech
- ไซริงจ์ฟิลเตอร์ (syringe filters) ชนิด PTFE (polytetrafluoroethylene) ขนาด 0.45 ไมครอน จากบริษัท International Scientific

#### 2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- สารละลายมาตรฐานยูจีนอล (eugenol, AR grade) จากบริษัท sigma-aldrich
- สารละลายมาตรฐานไอโซยูจีนอล (isoeugenol, AR grade) จากบริษัท sigma-aldrich
- สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) จากบริษัท sigma-aldrich
- สารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก (ferulic acid) จากบริษัท sigma-aldrich
- สารละลายมาตรฐานกรดคาเฟอิก (caffeic acid) จากบริษัท sigma-aldrich
- สารละลายมาตรฐานกรดพารา-คูมาริก (p-comaric acid) จากบริษัท sigma-aldrich
- โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, AR grade) จากบริษัท RCI Lab San
- เมทานอล (methanol, HPLC grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents

- เอทานอล (ethanol, AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile, HPLC grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- อะซิโตน (acetone, AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- 2-decanol จากบริษัท Acros organics
- 1-undecanol จากบริษัท Acros organics
- 1-dodecanol จากบริษัท Acros organics

### 3. ตัวอย่างยาไทยพื้นบ้าน

ยาดองเหล้า

ยาราศุนิดน้ำ

ยาแก้ไอชนิดน้ำ

ซื้อจากร้านขายยาทั่วไปในเขตจังหวัดกรุงเทพมหานคร



## วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัดที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

ในการศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ได้ทำการศึกษา ดังนี้

- 1.1 ชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว
- 1.2 อัตราส่วนและปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว
- 1.3 ความเข้มข้นของเกลือ
- 1.4 เวลาที่ทำให้ตัวทำละลายสกัดแข็งตัว

### 1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว

#### 1.1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัด

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัดที่นำมาใช้ในการทดลองทั้งหมด 3 ชนิดได้แก่ 2-decanol, 1-undecanol และ 1-dodecanol โดยทำการทดลองดังนี้

1.1.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอล เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.1.1.2 บีบอัดสารละลาย 1.00 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร

1.1.1.3 เตรียมสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 2-decanol และตัวทำละลายกระจายตัวเมทานอล ที่อัตราส่วน 1:4 v/v จากนั้นนำไปทำให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที

1.1.1.4 ฉีดสารละลายผสม ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในสารละลายอย่างรวดเร็ว แล้วเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 วินาทีและนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จะแยกออกเป็นสองชั้น

1.1.1.5 นำสารละลายไปแช่ในอ่างน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตัวทำละลายสกัดที่แยกชั้นอยู่ด้านบนจะเกิดการแข็งตัว

1.1.1.6 แยกตัวทำละลายสกัดที่แข็งตัวใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตัวทำละลายสกัดจะเกิดการหลอมเหลวทันทีที่อุณหภูมิห้อง

1.1.1.7 บีบอัดสารละลายที่สกัดได้ 50 ไมโครลิตรเจือจางด้วยเมทานอลเป็น 150 ไมโครลิตร และกรองสารละลายด้วยไซรินจ์ฟิลเตอร์เมมเบรนชนิดเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน

1.1.1.8 นำสารละลายที่สกัดได้ไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

1.1.1.9 ในทำนองเดียวกันทำการทดลองตามวิธีข้างต้น โดยเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเป็น 1-undecanol และ 1-dodecanol ตามลำดับ เพื่อศึกษาหาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่เหมาะสม (ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

### 1.1.2 ชนิดของตัวทำละลายกระจายตัว

ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่นำมาใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล, อะซิโตน และ อะซิโตนไไตรล์ โดยทำการทดลองตามตอนที่ 1.1 (ทั้งนี้การศึกษาแต่ละอัตราส่วนให้ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

## 1.2 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว

### 1.2.1 ศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว

ทำการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว ที่ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 v/v โดยทำการทดลองตามตอนที่ 1.1 (ทั้งนี้การศึกษาแต่ละอัตราส่วนให้ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

### 1.2.2 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว

ทำการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายผสม ที่ปริมาตร 250, 500, 750, 1000 และ 1500 ไมโครลิตร โดยทำการทดลองตามตอนที่ 1.1 (ทั้งนี้การศึกษาแต่ละอัตราส่วนให้ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

## 1.3 ศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของเกลือที่มีผลต่อการสกัด

ทำการศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เติมลงในสารละลายที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้น 0%, 2%, 4%, 6%, 8% และ 10% (w/v) โดยทำการทดลองตามตอนที่ 1.1 (ทั้งนี้การศึกษาแต่ละอัตราส่วนให้ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

## 1.4 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้ตัวทำละลายสกัดแห้งตัว

ทำการศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการแช่ตัวทำละลายสกัดในอ่างน้ำแข็งที่เวลา 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 และ 25.0 นาที โดยทำการทดลองตามตอนที่ 1.1 (ทั้งนี้การศึกษาแต่ละอัตราส่วนให้ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ตอนที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

### 2.1 ศึกษาความเหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

ทำการศึกษาโดยกำหนดสภาวะต่างๆ ดังนี้

- ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
- อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- คอลัมน์ VertiSep GES C18 ขนาด 5  $\mu\text{m}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm )
- ศึกษาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทานอลและน้ำปราศจากไอออน

ที่อัตราส่วน 60:40, 63:37, 65:35, 70:30 และ 75:25

- ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 2.2 ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

ทำการศึกษาโดยกำหนดสภาวะต่างๆ ดังนี้

- ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอล 10 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร

- คอลัมน์ VertiSep GES C18 ขนาด 5  $\mu\text{m}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm )
- วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ได้จากการทดลองข้อที่ 3.1
- ศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ 0.7 0.8 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3)

ตอนที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

### 3.1 กราฟมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

การเตรียมสารมาตรฐานทำการทดลองโดยใช้สารมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่ความเข้มข้น คือ 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

3.1.1 เตรียมสารมาตรฐานยูจีนอลที่ความเข้มข้น คือ 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และไอโซยูจีนอลที่ความเข้มข้น คือ 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0 และ 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.1.2 นำสารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่เตรียมได้กรองผ่านไซริงจ์ฟิลเตอร์เมมเบรน ชนิดเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน

3.1.3 นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมทุกระดับความเข้มข้น วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงปริมาตร 20 ไมโครลิตร และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.1.4 สร้างกราฟมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอล โดยสร้างความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัญญาณพื้นที่ใต้พีค (แกน Y) กับค่าความเข้มข้นของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลหน่วย ppm (แกน X)

### 3.2 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ทำการศึกษาโดยใช้สารมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่ความเข้มข้นต่ำๆ โดยทำการทดลองดังนี้

3.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่ความเข้มข้นต่ำ

3.2.2 นำสารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่เตรียมได้กรองผ่านไซริงจ์ฟิลเตอร์เมมเบรน ชนิดเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน

3.2.3 วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงปริมาตร 20 ไมโครลิตร และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ทำการทดลอง 10 ซ้ำ

3.2.4 คำนวณหาค่า LOD โดยค่า LOD จะให้สัญญาณเป็น 3 เท่า ของสัญญาณ noise (S/N) จากนั้นคำนวณหาค่า LOD ดังสมการที่ 1

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

### 3.3 ศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ทำการศึกษาโดยใช้สารมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่ความเข้มข้นต่ำๆ โดยทำการทดลองดังนี้

3.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่ความเข้มข้นต่ำ

3.3.2 นำสารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่เตรียมได้กรองผ่านไซริงจ์ฟิลเตอร์เมมเบรน ชนิดเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน

3.3.3 วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงปริมาตร 20 ไมโครลิตร และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ทำการทดลอง 10 ซ้ำ

3.3.4 คำนวณหาค่า LOQ โดยค่า LOQ จะให้สัญญาณเป็น 10 เท่า ของสัญญาณ noise (S/N) จากนั้นคำนวณหาค่า LOQ ดังสมการที่ 2

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

### 3.4 ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

การศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทำการศึกษาโดยการหาค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ทำการทดลองดังนี้

3.4.1 นำสารละลายตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 เติมสารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอล เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4.2 จากนั้นบีบเปิดสารละลายตัวอย่าง 1.00 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร

3.4.3 เตรียมสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดที่ 1-undecanol และตัวทำละลายกระจายตัวเมทานอล ที่อัตราส่วน 1:4 v/v จากนั้นนำไปทำให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที

3.4.4 ฉีดสารละลายผสมปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในสารละลายอย่างรวดเร็ว แล้วเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 วินาทีและนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จะแยกออกเป็นสองชั้น

3.4.5 นำสารละลายไปแช่ในอ่างน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตัวทำละลายสกัดที่แยกชั้นอยู่ด้านบนจะเกิดการแข็งตัว

3.4.6 แยกตัวทำละลายสกัดที่แข็งตัวใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตัวทำละลายสกัดจะเกิดการหลอมเหลวทันทีที่อุณหภูมิห้อง

3.4.7 บีบเปิดสารละลายที่สกัดได้ 50 ไมโครลิตรเจือจางด้วยเมทานอลเป็น 150 ไมโครลิตร และกรองสารละลายด้วยไซรินจ์ฟิลเตอร์เมมเบรนชนิดเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมครอน

3.4.8 นำสารละลายที่สกัดได้ไปฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละการได้กลับคืนดังสมการที่ 3

$$\text{ร้อยละการกลับคืน} = \frac{((C_{\text{in sample}} + C_{\text{added}}) - C_{\text{in sample}})}{C_{\text{added}}} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

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

### 3.5 ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision)

ทำการศึกษาความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ โดยการทำการทดลองซ้ำภายในวันเดียวกัน (intra-day precision) จำนวน 10 ซ้ำ และทำการทดลองซ้ำระหว่างวันเป็นระยะเวลา 3 วัน (inter-day precision) ซึ่งทำการทดลองซ้ำวันละ 10 ซ้ำ โดยทำการทดลองตามข้อ 3.4 โดยทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (% relative standard deviation , %RSD) ดังสมการที่ 4

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

#### ตอนที่ 4 การศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง

ศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง โดยศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิก กรดเพอร์รูติก กรดคาเฟอิก และ กรดพารา-คูมาริก โดยทำการทดลองดังนี้

4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานของยูจีนอล ไอโซยูจีนอล กรดแกลลิก กรดเพอร์รูติก กรดคาเฟอิก และกรดพารา-คูมาริก ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2 นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมผ่านการสกัดด้วยเทคนิค DLLME-SFO

4.3 นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูงปริมาตร 10 ไมโครลิตร และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

#### ตอนที่ 5 การวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทย

ตัวอย่างยาไทย จัดซื้อจากร้านขายยาในเขตกรุงเทพมหานคร โดยทำการเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.4 โดยนำสารตัวอย่าง ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตรมาใช้ในการทดลองบันทึกค่าพื้นที่ใต้กราฟเพื่อนำไปเทียบกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้ จากนั้นคำนวณหาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างแต่ละชนิด โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

สำหรับการศึกษการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยเสนอผลการวิจัยตามลำดับดังนี้

**ตอนที่ 1** ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัดที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

**ตอนที่ 2** ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

**ตอนที่ 3** ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

**ตอนที่ 4** ศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง

**ตอนที่ 5** วิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด

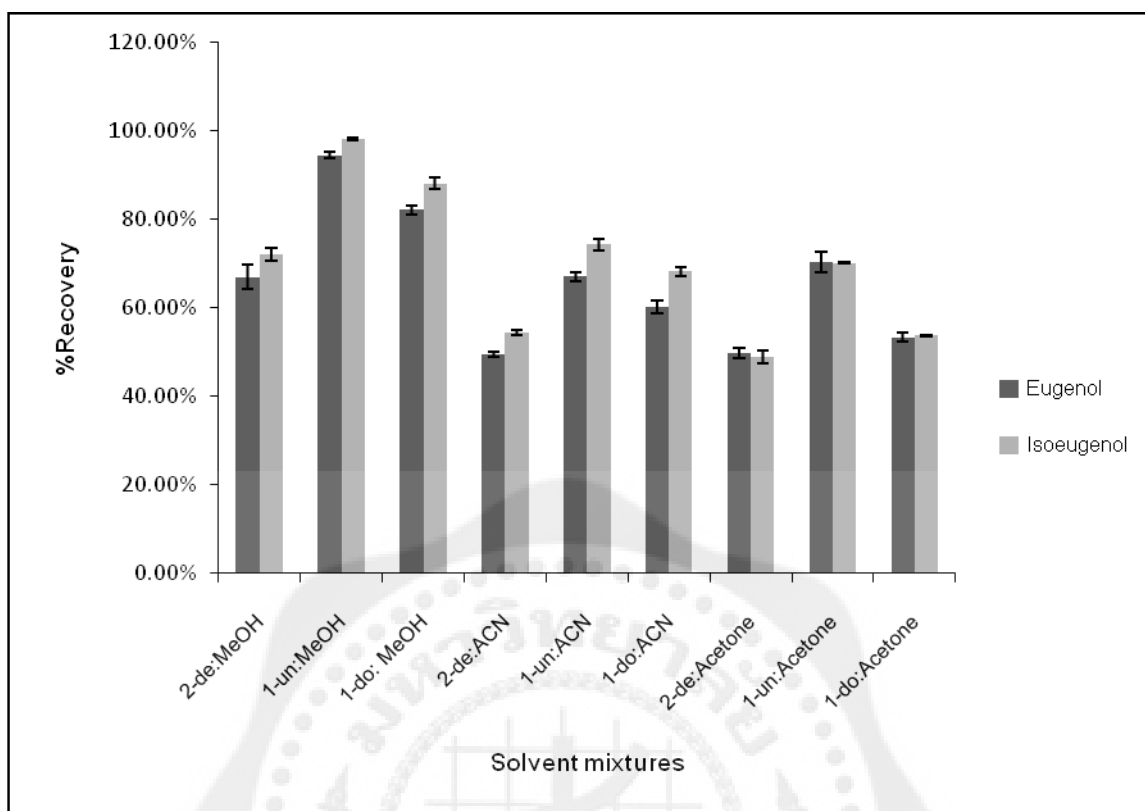
**ตอนที่ 1** ศึกษาผลของตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัดที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

ในการศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ได้ทำการศึกษา ดังนี้

- 1.1 ชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว
- 1.2 อัตราส่วนและปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว
- 1.3 ความเข้มข้นของเกลือ
- 1.4 เวลาที่ทำให้ตัวทำละลายสกัดแข็งตัว

#### 1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว

ชนิดของตัวทำละลายสกัดที่นำมาใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 3 ชนิดประกอบด้วย ตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติ มีความเป็นพิษต่ำ, สามารถละลายน้ำได้น้อย, มีความหนาแน่นต่ำกว่าน้ำ และมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง ได้แก่ 2-decanol, 1-undecanol และ 1-dodecanol และชนิดของตัวทำละลายกระจายตัวที่ใช้ในการสกัดที่นำมาใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล อะซิโตน และ อะซิโตนไตรเอทิล โดยจากภาพประกอบ 11 เป็นการแสดงผลการทดลองการสกัดโดยใช้สารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัวในอัตราส่วน 1:4 โดยนำสารละลายผสมปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาสกัดด้วยวิธี DLLME-SFO



ภาพประกอบ 11 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว

#### หมายเหตุ

- 2-de:MeOH แทน สารละลายสกัด 2-decanol และ สารละลายกระจายตัวเมทานอล  
 1-un:MeOH แทน สารละลายสกัด 1-undecanol และ สารละลายกระจายตัวเมทานอล  
 1-do:MeOH แทน สารละลายสกัด 1-dodecanol และ สารละลายกระจายตัวเมทานอล  
 2-de:ACN แทน สารละลายสกัด 2-decanol และ สารละลายกระจายตัวอะซิโตนไนโตรล์  
 1-un:ACN แทน สารละลายสกัด 1-undecanol และ สารละลายกระจายตัวอะซิโตนไนโตรล์  
 1-do:ACN แทน สารละลายสกัด 1-dodecanol และ สารละลายกระจายตัวอะซิโตนไนโตรล์  
 2-de:Acetone แทน สารละลายสกัด 2-decanol และ สารละลายกระจายตัวอะซิโตน  
 1-un:Acetone แทน สารละลายสกัด 1-undecanol และ สารละลายกระจายตัวอะซิโตน  
 1-do:Acetone แทน สารละลายสกัด 1-dodecanol และ สารละลายกระจายตัวอะซิโตน

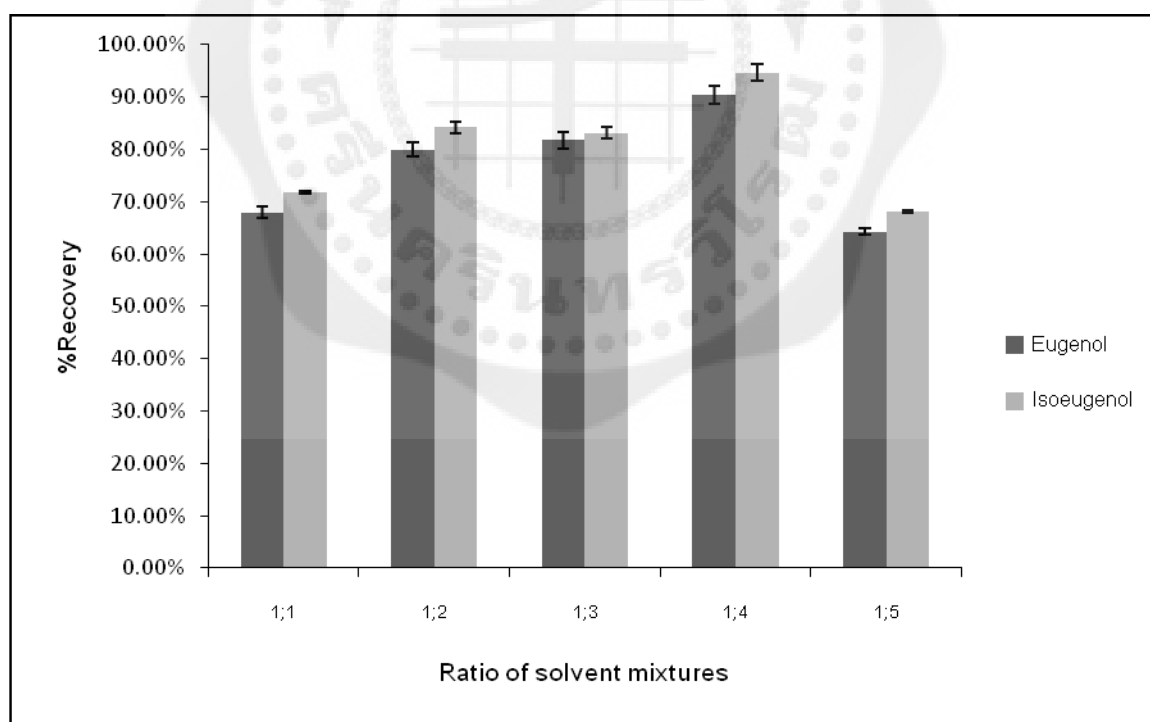
เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีของตัวทำละลายสกัดที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีลำดับความมีขั้วจากมากไปหาน้อยคือ 2-decanol > 1-undecanol > 1-dodecanol ตามลำดับ และเนื่องจากยูจีนอลและไอโซยูจีนอลเป็นสารที่มีความมีขั้วค่อนข้างต่ำ ตัวทำละลายสกัดที่นำมาใช้จึงควรเป็นสารที่มีความเป็นขั้วต่ำ จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อทำการสกัดด้วยตัวทำละลายสกัด

1-undecanol จะให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงสุด เนื่องจากยูจีนอลและไอโซยูจีนอลเป็นสารที่มีความ มีขั้วค่อนข้างต่ำแต่ยังมีโครงสร้างบางส่วนที่มีคุณสมบัติที่มีขั้ว ทำให้การสกัดด้วยตัวทำละลายสกัด 1-undecanol จะให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลาย 1-dodecanol และจาก การศึกษาพบว่าสารละลายผสมระหว่างสารละลายสกัด 1-undecanol และ สารละลายกระจายตัว เมทานอลให้ประสิทธิภาพในการสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอลได้สูงสุด โดยให้ค่าร้อยละการคืนกลับ ในการสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอลมากกว่า ร้อยละ 90 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกสารละลาย ดังกล่าวมาใช้ในการทดลอง

## 1.2 ศึกษาปริมาณของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว

### 1.2.1 ศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด และตัวทำละลายกระจายตัวที่ใช้ในการสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่อัตราส่วน 1:1 v/v, 1:2 v/v, 1:3 v/v, 1:4 v/v และ 1:5 v/v ตามลำดับ แสดงดังภาพประกอบ 12

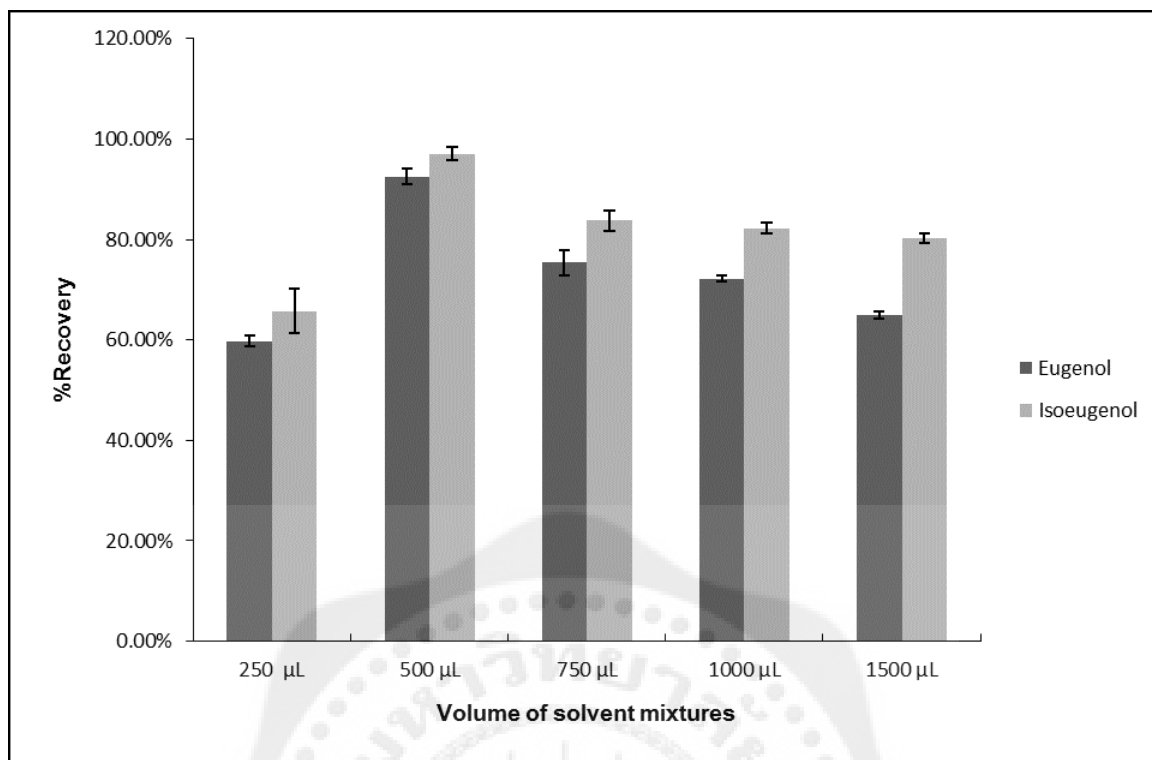


ภาพประกอบ 12 ผลการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว

จากภาพประกอบ 12 ซึ่งแสดงผลการทดลองการสกัดโดยนำสารละลายผสมระหว่างสารละลายสกัดคือ 1-undecanol และสารละลายกระจายตัวคือ เมทานอลที่อัตราส่วนต่างๆ มาปริมาตร 500 ไมโครลิตร สกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในสารละลายปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิค DLLME-SFO ที่พัฒนาขึ้น ทั้งนี้ผลการทดลองในภาพ แสดงให้เห็นว่า อัตราส่วนสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัวที่อัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 ให้ประสิทธิภาพร้อยละการคืนกลับเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ช่วงร้อยละ 60-90 ตามลำดับ เนื่องจากในการเพิ่มปริมาตรสารละลายกระจายตัวทำให้การกระจายตัวของตัวทำละลายสกัดเพิ่มขึ้นนับเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างตัวทำละลายสกัดและสารตัวอย่าง ซึ่งในที่นี้คือสารละลายมาตรฐาน ยูจีนอลและไอโซยูจีนอล จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดให้ดีขึ้น จากผลการศึกษาพบว่าที่อัตราส่วน 1:4 ให้ประสิทธิภาพร้อยละการคืนกลับสูงที่สุดโดยมีค่าร้อยละการคืนกลับมากเกินร้อยละ 90 อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ได้ทดลองเพิ่มปริมาตรสารละลายกระจายตัวมากขึ้นทำให้มีอัตราส่วนเป็น 1:5 กลับให้ผลการสกัดสารตัวอย่างลดลง ทั้งนี้แสดงแนวโน้มของให้ประสิทธิภาพการสกัดร้อยละการคืนกลับเพียง ร้อยละ 60 สาเหตุอาจเป็นผลจากการใช้สารละลายกระจายตัวมากเกินไปทำให้ยูจีนอลและไอโซยูจีนอลสามารถละลายในสารละลายได้เพิ่มขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพการสกัดในชั้นของตัวทำละลายสกัดลดลง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 1-undecanol และตัวทำละลายกระจายตัวเมทานอลที่อัตราส่วน 1:4 เพื่อใช้ในการสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

### 1.2.2 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัวได้แก่ 250, 500, 750, 1000 และ 1500 ไมโครลิตร ตามลำดับ โดยภาพประกอบ 13 แสดงผลการทดลองการศึกษปริมาตรที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอล โดยใช้ตัวทำละลายสกัด 1-undecanol และตัวทำละลายกระจายตัวเมทานอลที่อัตราส่วน 1:4 และนำสารละลายปริมาตร 1000 ไมโครลิตร มาสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอลด้วยเทคนิค DLLME-SFO ที่พัฒนาขึ้น โดยพบว่าสารละลายผสมที่ปริมาตรรวม 250 ไมโครลิตร ให้ประสิทธิภาพร้อยละการคืนกลับน้อย เนื่องจากการใช้ปริมาตรตัวทำละลายสกัดน้อยเกินไปจะส่งผลให้การสกัดเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ สำหรับสารละลายผสมที่ปริมาตรรวม 500 ไมโครลิตร ให้ประสิทธิภาพร้อยละการคืนกลับสูงที่สุดคือ ยูจีนอลมีร้อยละการคืนกลับ 92.49 และไอโซยูจีนอลมีร้อยละการคืนกลับ 97.11 และที่ปริมาตร 750 ไมโครลิตร 1000 ไมโครลิตร และ 1500 ไมโครลิตร มีแนวโน้มที่ให้ประสิทธิภาพร้อยละการคืนกลับลดลงเรื่อยๆตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มปริมาตรของสารละลายผสมจะส่งผลทำให้ความเข้มข้นของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลลดลง และการเพิ่มปริมาตรตัวทำละลายกระจายมากขึ้นจะส่งผลทำให้ยูจีนอลและไอโซยูจีนอลมีความสามารถในการละลายในของสารละลายตัวอย่างเพิ่มมากขึ้นจึงทำให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลง

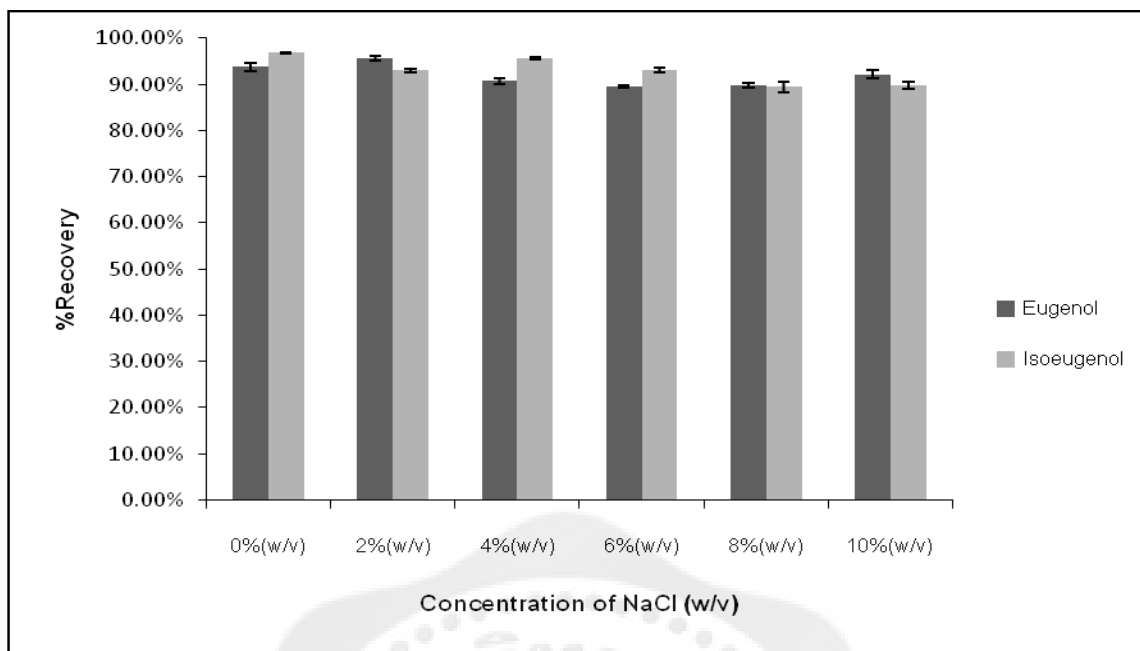


ภาพประกอบ 13 ผลการศึกษาปริมาณของตัวทำละลายผสมที่เหมาะสม

### 1.3 ศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของเกลือที่มีผลต่อการสกัด

การศึกษาคความเข้มข้นของเกลือที่เติมลงในสารละลายที่เหมาะสม ทำการศึกษาคความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0%, 2%, 4%, 6%, 8% และ 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ซึ่งใช้สารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัด 1-undecanol และตัวทำละลายกระจายตัว เมทานอลที่อัตราส่วน 1:4 และปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำมาสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในสารละลายปริมาตร 1.00 มิลลิลิตรด้วยเทคนิค DLLME-SFO ที่พัฒนาขึ้น โดยภาพประกอบ 14

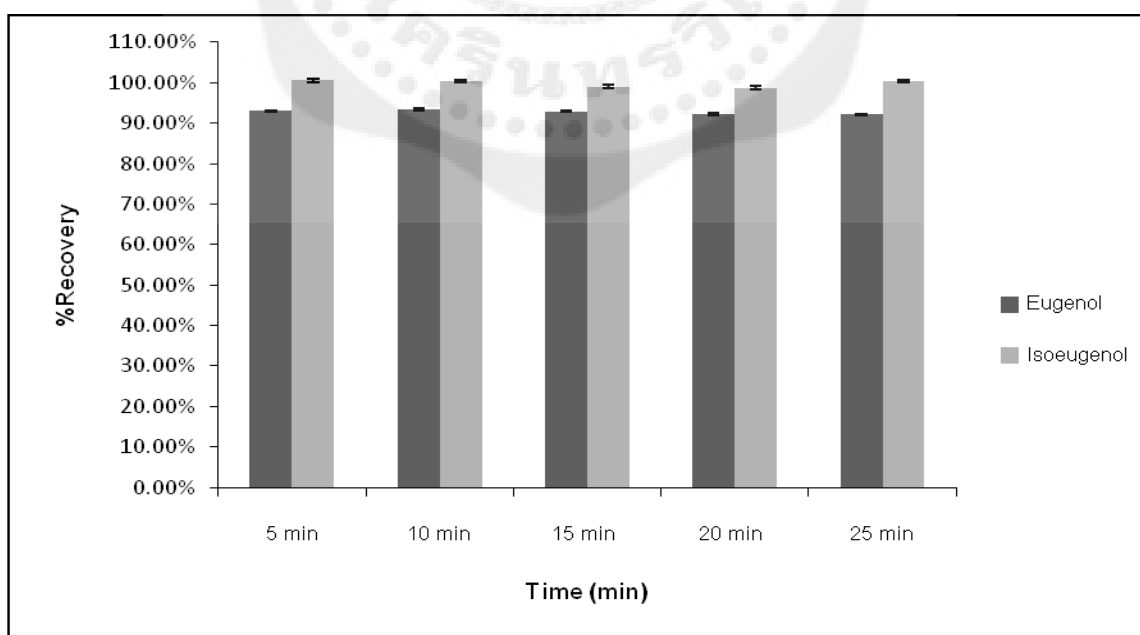
จากการศึกษาพบว่า การเติมไม่ส่งผลต่อการสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอล ซึ่งโดยทั่วไป การเติมเกลือจะช่วยให้สารที่ต้องการวิเคราะห์มีความสามารถในการละลายในสารตัวอย่างลดลง และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด (Nazir Fattahi, 2015: 825-831) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงไม่มีการเติมเกลือในการสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอล



ภาพประกอบ 14 แสดงผลการศึกษาค้นหาความเข้มข้นเกลือที่เหมาะสมในการทดลอง

#### 1.4 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้ตัวทำละลายสกัดแห้งตัว

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาค้นหาเวลาที่เหมาะสมในการแช่ตัวทำละลายสกัดในอ่างน้ำแข็งเนื่องจาก ตัวทำละลายสกัดที่ใช้ในการทดลองมีระยะเวลาที่ใช้ในการแห้งตัวแตกต่างกัน โดยภาพประกอบ 15



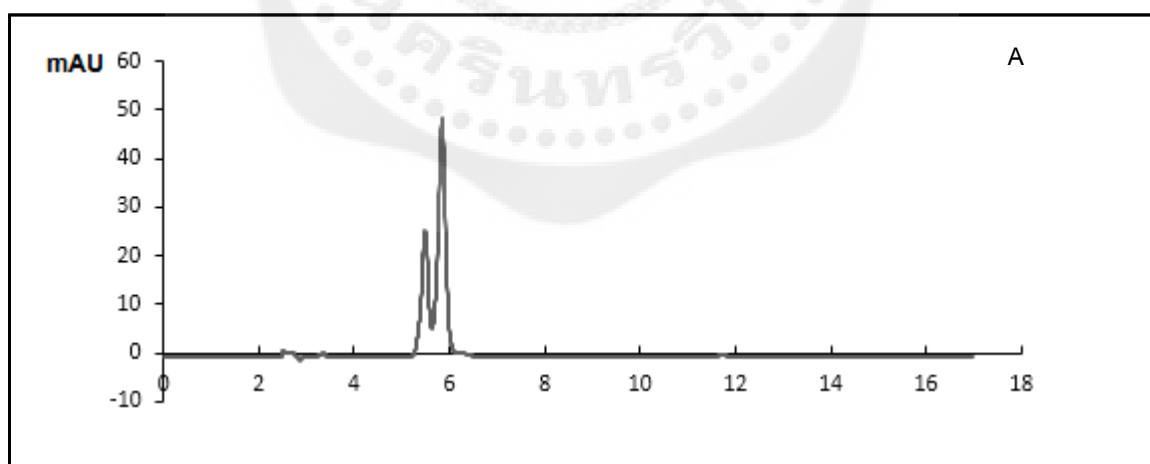
ภาพประกอบ 15 แสดงผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้ตัวทำละลายสกัดแห้งตัว

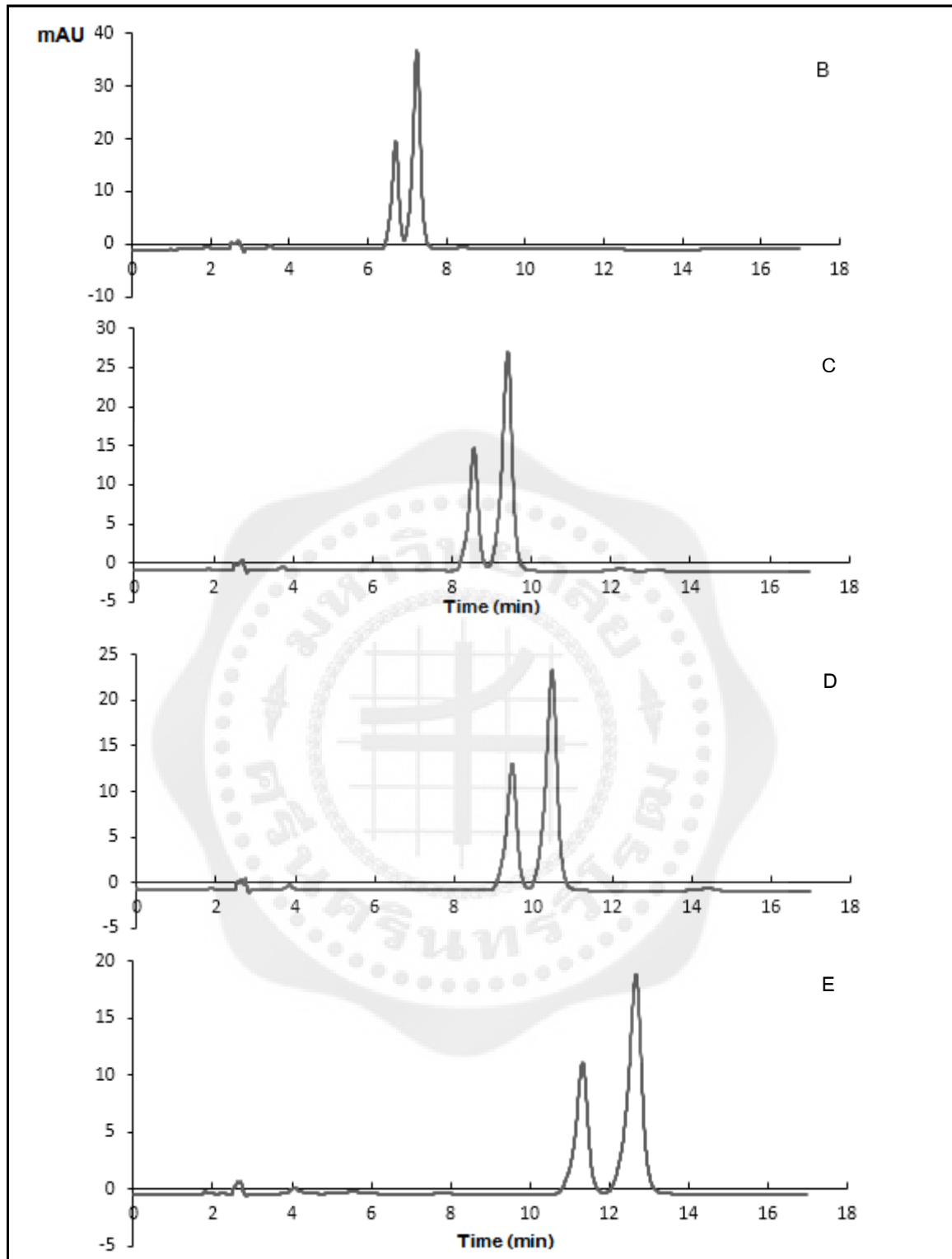
จากการศึกษาพบว่า 1-undecanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายสกัดเริ่มเกิดการแข็งตัวที่เวลา 5.0 นาที จากภาพประกอบ 14 พบว่าเวลาที่ทำให้ 1-undecanol เกิดการแข็งตัวที่ 5.0 10.0 15.0 20.0 และ 25.0 นาที มีประสิทธิภาพการสกัดที่ใกล้เคียงกัน โดยเมื่อทำการสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอล ด้วยเทคนิค DLLME-SFO พบว่า การใช้เวลาในการปล่อยให้ตัวอย่างแข็งตัวนาน 5 นาที จะสามารถสกัดสารทั้งสอง โดยสกัดยูจีนอลให้ร้อยละการคืนกลับ 92.96% และไอโซยูจีนอลมีร้อยละการคืนกลับ 100.55% เนื่องจากใช้เวลาในการสกัดน้อยที่สุดและให้ประสิทธิภาพการสกัดในขั้นตอนการสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอลสูง แต่อย่างไรก็ตามการปล่อยให้ใช้เวลาในการแข็งตัวนานขึ้นนั้นก็ไม่ได้ผลการสกัดที่แตกต่างกว่านี้อย่างมีนัยสำคัญ ฉะนั้นเพื่อความสะดวกรวดเร็วและมีประสิทธิภาพดี ในงานวิจัยนี้จึงเลือกเวลาที่ 5.0 นาทีซึ่งจัดเป็นระยะเวลาน้อยที่สุดและเหมาะสม ในการแช่ตัวทำละลายสกัดในอ่างน้ำแข็งเพื่อใช้ในการทดลองนี้

**ตอนที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล โดยใช้เทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง**

### 2.1 ศึกษาความเหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

ศึกษาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทานอลและน้ำปราศจากไอออนที่อัตราส่วน 60:40, 63:37, 65:35, 70:30 และ 75:25 โดยกำหนดอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจากภาพประกอบ 16





ภาพประกอบ 16 แสดงผลการศึกษ้อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่  
 ภาพ A แทน วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทานอลและน้ำปราศจากไอออนที่อัตราส่วน 75:25  
 ภาพ B แทน วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทานอลและน้ำปราศจากไอออนที่อัตราส่วน 70:30  
 ภาพ C แทน วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทานอลและน้ำปราศจากไอออนที่อัตราส่วน 65:35

ภาพ D แทน ภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทานอลและน้ำปราศจากไอออนที่อัตราส่วน 63:37

ภาพ E แทน ภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทานอลและน้ำปราศจากไอออนที่อัตราส่วน 60:40

งานวิจัยครั้งนี้พิจารณาค่าการแยกเพื่อศึกษาอัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 1 และแสดงค่าการแยกของอัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ต่างๆ ดังตาราง 5 โดยค่าการแยก มีความสำคัญในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีสารหลายตัวผสมกัน สารแต่ละชนิดควรแยกกันได้อย่างสมบูรณ์ เกณฑ์ยอมรับค่าจากการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ ค่าการแยก ต้องมีค่ามากกว่า 1.5

$$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 - w_2) \quad \dots\dots 1)$$

$R_s$  = ค่าการแยก (separation factor)

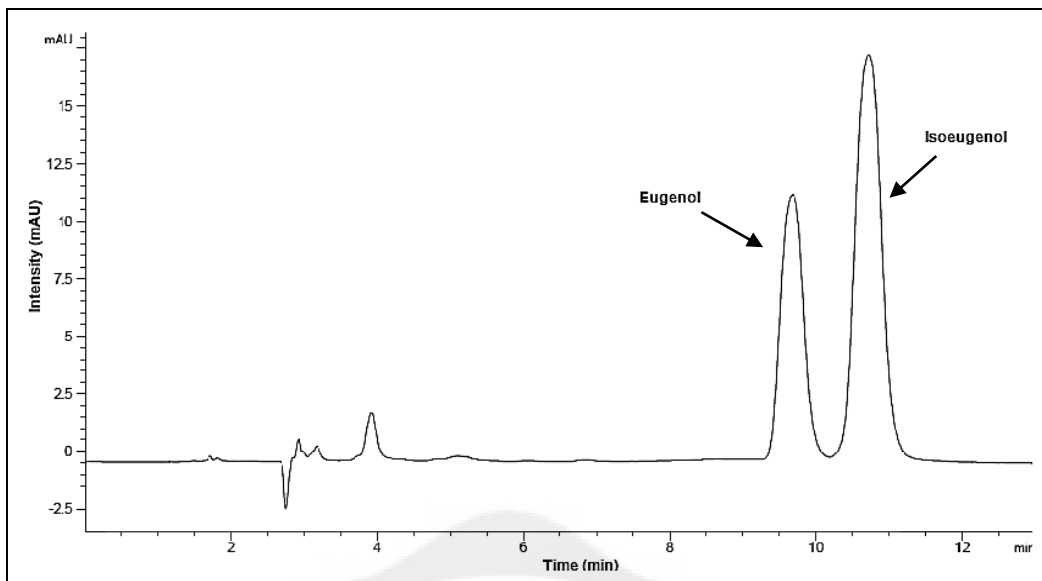
$T_{R1}, T_{R2}$  = รีเทนชันไทม์ (retention time) ของสารตัวที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

$w_1, w_2$  = ความกว้างที่ฐานพีกของสารตัวที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

จากผลการศึกษาพบว่าที่อัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างเมทานอลและน้ำปราศจากไอออน ที่อัตราส่วน 60:40, 63:37, 65:35, 70:30 และ 75:25 ให้ค่าการแยกมากกว่า 1.5 แต่เมื่อพิจารณาจากโครมาโทแกรมจากภาพประกอบ 16 พบว่า ที่อัตราส่วน 65:35, 70:30 และ 75:25 ฐานพีกของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลไม่สามารถแยกออกจากกันได้ และที่อัตราส่วน 63:37 และ 60:40 สามารถแยกพีกในโครมาโทแกรมของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลซึ่งเป็นไอโซเมอร์กันออกจากกันอย่างสมบูรณ์ โดยที่อัตราส่วน 63:37 ให้ค่าการแยก คือ 3.083 และใช้เวลาในกระบวนการแยกน้อยกว่าที่อัตราส่วน 60:40 คือรีเทนชันไทม์ของยูจีนอลเท่ากับ 9.5 และรีเทนชันไทม์ของไอโซยูจีนอลเท่ากับ 10.5 ซึ่งโครมาโทแกรมแสดงดังภาพประกอบ 17 ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงใช้เมทานอล : น้ำปราศจากไอออนที่ 63:37 เป็นอัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่การทดลอง

ตาราง 5 แสดงค่าการแยกของอัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ต่างๆ

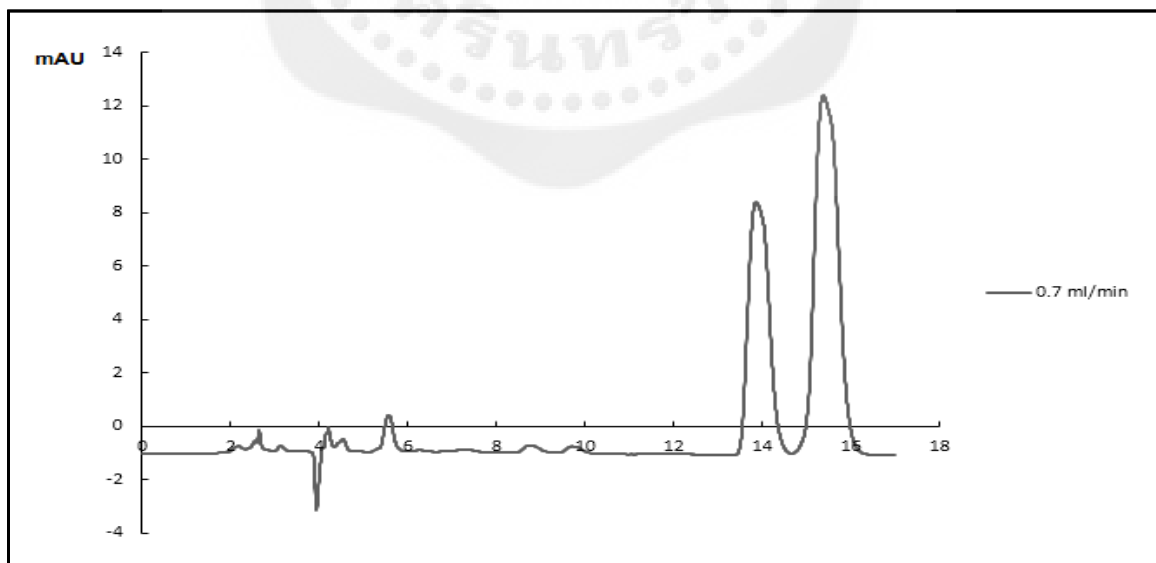
อัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ (เมทานอล : น้ำปราศจากไอออน)	ค่าการแยก ( $R_s$ )
75 : 25	2.229
70 : 30	2.512
65 : 35	2.939
63 : 37	3.083
60 : 40	3.415

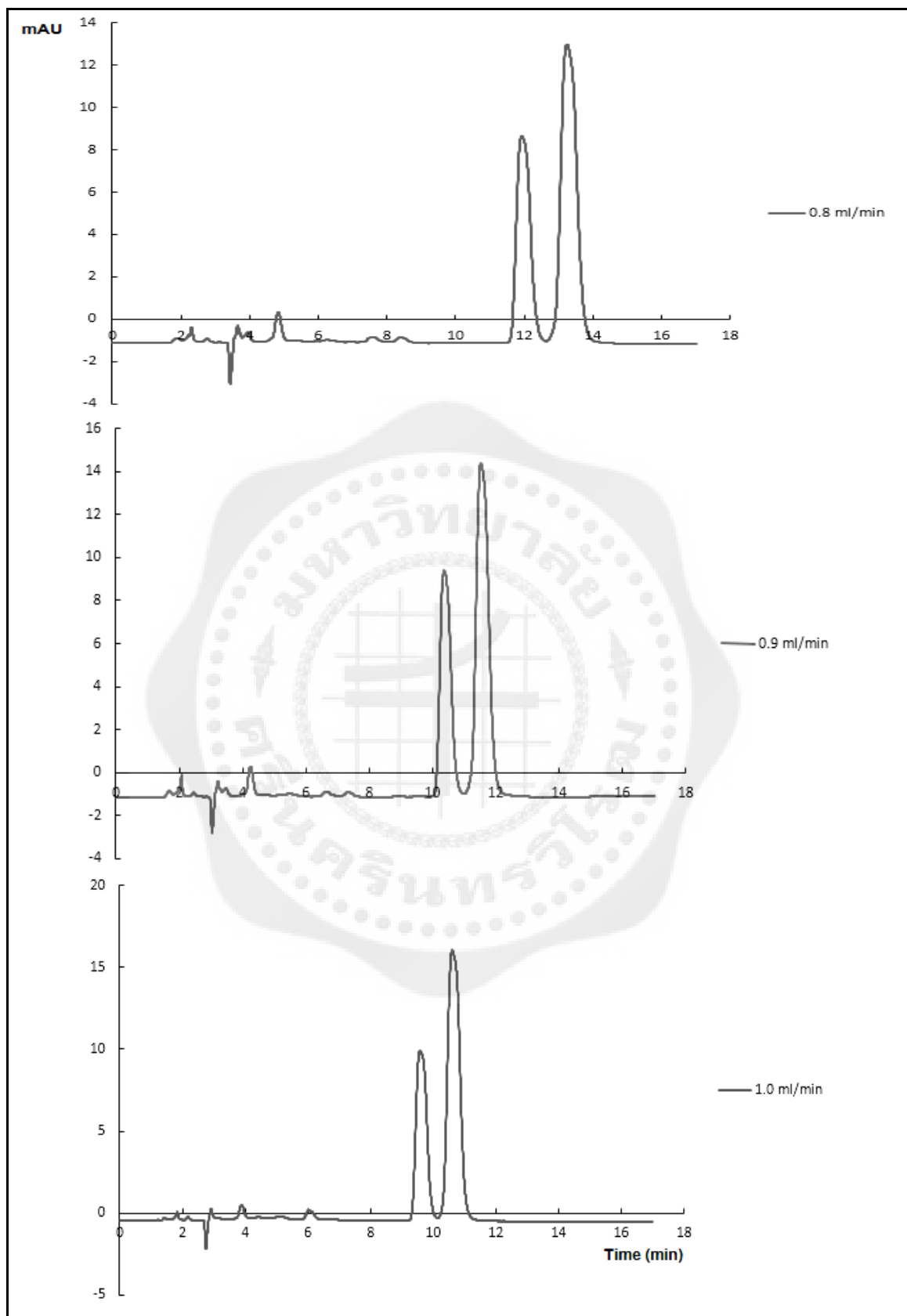


ภาพประกอบ 17 แสดงโครมาโทแกรมอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่เมทานอล:น้ำปราศจากไอออน 63:37 (v/v)

## 2.2 ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

ในงานวิจัยนี้ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมได้แก่ 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยภาพประกอบ 18 และตาราง 6 แสดงผลการศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งใช้สารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรในการวิเคราะห์





ภาพประกอบ 18 แสดงผลการศึกษาค่าการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	รีเทนชันไทม์ (นาที)	
	ยูจีนอล	ไอโซยูจีนอล
0.7	13.9	15.3
0.8	11.1	13.2
0.9	10.4	11.5
1.0	9.5	10.6

ตาราง 6 แสดงผลการศึกษ้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่มีผลต่อรีเทนชันไทม์ของสาร จากการศึกษาพบว่าที่อัตราการไหลที่ 0.7, 0.8, 0.9 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ยูจีนอลจะถูกชะออกจากคอลัมน์ที่เวลา 13.9, 11.1, 10.4 และ 9.5 นาที ตามลำดับ สำหรับไอโซยูจีนอลจะถูกชะออกจากคอลัมน์ที่เวลา 15.3, 13.24, 11.5 และ 10.6 ตามลำดับ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีเนื่องจากเป็นอัตราการไหลที่มีประสิทธิภาพในการแยกยูจีนอลและไอโซยูจีนอลออกจากกันอย่างสมบูรณ์ และใช้เวลาในกระบวนการแยกน้อยกว่า เมื่อเทียบกับอัตราการไหลที่ 0.7, 0.8 และ 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ยูจีนอลและไอโซยูจีนอลด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่คือ เมทานอล และน้ำปราศจากไอออน อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่และอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อการแยกยูจีนอลและไอโซยูจีนอล พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกยูจีนอลและไอโซยูจีนอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สามารถสรุปได้ตาราง 7

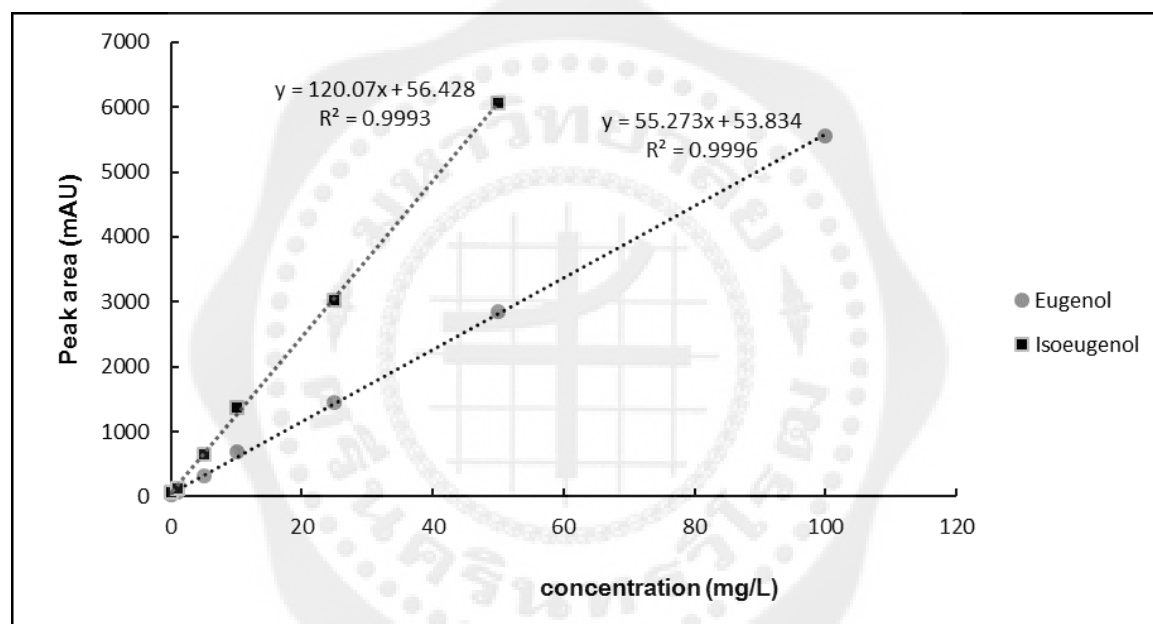
ตาราง 7 สภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกยูจีนอลและไอโซยูจีนอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ตัวแปร	สภาวะที่ใช้ในการทดลอง
ระบบการแยก	ไอโซครีติก
คอลัมน์	C <sub>18</sub> ขนาด 5 $\mu$ m (250 mm x 4.6 mm)
วัฏภาคเคลื่อนที่	เมทานอล และ น้ำปราศจากไอออน
อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่	63:37 (v/v)
อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่	1.0 mL/min
ชนิดเครื่องตรวจจับ	ไดโอดอาร์เรย์
ความยาวคลื่น	280 nm.

### ตอนที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

#### 3.1 กราฟมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของยูจีนอลในช่วงความเข้มข้น 1-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการศึกษาความเข้มข้นของไอโซยูจีนอลในช่วงความเข้มข้น 0.5-50 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) ของยูจีนอล และไอโซยูจีนอล เท่ากับ 0.9982 และ 0.9999 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 เมื่อทำการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยให้ แกน y แทนพื้นที่ใต้พีค (mAU) และแกน x แทนความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานยูจีนอลและ ไอโซยูจีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร) ตามแสดงในภาพประกอบ 19 และตาราง 8



ภาพประกอบ 19 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ที่พีค (mAU) กับช่วงความเข้มข้นของยูจีนอลและไอโซยูจีนอล (mg/L)

ตาราง 8 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์

สารละลายมาตรฐาน	ช่วงความเป็นเส้นตรง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สมการเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ )
ยูจีนอล	0.02-100	$y=55.273x+53.834$	0.9996
ไอโซยูจีนอล	0.01-50	$y=120.07x+56.428$	0.9993

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการแยกยูจีนอลและไอโซยูจีนอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สามารถนำสภาวะดังกล่าวนี้มาใช้วิเคราะห์เพื่อหาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด โดยในการวิเคราะห์ปริมาณในสารตัวอย่างนิยมใช้วิธีเทียบกับกราฟมาตรฐานเพราะมีความสะดวกและให้ความถูกต้อง โดยจะทำการเปรียบเทียบสัญญาณที่วัดได้จากตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน

### 3.2 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ทำการศึกษาโดยใช้สารมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่ความเข้มข้นต่ำๆ โดยทำการศึกษาค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD, 3S/N) ผลการศึกษาแสดงดังตาราง 9

ตาราง 9 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD)

สารละลายมาตรฐาน	ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ยูจีนอล	0.005
ไอโซยูจีนอล	0.001

### 3.3 ศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ทำการศึกษาโดยใช้สารมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่ความเข้มข้นต่ำๆ โดยทำการศึกษาค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ, 10S/N) ผลการศึกษาแสดงดังตาราง 10

ตาราง 10 ค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ)

สารละลายมาตรฐาน	ค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ยูจีนอล	0.02
ไอโซยูจีนอล	0.01

### 3.4 ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

การศึกษาคความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ทำการศึกษาโดยการหาค่าร้อยละการคืนกลับ โดยเติมสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้าน แล้วนำมาสกัดด้วยวิธีเทคนิค DLLME-SFO ที่ได้พัฒนาขึ้น

และวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าวิธีวิเคราะห์ยูจีนอล และไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านให้ค่าร้อยละการคืนกลับในช่วงร้อยละ 96.32-102.09 และ 98.00-104.83 ตามลำดับ ดังตาราง 11

ตาราง 11 ค่าร้อยละการคืนกลับของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้าน

ตัวอย่างยาไทยพื้นบ้าน	ค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery±SD)	
	ยูจีนอล	ไอโซยูจีนอล
S1	95.50±0.5	99.08±0.04
S2	101.13±0.19	99.54±0.56
S3	96.32±0.16	98.75±0.24
S4	100.90±0.25	98.01±0.35
S5	98.85±1.43	103.25±0.25
S6	102.09±0.02	99.30±0.39
S7	96.34±0.26	101.61±1.13
S8	98.81±1.02	99.62±0.61
S9	98.48±0.21	98.94±0.36
S10	97.94±0.76	104.83±0.26

#### หมายเหตุ

ยอดองเหล้า 2 ตัวอย่างได้แก่ S1 และ S2

ยาราชทูชนิดน้ำ 3 ตัวอย่างได้แก่ S3, S4 และ S5

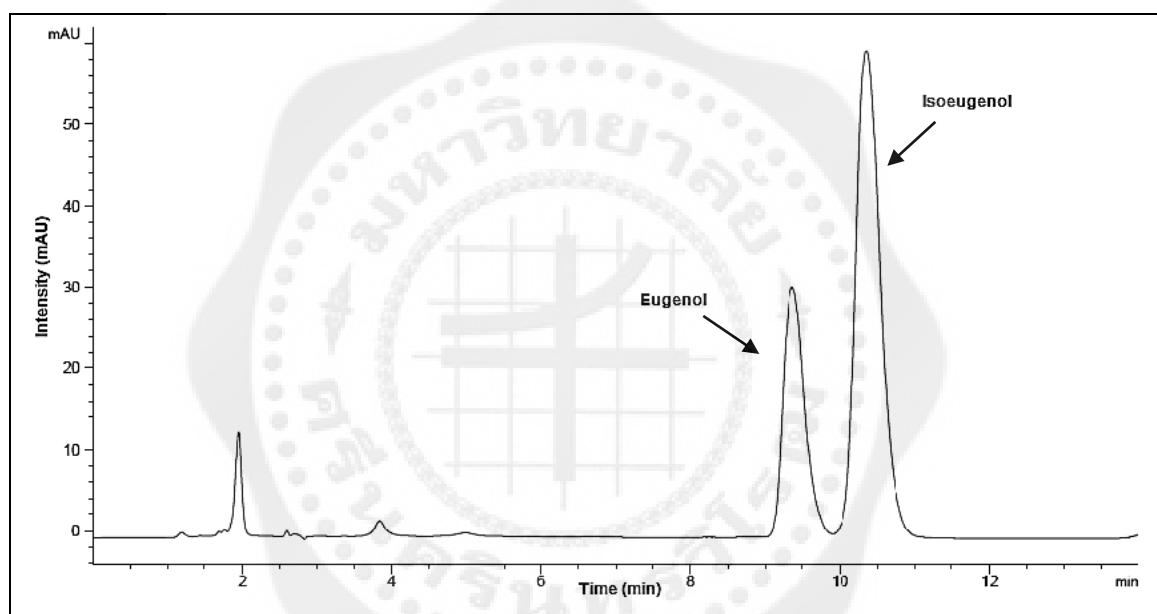
ยาแก้ไอชนิดน้ำ 5 ชนิด ได้แก่ S6, S7, S8, S9 และ S10

### 3.5 ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision)

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความเที่ยงของวิธีการตรวจวิเคราะห์ เพื่อประเมินความเที่ยงของวิธีตรวจวิเคราะห์ โดยทำการศึกษาความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intra-day precision) และ ความเที่ยงระหว่างวัน (inter-day precision) โดยใช้สารละลายมาตรฐานผสมระหว่างยูจีนอล และไอโซยูจีนอลที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีการตรวจวิเคราะห์แสดงดังตาราง 9 พบว่า ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ภายในวันเดียวกันของยูจีนอล และไอโซยูจีนอลได้แก่ 0.96 และ 0.13 ตามลำดับ และ ค่าร้อยละของเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ระหว่างวันของยูจีนอล และไอโซยูจีนอลได้แก่ 1.33 และ 0.19 ตามลำดับ

#### ตอนที่ 4 การศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง

งานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่างยาไทยพื้นบ้าน โดยได้ทำการศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิก ที่อาจจะมีผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกที่ศึกษามี 4 ชนิดได้แก่ กรดแกลลิก กรดเฟอร์รูลิก กรดคาเฟอิก และกรดพารา-คูมาริก ซึ่งทำการทดลองโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปสกัดด้วยเทคนิค DLLME-SFO ที่ได้พัฒนาขึ้นและนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มีความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ผลการศึกษาแสดงดังภาพประกอบ 20



ภาพประกอบ 20 โครมาโทแกรมจากผลการศึกษาสารรบกวนในตัวอย่าง

จากภาพโครมาโทแกรมพบว่าสารรบกวนทั้ง 4 ชนิด พบว่าในสภาวะที่ทำการทดลองนี้สารรบกวนทุกชนิดไม่ปรากฏพิกที่สำคัญที่รบกวนพิกของยูจีนอลและไอโซยูจีนอล อาจเป็นผลจากเมื่อทำการสกัดสารด้วยเทคนิค DLLME-SFO สารรบกวนถูกสกัดเข้าสู่ชั้นตัวทำละลายสกัดได้ในปริมาณน้อย และเมื่อวิเคราะห์สารด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงด้วยสภาวะที่เหมาะสมพบว่าสารรบกวนทั้ง 4 ชนิดจึงไม่ปรากฏพิกที่สำคัญของสารรบกวน ซึ่งสรุปได้ว่า ไม่มีการรบกวนสัญญาณของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลจากสารทั้ง 4 ชนิด

## ตอนที่ 5 การวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทย

การวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล ในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้าน ได้ทำการศึกษายาไทยพื้นบ้านทั้งหมด 10 ชนิด โดยทำการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค DLLME-SFO ที่ได้พัฒนาขึ้น จากนั้นตรวจวัดหาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงด้วยสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้าน แสดงดังตาราง 12

ตาราง 12 ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด

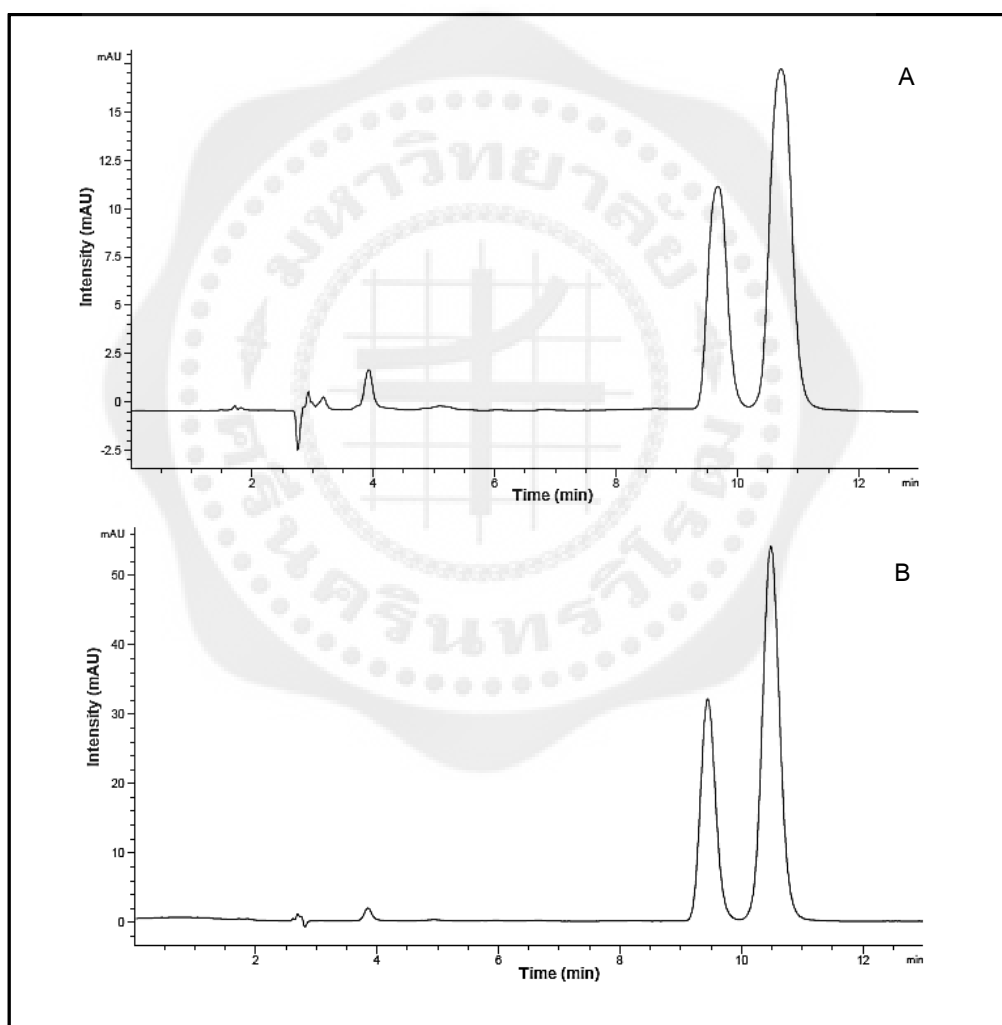
ตัวอย่าง	ปริมาณยูจีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณไอโซยูจีนอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)
S1	2.07	nd
S2	2.15	3.11
S3	nd	nd
S4	nd	nd
S5	nd	nd
S6	nd	nd
S7	34.22	nd
S8	95.84	nd
S9	nd	nd
S10	60.94	nd

หมายเหตุ nd หมายถึง ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิคที่ใช้ในการทดลองนี้

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด พบว่าพบปริมาณยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้าน 5 ชนิด ได้แก่ ยาดองเหล้า ทั้ง 2 ชนิด (S1, S2) และยาแก้ไอทั้งหมด 3 ชนิด (S7, S8, S10) ซึ่งพบปริมาณยูจีนอลในตัวอย่างยาแก้ไอในปริมาณสูง ทั้งนี้เนื่องจากมีความเป็นไปได้ว่าสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในยาอาจมียูจีนอลและถูกสกัดออกมาในขั้นตอนการปรุงยาหรือผลิตยา สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไอโซยูจีนอล พบว่าพบปริมาณไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านเพียงชนิดเดียว คือ ยาดองเหล้า (S2)

จากการศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค DLLME-SFO, ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง, ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการเตรียม

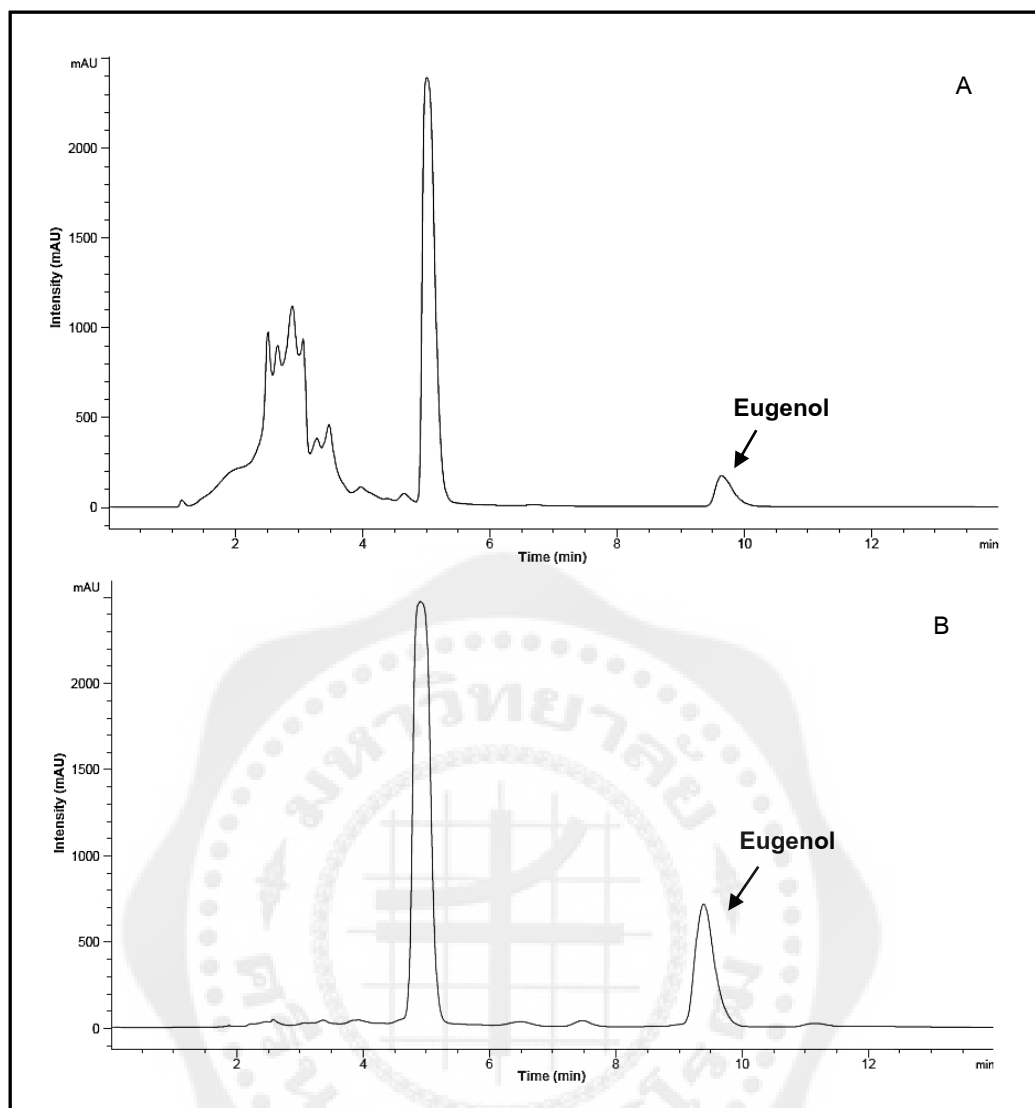
ตัวอย่าง และศึกษาผลของสารรบกวนจากตัวอย่าง พบว่าเทคนิค DLLME-SFO เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอล โดยพิจารณาจากการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (%Recovery) และจากการศึกษาความเที่ยงของวิธีการตรวจวิเคราะห์ (%RSD) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาโครมาโทแกรมที่ได้จากผลการวิเคราะห์เครื่องเทคนิครีเวสเฟสโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพบว่าการสกัดด้วยเทคนิค DLLME-SFO ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของยูจีนอลและไอโซยูจีนอล โดยค่าสัญญาณทางไฟฟ้า (Intensity) เพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่าแสดงถึงภาพประกอบ 21 และสามารถกำจัดสารรบกวนบางส่วนที่มีในสารตัวอย่าง เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอลออกจากสารรบกวนในตัวอย่าง แสดงถึงภาพประกอบ 22



ภาพประกอบ 21 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

A = ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด

B = ผ่านการสกัดด้วยเทคนิค DLLME-SFO



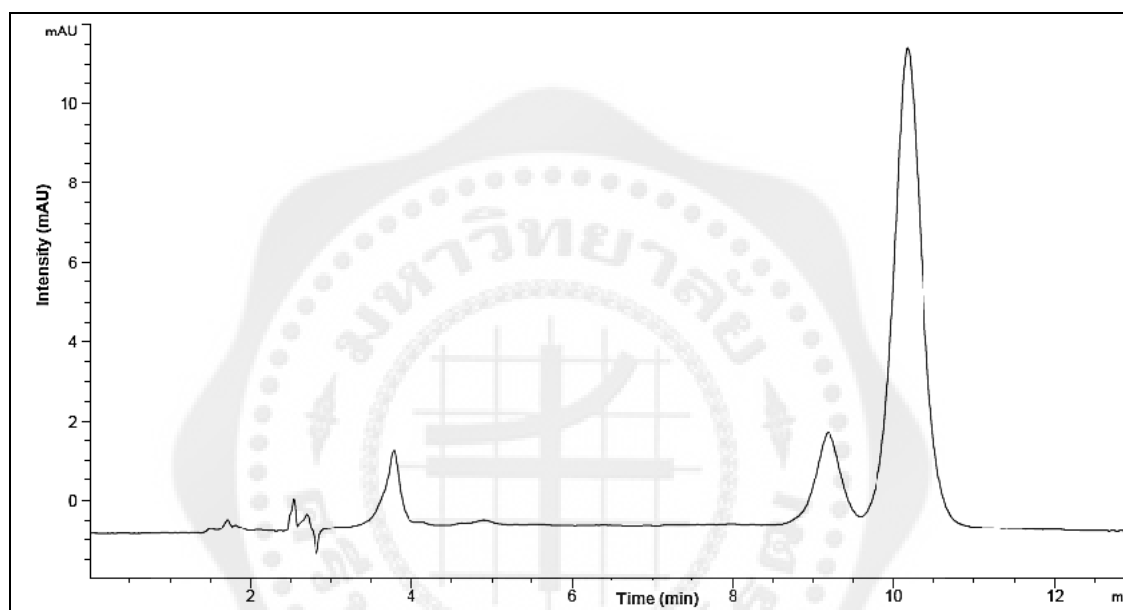
ภาพประกอบ 22 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างยาแก้ไอ (S8)

A = ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด

B = ผ่านการสกัดด้วยเทคนิค DLLME-SFO

จากการศึกษาประสิทธิภาพการสกัดด้วยเทคนิค DLLME-SFO ที่พัฒนาขึ้นโดยทำการสกัดซ้ำจำนวน 2 ครั้งพบว่า การสกัดซ้ำครั้งที่ 2 สามารถสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอลได้เพิ่มขึ้นเพียง 1-2% ดังนั้นในงานวิจัยนี้ทำการสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอลด้วยเทคนิค DLLME-SFO เพียงครั้งเดียวจากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการสกัดยูจีนอลและไอโซยูจีนอลด้วยเทคนิค DLLME แบบทั่วไปเพื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับเทคนิคการสกัดด้วยเทคนิค DLLME-SFO ที่ได้พัฒนาขึ้น โดยใช้สารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอลปริมาตร 500 ไมโครลิตรและคลอโรฟอร์มปริมาตร 200 ไมโครลิตรเป็นตัวทำละลายสกัดในการสกัด จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายสกัดออก และเติม

เมทานอลปริมาตร 500 ไมโครลิตร และทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง จากการศึกษพบว่า การสกัดด้วยเทคนิค DLLME-SFO แบบทั่วไปให้ค่าร้อยละการคืนกลับของยูจีนอลในช่วง 18.58-20.73% และให้ค่าร้อยละการคืนกลับของไอโซยูจีนอลในช่วง 57.14-63.95% ซึ่งพบว่าการสกัดด้วยเทคนิค DLLME-SFO แบบทั่วไปให้ค่าร้อยละการคืนกลับของสารทั้งสองชนิดต่ำ เนื่องจากเทคนิค DLLME-SFO แบบทั่วไปต้องผ่านขั้นตอนการระเหยตัวทำละลายสกัด จึงทำให้ยูจีนอลและไอโซยูจีนอลซึ่งเป็นสารที่สามารถระเหยง่ายเกิดการสูญเสียหรือละลายตัวในขั้นตอนนี้ โดยผลการศึกษาแสดงดังภาพประกอบ 23



ภาพประกอบ 23 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอลที่ผ่านการสกัดด้วยเทคนิค DLLME แบบทั่วไป

## บทที่ 5

### สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษากการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลด้วยเทคนิค DLLME-SFO จากตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิดได้แก่ ยาตองเหล้า, ยาธาตุชนิดน้ำ และยาแก้ไอชนิดน้ำ โดยทำการศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค DLLME-SFO และศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด

#### สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาการวิจัย สรุปผลได้ดังนี้

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยใช้วิธีการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัดที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

- 1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว
  - 1.1.1 ชนิดของตัวทำละลายสกัด
  - 1.1.2 ชนิดของตัวทำละลายกระจายตัว
- 1.2 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว
  - 1.2.1 ศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว
  - 1.2.2 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัว
- 1.3 ศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของเกลือ
- 1.4 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้ตัวทำละลายสกัดแข็งตัว

จากตัวแปรดังกล่าวข้างต้น พบว่าชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจาย ผลกระทบของความเข้มข้นของเกลือ และเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้ตัวทำละลายสกัดแข็งตัวที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) ร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายที่ใช้สกัด (solidification of floating organic drop, SFO) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล คือตัวทำละลายสกัดชนิด 1-undecanol และตัวทำละลายกระจายตัวชนิดเมทานอล ด้วยอัตราส่วน

ระหว่างตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัวเท่ากับ 1:4 (v/v) ปริมาตรรวมของตัวทำละลายสกัดและตัวทำละลายกระจายตัวเท่ากับ 500 มิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของเกลือไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ และใช้เวลาในการทำให้ตัวทำละลายสกัดแข็งตัว 5 นาที ตามลำดับ

## 2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลด้วยเทคนิครีเวอร์สเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

### 2.1 ศึกษาชนิดตัวภูมิภาคเคลื่อนที่

### 2.1 ศึกษาอัตราการไหลของตัวภูมิภาคเคลื่อนที่

จากสภาวะดังกล่าวข้างต้น พบว่าตัวภูมิภาคเคลื่อนที่เมทานอล และน้ำปราศจากไอออน ที่อัตราส่วน 63:37 (v/v) และที่อัตราการไหลของตัวภูมิภาคเคลื่อนที่ 1.0 mL/min ตามลำดับมีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ โดยยูจีนอลและไอโซยูจีนอลถูกชะออกมาจากคอลัมน์ที่ระยะเวลา 9.5 นาทีและ 10.6 นาที ตามลำดับ

## 3. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วย ของเหลวแบบกระจายร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของตัวทำละลายสกัด ได้แก่

### 3.1 กราฟมาตรฐานยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

3.2 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

### 3.3 ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

### 3.4 ศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ พบว่ากราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานยูจีนอลในช่วงความเข้มข้น 1.0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายมาตรฐานไอโซยูจีนอลในช่วงความเข้มข้น 0.5-50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.9982 และ 0.9999 ตามลำดับ ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลเท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) ของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลเท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และให้ค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) สำหรับวิธีวิเคราะห์ยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านในช่วงร้อยละ 96.32-102.09 และ 98.00-104.83 ตามลำดับ และมีความแม่นยำของการวิเคราะห์โดยค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ภายในวันเดียวกันของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลได้แก่ 0.96 และ 0.13 ตามลำดับ และ ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ระหว่างวันของยูจีนอลและไอโซยูจีนอลได้แก่ 1.33 และ 0.19 ตามลำดับ

#### 4. การศึกษาผลของสารรบกวนของการวิเคราะห์ยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

การศึกษาผลของสารรบกวนของการวิเคราะห์ยูจีนอลและไอโซยูจีนอลได้ทำการศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิก, กรดเฟอร์รูลิก, กรดคาเฟอิก และกรดพารา-คูมาริก พบว่าสารรบกวนทั้ง 4 ชนิดเมื่อทำการสกัดด้วยเทคนิค DLLME-SFO สารรบกวนถูกสกัดเข้าสู่ชั้นตัวทำละลายสกัดได้ในปริมาณน้อย และไม่รบกวนสัญญาณของยูจีนอลและไอโซยูจีนอล

#### 5. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

จากการวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด ได้ทำการศึกษายาไทยพื้นบ้าน 3 ชนิดทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ได้แก่ ยาดองเหล้า 2 ตัวอย่าง, ยาธาตุชนิดน้ำ 3 ตัวอย่างและยาแก้ไอชนิดน้ำ 5 ชนิด พบว่าพบปริมาณยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้าน 5 ชนิด ได้แก่ ยาดองเหล้าทั้ง 2 ชนิด และยาแก้ไอทั้งหมด 3 ชนิด ซึ่งพบปริมาณยูจีนอลในตัวอย่างยาดองเหล้าในช่วงความเข้มข้น 2.07-2.15 มิลลิกรัมต่อลิตร และยาแก้ไอในช่วงความเข้มข้น 34.22-95.84 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบปริมาณไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาดองเหล้าเพียงชนิดเดียวที่ความเข้มข้น 3.11 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการศึกษาการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลพร้อมกันในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิดด้วยเทคนิค DLLME-SFO ทำให้สามารถทราบถึงปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลในตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิดได้ นอกจากสามารถนำเทคนิคดังกล่าวไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอื่นๆได้ เนื่องจากขั้นตอนการสกัดเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน และมีความเป็นพิษต่ำ

#### ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาภูมิภาคเคลื่อนที่อื่นๆ เพื่อเป็นการลดการใช้ตัวทำละลาย
2. วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค DLLME-SFO ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอื่นๆที่มีลักษณะของแข็งและของเหลวได้
3. การวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอล สามารถนำข้อมูลที่นำไปสนับสนุนด้านคุณภาพของยาไทยพื้นบ้านบางชนิดได้



## บรรณานุกรม

- กิตติศักดิ์ ดีมานพ. (2557). ความเป็นพิษและประสิทธิภาพในการใช้เป็นยาสลบของ Isoeugenol ใน  
ลูกปลาสวาย. วิทยานิพนธ์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.
- โชติอนันต์ และคณะ. (2551). สมุนไพรไทย สำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. กรุงเทพฯ: ดวงกมล  
พับลิชชิ่ง. หน้า 78.
- ฐาปนีย์ หงส์รัตนารกิจ. (2550ก). น้ำมันหอมระเหยและการใช้ในสุคนธบำบัด. กรุงเทพฯ: วิฑูรย์  
การปก. หน้า 9-12.
- ..... (2550ข). น้ำมันหอมระเหยและการใช้ในสุคนธบำบัด. กรุงเทพฯ: วิฑูรย์การปก. หน้า  
98.
- ..... (2550ค). น้ำมันหอมระเหยและการใช้ในสุคนธบำบัด. กรุงเทพฯ: วิฑูรย์การปก. หน้า  
178-208.
- นาวิณ มหาวงศ์. (2549). การทดสอบเบื้องต้นในการใช้น้ำมันกานพลูเป็นยาสลบปลาน้ำจืดที่สำคัญ  
ทางเศรษฐกิจบางชนิด. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา: 1. ถ่ายเอกสาร.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.  
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีปีที่ 21 (ฉบับที่ 3). สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม  
วิทยาลัยพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา. 226-227.
- ประภัสสร วีระพันธ์. (2554). คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยในหลอด  
ทดลอง. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. 7(3): 31.
- พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. (2526). คู่มือการใช้สมุนไพร. กรุงเทพฯ: เมติคัล มีเดีย. หน้า 1-2.
- วันเฉลิม จันทรากุล. (2537ก). สมุนไพรไทย ธุรกิจ “หมื่นล้าน”. กรุงเทพฯ: นาบอนอิงค์. หน้า 9.
- ..... (2537ข). สมุนไพรไทย ธุรกิจ “หมื่นล้าน”. กรุงเทพฯ: นาบอนอิงค์. หน้า 12.
- สุกัญญา เขียวสะอาด. (2555). กระเพาะกับการต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง ปี  
ที่ 21 (ฉบับที่ 2). กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพายัพ.  
56-58.
- สมพร ภูติยานนท์. (2542ก). ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับแพทย์แผนไทยว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์  
แผนไทย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. หน้า 1-2.
- ..... (2542ข). ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับแพทย์แผนไทยว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์แผน  
ไทย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. หน้า 49-51.
- ..... (2542ค). ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับแพทย์แผนไทยว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์แผน  
ไทย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. หน้า 77-82.
- ..... (2542ง). ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับแพทย์แผนไทยว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์แผน  
ไทย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. หน้า 343-345.

- อภิญา นวคุณ. (2557ก). วิธีการเตรียมตัวอย่างที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมด้วยการสกัดระดับจุลภาค. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 20 (ฉบับที่ 1)*. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. 228.
- ..... (2557ข). วิธีการเตรียมตัวอย่างที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมด้วยการสกัดระดับจุลภาค. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 20 (ฉบับที่ 1)*. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. 230-232.
- อรชร เอกภาพสากล. (2547ก). มหัศจรรย์น้ำมันหอมระเหย. กรุงเทพฯ: เพชรการเรือน. หน้า 17-19.
- ..... (2547ข). มหัศจรรย์น้ำมันหอมระเหย. กรุงเทพฯ: เพชรการเรือน. หน้า 32-33.
- Allen A.; et al. (2015). Liquid-Liquid Extraction. สืบค้นเมื่อ 6 กรกฎาคม 2559, จาก <http://slideplayer.com/slide/6074411>.
- Bakkali F.; et al. (2008). Biological Effects of Essential Oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 447-449.
- Bio-analytical method development, validation and transfer by using LC-MS/MS – A review. *Pharmatutor Alerts*. สืบค้นเมื่อ 6 กรกฎาคม 2559, จาก <http://www.pharmatutor.org/articles>.
- Caitlin N. Hahn; & Jeremy R. Burkett. (2013). Optimizing Eugenol Extraction Conditions From Fresh and Dried Samples of Holy Basil (*Ocimum sanctum*). *Plant Science and Research*. 3(5): 28-31.
- Chia-Hsien Feng; et al. (2015). Dual Dispersive Liquid Liquid Microextraction for Determination of Phenylpropenes in Oils by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1410: 60-67.
- Christina K. N. (2016). Enhancing the Antibacterial Efficacy of Isoeugenol by Emulsion Encapsulation. *Food Microbiology*. 229: 7-8.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2010). Consideration of Hydroxypropenylbenzenes Evaluated by JECFA (61<sup>st</sup> meeting) Structurally Related to 2-methoxy-4-(prop-1-enyl) phenyl 3-methylbutyrate from Chemical Group 17 Evaluated by EFSA in FGE. 30: 19.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2012). Scientific Opinion on the Safety and Efficacy of Propenylhydroxybenzenes (chemical group 17) when used as Flavourings for all Animal Species: 1-15.
- Garry M. Lampman. (1977). The Preparation of Vanillin from Eugenol and Sawdust. *Chemical education*: 776-778.

- Geng Y.; et al. (2007). An Efficient Method for Extraction, Separation and Purification of Eugenol from *Eugenia caryophyllata* by Supercritical Fluid Extraction and High-Speed Counter-Current Chromatography. *Separation and Purification Technology*. 57: 237.
- HERA Risk Assessment of Isoeugenol. (2005). Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of Household Cleaning Products: 75.
- Herbicide Risk Assessment. (2010). Clove oil (Eugenol). สืบค้นเมื่อวันที่ 5 กรกฎาคม 2559, จาก <https://www.marinwater.org/DocumentCenter/View/253>.
- Janel E. Owens; et al. (2016). Analysis of Whiskey by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with Gas Chromatography/Mass Spectrometry: An Upper Division Analytical Chemistry Experiment Guided by Green Chemistry. *Chemical education*. 93: 186-192.
- Rios A.; et al. (2012). Determination of Alkenylbenzenes and related Flavour Compounds in Food samples by On-Column Preconcentration-Capillary Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1216: 7179-7185.
- Robert Tisserand, Rodney Young. (2014). Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals: 575.
- Schulz K.; et al. (2008). Headspace Solid-Phase Microextraction–Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Quantitative Determination of the Characteristic Flavouring Agent Eugenol in Serum samples after Enzymatic Cleavage to Validate Post-Offence Alcohol Drinking Claims. *Journal of Chromatography A*. 1211: 113-119.
- Solmaz M. N. (2014). Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of Eugenol in Lymphocytes. Pharmaceutical Toxicology Programme thesis of master of sciences. Hacettepe University. Turkey.
- Maskat. (2015). Optimization of Vanillin Production using Isoeugenol as Substrate by *Aspergillus niger* I-1472. *International Food Research*. 22(4): 1651.
- Nazir F.; et al. (2013). Determination of Organophosphorous Pesticides in Summer Crops using Ultrasound-Assisted Solvent Extraction followed by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction based on the Solidification of Floating Organic Drop. *Food Control*. 34: 378-385.
- Nazir F.; et al. (2015). Simultaneous Determination of Imidacloprid and Diazinon in Apple and Pear samples using sonication and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *Food Science and Technology*. 60: 825-831.

- Rosa Garcia-Arrona. (2016). Determination of Phthalates in Food Simulants and Liquid samples using Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction followed by Solidification of Floating Organic Drop. *Food control*. 62: 171-177.
- Shang-Da Huang. (2008). Dispersive Liquid–Liquid Microextraction method based on Solidification of Floating Organic Drop combined with Gas Chromatography with Electron-Capture or Mass Spectrometry Detection. *Journal of Chromatography A*. 1211: 9.
- Shaodong Jia; et al. (2013). Combined application of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction based on the Solidification of Floating Organic Droplets and Charged Aerosol Detection for the Simple and Sensitive Quantification of Macrolide Antibiotics in Human Urine. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 86: 204-213.
- Xiang-Sheng. (2012). Simultaneous Determination of Eugenol, Isoeugenol, Myristicin and Elemicin in *Myristica fragrans* Houtt. by GC. *Pharmaceutical Analysis*. 5: 1569-1573.
- Xiaohong Hou; et al. (2014). Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction based on the Solidification of a Floating Organic Droplet followed by Gas Chromatography for the Determination of Eight Pyrethroid Pesticides in Tea Samples. *Journal of Chromatography B*. 969: 123-127.
- Yong-Hong Li; et al. (2004). Determination of Vanillin, Eugenol and Isoeugenol by RP-HPLC. *Chromatographia*. 60: 709-713.



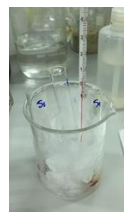


ภาคผนวก ก

การเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดระดับจุลภาคด้วยของเหลวแบบกระจาย  
(dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) ร่วมกับเทคนิคการเกิดการแข็งตัวของ  
ตัวทำละลายที่ใช้สกัด (solidification of floating organic drop, SFO)



1. นำตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 4 และปิเปตตัวอย่างมา 1.00 มิลลิลิตร



5. นำสารละลายตัวอย่างไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที



2. เตรียมสารละลายผสมระหว่าง 1-undecanol และเมทานอล ในอัตราส่วน 1:4 (v/v) โดยนำไป vortex เป็นเวลา 1 นาที



6. แยกตัวทำละลายสกัดที่แข็งตัวลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์



3. ฉีดสารละลายผสมปริมาตร 500 ไมโครลิตร อย่างรวดเร็วลงในสารละลายตัวอย่าง



7. ตัวทำละลายสกัดที่แข็งตัวจะหลอมเหลวที่อุณหภูมิห้อง



4. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

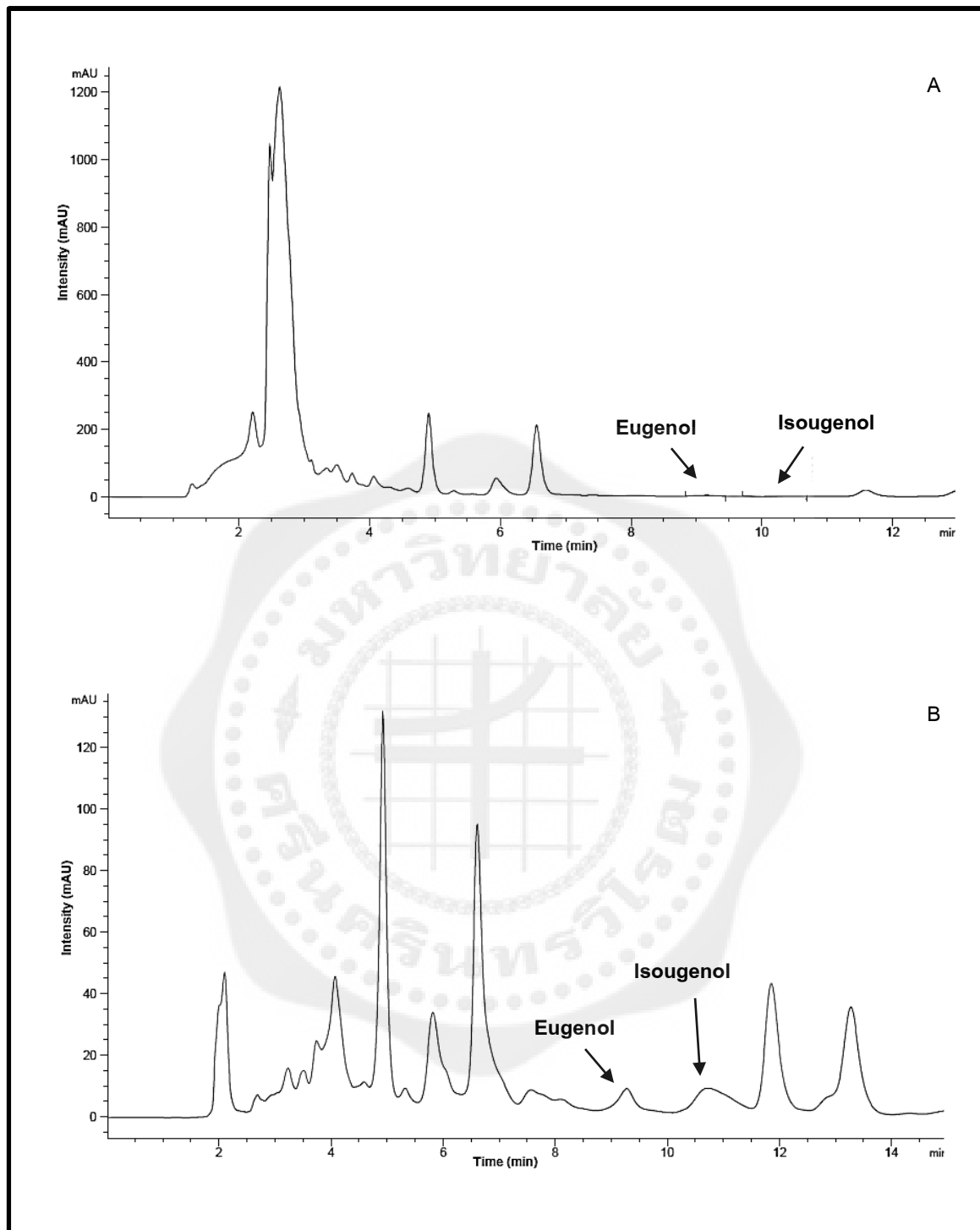


8. ปิเปตตัวทำละลายสกัด 50 ไมโครลิตร เจือจางด้วยเมทานอลจนเป็น 150 ไมโครลิตร

ภาพประกอบ 24 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัด DLLME-SFO



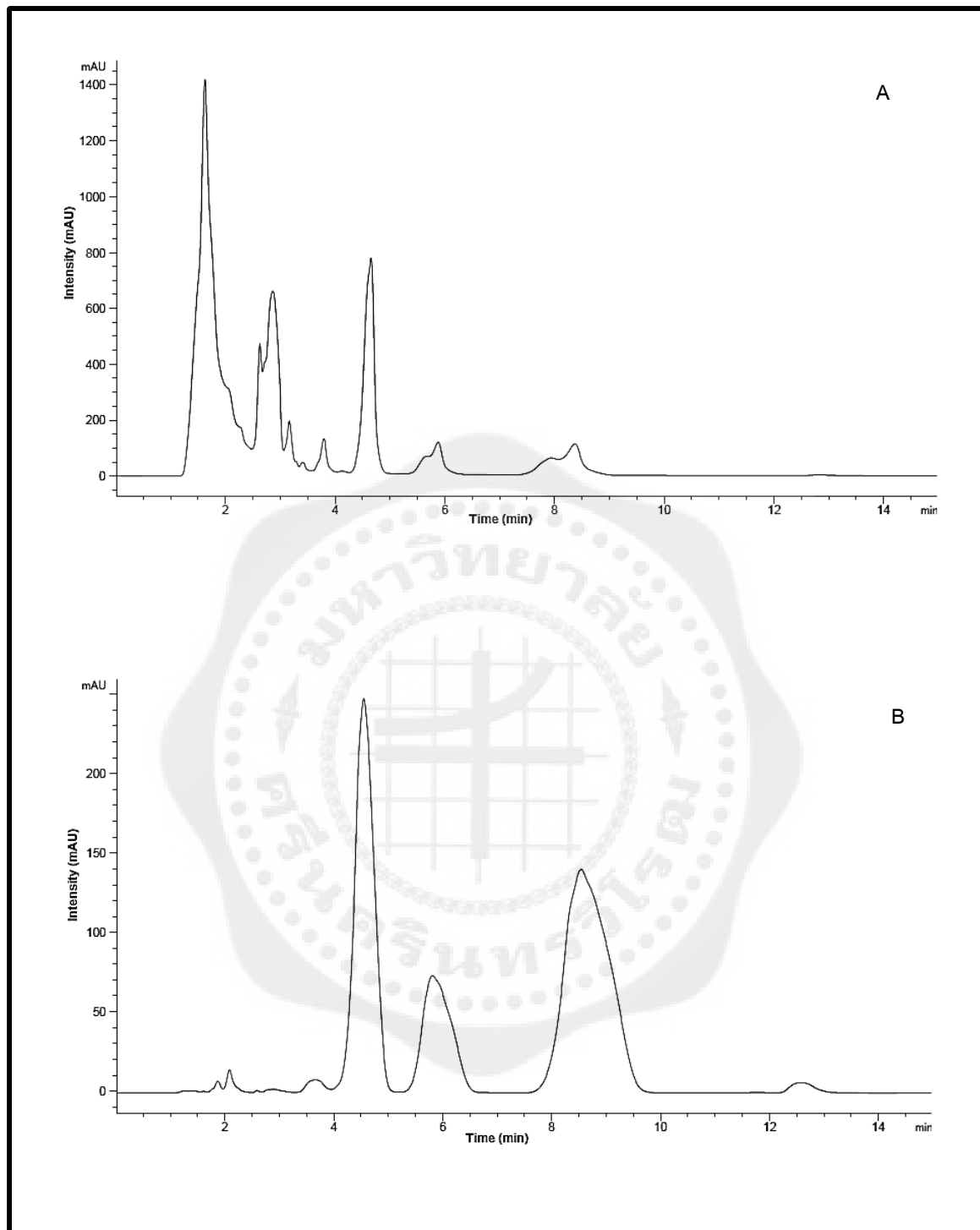
ภาคผนวก ข  
โครมาโทแกรมตัวอย่างยาไทยพื้นบ้านบางชนิด



ภาพประกอบ 25 โครมาโทแกรมตัวอย่างยาดองเหล้า (S2)

A = ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด

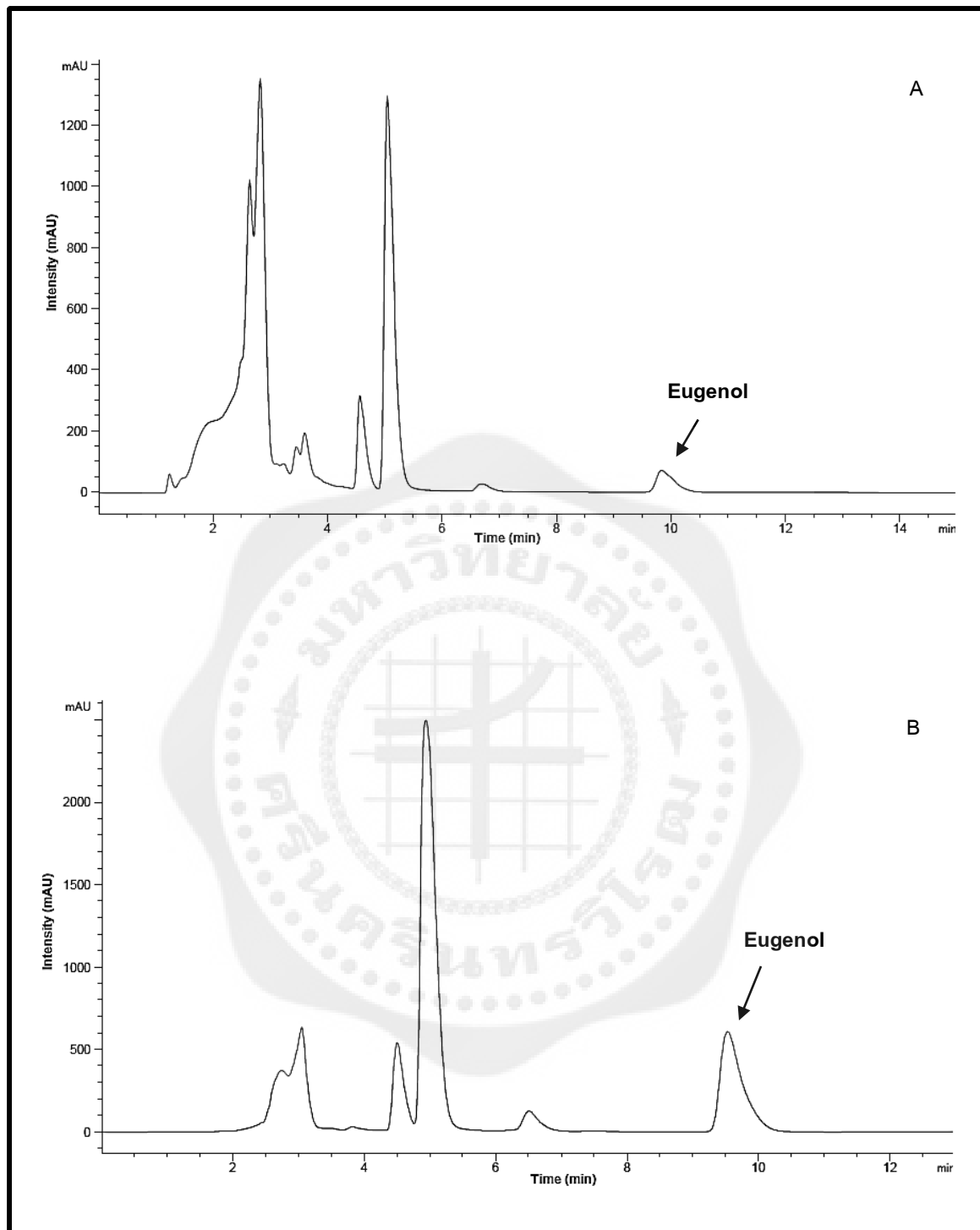
B = ผ่านการสกัดด้วยเทคนิค DLLME-SFO



ภาพประกอบ 26 โครมาโทแกรมตัวอย่างยาธาตุ (S3)

A = ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด

B = ผ่านการสกัดด้วยเทคนิค DLLME-SFO



ภาพประกอบ 27 โครมาโทแกรมตัวอย่างยาแก้ไอ (S10)

A = ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด

B = ผ่านการสกัดด้วยเทคนิค DLLME-SFO



ภาคผนวก ค  
เครื่องมือและอุปกรณ์



ภาพประกอบ 28 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์ (diode array detector) จากบริษัท Agilent Technologies รุ่น 1260



ภาพประกอบ 29 เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน



ภาพประกอบ 30 เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง



ภาพประกอบ 31 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Zentrifugen EBA 8S จากบริษัท Hettich



## ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวพัชรพรรณ ดิษยมนตรี
วันเดือนปีเกิด	4 มีนาคม 2533
สถานที่เกิด	บ้านเลขที่ 32/6 หมู่ที่ 6 ตำบลเปลี่ยน อำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช 80120
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2549	มัธยมศึกษาตอนต้น จาก โรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย นครศรีธรรมราช
พ.ศ. 2552	มัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย นครศรีธรรมราช
พ.ศ. 2556	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี จาก มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม
พ.ศ. 2560	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร