การศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในน้อยหน่า ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

สุพรรษา กัณทวงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีประยุกต์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2560

การศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในน้อยหน่า
ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

สุพรรษา กัณทวงศ์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีประยุกต์

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร แสงศรีจันทร์)
วันที่ 24 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2560

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศักดิ์ชัย เสถียรพีระกุล)
วันที่ 24 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2560

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพรรณ ฉิมสุข)
วันที่ 24 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2560

ประธานอาจารย์ประจำหลักสูตร .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร แสงศรีจันทร์)
วันที่ 24 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2560

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่ 27 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2560

ชื่อเรื่อง การศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในน้อยหน่าด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

ชื่อผู้เขียน นางสาวสุพรรษา กัณทวงศ์

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร แสงศรีจันทร์

บทคัดย่อ

น้อยหน่าเป็นสมุนไพรท้องถิ่นที่ใช้ทางยา และยังใช้เป็นสารฆ่าแมลงได้ สารประกอบกลุ่มฟีนอลิกเป็นหนึ่งในสารที่มีฤทธิ์ทางยา คือ ในการวิจัยนี้ทำการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีในใบน้อยหน่า วิธีการสกัดที่ศึกษา ได้แก่ วิธีการสกัดแบบการแช่ยุ่ย ซอกห์เลต รีฟลักซ์ การใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด และการใช้ไมโครเวฟช่วยสกัด น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน เป็นตัวทำละลายที่เลือกศึกษาโดยประเมินจากค่าร้อยละของสารสกัด และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมศึกษาด้วยวิธีโฟลิน-ไซโอแคลทู และปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธีคัลเลอริเมตรี สารสกัดหยาบด้วยวิธีรีฟลักซ์เมทานอลและเอทานอลเป็นตัวทำละลายชนิดมีขั้ว สามารถสกัดสารได้ดีกว่าตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้ว เอทานอลมีความเป็นพิษน้อยกว่าเมทานอลจึงเลือกใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์และโครมาโทกราฟีของเหลว-แมสสเปกโทรเมทรี เฟสเคลื่อนประกอบด้วยอะซิโตไนไตรล์ และแอมโมเนียมฟอร์เมทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ การทดสอบสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าโดยวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอลพบกรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน และไฮโดรควินิน ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี agar diffusion method สารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าจากเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้ สารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ออสเตรเลียสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *B. cereus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ น้อยหน่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม สารประกอบฟีนอลิก เทคนิคทางโครมาโทกราฟี และเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี

Title The Study of Chemical Components in *Annona* spp. by Chromatography

Author Miss Supansa Kantawong

Degree Master of Science in Applied Chemistry

Advisor Committee Chairperson Assistant Professor Dr. Supaporn Sangsrichan

ABTRACT

Annona spp. has been used as medicinal herb and pesticides. Phenolic compounds are one of the active substances. In this research, the determination of chemical components in *Annona* spp. leaves were studied. Extraction methods studied were maceration, Soxhlet, reflux, ultra sonication assisted extraction and microwave assisted extraction. Water, methanol, ethanol, acetone, ethyl acetate and hexane were selected as solvents for further extraction study to evaluate their percentage of crude yield and total phenolic and total flavonoid contents. The determination of total phenolic compounds by Folin-Ciocalteu phenol reagent, total flavonoid content by aluminum chloride colorimetric assay were also performed. The methanolic and ethanolic reflux extractions were selected as they gave the reasonable highest percentage of their crude yield, total phenolic and total flavonoid contents. Ethanol was selected as the appropriate solvent due to lower toxicity than methanol. Chemical components of the crude extracts were analyzed by HPLC-DAD and also LC-MS. The mobile phase system was composed of acetonitrile and 10 mM ammonium formate buffer (pH 4.0). Tannic acid, catechin, rutin, isoquercetin, quercetin and hydroquinin were found in ethanolic reflux from *Annona spp*. leaves. The antimicrobial activity was measured by agar diffusion method. Ethanolic extract from *Annona* spp. yielded inhibition against *B. cereus*. *Annona atemoya* gave the highest inhibition against *B. cereus* with the minimum inhibitory concentration (MIC) of 125 mg/mL.

Keywords *Annona* spp., Total phenolic and flavonoid contents, Phenolic compounds, Chromatography and Mass spectrometry

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร แสงศรีจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลักที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขจนรูปเล่มนี้สมบรูณ์ และทำให้การทำวิทยานิพนธ์สำเร็จไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศักดิ์ชัย เสถียรพีระกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพรรณ ฉิมสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงการตรวจแก้ไขรูปเล่มวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณปภา พรหมสวรรค์ ที่กรุณารับเป็นประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณสมศักดิ์ ทะระถา และคุณนรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และช่วยเหลือแก้ปัญหาเกี่ยวกับการใช้เครื่องมือต่าง ๆ ในงานวิจัยบางส่วน

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุนทุนวิจัยบางส่วนและบริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด ที่สนับสนุนตลอดการศึกษา

ขอขอบพระคุณอาจารย์และบุคลากรสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้คำแนะนำและสั่งสอนให้ความรู้ในด้านต่าง ๆ ตลอดตนให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ สารเคมีและอุปกรณ์ต่าง ๆ

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ชาย และเพื่อน ๆ ที่คอยช่วยเหลือสนับสนุนแนะนำและเป็นกำลังใจทำให้สำเร็จการศึกษาไปได้ด้วยดี

สุพรรษา กัณทวงศ์

กรกฎาคม 2560

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง

สารบัญภาพ

สารบัญตารางผนวก

อักษรย่อและสัญลักษณ์

สัญลักษณ์	ความหมาย
%	ร้อยละ
°C	องศาเซลเซียส
µm	ไมโครเมตร
DC_{50}	Dose Concentration fifty
e	อิเล็กตรอน
HPLC	โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
HPLC-DAD	โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์
HPLC-DAD-MS	โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์และแมสสเปกโทรมิเตอร์
IC_{50}	ค่าความเข้มข้นที่สารนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ร้อยละ 50
KD_{50}	Knock Down Dose fifty
L/min	ลิตรต่อนาที
LC_{50}	Lethal Concentration fifty
LOD	ขีดจำกัดการตรวจวัด
m/z	มวลต่อประจุ
MIC	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยังการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
mm	มิลลิเมตร
ND	ตรวจไม่พบ
pH	ค่าความเป็นกรดด่าง
psi	ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
SD	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
V	แรงดันไฟฟ้า

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural products) เป็นแหล่งของยาที่สำคัญ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจะมีสารที่มีโครงสร้างทางเคมีหลากหลาย ซึ่งสารเหล่านี้มีแหล่งที่มาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลากหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็นผลผลิตจากสิ่งมีชีวิตทั้งจากพืช สัตว์ แม้กระทั่งจากจุลินทรีย์ ซึ่งสารทางธรรมชาติบางชนิดก็มีฤทธิ์กว้าง ทำให้มีรายงานอย่างมากมายถึงการนำเอาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านั้นมาใช้ในการป้องกัน รักษาโรค ใช้เป็นสารต้านจุลชีพและใช้เป็นยาฆ่าแมลงต่าง ๆ ได้

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากพืชยังได้รับความสนใจในการศึกษาและนำมาประยุกต์ใช้ในปัจจุบันมากที่สุด เนื่องจากมีฤทธิ์ในการรักษาโรคและมีฤทธิ์ต้านจุลชีพจำนวนมาก ราคาถูก ประหยัด หาได้ง่ายตามแต่ละท้องถิ่น ปลอดภัย และมักจะไม่มีอาการแพ้ทางเคมีเพราะเป็นสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ ซึ่งในประเทศไทยมีพืชสมุนไพรมากมายหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีสรรพคุณที่แตกต่างกันออกไป (พิสุทธิพร, 2549) เพื่อให้สามารถนำสมุนไพรพื้นบ้านของประเทศไทยเหล่านี้มาใช้ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด จึงควรมีการศึกษารายละเอียดในการสกัด และสรรพคุณของสารที่สำคัญต่าง ๆ ที่ออกฤทธิ์และศึกษาวิธีการใช้ที่ถูกต้อง สามารถนำมาใช้ประยุกต์ให้เกิดประโยชน์ต่อไปได้ในด้านเกษตรกรรม ซึ่งถือว่าเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการเกษตรกรรมในปัจจุบันและอนาคต

น้อยหน่า (สุนทรี, 2535; เต็ม, 2544) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านชนิดหนึ่งที่รู้จักกันในประเทศไทยมานานและยังสามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่น ส่วนต่าง ๆ ของน้อยหน่าล้วนแต่มีสรรพคุณมากมาย ใบและเมล็ดของน้อยหน่าที่มีฤทธิ์เป็นยาฆ่าแมลง ในอดีตได้มีการนำใบที่มีฤทธิ์เป็นยาฆ่าแมลงนี้มาใช้ในการกำจัดพวกปรสิต เช่น เหา และตัวจี๊ด เป็นต้น (ข้อมูลสาธารณะสุขมูลฐาน, 2551) ในปัจจุบันได้มีการนำมาศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีและนำมาศึกษาในทางการแพทย์มากขึ้น พบว่าน้อยหน่าเป็นพืชที่มีฤทธิ์ทางยา เช่น สามารถใช้เป็นยาแก้ปวด สารต้านการอักเสบ สารต้านเชื้อมาลาเรียได้อีกด้วย

การศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของน้อยหน่าจะต้องมีการศึกษาหาสภาวะและตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสกัดเอาสารที่สำคัญที่สนใจแต่ชนิดออกมาจากส่วนต่าง ๆ ของต้นน้อยหน่า และเลือกสายพันธุ์ของน้อยหน่าที่ใช้ในงานวิจัย โดยตัวทำละลายทั่วไปที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญในพืชสมุนไพร ได้แก่ น้ำ (Mahdavikia and Saharkhiz, 2015) เมทานอล (Kumar et al., 2011; Hasan et al., 2015) เอทานอล (Kumar et al., 2010) อะซิโตน (Antunes de Araújo et al., 2014; Kraujalien et al., 2016) เฮกเซน (Bafor et al., 2010; Andreazza et al., 2016) และ

เอทิลอะซิเตท (Nwaehujor and Udeh, 2011; Vaithiyanathan and Mirunalini, 2016) ด้วยวิธีการสกัดหลากหลาย ตัวอย่างเช่น วิธีการสกัดแบบการแช่ยุ่ย (Ortega-Heras et al., 2012; Costa-Machado et al., 2013) ซอกห์เลต (Kaneria and Chanda, 2012; Dutta et al., 2014) รีฟลักซ์ (Chua et al., 2016) การสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ (Chen et al., 2015; Thakkeret et al., 2016) และการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัดด้วยตัวทำละลาย (Park et al., 2015)

สารสกัดที่ได้จากการสกัดสามารถนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (UV-Visible spectroscopy) (Subedi et al., 2014; Hamood and Hossain, 2015) รวมไปถึงการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่ได้ต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography) (Godoy-Caballero et al., 2012) นอกจากนั้นยังมีการทำการยืนยันผลการทดลองด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี (Mass spectroscopy) (Terpinc et al., 2016; Wu et al., 2016; Kelebek, 2016)

จากรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในส่วนต่าง ๆ ของต้นน้อยหน่าสายพันธุ์ *Annona squamosa* ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ของ Kumar et al. (2010) ยังพบว่า สารที่ออกฤทธิ์ทางยาเหล่านั้น คือสารประกอบกลุ่มแอลคาลอยด์ โปรตีน กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต กลัยโคไซด์ ไฟโตสเตอรอล แทนนิน และสารประกอบฟีนอลิก เป็นต้น เมื่อนำสารสกัดเอทานอลที่ได้ไปทดสอบกับแมลง *Sitophilusoryzae* พบว่ามีค่า KD_{50} ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 23.1 และ 11.4 นาที และแมลงจะตายหมดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 39.6±1.4 และ 14.5±1.1 นาที ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกันของ สุดารัตน์ หอมหวล และคณะ (2554) ได้รายงานว่าใบน้อยหน่ามีสารแอลคาลอยด์ แอนโนเนอีน (Anonaine) และเรซิน (Resin) และในเมล็ดมีน้ำมันอยู่ 45เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นพิษกับด้วงปีกแข็ง เพลี้ยอ่อนแมลงวันและมวนปีกแข็ง สารสกัดเมทานอลของใบน้อยหน่าเป็นพิษต่อไรทะเล และใบน้อยหน่ายังเป็นพิษต่อเพลี้ยอ่อนถั่วโดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ Seffrin et al. (2010) ได้รายงานว่าสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลของ *Annona squamosa* และ *Annona atemoya* เป็นพิษต่อตัวอ่อนระยะที่สามของหนอนผีเสื้อสายพันธุ์ *Trichoplusiani* ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตแบบยับยั้งการกินอาหารและความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารสกัดจากเมล็ดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ *Annona squamosa* มีมากกว่า *Annona atemoya* โดยมีค่า DC_{50} เท่ากับ 2.3 และ 20.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษโดยการให้ทางอาหารพบว่าสารสกัดจากเมล็ดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ *Annona squamosa* มีมากกว่า *Annona atemoya* โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 167.5 และ 382.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดจากเมล็ด

น้อยหน่าลดการเติบโตของตัวอ่อนในการทดลองเรือนกระจกได้จริงและมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาฆ่าแมลงจากพืช

แต่ปัจจุบันในประเทศไทยยังมีการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากแต่ละส่วนในน้อยหน่าที่ยังไม่แพร่หลายมากนัก จึงทำให้ยังไม่สามารถนำสารสกัดที่เป็นประโยชน์จากส่วนต่าง ๆ ของน้อยหน่า สกัดออกมาเป็นสารบริสุทธิ์ เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ต่าง ๆ ที่มีในน้อยหน่าและนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้อย่างครบถ้วน

ดังนั้นในการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะทำการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในน้อยหน่า โดยทำการศึกษาหาวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเอาองค์ประกอบทางเคมีใบน้อยหน่าออกมา โดยใช้ใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว ด้วยวิธีการสกัดแบบการแช่ยุ่ย ซอกห์เลต รีฟลักซ์ การสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ และการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปีรวมไปถึงการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่ได้ต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการยืนยันผลการทดลองด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี และนำไปทดสอบฤทธิ์ฆ่าหนอนหรือฤทธิ์ต่อจุลชีพต่อไป ซึ่งผลงานวิจัยที่ได้จะทำให้สามารถนำมาประยุกต์และปรับปรุงใช้ในทางการเกษตรได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดองค์ประกอบทางเคมีของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว ที่ให้ปริมาณของฟีนอลิกรวม และปริมาณของฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบสูง

2. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของฟีนอลิกรวมและปริมาณของฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าในสายพันธุ์ต่าง ๆ

3. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยั้บยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่า

4. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบน้อยหน่าด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และทำการยืนยันผลการทดลองด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง-แมสสเปกโทรเมทรี

ขอบเขตของงานวิจัย

1. หาวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดองค์ประกอบทางเคมีของใบน้อยหน่า โดยใช้ใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว ด้วยวิธีการสกัดแบบการแช่ยุ่ย ซอกห์เลต รีฟลักซ์ การสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟช่วยในการสกัด และการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 6 ชนิดได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากวิธีการต่าง ๆ มาวิเคราะห์หาปริมาณของฟีนอลิกรวม และปริมาณของฟลาโวนอยด์รวม โดยใช้เทคนิคในการวิเคราะห์ด้วยยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปีเป็นเกณฑ์คัดเลือกเพื่อนำวิธีการสกัดที่เหมาะสมไปสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ต่าง ๆ

2. ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ด้วยวิธี broth dilution technique

3. หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และทำการยืนยันผลการทดลองด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง-แมสสเปกโทรเมทรี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. พบวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของใบน้อยหน่า

2. ทราบปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของใบน้อยหน่าในสายพันธุ์ต่าง ๆ

3. ได้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์และทราบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้

4. สามารถนำสารสกัดจากใบน้อยหน่าไปประยุกต์ในการใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้

บทที่ 2
ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร

น้อยหน่า

ลักษณะทั่วไปของน้อยหน่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Annona* spp.

ชื่อสามัญ : Sugar apple, Sweet sop

ชื่ออื่นๆ : หมักเขียบ (ตะวันออกเฉียงเหนือ) ลาหนัง (ปัตตานี) มะนอแน่ (เหนือ) เตียบ (เขมร) หน่อเกล๊ะแซ (เงี้ยว-แม่ฮ่องสอน) มะออจ้า มะโอจ่า (เงี้ยว-เหนือ)

การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของน้อยหน่า

Kingdom : Plantae

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Order : Magnoliales

Family : Annonaceae

Genus : Annona

น้อยหน่า (เต็ม, 2523) มีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกากลางและใต้ ปัจจุบันพบได้ทั่วไปในเขตร้อน น้อยหน่าเป็นไม้ยืนต้น ดังภาพที่ 1 (ก) มีความสูงประมาณ 3-5 เมตร ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปใบหอกแกมขอบขนานกว้างประมาณ 3-6 ซม. ยาวประมาณ 7-13 ซม. ดังภาพที่ 1 (ข) ดอกมีลักษณะเป็นดอกเดี่ยวจะออกที่ซอกใบและห้อยลง กลีบดอกมีสีเหลืองแกมเขียว 6 กลีบ เรียง 2 ชั้น ชั้นละ 3 กลีบ มีลักษณะหนาอวบน้ำ มีเกสรตัวผู้และรังไข่จำนวนมาก ดังภาพที่ 1 (ค) ผลเป็นผลกลุ่มค่อนข้างกลมมีสีเขียว สีครั่ง และสีทอง

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 1 ลักษณะของต้นน้อยหน่า (ก) ใบน้อยหน่า (ข) ดอกน้อยหน่า (ค)

สรรพคุณทางยา

ใบสดและเมล็ดน้อยหน่าสามารถใช้ขับพยาธิลำไส้ ฆ่าเหา แก้หิด กลากเกลื้อน และแก้ฟกบวม ส่วนรากสามารถใช้เป็นยาระบาย ทำให้อาเจียน ถอนพิษเบื่อเมา และแก้พิษงู เปลือกต้นใช้เป็นยาสมานลำไส้ สมานแผล แก้ท้องร่วง แก้พิษงู แก้รำมะนาด ยาฝาดสมาน ผลสดใช้เป็นยาแก้พิษงู แก้ฝีในคอ กลาก เกลื้อน ฆ่าพยาธิ ผิวหนัง และผลแห้งสามารถใช้แก้งูสวัด เริม แก้ฝีในหู (เต็ม, 2544; พิสุทธิพร, 2549)

สายพันธุ์น้อยหน่าและน้อยหน่าลูกผสมในประเทศไทย

จากการศึกษาสายพันธุ์น้อยหน่าและน้อยหน่าลูกผสมในประเทศไทยของสถานีวิจัยปากช่อง ซึ่งเป็นหน่วยงานของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้มีการเริ่มโครงการรวบรวมเชื้อพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์น้อยหน่าและน้อยหน่าลูกผสม โดยได้มีการสำรวจและเก็บตัวอย่างพันธุ์ปลูกจากแหล่งปลูกทั่วประเทศ พบว่าในปัจจุบันน้อยหน่าและน้อยหน่าลูกผสมมีสายพันธุ์มากกว่า 100 สายพันธุ์ สถานีวิจัยปากช่องได้ทำการปลูกพร้อมกับจำแนกสายพันธุ์เบื้องต้น ตามลักษณะสีผิวของผล สีเนื้อ สีใบ ลักษณะของผลภายใน และภายนอกเป็นต้น แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มพันธุ์ คือ (เรืองศักดิ์ และกวิศร์, 2553)

กลุ่มที่ 1 น้อยหน่าพื้นเมืองหรือน้อยหน่าฝ้าย แบ่งออกได้ 2 สายพันธุ์ ตามลักษณะของสีผล คือ น้อยหน่าฝ้ายเขียวซึ่งมีผลสีเขียวดังภาพที่ 2 (ก) กับน้อยหน่าฝ้ายครั่งมีผลสีม่วงเข้ม ดังภาพที่ 2 (ข) ลักษณะภายในผล เนื้อหยาบเป็นทราย ยุ่ย ไม่จับตัวเป็นก้อน เนื้อมีสีขาวในน้อยหน่าฝ้ายเขียว และสีขาวอมชมพูในน้อยหน่าฝ้ายครั่ง เมื่อผลสุกเปลือกไม่ล่อนออกจากเนื้อและเละง่าย มีกลิ่นหอมและรสหวาน

(ก) (ข)

ภาพที่ 2 ลักษณะผลน้อยหน่าฝ้ายเขียว (ก) ฝ้ายครั่ง (ข)

กลุ่มที่ 2 น้อยหน่าหนังหรือน้อยหน่าญวน แบ่งออกได้เป็น 3 สายพันธุ์ คือ น้อยหน่าหนังเขียว มีผลสีเขียวดังภาพที่ 3 (ก) น้อยหน่าหนังครั่งเกิดจากการเพาะเมล็ดแล้วมีการกลายพันธุ์ แต่มีผลสีม่วงเข้มคล้ายน้อยหน่าฝ้ายครั่งดังภาพที่ 3 (ข) และน้อยหน่าหนังทองเกิดจากการเพาะเมล็ดแล้วกลายพันธุ์ผลมีสีเหลืองทองเช่นเดียวกับหนังครั่ง ดังภาพที่ 3 (ค) ลักษณะภายในผล เนื้อจะมากเหนียวละเอียด สีขาวในน้อยหน่าหนังเขียว สีขาวอมชมพูในน้อยหน่าหนังครั่ง และสีขาวอมเหลืองในน้อยหน่าหนังทอง ดังภาพที่ 3 เมื่อผลสุกเปลือกจะล่อนเป็นแผ่นลอกจากเนื้อได้ง่าย มีกลิ่นหอมและรสหวาน

(ก) (ข)

(ค)

ภาพที่ 3 ลักษณะผลน้อยหน่าหนังเขียว (ก) หนังครั่ง (ข) หนังทอง (ค)

กลุ่มที่ 3 น้อยหน่าลูกผสมหรืออะติมัวย่า เป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างน้อยหน่า (A. *squamosa* Linn.) กับ เชริมัวย่า (A. *cherimola* Mill.) มีชื่อสามัญว่า อะติมัวย่า (atemoya) ดังภาพที่ 4

ภาพที่ 4 ลักษณะผลน้อยหน่าลูกผสม

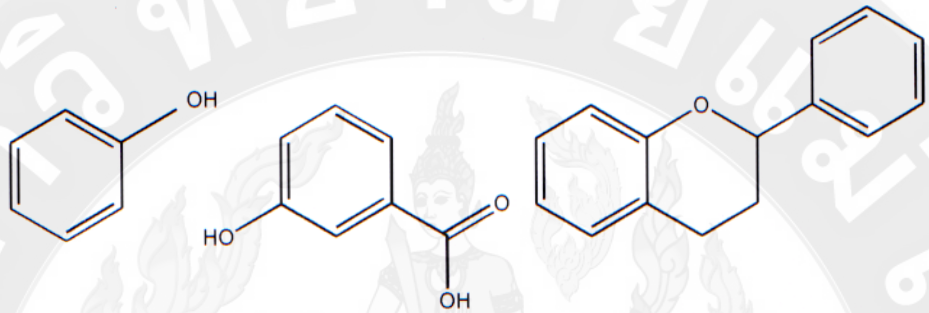
กลุ่มที่ 4 ลูกผสมอื่น ๆ เป็นกลุ่มพันธุ์ที่กลายพันธุ์เองจากธรรมชาติที่พบในแปลงเกษตรกร ไม่สามารถทราบชื่อพ่อแม่พันธุ์หรือที่มาของพันธุ์ได้ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะที่แตกต่างกันเช่นเดียวกับกลุ่มน้อยหน่าลูกผสมหรืออะติมัวย่า

องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ

องค์ประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพรมีหลายชนิดแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดสายพันธุ์และส่วนต่าง ๆ ของพืช การทราบองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจะช่วยให้สามารถนำสมุนไพรชนิดนั้นมาใช้ประโยชน์ได้อย่างเต็มที่และยังสามารถพัฒนาให้เป็นยารักษาโรคได้อย่างเหมาะสม องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญที่พบในพืชสมุนไพรส่วนใหญ่มีดังนี้

สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) หรือ สารประกอบฟีนอล เป็นสารที่พบได้ตามธรรมชาติในพืชทั่วไปหลาย ๆ ชนิด เป็นอนุพันธ์ของเบนซีน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH-group) ต่ออยู่เป็นหลัก และอาจมีหมู่แทนที่ในตำแหน่งออโท (Ortho) เมตา (Meta) หรือพารา (Para) ต่ออยู่กับสารประกอบฟีนอลิกพื้นฐาน คือ ฟีนอล (Phenol) (พิมพ์เพ็ญ และ นิธิยา, 2557) ดังภาพที่ 5

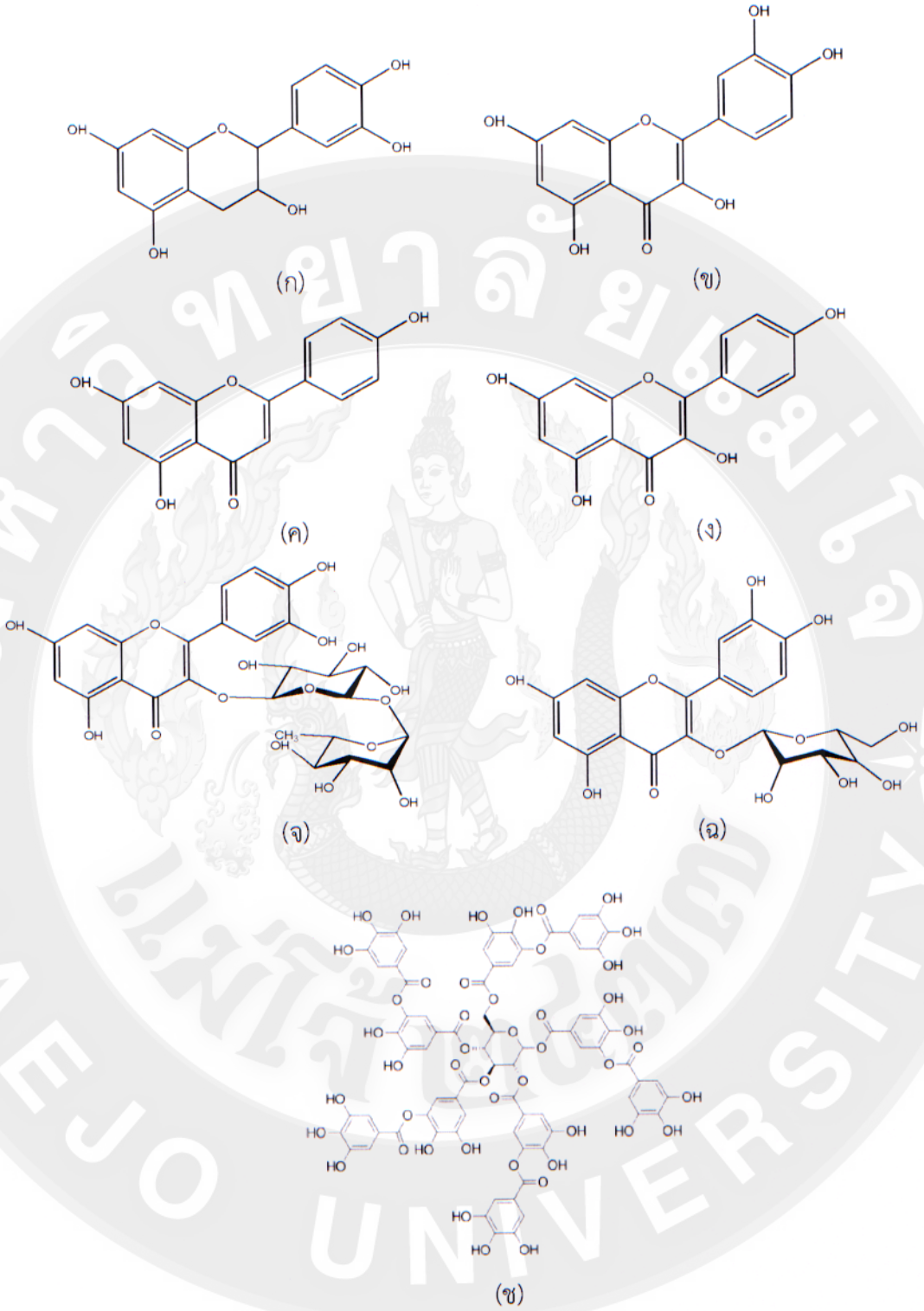


ฟีนอล กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์

ภาพที่ 5 โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติ มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (Phenolic acids) ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นโพลิเมอร์ เช่น ลิกนิน (Lignin) กลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบคือ สารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) และสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบ กลัยโคไซด์ (Glycoside) น้ำตาลที่พบว่าอยู่รวมโมเลกุลกับสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด คือ น้ำตาลกลูโคส (Glucose) และพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลหรือสารประกอบอื่น ๆ ได้อีก เช่น กรดอินทรีย์ (Organic acid) หรืออาจรวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน เช่น แอลคาลอยด์ (Alkaloids) และเทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) เป็นต้น

ตัวอย่างของสารประกอบฟีนอลิกที่มักพบในสารสกัดทางธรรมชาติ มีทั้งสารประกอบที่รวมกลุ่มกับสารอื่น ๆ ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติ

หมายเหตุ (ก) คาเทชิน (ข) เคอร์ซิทิน (ค) อะพิจินิน (ง) แคมป์ฟีรอล (จ) รูทิน (ฉ) ไอโซเคอร์ซิทิน และ (ช) กรดแทนนิก

ประโยชน์ของสารประกอบฟีนอลิก

1. ประโยชน์ต่อพืช ใช้ในการเจริญเติบโต

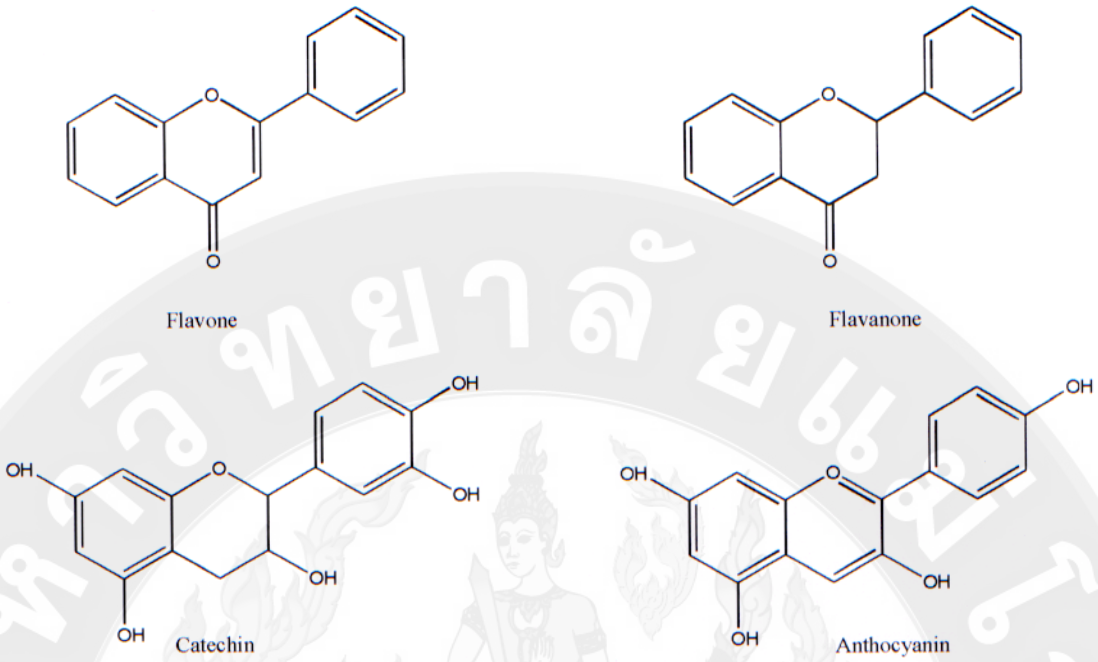
2. ประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยส่วนใหญ่พืชสมุนไพรมักจะมีสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดเป็นองค์ประกอบและมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันและสารต้านการกลายพันธุ์ (Antimutagens) มีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพ สามารถการป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ (Free radical) และไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่น ๆ โดยใช้ตัวเองเป็นตัวรับอนุมูลอิสระทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ที่มีสารอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุ แต่สารต้านอนุมูลอิสระก็จะถูกทำลายไปด้วย

3. ใช้ในการถนอมอาหาร โดยใช้เป็นสารกันหืน เพื่อป้องกันปฏิกิริยาการออกซิเดชันของลิพิด (Lipid oxidation)

ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) (พิมพ์เพ็ญ และ นิธิยา, 2556) เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลรวมอยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สามารถละลายในน้ำได้ ส่วนใหญ่มักพบอยู่รวมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบกลัยโคไซด์

สารประกอบฟลาโวนอยด์ สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ ตามระดับการออกซิเดชันและหมู่ฟังก์ชันของ C ring คือ ฟลาโวนอล (Flavonol) ฟลาโวโนน (Flavonone) ฟลาโวน (Flavone) ไอโซฟลาโวน (Isoflavone) และแอนโทไซยานิดีน (Anthocyanidin) ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 โครงสร้างโมเลกุลของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

ประโยชน์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟลาโวนอยด์อาจเรียกได้ว่าเป็นสารโภชนเภสัช (Nutraceutical) หมายถึง อาหารหรือองค์ประกอบของอาหารที่สามารถนำมาใช้เป็นยาหรือมีประโยชน์ต่อสุขภาพ ทั้งในด้านการป้องกันและการรักษาโรค โดยมีประโยชน์ดังนี้

1. สารต้านอนุมูลอิสระพบว่ากลุ่มของสารประกอบฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเช่น ฟลาโวนและคาเทชิน เป็นสารที่สามารถช่วยป้องกันการถูกทำลายของเซลล์และเนื้อเยื่อร่างกายจากอนุมูลอิสระและออกซิเจนอิสระ (Reactive oxygen species, ROS) ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของสารประกอบฟลาโวนอยด์แสดงได้ดังนี้ Myrcetin > Quercetin > Rhamnetin > Morin > Diosmetin > Naringenin > Apigenin > Catechin > 5,7-dihydroxy-3´,4´,5´-trimethoxy-flavone > Robinin > Kaempferol > Flavone

2. สารต้านจุลชีพ (Antimicrobial) เช่น เคอร์ซิทิน (Quercetin) มีคุณสมบัติเป็นสารต้านแบคทีเรีย (Antibacterial)

3. สารต้านไวรัส (Antiviral) เช่น เคอร์ซิทิน, โมริน (Morin), รูทิน, ไดไฮโดรเคอร์ซิทิน (Dihydroquercetin), อะพิจินิน, คาเทชิน และ เฮสพิริดีน (Hespiridine) ช่วยในการต้านทานไวรัสได้ถึง 11 ชนิด

4. สารต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) เช่น แคมป์ฟีรอล (Kaempferol) เคอร์ซิทิน (Quercetin) เป็นต้น

5. สารต้านโรคเบาหวาน (Antidiabetic) ได้แก่ สารเคอร์ซิทิน โดยพบว่าช่วยกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินและเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมแคลเซียมซึ่งมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

6. ผลต่อระบบไหลเวียนโลหิต พบว่าการได้รับสารฟลาโวนอยด์จะช่วยป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง ภาวะการมีไขมันในเลือดสูงและหลอดเลือดแดงแข็งตัว การแข็งตัวของเลือด เป็นสารที่มักจะมีสี เช่น คาร์ทามิน (Cathamin) สีแดงจากดอกคำฝอย ลูทิโอลิน (Luteolin) สีเหลืองจากดอกสายน้ำผึ้ง ไคร์ซิน (Chrysin) สีเหลืองอ่อนจากเปลือกของต้นเพกา เป็นต้น ยังพบอีกว่าสารฟลาโวนอยด์บางชนิดมีฤทธิ์ช่วยลดอาการเส้นโลหิตเปราะ เช่น รูทิน และเคอร์ซิทิน เป็นต้น

แอลคาลอยด์

แอลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นสารอินทรีย์กลุ่มที่มีธาตุไนโตรเจนอยู่ภายในโมเลกุล ในรูปของเอมีน (amine) เอมีนออกไซด์ (Amine oxide) หรืออาจพบอยู่ในรูปของเอไมด์ (Amide) และอีไมด์ (Imide) ไนโตรเจนในแอลคาลอยด์ได้มาจากกรดอะมิโน โดยทั่วไปแอลคาลอยด์ จะมีคุณสมบัติเป็นเบส แต่จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนของไนโตรเจน บางชนิดเป็นกลางหรือเป็นกรดอ่อน ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำลายอินทรีย์ (Organic solvent) เป็นสารที่พบมากในพืชสมุนไพรมักมีฤทธิ์ทางยา ในธรรมชาติจะพบแอลคาลอยด์มากในพืชชั้นสูง ตามส่วนต่างๆ ของพืชเช่น ใบ ดอก ผล เมล็ด รากและเปลือก แต่ปริมาณสารจะต่างกันไปตามฤดูกาล สารประเภทนี้จะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในหลายระบบ ตัวอย่างเช่น สารรีเซอร์ปีน (Reserpine) ในรากของต้นระย่อม มีสรรพคุณลดความดันเลือด สารควินีน (Quinine) ในเปลือกต้นซิงโคนา (Cinchona) มีสรรพคุณรักษาโรคมาเลเรีย และสารมอร์ฟีน (Morphine) ในยางของผลฝิ่น มีสรรพคุณระงับอาการปวด เป็นต้น (ประไพรัตน์, 2555)

การแบ่งแอลคาลอยด์ตามโครงสร้างทางเคมี สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. กลุ่มแอลคาลอยด์ที่มีไนโตรเจนอยู่นอกวง (Non-heterocyclic alkaloids) ตัวอย่างเช่น สารอีฟิดรีน (Ephedrine) และ อีริโทรไมซิน (Erythromycin) เป็นต้น

2. กลุ่มแอลคาลอยด์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนของวง (Heterocyclic alkaloids) ตัวอย่างเช่น สารรีเซอร์ปีน (Reserpine) ควินีน (Quinine) และมอร์ฟีน (Morphine) เป็นต้น

หน้าที่ของแอลคาลอยด์ในพืชยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด สันนิษฐานว่าอาจเป็นแหล่งสะสมไนโตรเจนเพื่อสร้างโปรตีน ควบคุมการเจริญเติบโต หรือการงอกของเมล็ดพืชบางชนิด ช่วยป้องกันพืชจากแมลง หรืออาจเป็นสารที่ได้จากการทำลายพิษที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมทาบอลิซึมของพืช โดยแอลคาลอยด์ส่วนใหญ่มักมีรสขมและมีพิษ อย่างไรก็ตามมีพืชมากกว่า 80% ที่ไม่สร้างและไม่สะสม

แอลคาลอยด์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารแอลคาลอยด์เป็นสารที่ไม่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพืชทุกชนิด มักจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น อะโทรปีน (Atropine) จากดอกลำโพง สตริกนีน (Strychnine) จากโกศกะกลิ้งหรือแสลงใจ มอร์ฟีน (Morphine) จากฝิ่น และควินิน (Quinine) จากซิงโคนา เป็นต้น

กลัยโคไซด์

กลัยโคไซด์ (Glycoside) เป็นสารประกอบที่มีองค์ประกอบอยู่ 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำตาล เรียกว่า กลัยโคน (Glycone) และส่วนที่ไม่เป็นน้ำตาล เรียกว่า อะกลัยโคน (Aglycone) โดยพบว่ากลัยโคโซด์หลายชนิดมีประโยชน์ทางยา เช่น แอนทราควิโนนกลัยโคไซด์ (Anthraquinone glycosides) จากชุมเห็ดเทศ มะขามแขก และยาดำ มีฤทธิ์เป็นยาระบาย

น้ำมันระเหยง่าย

น้ำมันระเหยง่าย (Volatile Oil) เป็นของเหลวที่มีกลิ่นจำเพาะ ส่วนมากจะมีกลิ่นหอม ระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิห้อง บางครั้งจึงมีผู้เรียกว่าน้ำมันหอมระเหย (Essential Oil) น้ำมันระเหยง่าย มักประกอบไปด้วยสารเคมีที่สำคัญประเภทเทอร์ปีนอยด์ (Terpeniod) น้ำมันระเหยง่ายมีหลายชนิดที่มีประโยชน์ เช่น น้ำมันกานพลู ใช้ขับลม ฆ่าเชื้อและใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ ระงับอาการปวดฟัน น้ำมันสะระแหน่ ใช้เป็นยาขับลม บำบัดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และน้ำมันยูคาลิปตัส ใช้เป็นยาขับเสมหะและฆ่าเชื้อ เป็นต้น

แทนนิน

แทนนิน (Tannins) เป็นสารที่มีรสฝาด มีฤทธิ์เป็นยาฝาดสมานบรรเทาอาการท้องร่วง พบในสีเสียด ฝรั่ง สมอไทย เป็นต้น

สเตอรอยด์

สเตอรอยด์ (Steroid) เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับฮอร์โมนและยาต้านอักเสบ ด้วยเหตุนี้สารในกลุ่มนี้บางชนิดจึงนำมาเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยาดังกล่าว เช่น ไดออสเจนิน (diosgenin) จากเอื้องหมายนา เป็นต้น

เทอร์ปีนอยด์

เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoid) เป็นสารประกอบกลุ่มที่สามารถพบได้ในพืชทั่วไปและเป็นองค์ประกอบสำคัญของน้ำมันระเหยง่าย เช่น ลิโมนีน (Dimonene) และซิโทรเนลลอล (Citronellol) เป็นต้น

ยางไม้

ยางไม้ (Gum) เป็นของเหนียวที่พบในพืช ที่มักไหลออกมาเมื่อพืชเป็นแผล โดยบางชนิดสามารถนำมาใช้ในการเตรียมยาจำพวกอีมัลชั่น (Emulsion) ในทางเภสัชกรรม เช่น กัมอะเคเชีย (Gum acacia) และกัมทรากาคานท์ (Gum tragacanth)

สารอื่นๆ เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน เอ็นไซม์ วิตามิน และเรซิน (Resin) เป็นต้น

การสกัด

การสกัด (Extraction) เป็นเทคนิคในการแยกสารออกจากของผสมโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในเคมีอินทรีย์ เช่น การแยกสารออกจากของผสมที่ได้จากการสังเคราะห์ และแยกสารออกจากของผสมที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ การสกัดด้วยตัวทำละลายมีหลายวิธี โดยสามารถแบ่งเทคนิคการสกัดได้ตามสถานะของตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารดังนี้

1. เทคนิค liquid - liquid extraction สารสกัดเป็นของเหลว
2. เทคนิค liquid - solid extraction สารสกัดเป็นของแข็ง
3. เทคนิค acid - base extraction

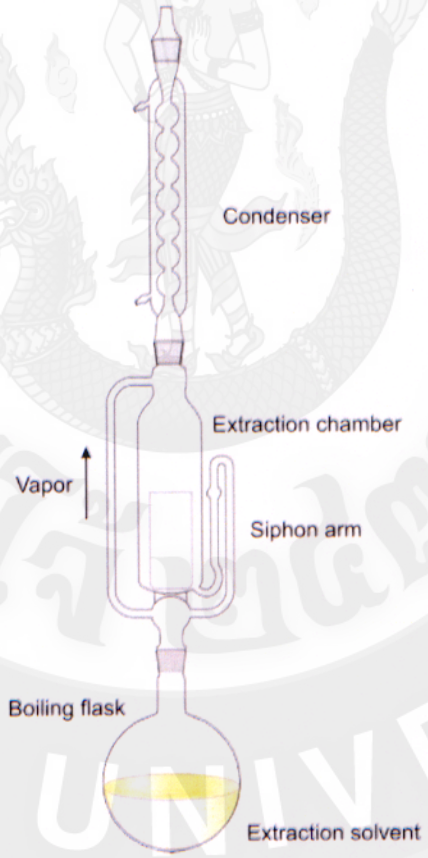
การสกัดองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในพืชสมุนไพร สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการแยก (Dean, 1998) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้วิธีการสกัดที่สำคัญ เช่น

วิธีแช่ยุ่ย

วิธีแช่ยุ่ย (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถเป็นต้น ทิ้งไว้ตามระยะเวลาที่เหมาะสม ในระหว่างนั้นต้องหมั่นเขย่าหรือคนบ่อย ๆ เมื่อครบตามกำหนดเวลาจึงค่อย ๆ รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบสารละลายออกจากกากให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง ถ้าต้องการสกัดให้ได้ประสิทธิภาพ อาจจำเป็นต้องสกัดหลาย ๆ ครั้ง ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือสารสกัดที่ได้ไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก (วลี, 2550)

วิธีสกัดด้วยซอกห์เลต

วิธีสกัดด้วยซอกห์เลต (Soxhlet extraction) เป็นวิธีที่ใช้ความร้อนในการสกัดและต้องอาศัยการควบแน่นเข้าช่วย เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง (Dean, 1998) ตัวทำละลายจะต้องมีจุดเดือดต่ำ เมื่อระเหยจะนำสารจากพืชสมุนไพรไปด้วยจากนั้นเมื่อถูกความเย็นก็จะกลั่นตัวลงในทิมเบิล (Thimble) ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายในภาชนะที่ถูกทำให้เกิดการสกัด (Extracting chamber) สูงขึ้นถึงระดับกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับไปในขวดก้นกลมด้วยวิธีกาลักน้ำ ทำตัวละลายก็ระเหยขึ้นแล้วกลั่นตัวกลับมาเป็นตัวทำละลายสกัดสารใหม่ วนเวียนไป ดังภาพที่ 8 การใช้ความร้อนอาจทำให้สารที่ระเหยง่ายระเหยออกไป จึงไม่เหมาะกับการสกัดสารจากพืชสมุนไพรที่มีสารที่ระเหยง่ายเป็นองค์ประกอบ วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสำหรับการสกัดสารองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อน และใช้ตัวทำละลายน้อยไม่สิ้นเปลือง (วลี, 2550)

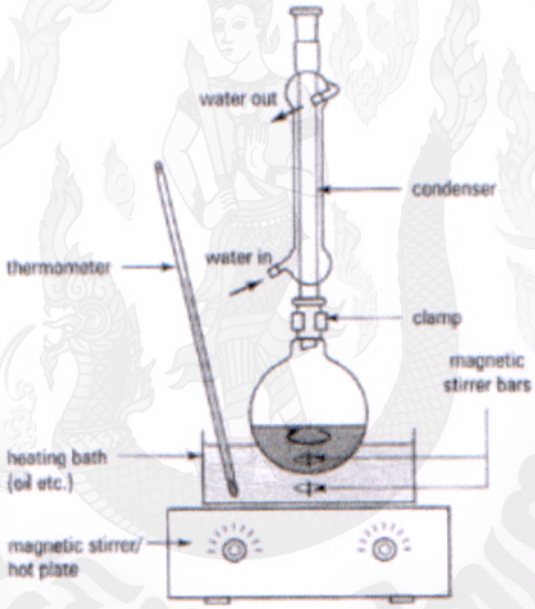


ภาพที่ 8 ชุดสกัดซอกห์เลต (Soxhlet extractor apparatus)

ที่มา: Chemistry Glossary (2017)

วิธีรีฟลักซ์

วิธีรีฟลักซ์ (Reflux) เป็นวิธีที่ใช้ความร้อนในการสกัดและต้องอาศัยการควบแน่นเข้าช่วย เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง (Dean, 1998) เมื่อตัวทำละลายถูกให้ความร้อนจะสกัดนำสารจากพืชสมุนไพรออกมา แต่ตัวทำละลายเมื่อถูกความร้อนจนถึงจุดเดือดทำตัวละลายก็ระเหยขึ้นแต่เมื่อถูกความเย็นก็จะกลั่นตัวและไหลกลับไปในขวดก้นกลมที่มีพืชสมุนไพรอยู่ วนเวียนไป ดังภาพที่ 9 การใช้ความร้อนอาจทำให้สารที่ระเหยง่ายระเหยออกไป จึงไม่เหมาะกับการสกัดสารจากพืชสมุนไพรที่มีสารที่ระเหยง่าย เป็นองค์ประกอบ วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสำหรับการสกัดสารองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อน และใช้ตัวทำละลายน้อยไม่สิ้นเปลือง (วลี, 2550)



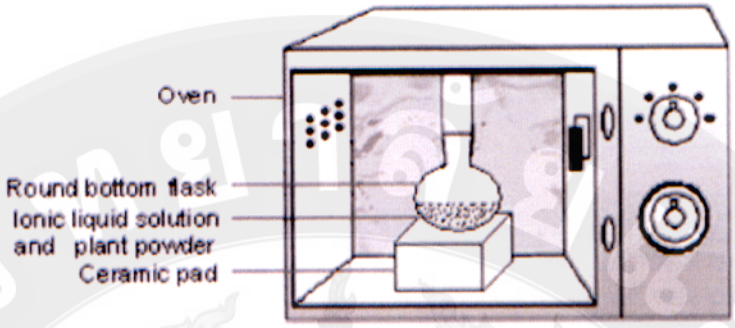
ภาพที่ 9 ชุดสกัดรีฟลักซ์ (reflux apparatus)

ที่มา: Biocyclopedia (2017)

วิธีสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ

วิธีสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ (Microwave assisted extraction) เป็นการสกัดโดยตรงของคลื่นไมโครเวฟต่อโมเลกุล โดยพลังงานจากคลื่นไมโครเวฟมีผลทำให้โมเลกุลเกิดการเคลื่อนไหว โดยเกิดการไมเกรตของไอออนและการหมุนของคู่ขั้ว โดยการหมุนของคู่ขั้วเป็นผลให้เกิดเป็นสนามไฟฟ้าของโมเลกุลทั้งในตัวทำละลายและในตัวอย่างทำให้มีความร้อนเกิดขึ้นอย่างฉับพลัน มีประสิทธิภาพใน

การสกัด ลดเวลาในการเตรียมตัวอย่างและลดปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการสกัดตัวอย่างแบบเดิม (Dean, 1998)



ภาพที่ 10 เครื่องไมโครเวฟช่วยในการสกัด

ที่มา: Yao et al. (2012)

วิธีสกัดโดยใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด

วิธีสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ (Microwave assisted extraction) ซึ่งคลื่นอัลตร้าโซนิค (Ultrasound หรือ Sonication) เป็นคลื่นเสียง ที่มีความถี่อยู่ในช่วงที่หูมนุษย์ไม่สามารถได้ยิน และเมื่อคลื่นนี้ผ่านน้ำจะทำให้เกิดคลื่นน้ำและฟองอากาศ (Cavitation) ซึ่งเป็นการเกิดคลื่นน้ำและฟองอากาศซ้ำแล้วซ้ำอีกในขนาดที่เล็กมาก ประมาณหนึ่งในหนึ่งล้านเมตร (ขนาดไมครอน) ทำให้ได้พลังงานจำนวนมาก (ศิริวัลย์ และคณะ, 2556; Dean, 1998)

ภาพที่ 11 การใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด

ตัวทำละลาย

ตัวทำละลาย (Solvent) เป็นของเหลวที่สามารถละลายตัวถูกละลายที่เป็นของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซได้เป็นสารละลาย โดยตัวทำละลายที่คุ้นเคยมากที่สุดและใช้ในชีวิตประจำวันคือน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) จะหมายถึงตัวทำละลายอีกชนิดที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ (Organic compound) และมีคาร์บอนอะตอมอยู่ด้วย โดยปกติตัวทำละลายจะมีจุดเดือดต่ำ และระเหยง่าย หรือสามารถกำจัดโดยการกลั่นได้ โดยทั่วไปแล้วตัวทำละลายไม่ควรทำปฏิกิริยากับตัวถูกละลาย และตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดทั่วไปมีหลายชนิดเช่นกัน (ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์, 2556)

การแบ่งกลุ่มของตัวทำละลายออกเป็นกลุ่มต่างๆ ตามสภาพขั้ว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวทำละลายไม่มีขั้ว (Non polar solvent) กลุ่มตัวทำละลายมีขั้วที่ปราศจากไฮโดรเจนที่แตกตัวได้ (Polar aprotic solvent) และกลุ่มตัวทำละลายมีขั้วที่มีไฮโดรเจนที่แตกตัวได้ (Polar protic solvent) ซึ่งคุณสมบัตินี้เป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญในการเลือกตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญในงานวิจัยนี้ นอกจากคุณสมบัติความมีขั้วของตัวทำละลายแล้ว ยังมีคุณสมบัติอื่นๆ อีกมากมายที่มีผลต่อการสกัดสารที่สนใจออกมา ดังนั้นจึงมีหลักการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม (Dean, 1998) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งเพื่อให้การสกัดมีประสิทธิภาพสูง โดยพิจารณาดังนี้

1. ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด
2. ไม่ละลายในตัวทำละลายที่ละลายของผสม
3. ละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี (K_d มีค่าสูง) ขณะที่ละลายสารอื่นได้น้อย (K_d มีค่าต่ำ)
4. แยกจากสารสกัดได้ง่ายหลังจากสกัดแล้ว เช่น มีจุดเดือดต่ำ เป็นต้น
5. ราคาถูก
6. ความเป็นพิษของตัวทำละลาย

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในแต่ละกลุ่มดังต่อไปนี้

1. น้ำ (water) สูตรโมเลกุลคือ H_2O มวลโมเลกุลเท่ากับ 18.02 กรัมต่อโมล มีจุดเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส ความมีขั้วเท่ากับ 80 ความหนาแน่นเท่ากับ 0.998 กรัมต่อมิลลิลิตร มีลักษณะทั่วไปโปร่งใส เกือบเป็นของเหลวไม่มีสี หรือมีสีน้ำเล็กน้อย เป็นตัวทำละลายที่ดี เนื่องจากมีราคาถูก หาได้ง่าย มีความเป็นพิษต่อเซลล์พืชต่ำ มีอำนาจในการทำละลายที่กว้างมาก จัดอยู่ในกลุ่มตัวทำละลายมีขั้วที่มีไฮโดรเจนที่แตกตัวได้

2. เมทานอล (Methanol) หรือเรียกว่า เมทิลแอลกอฮอล์ (Methyl alcohol) สูตรโมเลกุลคือ CH_3OH มวลโมเลกุลเท่ากับ 32.05 กรัมต่อโมล จุดเดือดที่ 65 องศาเซลเซียส ความมีขั้วเท่ากับ 33 ความหนาแน่นเท่ากับ 0.7918 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารกลุ่มแอลกอฮอล์เป็นของเหลวใส ระเหยง่าย เป็นพิษ นิยมใช้เป็นตัวทำละลาย เช่น เมทานอลเป็นผลิตภัณฑ์จากการสลายสารอาหารแบบไม่ใช้ออกซิเจนของแบคทีเรียหลายชนิด จัดอยู่ในกลุ่มตัวทำละลายมีขั้วที่มีไฮโดรเจนที่แตกตัวได้

3. เอทานอล (Ethanol) หรือเรียกว่า เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) สูตรโมเลกุลคือ C_2H_6O มวลโมเลกุลเท่ากับ 46.07 กรัมต่อโมล จุดเดือดที่ 79 องศาเซลเซียส ความมีขั้วเท่ากับ 24 ความหนาแน่นเท่ากับ 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร สารกลุ่มแอลกอฮอล์เป็นของเหลวใส ระเหยง่าย เป็นพิษน้อยกว่าเมทานอล นิยมใช้เป็นตัวทำละลายเช่นกัน จัดอยู่ในกลุ่มตัวทำละลายมีขั้วที่มีไฮโดรเจนที่แตกตัวได้

4. อะซิโตน (Acetone) หรือเรียกว่า โพรพาโนน (Propanone) สูตรโมเลกุลคือ C_3H_6O มวลโมเลกุลเท่ากับ 58.08 กรัมต่อโมล จุดเดือดที่ 56 องศาเซลเซียส ความมีขั้วเท่ากับ 21 ความหนาแน่นเท่ากับ 0.786 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารเคมีที่พื้นฐานที่สุดของกลุ่มคีโตน (Ketone group) เป็นของเหลวที่ระเหยง่ายไม่มีสี ละลายได้ดีในน้ำ เอทานอล และอีเทอร์ เป็นตัวทำละลายที่สำคัญมาก จัดอยู่ในกลุ่มตัวทำละลายมีขั้วที่ปราศจากไฮโดรเจนที่แตกตัวได้

5. เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) สูตรโมเลกุลคือ $C_4H_8O_2$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 88.11 กรัมต่อโมล จุดเดือดที่ 77.1 องศาเซลเซียส ความมีขั้วเท่ากับ 6 ความหนาแน่นเท่ากับ 0.902 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารกลุ่มเอทิลเอสเตอร์เป็นเอทานอลและกรดอะซิติก เป็นของเหลวใสไม่มีสี มีกลิ่นหอม นิยมใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมน้ำยาล้างเล็บ เป็นต้น จัดอยู่ในกลุ่มตัวทำละลายไม่มีขั้ว

6. เฮกเซน (Hexane) สูตรโมเลกุลคือ C_6H_{14} มวลโมเลกุลเท่ากับ 86.18 กรัมต่อโมล จุดเดือดที่ 69 องศาเซลเซียส ความมีขั้วเท่ากับ 2 ความหนาแน่นเท่ากับ 0.6548 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารประกอบ แอลเคนโซ่ตรงที่มีจำนวนคาร์บอน 6 อะตอม เป็นของเหลวใส ไม่มีสี จุดเดือดต่ำ เป็นของเหลวใส ไม่มีสี จุดเดือดต่ำ เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่พบบ่อยในห้องปฏิบัติการและในอุตสาหกรรม จัดอยู่ในกลุ่มตัวทำละลายไม่มีขั้ว

จากข้อมูลขั้นต้นสามารถสรุปคุณสมบัติของตัวทำละลายที่เลือกใช้ได้คร่าว ๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาพขั้ว จุดเดือดและ polarity ของตัวทำละลายแต่ละชนิด

ตัวทำละลาย	สภาพขั้ว	จุดเดือด (องศาเซลเซียส)	Polarity
เฮกเซน	non polar	69	2
เอทิลอะซิเตท	non polar	77	6
อะซิโตน	polar aprotic	56	21
เอทานอล	polar protic	79	24
เมทานอล	polar protic	65	33
น้ำ	polar protic	100	80

ที่มา: วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี (2556)

การวิเคราะห์ทางเคมีของสารสกัดหยาบสามารถทำได้หลายทาง แต่ทุกเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ต้องสามารถรายงานผลการตรวจวัดวิเคราะห์ที่ได้ออกมาเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นเทคนิคและเครื่องมือที่เลือกใช้ในงานวิเคราะห์จะต้องมีประสิทธิภาพและสามารถทำงานได้เป็นอย่างดี เพื่อที่จะให้ผลการวิเคราะห์มีความแม่นยำ มีความเที่ยง มีขีดจำกัดในการตรวจวัดได้ต่ำเพียงพอต่อการวิเคราะห์และสามารถตรวจสอบกลับได้ ดังนั้นจึงมีหลักการเลือกเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่เหมาะสมคือ

1. เทคนิคนั้นจะต้องมีความสามารถในการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว
2. มีความเสถียรดี (Stability)
3. มีความจำเพาะกับสารที่ต้อง (Selectivity)
4. มีการรบกวนจากตัวอย่างน้อย (Robustness)
5. มีความไวสูงและปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้น้อย (Selectivity and low limits of detection)
6. มีช่วงความเป็นเส้นตรงกว้าง (Linearity and dynamic range)

เครื่องมือในการวิเคราะห์ควรมีคุณสมบัติที่ดีคือ

1. ต้องเหมาะสมกับเทคนิควิเคราะห์ที่เลือกใช้
2. ใช้งานง่าย สะดวก มีความปลอดภัยต่อการใช้งาน และบำรุงรักษาง่าย
3. ใช้งานได้กับตัวอย่างที่หลากหลายและเหมาะกับตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์
4. ใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อย และมีของเสียจากงานวิเคราะห์น้อย

5. เครื่องมือมีสมรรถนะของการทำงานสูง

6. มีความน่าเชื่อถือในงานวิเคราะห์ทางเคมี

7. เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ราคาไม่แพงเกินไปและมีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำ

เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy) เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับแสงหรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีลักษณะเป็นแถบพลังงาน (Spectrum) โดยใช้หลักการวัดการดูดกลืน (Absorption) หรือการแผ่รังสี (Emission) รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic radiation) ของสาร ใช้ประโยชน์ทั้งในด้านพิสูจน์โครงสร้างและหาปริมาณของสาร สามารถตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative Analysis) และเชิงปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative Analysis) เป็นเทคนิคที่มีความสำคัญทางวิทยาศาสตร์เป็นอย่างยิ่ง เพราะถือว่าเป็นเทคนิคที่ง่าย ถูกต้องแม่นยำและใช้กันอย่างกว้างขวาง มีประสิทธิภาพสูง และเป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมีที่ใหญ่ที่สุด (แม้น และคณะ, 2554)

โดยเทคนิคของการวิเคราะห์นี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ

1. การวิเคราะห์ธาตุ (Atomic analysis) เป็นเทคนิคที่ใช้หลักการทางกายภาพของสาร (Physical principles) โดยมีการดูดกลืนพลังงาน (Absorption of energy) หรือการแผ่รังสี ของการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic radiation, EM) จากอะตอมของธาตุ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงานของธาตุซึ่งมีลักษณะเฉพาะตัว (Characterization) พลังงานที่เกิดการเปลี่ยนแปลงนี้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงระดับของพลังงานของธาตุ (Energy level หรือ status) หลักการนี้ได้นำไปใช้ในการสร้างเครื่องมือ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

Atomic absorption spectroscopy

UV-Vis absorption spectroscopy

X-ray fluorescence spectroscopy

Inductively coupled plasma spectroscopy

Spark/arc spectroscopy

Inorganic mass spectroscopy เป็นต้น

2. การวิเคราะห์โมเลกุลของสาร (Molecular analysis) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สารที่มีรูปของโมเลกุลหรือระบบของสารที่เป็นโมเลกุล (Molecular system) สามารถวิเคราะห์เชิงคุณภาพหรือตรวจสอบได้จากคุณสมบัติเฉพาะหรือระดับพลังงานเฉพาะคืออิเล็กทรอนิกส์

(Electronic state) ระดับพลังงานที่เกิดจากการสั่น (Vibrational states) หรือระดับพลังงานของการหมุน (Rotational state) ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งส่วนใหญ่จะมีระดับพลังงานที่สถานะพื้น (Ground states) แต่ถ้าสารเหล่านี้เกิดอันตรกิริยา (Interaction) กับพลังงานของ EM ที่เหมาะสม จะเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานอิเล็กตรอน การสั่นและการหมุนไปยังสภาวะกระตุ้น (Excited states) โมเลกุลที่กระตุ้นจะลดระดับลงมาอยู่ที่สถานะพื้นภายในเวลาประมาณ 10^{-8} วินาที จากหลักการดังกล่าวมีการสร้างเครื่องมือที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงมาก ได้แก่

UV-Vis absorption spectroscopy

IR absorption spectroscopy

Raman spectroscopy

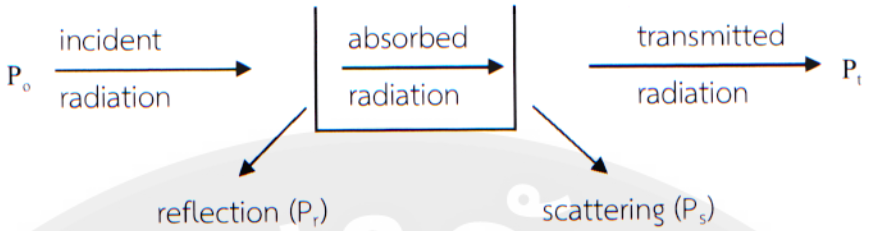
NMR spectroscopy

ESR spectroscopy

Mass spectroscopy เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (UV-Vis spectroscopy) โดยรายละเอียดของเทคนิคดังกล่าวมีดังนี้

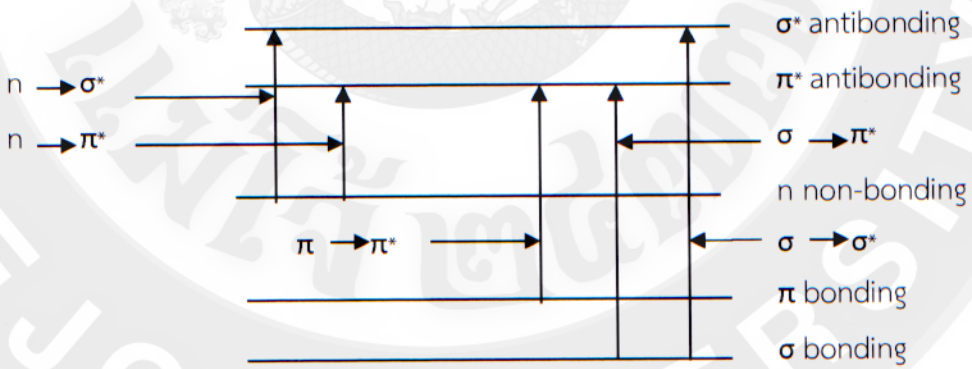
การวิเคราะห์ด้วยอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี เป็นเทคนิคที่ใช้ความสามารถของการดูดกลืนคลื่นในช่วงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet; UV) และช่วงแสงที่มองเห็นได้ (Visible) ได้ซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 190-800 นาโนเมตร จากสมบัตินี้จึงนำมาใช้เป็นเทคนิควิเคราะห์ที่เรียกว่า ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (UV-Vis spectroscopy) โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์เรียกว่า UV-Vis spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่าง ส่วนใหญ่ได้แก่สารอินทรีย์ สารเชิงซ้อน (Complex compound) และสารอนินทรีย์ (inorganic compound) ทั้งที่มีสีและไม่มีสี แต่บางครั้งใช้วิเคราะห์สารที่มีสีและมีการดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิลเรียกว่า คัลเลอริเมตรี (Colorimetry) ซึ่งเป็นเทคนิควิเคราะห์ที่มีความเที่ยง ความแม่น และมีสภาพไวสูง โดยอาศัยคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารนั้น ๆ เมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานที่เหมาะสมผ่านเข้าไปในตัวอย่างพบว่าแสงบางส่วนถูกดูดกลืน บางส่วนเกิดการสะท้อน บางส่วนเกิดการกระเจิง และบางส่วนผ่านทะลุออกไป ถ้าทำให้แสงที่ทะลุออกไปนั้นผ่านเข้าเครื่องกระจายแสงได้ (เช่นปริซึม หรือเกรตติง) จะทำให้เห็นว่ามีสเปกตรัมส่วนหนึ่งที่หายไปเรียกว่า absorption spectrum (แม้น และคณะ, 2554) ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 การเกิดอันตรกิริยาของสารเคมีกับการแผ่รังสีหรือแสง

ที่มา: แม้น และคณะ (2554)

เมื่ออิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะจากสถานะพื้นไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่าหรือสถานะกระตุ้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอน (electronic transition) ซึ่งโดยมากจะใช้พลังงานประมาณ 30-150 kcal/mole และอิเล็กตรอนที่เกี่ยวข้องคือ อิเล็กตรอนวงนอกสุด อิเล็กตรอนที่เกิดพันธะ หรืออิเล็กตรอนที่ยังไม่เกิดพันธะ (Non-bonding electron) ซึ่งอิเล็กตรอนแต่ละชนิดจะใช้พลังงานแตกต่างกัน อิเล็กตรอนที่ได้รับพลังงานสูงขึ้นนี้เรียกว่า antibonding orbitals (แม้น และคณะ, 2554) ดังแสดงในภาพที่ 13

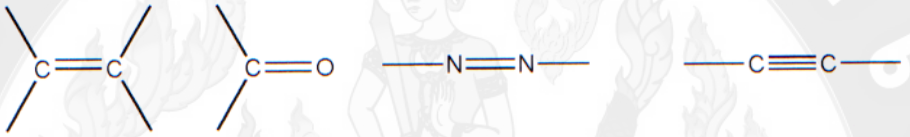


ภาพที่ 13 แผนภาพระดับชั้นพลังงานของอิเล็กตรอน
และการเปลี่ยนสภาวะของอิเล็กตรอน

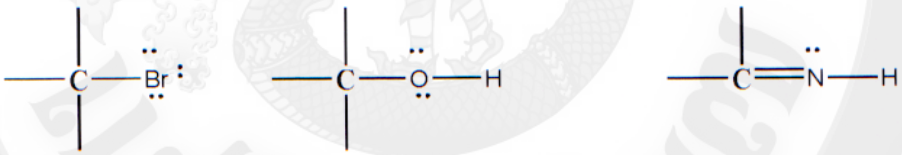
อิเล็กตรอนในออร์บิตัลที่อยู่ในสภาวะพื้นมี 3 รูปแบบ (แม้น และคณะ, 2554) คือ

1. sigma molecular orbital (σ bonding) ซึ่งเป็นการใช้อิเล็กตรอนร่วมกัน 1 e ต่อ 1 e เป็น single covalent bond ตัวอย่างเช่น

2. pi molecular orbital (π bonding) เป็นการใช้อิเล็กตรอนร่วมกัน (share electrons 2e ต่อ 2e เป็น double covalent bond หรือ pi-bond ตัวอย่างเช่น



3. non-atomic orbital (n-bonding, non-bonding) คือ อิเล็กตรอนที่ยังไม่เกิดพันธะเป็น un-shared electrons ตัวอย่างเช่น



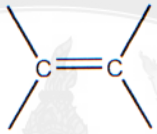
สำหรับ antibonding orbitals ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงพลังงานหรือสามารถเกิดเป็นแทรนซิชันมี 2 ชนิด คือ σ* (sigma star) และ π* (pi-star)

ถ้าจะเรียงลำดับพลังงานที่ต้องการใช้ในการทำอิเล็กตรอนเกิดแทรนซิชันจากน้อยไปหามาก เรียงลำดับจากการเกิดได้ง่ายไปหายากดังนี้

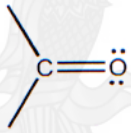
	$n \rightarrow \pi^*$	$\pi \rightarrow \pi^*$	$n \rightarrow \sigma^*$	$\sigma \rightarrow \pi^*$	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
แสงที่ใช้	near UV	UV	near UV	far UV	Vac. UV

แต่จะต้องไม่ลืมว่าการเกิดการแทรนซิชันมิใช้เกิดได้ตามใจชอบ ทั้งนี้ต้องเป็นไปตาม selection rule ซึ่งเกี่ยวข้องกับ spin orientation symmetry และเกี่ยวข้องกับ orbital overlap และสารอินทรีย์ทุกชนิดที่มี unsaturated functional group สามารถดูดกลืนแสงในช่วงยูวี-วิสิเบิลได้ เรียกว่าโครโมฟอร์ (chromophore) สามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ

1. โครโมฟอร์ที่มี multiple bond ระหว่าง 2 อะตอมของธาตุ โดยที่ไม่มี lone pair of electrons ตัวอย่างเช่น สารประกอบที่มีกลุ่ม



2. โครโมฟอร์ที่มี multiple bond ระหว่าง 2 อะตอมของธาตุ โดยที่มี lone pair of electrons ตัวอย่างเช่น สารประกอบที่มีกลุ่ม



3. โครโมฟอร์ที่มี benzene ring โดยสารกลุ่มนี้เป็นสารกลุ่มอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งจะให้ absorption spectra 3 band ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงพลังงานจาก $\pi \rightarrow \pi^*$ แต่ถ้าหากเกิดการ conjugate กันเองระหว่างสารโครโมฟอร์จะทำให้เกิด absorption spectra ใหม่ขึ้นมาอีกซึ่งมักจะทำให้ความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น แต่หากมีธาตุหรือสารประกอบบางชนิดที่ไม่สามารถดูดกลืนแสงหรือเรียกว่า ออกโซโครม (auxochrome) เข้ามาแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมในเบนซีน ก็จะทำให้ความยาวคลื่นที่ได้เพิ่มขึ้นหรือลดลง และความสามรถในการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นหรือลดลงเช่นกัน สามารถแบ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ออกได้ 4 แบบด้วยกันคือ

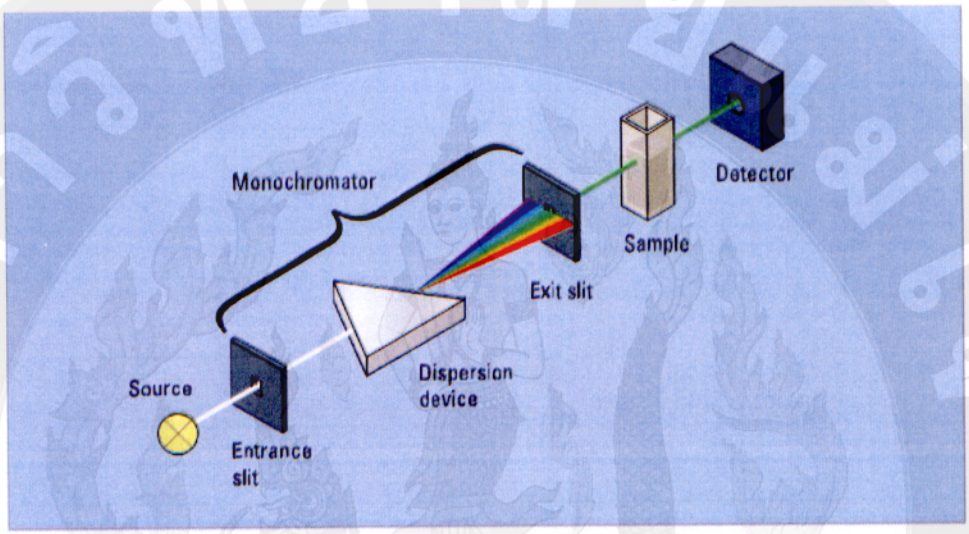
1. Bathochromic shift (Red shift) จะทำให้ absorption spectrum มีค่าความยาวคลื่นมากขึ้น

2. Hypsochromic shift (Blue shift) จะทำให้ absorption spectrum มีค่าความยาวคลื่นลดลง

3. Hyperchromic effect จะทำให้เกิดการเพิ่ม intensity คือ มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น

4. Hypochromic effect จะทำให้เกิดการลด intensity คือ มีค่าการดูดกลืนแสงลดลง

เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนออกมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่าง ๆ ก็จะได้ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสาร ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในการระบุชนิดและปริมาณของสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับสารนั้น ๆ ดังได้แสดงหลักการทำงานของเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 ส่วนประกอบของเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

ที่มา: San Diego Miramar College (2015)

โดยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ

1. แหล่งกำเนิดแสง (Light source) โดยแหล่งกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลตมีหลายชนิดเช่น หลอดไฮโดรเจน (Hydrogen lamp) หรือ หลอดดิวเทอเรียม (Deuterium lamp) ซึ่งให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 185-375 นาโนเมตร ส่วนหลอดทังสเตน (Tungsten filament lamp) จะมีลักษณะคล้ายหลอดไฟธรรมดา ซึ่งให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 320-2500 นาโนเมตรซึ่งเป็นที่นิยมมากที่สุดในปัจจุบัน

2. โมโนโครเมเตอร์ (Monochromator) เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงที่ออกจากแหล่งกำเนิดแสงซึ่งเป็นแสงที่มีหลายความยาวคลื่นให้เป็นแสงที่มีความยาวคลื่นเดียวที่มีลักษณะเป็นแสงแคบ ๆ ซึ่งในอุปกรณ์นี้ประกอบไปด้วย ช่องที่ปล่อยให้แสงเข้า (Entrance slit) กระจก (Mirror) และเลนส์ (Lens) และส่วนที่ทำให้แสงกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่าง ๆ โมโนโครเมเตอร์มีหลายชนิดด้วยกัน คือ

- ฟิลเตอร์ (Filters) เป็นโมโนโครเมเตอร์อย่างง่ายที่สุด เป็นแผ่นกลมที่ประกอบด้วยกระจกสีต่างๆ ให้ความกว้างของแถบคลื่นแสงขนาด 25 นาโนเมตร

- ปริซึม (Prism) ใช้หลักการการตกกระทบของแสงขนานบนปริซึมแล้วเกิดการหักเห แล้วให้สะท้อนกลับมาที่ปริซึมอีกครั้งเพื่อให้เกิดการกระจายออกเป็นความยาวคลื่นที่ต้องการได้ แต่ปัจจุบันเลิกใช้แล้ว

- เกรตติง (Grating) ในปัจจุบันนิยมใช้อยู่ 3 แบบ คือ transmission grating, reflection grating และ Echelle grating คู่กับ CaF_2 prism

(1) Transmission grating เป็นกระจกที่ถูกนำมาขีดให้เป็นร่องขนานกัน จำนวนร่องต่อมิลลิเมตรมีได้แตกต่างกัน ปัจจุบันไม่นิยมแล้ว

(2) Reflection grating หรือเกรตติงแบบสะท้อน ทำจากวัสดุที่สามารถสะท้อนแสงได้และเรียบ โดยเกรตติงที่ใช้ในช่วงยูวี-วิสิเบิล ควรจะต้องมีจำนวนร่อง 300-2000 ร่องต่อมิลลิเมตร ปัจจุบันทำได้ง่ายและมีราคาถูก

(3) Echelle grating คู่กับ CaF_2 prism เป็น polychromatic จึงนิยมใช้กับ spectrometer ที่เป็น multielemental analysis

3. ส่วนที่วางสารตัวอย่างเพื่อวัด เรียกว่า sample cell หรือ cuvettes มีหลายแบบ คือ ทำจากแก้วจะใช้ได้เฉพาะช่วงวิสิเบิลเท่านั้น ส่วนเซลล์ที่ทำจากซิลิกา (silica) และควอร์ตซ์ (quartz) ใช้ได้ทั้งช่วงยูวีและวิสิเบิล

4. เครื่องวัดแสง (radiation detector) มีหลายแบบ ซึ่งแตกต่างกันที่ความกว้างของช่วงคลื่นแสงที่ตรวจจับได้ ความเร็วของการตอบสนองต่อแสง สภาพไวของการรับแสง เป็นต้น

- Photovoltaic or barrier-layer cells ใช้ตรวจวัดแสงช่วงวิสิเบิล ให้สภาพไวสูงสุดที่ความยาวคลื่น 550 nm

- Phototube หรือหลอดรับแสง ทำจากซิลิกา ภายในหลอดเป็นสุญญากาศ มีอิเล็กตรอนถูกฉาบอยู่ที่แคโทด (cathode)

- Photomultiplier (PMT) คล้ายกับ phototube แต่มีสภาพไวที่ดีกว่า สามารถวัดแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 190-900 นาโนเมตร จึงนิยมใช้ในเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

- Silicon diode detector มีสภาพไวที่ดีกว่า phototube แต่น้อยกว่า photomultiplier (PMT) สามารถวัดแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 400-1100 นาโนเมตร มี 2 ชนิดคือ

(1) หัววัดวิดิคอน (Vidicon tube detector) วิดิคอนเป็นชื่อทั่ว ๆ ไปที่ใช้กับพวกหลอดภาพ ซึ่งมีลักษณะอย่างเดียวกันกับหลอดภาพโทรทัศน์ ซึ่งประกอบด้วยซิลิกอนไดโอดต่อกัน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 มิลลิเมตร และประกอบด้วยโฟโตไดโอดมากกว่า 15,000 ตัวต่อตารางมิลลิเมตร ที่ผิวของไดโอดทั้งหมดจะถูกแบ่งออกเป็นจำนวนช่อง (Channels) ได้เป็น 211–4,096 ช่อง

สัญญาณที่ได้แต่ละช่องจะเก็บแยกกันไว้ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ ดังนั้นเมื่อวิดิคอนรับแสงจากโมโนโครเมเตอร์ สัญญาณที่ได้แต่ละช่องจะถูกนำมารวมกันได้ออกมาเป็นสเปกตรัมที่สมบรูณ์ โดยที่ไม่ต้องมีการทำให้โมโนโครเมเตอร์เคลื่อนที่เลย แต่ใช้ระบบอิเล็กทรอนิกแทน

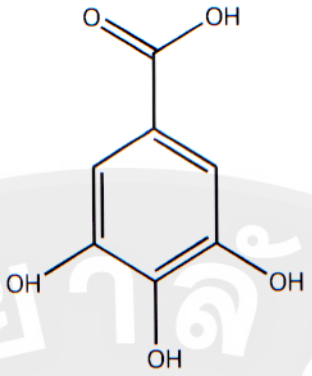
(2) หัววัดซิลิกอนไดโอดอาร์เรย์ (Silicon diode arrays) หรือเรียกว่าโฟโตไดโอดอาร์เรย์ (PDA) ประกอบด้วยโฟโตไดโอดและตัวเก็บประจุ (Capacitor) ต่อกันเข้าเป็นแถว ในแต่ละชิ้นจะมีไดโอดและตัวเก็บประจุจาก 211–4,096 ตัว ไดโอดแต่ละตัวมีขนาดกว้างประมาณ 15–50 ไมโครเมตร และสูงประมาณ 500 ไมโครเมตร โฟโตไดโอดอาร์เรย์มีขนาดยาวประมาณ 1–6 เซนติเมตร เมื่อแสงตกลงบนไดโอดจะทำให้เกิดประจุไฟฟ้าขึ้นไปทำลายประจุที่ใส่ไว้ของตัวเก็บประจุ ซึ่งเป็นช่วงของการวัดแต่ละครั้งหรือเป็นเวลาของการ scanning cycle แต่ละครั้ง ปริมาณของประจุที่ต้องใส่เข้าไปใหม่นั้นจะเป็นจำนวนโฟตอนที่ได้ของแต่ละไดโอดซึ่งเป็นปฏิภาคกับกำลังของแสงหรือความเข้มข้นของแสง ดังนั้นจากการวัดกำลังของแสงที่แตกต่างกันตลอดช่วงความยาวคลื่นของแสงที่ใช้ จะเป็นสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารที่นำไปวัดนั้นโฟโตไดโอดอาร์เรย์ที่ผลิตขึ้นมาใช้ก็คล้าย ๆ กับการผลิตไมโครโปรเซสเซอร์

5. เครื่องประมวลผล

เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโกปีเป็นที่นิยมนำมาใช้เป็นเทคนิคหลักในการวิเคราะห์หาสารองค์ประกอบต่าง ๆ ในงานวิจัย เนื่องจากทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยากและมีความจำเพาะเจาะจงกับสารที่สนใจ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เทคนิคการนี้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญหลักของสารสกัดจากน้อยหน่าเช่นกัน โดยจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีรายละเอียดของเทคนิคดังกล่าวดังนี้

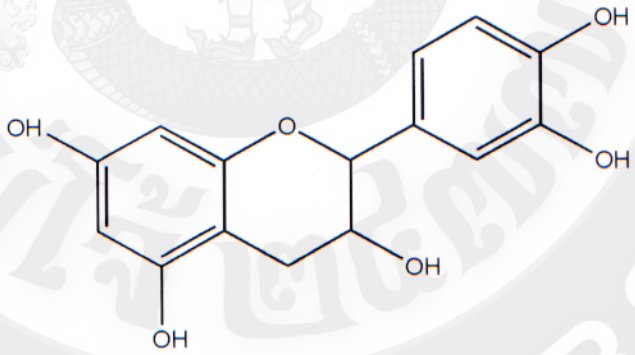
5.1 การวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี โฟลิน-ไซโอแคลทู เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยอาศัยหลักการของการเกิดปฏิกิริยารีดักชันและออกซิเดชัน คือสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะทำปฏิกิริยาเคมีกับสารละลายโฟลิน-ไซโอแคลทู ซึ่งสารละลายนี้ประกอบด้วย phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents ซึ่งสารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) (Naczka and Shahidi, 2004) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 15 โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือ

$$MO^{5+} + e^{-} \text{ (สารต้านอนุมูลอิสระ)} \longrightarrow MO^{4+}$$

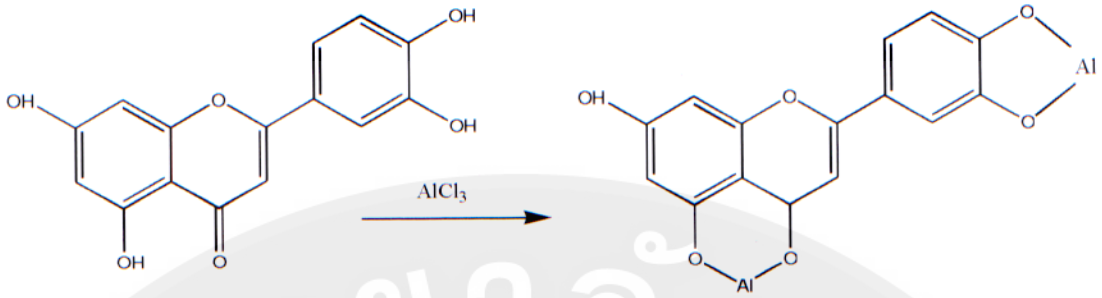


ภาพที่ 15 โครงสร้างทางเคมีของกรดแกลลิก

5.2 การวิเคราะห์หาสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธีอะลูมิเนียมคลอไรด์คัลเลอริเมตริก เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 16 โดยหลักการของการเกิดปฏิกิริยารีดักชันและและออกซิเดชันเช่นกัน คือสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จะทำปฏิกิริยากับอะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminum chloride) ซึ่งสารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดยกลุ่มไฮดรอกซิลของฟลาโวนอยด์ เกิดเป็นสาร orthodihydroxyl groups ซึ่งมีสีชมพูและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐานคาเทชิน ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นเป็นไปดังภาพที่ 17



ภาพที่ 16 โครงสร้างทางเคมีของคาเทชิน



ภาพที่ 17 ปฏิกิริยาทางเคมีการวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์

เทคนิคทางโครมาโทกราฟี

เทคนิคทางโครมาโทกราฟี (Chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารที่ผสมกันอยู่หลาย ๆ สารให้แยกออกจากกันเป็นส่วน ๆ ดังนั้นจึงเป็นที่มาของคำว่า Chromatography ซึ่งมาจากคำว่า Chroma ที่หมายถึงสี รวมกับคำว่า graphein ที่แปลว่าการเขียน นอกจากนั้นเทคนิคนี้ยังสามารถหาปริมาณของสารแต่ละชนิดที่แยกออกมาได้ด้วย โดยมีหลักการแบ่งชนิดของโครมาโทกราฟีได้หลายแบบออก แบบหนึ่งที่นิยมคือสามารถแบ่งตามสถานะของเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งแบ่งออกเป็น แก๊สและของเหลว (แม้น และคณะ, 2555)

โดยแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography) สามารถแบ่งออกตามชนิดของเฟสอยู่กับที่ คือ Gas-liquid chromatography เป็นการใช้เฟสอยู่กับที่เป็นของเหลว และ Gas-solid chromatography เป็นการใช้เฟสอยู่กับที่เป็นของแข็ง

ส่วนลิควิดโครมาโทกราฟี (Liquid chromatography) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามชนิดของเฟสเคลื่อนที่ (เฟสเคลื่อนที่) และเฟสที่อยู่กับที่ (Stationary phase) โดยจะเรียกชื่อเฟสเคลื่อนที่ก่อนเฟสที่อยู่กับที่คือ Liquid-liquid chromatography เป็นการใช้เฟสอยู่กับที่เป็นของเหลวที่เคลือบอยู่บนของแข็งหรือแกน และ Liquid-solid chromatography เป็นการใช้เฟสอยู่กับที่ที่เป็นของแข็ง

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้เป็นเทคนิคหลักในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญต่าง ๆ ในงานวิจัย เพราะมีความจำเพาะเจาะจงกับสารที่สนใจมาก เนื่องจากสารเชิงเดี่ยวแต่ละชนิดจะมีระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (Retention time, RT) เฉพาะตัว จึงเป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้เป็นเทคนิคในการวิเคราะห์หลัก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography; HPLC) ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญหลักของสารสกัดจากน้อยหน่าเช่นกัน โดยจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีรายละเอียดของเทคนิคดังกล่าวดังนี้

เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี

เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (Liquid chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารผสมที่อยู่ในสภาวะของเหลว โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ที่บรรจุเฟสที่อยู่กับที่ โดยอาศัยการชะหรือการพาของเฟสเคลื่อนที่ ทำให้สารแต่ละตัวในสารผสมถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน โดยอาศัยความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับเฟสที่เคลื่อนที่หรือเฟสที่อยู่กับที่ หากสารประกอบตัวไหนที่เข้ากันได้ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่ สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่ หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณ (Detector) และสัญญาณ (Signal) ที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค (Peak) ซึ่งจะเรียกรวมกันทั้งหมดว่าโครมาโทแกรม (Chromatogram) (แม้น, 2555)

โดยการชะหรือการพาของเฟสเคลื่อนที่สามารถจำแนกได้ 4 ประเภท ได้แก่

1. Adsorption chromatography หรือ Liquid-solid chromatography เป็นการแยกสารโดยใช้เฟสอยู่กับที่เป็นตัวดูดซับ (Adsorbent) ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง และไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ ใช้ของเหลวเป็นเฟสเคลื่อนที่และใช้ของแข็งเป็นเฟสอยู่กับที่ ตัวอย่างเช่น แป้ง เซลลูโลส เป็นต้น ซึ่งการดูดซับของสารอาศัยสภาพมีขั้ว (Polarity) และจำนวนหมู่ที่ทำให้เกิดสภาพมีขั้ว (Polarity group) ของเฟสอยู่กับที่และสารตัวอย่าง ส่วนการแยกสารต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์ อาศัยการเปลี่ยนสภาพมีขั้วของเฟสเคลื่อนที่ กล่าวคือถ้าเฟสเคลื่อนที่มีสภาพมีขั้วสูง สารที่ละลายน้ำได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า

2. Partition chromatography หรือ Liquid-liquid chromatography เป็นวิธีการแยกสารที่ใช้ของเหลวเป็นเฟสเคลื่อนที่ และใช้ของเหลวเคลือบอยู่บนของแข็งเป็นเฟสอยู่กับที่ ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างช้า ๆ แยกสารออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างในการละลายของสารตัวอย่างในของเหลวซึ่งเป็นเฟสอยู่กับที่และของเหลวซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ นิยมใช้สำหรับแยกสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันออกจากกัน ตัวอย่างเช่น การแยกกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ออกจากกัน

3. Ion-exchange chromatography เป็นการใช้เฟสอยู่กับที่ที่มีประจุแลกเปลี่ยน (Counter ion) เมื่อเกิดการแลกเปลี่ยนประจุกับโมเลกุลของสารตัวอย่างที่มีประจุโมเลกุลของสารตัวอย่างนั้นจะถูกจับไว้ในคอลัมน์ หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนคุณสมบัติของของเหลวซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ ตัวอย่างเช่น การเปลี่ยนพีเอช (pH) การเพิ่มปริมาณไอออนแลกเปลี่ยน จะทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ในอัตราเร็วที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับจำนวนประจุและความแรงของประจุที่จับกับเฟสอยู่กับที่

4. Size exclusion chromatography หรือ Gel filtration chromatography เป็นการใช้เฟสอยู่กับที่เป็นเม็ดเจลที่มีรูขนาดต่างกันบรรจุในคอลัมน์ทำให้โมเลกุลของสารที่มีขนาดเล็กเคลื่อนที่เข้าไปในโมเลกุลของเจล ทำให้เคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ได้ช้ากว่าสารตัวอย่างที่มีโมเลกุลใหญ่กว่า

ในงานวิจัยนี้จะใช้เครื่องมือไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีหรือโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์ ซึ่งเครื่องมือนี้มีส่วนประกอบหลัก ประกอบด้วย

1. ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง (เฟสเคลื่อนที่ หรือ Solvent) เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่เฟสที่อยู่กับที่ถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ซึ่งกระบวนการแยกจะเกิดขึ้นภายในคอลัมน์

2. ปั๊ม (Pump) ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้แบบควบคุมอัตราการไหลคงที่ หรือเรียกว่า constant flow แต่ในระบบยังสามารถควบคุมอัตราส่วนของตัวทำละลายได้อีก จึงสามารถแบ่งออกเป็น 2 ระบบคือ การใช้สารละลายตัวชะที่มีองค์ประกอบและความเข้มข้นเดียวกันตลอดการวิเคราะห์เรียกว่า ระบบ isocratic elution แต่หากมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและความเข้มข้นของสารละลายตัวชะระหว่างการวิเคราะห์เรียกว่า ระบบ gradient elution

3. เครื่องกำจัดแก๊สในตัวทำละลาย (Degasser) ทำหน้าที่กำจัดแก๊สในตัวทำละลาย เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศในระบบ เช่น ที่เครื่องสูบ คอลัมน์ และตัวตรวจวัดสัญญาณ มีหลายแบบด้วยกัน เช่น

- กำจัดแก๊สโดยทำให้แก๊สเฉื่อย เช่น ฮีเลียม ไนโตรเจน พ่นลงในสารละลายที่ทำหน้าที่เป็นตัวชะ มีข้อดีคือ สะดวก รวดเร็ว ส่วนข้อเสียคือ สิ้นเปลืองเนื่องจากแก๊สราคาแพง
- ใช้ระบบสุญญากาศ (Vacuum) เป็นระบบที่ใช้ในเครื่องกำจัดแก๊สอัตโนมัติที่อยู่ภายในเครื่อง HPLC ตัวทำละลายจะผ่านท่อที่ทำด้วยวัสดุที่แก๊สผ่านได้ อยู่ภายในกล่องที่มีความดันต่ำ แก๊สในตัวทำละลายจะซึมผ่านเมมเบรนออกไปสู่บริเวณที่มีความดันต่ำ
- การใช้คลื่นความถี่สูง จากเครื่องให้ความถี่สูงซึ่งจะปล่อยคลื่นที่ความถี่สูงทำให้เกิดการสั่น และไล่แก๊สที่ละลายออกไป

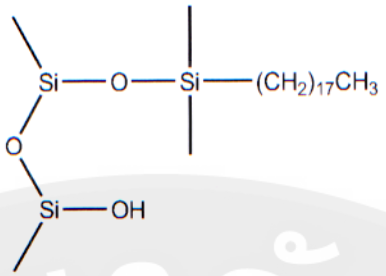
4. เครื่องฉีดสาร (Injector) ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ มีหลายแบบ เช่น การใช้เข็มฉีดสารเข้าไปโดยตรง (Syringe injector) มีทั้งการฉีดผ่านและไม่ผ่านยางรอง (Septum) หรือการฉีดแบบ sampling injector เป็นวิธีที่มีความเที่ยงในการฉีดสารสูง มีวิธีการฉีด คือ เมื่อจะทำการฉีดจะต้องหมุนชุดฉีดสารให้อยู่ตรงตำแหน่ง load จากนั้นใช้เข็มขนาดที่เหมาะสม ดูดสารตัวอย่างและฉีดสารเข้าไปใน sample loop สารตัวอย่างจะถูกบรรจุอยู่ใน loop จนเต็มส่วนสารที่เกินจะล้นออกมา จากนั้นให้หมุนวาล์วของตัวฉีดมาที่ตำแหน่ง inject สารตัวอย่างที่บรรจุอยู่ข้างในจะเคลื่อนที่

ออกไปพร้อมกับตัวทำละลายเข้าสู่คอลัมน์ โดยในงานวิจัยนี้ใช้เครื่องฉีดสารแบบอัตโนมัติ (Autosampler) เป็นการฉีดสารแบบอัตโนมัติที่ถูกควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ เนื่องจากเป็นเครื่องฉีดสารที่เหมาะสำหรับใช้ในงานวิเคราะห์ที่มีปริมาณการฉีดสารตัวอย่างจำนวนมาก และการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างใช้เวลาเท่ากัน

5. คอลัมน์ (Column) ภายในจะถูกบรรจุด้วยเฟสที่อยู่กับที่ มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล ทำให้เกิดกระบวนการแยกองค์ประกอบของสารที่สนใจ โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่างเฟสที่เคลื่อนที่ กับเฟสที่อยู่กับที่ โดยคอลัมน์ยังสามารถแบ่งออกไปตามการใช้งาน เช่น ใช้สำหรับแยกสาร ใช้สำหรับป้องกันหรือยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร หรือ ใช้สำหรับทำปฏิกิริยาเคมี เป็นต้น ซึ่งคอลัมน์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน

โดยในงานวิจัยนี้มีการใช้สำหรับแยกสารและใช้คอลัมน์สำหรับป้องกันหรือยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร ซึ่งคอลัมน์ทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติดังนี้

1) คอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร (Analytical Column) เป็นคอลัมน์ที่ทำหน้าที่แยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ มีหลายแบบ หลายขนาดขึ้นอยู่กับงานวิเคราะห์ สารที่บรรจุอยู่ภายในมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับงานวิเคราะห์เช่นกัน สำหรับของแข็งที่นิยมใช้คือ silica gel แต่อาจใช้แป้ง เซลลูโลส หรืออะลูมินาแทนได้ ส่วนเฟสอยู่กับที่ที่เคลือบบนของแข็งอาจเป็น น้ำ บัฟเฟอร์ กรดแก่ ด่างแก่ แอลกอฮอล์ หรือไนโตรมีเทน เป็นต้น โดยปกติจะใช้เฟสอยู่กับที่ที่มีสภาพมีขั้วสูงเพื่อแยกสารที่มีสภาพขั้วสูงออกจากกัน และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีสภาพขั้วต่ำกว่ามาชะสารต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์ โดยสารที่มีสภาพขั้วสูงกว่าจะออกมาทีหลัง เรียกวิธีการนี้ว่าโครมาโทกราฟีแบบปกติ หรือ normal phase chromatography แต่ในบางกรณีจะใช้เฟสคงที่มีสภาพขั้วต่ำ ตัวอย่างเช่น สารอินทรีย์ประเภท n-alkyl ซึ่งมีคาร์บอน 8 หรือคาร์บอน 18 โมเลกุลดังภาพที่ 18 เพื่อแยกสารที่มีสภาพขั้วต่ำออกจากกัน และใช้เฟสเคลื่อนที่มีสภาพขั้วสูงกว่าไล่สารที่ต้องการออกมาจากคอลัมน์ โดยสารที่มีสภาพขั้วต่ำกว่าจะออกมาช้ากว่า ซึ่งเรียกว่าโครมาโทกราฟีแบบผันกลับ หรือ reversed phase chromatography ด้านหัวและท้ายของคอลัมน์ปิดด้วยตะแกรงที่ทำจากเหล็กไร้สนิม เพื่อป้องกันไม่ให้สารที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์หลุดออกมา ส่วนปลายด้านนอกจะติดอยู่กับแป้นเกลียวเพื่อให้ต่อเข้ากับระบบของ HPLC ได้



ภาพที่ 18 โครงสร้างคาร์บอน 18 โมเลกุล

2) คอลัมน์สำหรับป้องกันหรือยืดอายุการใช้งาน เป็นคอลัมน์ที่มีขนาดสั้นใช้ต่อกับด้านหน้าของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ภายในมักจะบรรจุสารชนิดเดียวกับคอลัมน์ที่ใช้ในงานวิเคราะห์นั้น ๆ เพียงแต่จะขนาดโมเลกุลที่ใหญ่กว่า เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความดันมากเกินไป โดยการ์ดคอลัมน์ยังช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์แยกสารให้นานขึ้นได้อีกด้วย

6. เครื่องตรวจวัดสัญญาณ (Detector) ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณที่ได้จากกระบวนการแยก แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

1) Bulk property หรือ general detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่รวมกับของตัวถูกละลาย เช่น refractive index และ conductivity detectors

2) solute property หรือ selective detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เช่น ยูวี-วิสิเบิล, ฟลูออเรสเซน หรือ อิเล็กโตรเคมิคอล เป็นต้น

ซึ่งเครื่องตรวจวัดสัญญาณแต่ละชนิดมีคุณสมบัติเฉพาะที่แตกต่างกันออกไป ในการวิเคราะห์สารแต่ละชนิดจึงต้องเลือกตัวตรวจวัดสัญญาณให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยพิจารณาจากคุณสมบัติเฉพาะและหลักการการทำงานของเครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิดนั้น ๆ ซึ่งเครื่องตรวจวัดสัญญาณแต่ละชนิดมีคุณสมบัติดังนี้

1) ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ (UV-Vis Detectors) เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณที่นิยมใช้มากในงานวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง HPLC โดยมีหลักการทำงานอาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสาร ตัวอย่าง ลักษณะที่พิเศษคือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลและอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ ยูวี-วิสิเบิลที่นิยมใช้แบ่งเป็น 3 ชนิด ได้แก่ Fixed-wavelength UV detector, Variable UV-Vis detector เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณที่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่มีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถดูดกลืนแสงได้ เรียกว่า Chromophore และเครื่องตรวจวัดสัญญาณนี้มีทั้งเครื่องตรวจวัดสัญญาณที่อ่านได้ทีละ 1 ความยาวคลื่นมีแหล่งกำเนิดแสงเป็น

deuterium lamp อ่านค่าได้ตั้งแต่ 190-600 นาโนเมตรและ Diode array detector (DAD) ที่สามารถวัดได้ทีละหลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกัน และวัดได้ตั้งแต่ 190-850 นาโนเมตร ระบบการเดินทางของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง Reverse optics คือ แสงจากแหล่งกำเนิดแสงจะผ่านไปยังโฟลเซลล์ (flow cell) ก่อนที่จะผ่านไปยัง monochromator คือ slit และ grating เมื่อแสงตกกระทบบน grating แสงจะกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่าง ๆ แล้วไปตกกระทบบนแผงของ Diode array ตรวจวัดสัญญาณออกมาเป็นโครมาโทแกรม

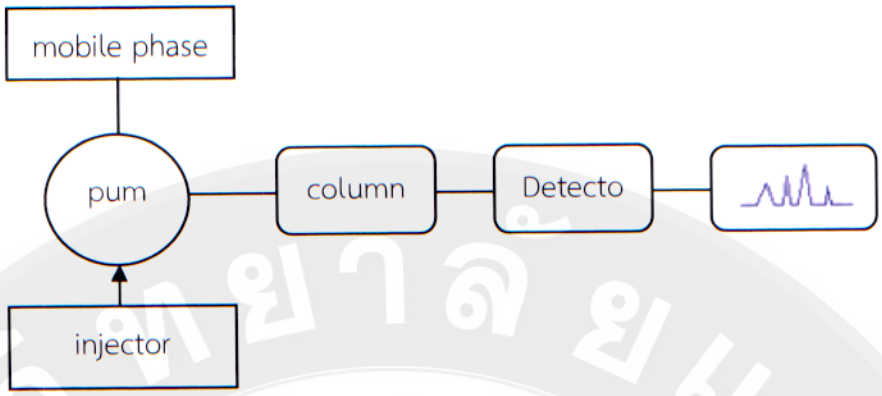
2) ดีเทคเตอร์ฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent Detector) เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณมีสภาพความไวสูงเฉพาะ (selective) เนื่องจากมันมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนต์ที่ได้ออกมาจากตัวถูกละลายบางชนิดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวี โดยที่แสงยูวีจากแหล่งกำเนิดแสงผ่านโมโนโครเมเตอร์ เพื่อให้แสงที่มีความยาวคลื่นตามต้องการแล้วเข้าไปยังโฟลเซลล์ที่มีสารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์ เมื่อตัวอย่างถูกกระตุ้นจะปล่อยแสงออกมาทุกทิศทาง แต่จะมีแสงที่ทำมุม 90 องศาเท่านั้นซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะผ่านไปยัง ฟิลเตอร์ ตัดแสงที่ไม่ต้องการออกจากนั้นจึงผ่านเข้าไปยังโฟโตเซลล์ (photo cell) ตรวจวัดสัญญาณออกมาเป็นโครมาโทแกรม ดังนั้นทั้งความยาวคลื่นในการกระตุ้น และการแผ่รังสี จึงเป็นความยาวคลื่นที่เป็นลักษณะจำเพาะกับตัวอย่างนั้น ๆ เท่านั้นดีเทคเตอร์ชนิดนี้มีประโยชน์มากเมื่อนำมาตรวจหาสารในสารตัวอย่างทางชีวภาพ (biological samples) ต่าง ๆ ที่มีปริมาณน้อย ๆ

3) ดีเทคเตอร์ดิฟเฟอเรนเชียลรีแฟรกโตมิเตอร์ (Differential Refractometers detector) นิยมมากใน HPLC รองลงมาจากเครื่องยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของดรรชนีหักเห (Refractive index, RI) อย่างต่อเนื่องระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสเคลื่อนที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลายละลายอยู่ขณะผ่านออกจากคอลัมน์

4) ดีเทคเตอร์ชนิดอิเล็กโทรเคมิคัล (Electrochemical Detector) เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณที่อาศัยหลักการวัดค่าทางเคมีไฟฟ้าของสารที่ถูกแยกออกจากคอลัมน์ได้แก่ voltammetry amperometry coulometry และความนำไฟฟ้า ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยในน้ำหรือของเหลว

ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิดยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์แบบ Diode array Detector (DAD) ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่สนใจ

7. เครื่องควบคุมและประมวลผล (Computer) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการควบคุมการทำงานของเครื่องมือส่วนอื่น รวมถึงการประมวลผลการวิเคราะห์ให้ออกมาในรูปโครมาโทแกรมดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 หลักการทำงานของเครื่อง HPLC

เทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี

เทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี (Mass Spectrometry) เป็นเทคนิควิเคราะห์ทางเคมีที่ใช้หลักการการเปลี่ยนสารตัวอย่างให้เป็นไอออน (Ionization) แล้วจะผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (Mass analyzer) และส่วนตรวจวัดสัญญาณโดยตรวจจับไอออนที่มาตกกระทบ จากนั้นจะได้ผลออกมาเป็นแมสสเปกตรัม (Mass Spectrum) ที่มีแกนตั้งเป็นค่า relative intensity และแกนนอนเป็นค่ามวลต่อประจุ (Mass to charge ratio, m/z) โดยเทคนิคนี้ใช้ในการหามวลโมเลกุล องค์ประกอบของธาตุ โครงสร้างของสาร และเคมิคอลสปีชี่ (Chemical species) สามารถใช้ในการศึกษาและทำนายเกี่ยวกับโครงสร้างโมเลกุลได้ เพราะธาตุแต่ละตัวจะมีค่าอะตอมมิกแมสที่แตกต่างกันออกไป แต่การวิเคราะห์สารผสมโดยใช้เทคนิคแมสสเปกโทรเมทรีเพียงอย่างเดียวทำได้ยาก เนื่องจากการทำให้สารเกิดเป็นไอออนอาจเกิดการแตกตัวที่ซับซ้อน จึงนิยมทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ก่อนโดยนำมาต่อกับเทคนิคการแยกอื่น โดยในปี 1960 ได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิเคราะห์ร่วมกับแก๊สโครมาโทกราฟี เรียกว่าแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมทรี (Gas chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS) หลังจากนั้นประมาณสิบปีจึงได้มีการพัฒนานำเทคนิคนี้นำมาใช้ร่วมกับลิควิดโครมาโทกราฟี เรียกว่า ลิควิดโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมทรี (Liquid chromatography/Mass Spectrometry, LC/MS) แต่ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาการต่อแบบอนุกรมกับแมสสเปกโทรสโกปี (Tandem Mass Spectroscopy) หรือนิยมเรียกกันทั่วไปว่า MS/MS เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ (แม้นและคณะ, 2555)

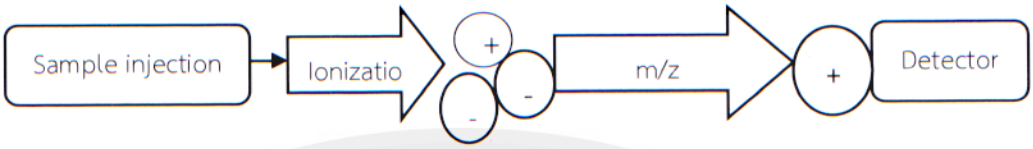
โดยเครื่องแมสสเปกโทรเมทรีมีประกอบด้วยหลายส่วน ซึ่งแต่ละส่วนทำหน้าที่และหลักการทำงานดังนี้ ส่วนผลิตไอออน (Ionization source) เมื่อนำระบบของทั้งสองระบบมาเชื่อมต่อกันการแยกสารด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นกระบวนการเกิดขึ้นภายใต้สภาวะบรรยากาศ

แต่กระบวนการทำงานของแมสสเปกโทรเมทรีจะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่เป็นสุญญากาศ ดังนั้นการเชื่อมต่อระหว่างระบบทั้งสองเข้าด้วยกันเรียกว่า Interface ทำหน้าที่กำจัดตัวทำละลาย ทำให้สารที่ต้องการทดสอบอยู่ในรูปของประจุ มีรูปแบบการ Transition จากระบบทั้งสองจะเปลี่ยนไปตามสถานะดังนี้

	LC	MS
State of Matter	Liquid	Gas
Charge State	Neutral	Ion
Pressure	760 torr	10^{-5} to 10^{-8} torr

โดยมีวิธีการเปลี่ยนสารตัวอย่างให้เป็นไอออนมีหลายวิธีหนึ่งในนั้นคือ Electron Ionization (EI) เป็นการทำให้สารเกิดการแตกตัวเป็นอิออน โดยใช้ลำอิเล็กตรอน ใช้ความดันต่ำประมาณ 10^{-8} Torr โดยอิเล็กตรอนจากเส้นลวดที่ร้อนจะถูกโฟกัส ทำให้ของผสมที่ซับซ้อนของไอออนเกิดการแตกหัก (Fragmentation ion) สามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ การเกิดไอออนไนเซชันแบบแรง (Hard ionization) และการเกิดไอออนไนเซชันแบบอ่อน (Soft ionization) ซึ่งเกิดจากทิศทางของการชนคือ ถ้าอิเล็กตรอนชนแบบตรงจะทำให้เกิดไอออนไนเซชันแบบแรง แต่หากอิเล็กตรอนชนแบบไม่ตรงจะทำให้เกิดไอออนไนเซชันแบบอ่อน และลำของไอออนจะผ่านเข้าไปในสนามแม่เหล็กกำลังสูง ลำของไอออนจะเกิดการเบี่ยงเบนซึ่งขึ้นอยู่กับมวลของไอออนนั้น ๆ เนื่องจาก molecular ion (M^+) จะต้องมีมวลเท่ากับมวลโมเลกุลของสารและเกิดการตรวจจับสัญญาณ ดังนั้นเทคนิคนี้เป็นเครื่องมือที่เหมาะสำหรับใช้หามวลโมเลกุลของสารได้ (แม้น และคณะ, 2555)

เมื่อสารสู่ Capillary Tube ซึ่งจะมีการให้ค่าศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงประมาณ 3000 โวลต์ ทำให้ ณ บริเวณนี้เกิดเป็นสนามไฟฟ้า ที่มีความแรงมาก เมื่อสารละลายผ่านออกจากปลาย capillary tube จึงมีลักษณะเป็นหยดของเหลวที่มีประจุอยู่ที่ผิว และเมื่อเกิดการระเหยของหยดของเหลวขนาดเล็กลง ประจุจะเข้าใกล้กันมากขึ้นเกิดการแตกกระจายเป็นไอออน (Ion Evaporation) สำหรับสเปคตรัมที่ได้จากเทคนิค Electrospray ionization (ESI) เป็นได้ทั้ง Single Charge และ Multi Charge จึงสามารถเลือกที่จะวิเคราะห์ไอออนบวกหรือไอออนลบก็ได้ถ้าเลือกวิเคราะห์ไอออนบวก ไอออนบวกเท่านั้นที่จะผ่านเข้าไปยังดีเทคเตอร์ในทางกลับกันถ้าต้องการวิเคราะห์ไอออนลบ ไอออนลบเท่านั้นที่จะวิ่งไปยังดีเทคเตอร์ และเกิดการตรวจจับสัญญาณดังภาพที่ 20



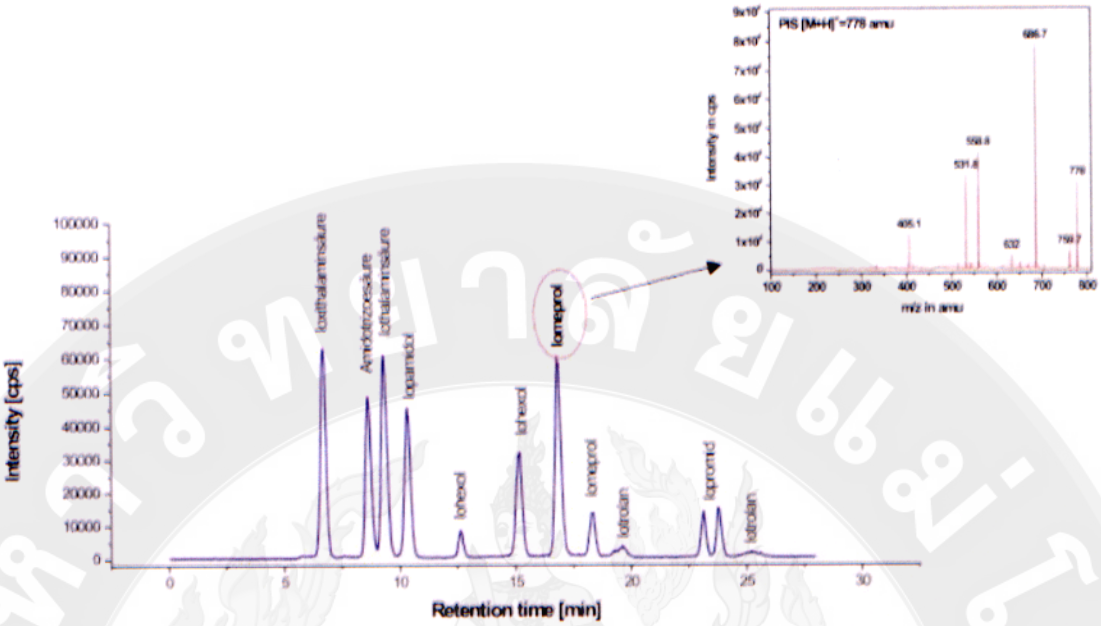
ภาพที่ 20 หลักการทำงานของเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์

ที่มา: แม้น และคณะ (2555)

การวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์แบบ Electron Ionization (EI) สามารถใช้วิเคราะห์สารได้ทั้งแบบ low resolution และ High resolution โดยค่าความสามารถในการแยก (resolution) จะบอกให้เราทราบถึงความสามารถในการแยกมวลของตัวอย่าง ที่ทดสอบออกจากกัน ตัวเลขยิ่งมากก็สามารถแยกได้ดี อย่างไรก็ตามการปรับค่าความสามารถในการแยกที่สูงขึ้นจะส่งผลต่อ Intensity ของสัญญาณ โดยดีเทคเตอร์ที่ใช้โดยทั่วไปในเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์มีหลายอย่าง คือ

1) ฟาราเดย์คัพ (Faraday Cup)
2) อิเล็กตรอน มัลติพลายเออร์ (Electron Multiplier)
3) ซินทิลเลชัน เคาร์เตอร์ (Scintillation Counter)
4) แผ่นฟิล์มถ่ายรูป (Photographic Plate)

โดยแมสสเปกตรัมที่ได้ นอกจากจะบอกน้ำหนักโมเลกุลของสารซึ่งดูได้จาก molecular ion (M^+) ของแต่ละพีคแล้ว ยังสามารถบอกประเภทและโครงสร้างของสารอย่างคร่าวๆ ได้เช่นกัน โดยสารแต่ละประเภทจะมีรูปแบบ (pattern) การแตกตัวที่ไม่เหมือนกัน จึงสามารถใช้ในการยืนยันความถูกต้องได้ ตัวอย่างรูปแบบของแมสสเปกตรัม ดังภาพที่ 21

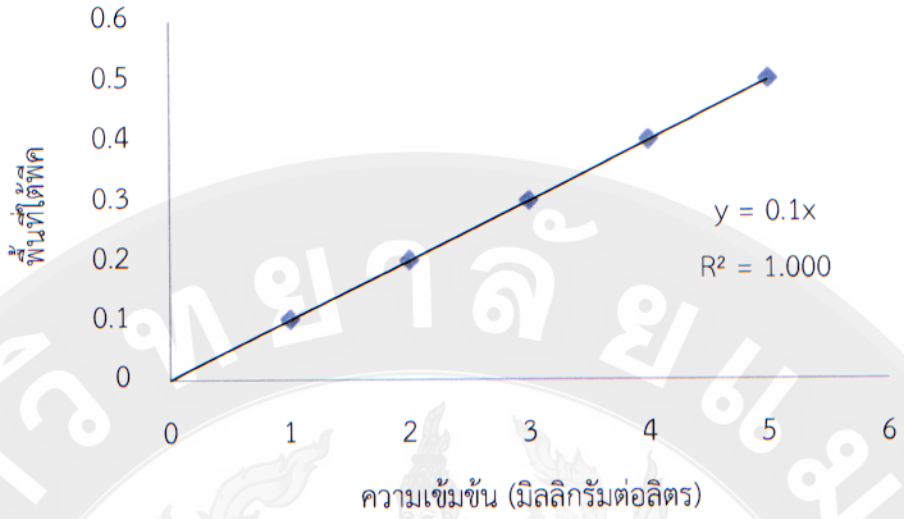


ภาพที่ 21 รูปแบบของแมสสเปกตรัม

ที่มา: Wikimedia Common (2014)

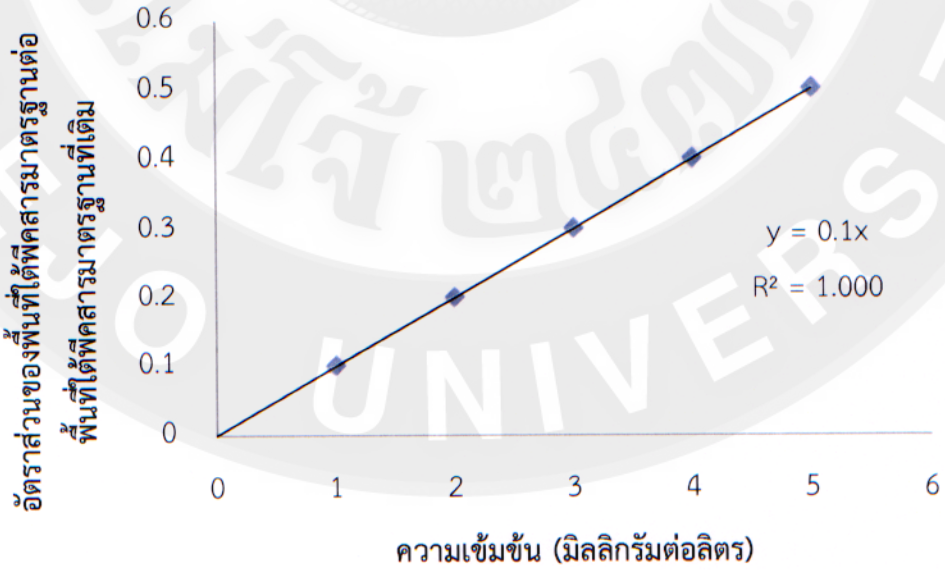
การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้นไม่ว่าจะเป็นการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrometer ที่ตรวจวัดเชิงปริมาณวิเคราะห์ และเครื่อง HPLC ที่สามารถตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative Analysis) และเชิงปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative Analysis) จะต้องมีการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งทำได้ด้วยการเตรียมกราฟมาตรฐานมี 3 วิธีด้วยกันคือ

1. External standard เป็นการเตรียมสารมาตรฐานที่นิยมใช้กับห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป เป็นการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ประมาณ 3-5 ระดับความเข้มข้น จากนั้นนำมาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกนนอน) กับพื้นที่ใต้พีค (แกนตั้ง) ดังภาพที่ 20 เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ โดยกราฟมาตรฐานที่ดีควรจะมีความเป็นเส้นตรงที่ผ่านจุดศูนย์ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) หรือค่า R^2 จะต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 0.995–1.000 ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานแบบ External standard

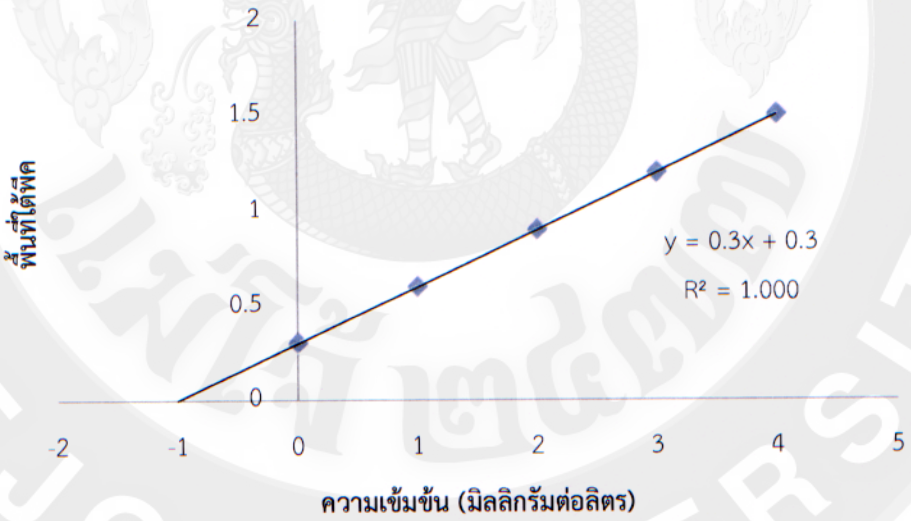
2. Internal standard ทำได้โดยการเติมสารมาตรฐานชนิดที่ไม่มีในตัวอย่างเรียกว่า internal standard ลงไปในสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐานในปริมาณเท่ากัน การทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกนนอน) กับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานต่อพื้นที่ใต้พีคจาก internal standard (แกนตั้ง) ดังภาพที่ 23



ภาพที่ 23 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานแบบ Internal standard

จากนั้นนำอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารตัวอย่างต่อพื้นที่ใต้พีคจาก internal standard นำมาหาค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน การวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีนี้มีความแม่นยำและเที่ยงตรงสูง แต่มีความยุ่งยากในการเลือกสารที่จะนำมาใช้เป็น internal standard เนื่องจากสารนั้นต้องไม่ใช่สารที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่าง เป็นสารบริสุทธิ์ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่างและตัวทำละลาย และสารที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ต้องให้พีคที่ไม่ซ้อนทับกับสารที่สนใจมี retention time ไม่มากเกินไป และมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ในสารตัวอย่างและสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดเดียวกัน ส่วนใหญ่นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก (Low volatile substation) หรือมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (High molecular weight compounds) ตัวอย่างเช่น อุตสาหกรรมยา สิ่งแวดล้อม และอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น

3. Standard addition ทำได้โดยการเติมสารมาตรฐานชนิดเดียวกับสนใจ ลงไปในสารละลายตัวอย่างด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกัน สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกนนอน) กับพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานกับสารที่สนใจ (แกนตั้ง) ดังภาพที่ 24



ภาพที่ 24 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานแบบ Standard addition

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะใช้การเตรียมสารมาตรฐานแบบ external standard ในการเตรียมสารมาตรฐานในทุกการวิเคราะห์เนื่องจากทำได้ง่าย และมีความถูกต้องเช่นกัน

การทดสอบฤทธิ์ยังยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพร สามารถทำการทดสอบได้ 2 วิธี คือ

1. Dilution Method เป็นวิธีที่ใช้หลักการการเจือจางสารสกัดให้มีระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปทดสอบกับเชื้อ โดยวิธีนี้สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อได้ (Minimal inhibition concentration, MIC) ซึ่งสามารถทำได้ 2 แบบ คือการเจือจางสารสกัดในอาหารเหลว (Broth dilution method) และการเจือจางสารสกัดในอาหารแข็ง (Agar dilution method) ซึ่งจะต้องใช้เวลานาน ยุ่งยาก แต่ให้ผลการทดลองที่แน่นอนกว่า (กนกนาฏ, 2556; สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง, 2554; Lorian, 1991)

2. Diffusion Method เป็นวิธีที่ใช้หลักการแพร่ ในการทดสอบจะให้สารสกัดแพร่ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านกระดาษกรองหรือเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นหลุม แล้วเติมสารสกัดลงไปในหลุมเพื่อให้สารสกัดเกิดการแพร่จากบริเวณหนึ่งที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่บริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำ หากเชื้อถูกยับยั้งการเจริญจะเกิด clear zone หรือ inhibition zone ซึ่งวิธี agar diffusion method เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการและการวิจัย เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถปฏิบัติได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว รวมทั้งยังสามารถให้ผลที่แน่นอนและถูกต้อง การทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการแพร่ โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เติมลงไปใน agar หรือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรวจสอบไว้ หากไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ให้เห็นจะเกิดเป็นวงยับยั้ง (inhibition zone) หรือ clear zone ขึ้น ซึ่งอัตราการแพร่ของสารออกฤทธิ์ที่ทดสอบที่สามารถแพร่ผ่านเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่เกิดขึ้น ซึ่งใช้บอกความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ ทำได้โดยการวัดขนาด clear zone ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับ standard zone ที่เกิดจากการใช้ยามาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะนั้น ก็จะทราบถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (กนกนาฏ, 2556; สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง, 2554; Lorian, 1991)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ

เป็นการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration) หรือเรียกสั้น ๆ ว่า MIC เป็นค่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุด (ในหลอดทดลอง) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย หาได้จากการเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างกัน ใส่ลงไปในเชื้อที่กำลังเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยปกติยาที่มีประสิทธิภาพ คือยาที่มีความสามารถ

กระจายตัวใน body fluid โดยมีความเข้มข้นเป็น 2-10 เท่าของ MIC โดยการเจือจางสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจากการทดสอบวิธี Broth Dilution แบบลำดับสอง (2-fold dilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นชนิดละ 5-10 ความเข้มข้น และนำไปบ่มกับเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจนครบ 18-24 ชั่วโมง สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่ปรากฏเชื้อจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC ของการทดลองค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้อย่างสมบูรณ์ (Lorian, 1991; Seffrin et al., 2010)

เชื้อที่นิยมใช้ในการทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกสองสายพันธุ์คือ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) และ *Bacillus cereus* (*B. cereus*) และแบคทีเรียแกรมลบอีกสองสายพันธุ์คือ *Escherichia coli* (*E. coli*) และ *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (Lorian, 1991; Jayshree and Kumar, 2008)

สรุปสาระสำคัญจากเอกสารที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของน้อยหนาหลายสายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง ตัวอย่างเช่น Pandey and Barve (2011) ได้รายงานว่า *Annona squamosa* Linn เป็นพืชสมุนไพรและเป็นผลไม้ที่เป็นแหล่งของต้านอนุมูลอิสระ ที่มีฤทธิ์ต้านโรคเบาหวาน แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และต่อพันธุกรรม นอกจากนั้นยังมีฤทธิ์ต้านการก่อมะเร็งและในทางเภสัชวิทยาพบว่าน้อยหน่าสายพันธุ์นี้มีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ กลัยโคไซด์ แอลคาลอยด์ ซาโปนิน แทนนิน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน สารประกอบกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และสารไฟโตสเตียรอล นอกจากนั้นยังพบกรดอะมิโนบางชนิดด้วย ส่วนองค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ที่แยกออกมาได้จากใบ ลำต้นและรากประกอบไปด้วย anonaine, aporphine, corydine, isocorydine, norcorydine, glaucine และยังมีองค์ประกอบทางเคมีอื่น ๆ เช่น borneol, Camphene, Camphor, Eugenol, Farnesol, Geraniol, 16-Hetriacontanone, Hexacontanol, และ n-Triacontanol เป็นต้น

นอกจากนั้นยังมีรายงานวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับวิธีการสกัดหาองค์ประกอบทางเคมีที่น่าสนใจเหล่านั้นจากส่วนต่าง ๆ ของน้อยหน่า โดยใช้วิธีการสกัดและตัวทำละลายที่แตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น El-Chaghaby et al. (2011) ได้รายงานว่าชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านเชื้อแบคทีเรียจากใบน้อยหน่า โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เมทานอล 80% อะซีโตน 50% เอทานอล 50% และน้ำต้มเดือด พบว่าสารสกัดจากอะซิโตน 50% และน้ำต้มเดือดให้ร้อยละของการสกัด (%yield) มากที่สุด แต่สารสกัดหยาบจากอะซิโตนให้

ปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด ส่วนสารสกัดจากน้ำต้มเดือดมีฟีนอลิกรวมน้อยที่สุดและเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียพบว่าสารสกัดฟีนอลิกที่สกัดได้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ยังมีการศึกษาการใช้เทคนิคอื่น ๆ ช่วยในการสกัดอีกหลายวิธี ตัวอย่างเช่น รายงานการวิจัยของ Wang et al. (2011) ได้รายงานว่าการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด (sonication) ซึ่งคลื่นความถี่สูงสามารถทำให้การสกัดสารได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญเพิ่มมากขึ้น นอกจากนั้นปริมาณและฤทธิ์ของสารสำคัญดังกล่าวจะแตกต่างกันเมื่อระยะเวลาในการโซนิเคทต่างกัน ซึ่งได้มีรายงานที่ให้การสนับสนุนในทิศทางเดียวกันของ Annegowda et al. (2010) และ Bhat et al. (2011) อีกด้วย

ส่วนการวิจัยของ Routray and Orsat (2012) ได้รายงานว่าการสกัดสารฟลาโวนอยด์จากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติด้วยเครื่องไมโครเวฟสามารถใช้ปริมาณของตัวทำละลายเพียงเล็กน้อย ทำให้เกิดการสลายตัวของสารฟลาโวนอยด์น้อย และเป็นการสกัดที่ต้องทำในระบบปิดจึงทำให้ไม่มีออกซิเจนและแสงมารบกวนในระหว่างกระบวนการการสกัดอีกด้วย แต่จะต้องมีการศึกษาพารามิเตอร์ที่มีอิทธิพลต่อการทดลอง ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ ระดับคลื่นไมโครเวฟที่ใช้ และรวมไปถึงพื้นที่ผิวสัมผัสของตัวอย่าง เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Wang et al. (2010) ได้รายงานว่าการใช้เทคนิคไมโครเวฟช่วยในการสกัดได้รับการพัฒนาสำหรับขึ้นมาเพื่อใช้ในการสกัด ฟลาโวนอยด์จาก *Radix puerariae* แต่ต้องมีการศึกษาพารามิเตอร์ที่มีอิทธิพลหลายขั้นตอน เช่น ความเข้มข้นของเอทานอล ปริมาณตัวทำละลาย พลังงานไมโครเวฟและเวลาการสกัด จากการศึกษาพบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ เอทานอล 70% โดยใช้ปริมาณตัวทำละลาย 35 มิลลิลิตร ระดับพลังงานไมโครเวฟ 255 วัตต์ ใช้ระยะเวลา 6.5 นาที ให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 8.37 มิลลิกรัมต่อกรัม

ในการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในน้อยหน่าต้องเลือกใช้เทคนิคที่เหมาะสมกับสารประกอบแต่ชนิดที่ต้องการศึกษาด้วยเช่นกัน ตัวอย่างการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในพืชสมุนไพร พบว่าเป็นสารกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก และเทคนิคที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีวิธีโฟลิน-ไซโอแคลทู เช่น Mariod et al. (2012) ได้รายงานว่าการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสารสกัดหยาบของพืชสมุนไพร 2 ชนิด คือน้อยหน่าสายพันธุ์ *A. squamosa* และ *C. nilotica* ด้วยวิธีโฟลิน-ไซโอแคลทู ในสารสกัดหยาบจากใบและเปลือกไม้ของ *A. squamosa* และ *C. nilotica* พบว่าสารสกัดหยาบมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 171.5, 167.9, 169.5 และ 170.4 กรัมเทียบเท่าสารมาตรฐานกรดแกลลิกต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนผลการศึกษาหาปริมาณฟลาโวนอยด์จากสารสกัดจากใบของพืชทั้งสองชนิดก็พบว่ามีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ปริมาณมากเช่นกัน ซึ่งผลการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 7.81-62.5 และ 7.81-125.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ โดยใช้ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ในการ

ทดสอบ ดังนั้นสารสกัดหยาบจากใบของ *A. squamosa* มีค่า IC_{50} น้อยกว่าจึงทำให้มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระมากกว่า *C. nilotica*

เทคนิคทางโครมาโทกราฟีเป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาหาองค์ประกอบที่สำคัญทางเคมีในน้อยหน่าเช่นกัน พบรายงานของ Jahan et al. (2014) ได้รายงานว่าการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากใบของ *A. reticulata* ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีสารรูทินในปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 603.88 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัด ส่วนสารที่พบในปริมาณปานกลางได้แก่ catechin, epicatechin และ p-coumeric acid พบว่ามีปริมาณ 99.00, 78.19, 85.38 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดตามลำดับ และสารที่พบในปริมาณน้อยได้แก่ vanillic acid, ellagic acid และเคอร์ซิทิน พบว่ามีปริมาณ 19.80, 31.56, 8.83 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบตามลำดับ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่ามีค่าเท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าร้อยละของการยับยั้ง ABTS เท่ากับ 99.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการดูดกลืนแสงสูงสุดสำหรับการทดสอบการยับยั้งเท่ากับ 0.195 ส่วนการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีค่าเท่ากับ 419.20 มิลลิกรัมต่อกรัมเทียบเท่าวิตามินซี ปริมาณของฟีนอลิกรวมพบว่ามีค่าเท่ากับ 120.07 มิลลิกรัมต่อกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิก และฟลาโวนอยด์พบว่ามีค่าเท่ากับ 90.05 มิลลิกรัมต่อกรัมเทียบเท่าเคอร์ซิทิน ตามลำดับ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าปริมาณของสารฟีนอลิกรวมในน้อยโหน่งมีผลกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

รายงานวิจัยของ Wurangian (2005) ได้รายงานว่าสารสกัดด้วยเอทานอลและเอทิลอะซิเตตจากน้อยหน่าด้วยวิธีซอกห์เลตและนำมาวิเคราะห์หาปริมาณของสาร annonacins ด้วยเครื่อง HPLC ด้วยระบบ reverse phase โดยใช้คอลัมน์ชนิด Novapack ODS C-18 (Waters; 3.9 × 150 นาโนเมตร) ใช้อะซิโตไนไทล์และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ ด้วยอัตราส่วน 60:40 และอัตราการเคลื่อนที่เท่ากับ 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดสัญญาณด้วยยูวี ดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 220 นาโนเมตร พบว่าปริมาณของสาร annonacins ที่สกัดด้วยเอทานอลมากกว่าเอทิลอะซิเตตและมีปริมาณเท่ากับ 0.0405 ± 0.0021% และ 0.0293 ± 0.0009% ตามลำดับ

นอกจากนั้นยังได้มีการนำเทคนิคทางโครมาโทกราฟีมาศึกษาร่วมกับเครื่องมือหรือเครื่องตรวจจับสัญญาณชนิดอื่นอีก ตัวอย่างเช่น รายงานวิจัยของ Garcia-Salas et al. (2015) ได้ทำการศึกษาน้อยหน่าสายพันธุ์ *Annona cherimola* โดยใช้เทคนิค HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS โดยใช้เครื่อง HPLC รุ่น Agilent 1200 คอลัมน์ชนิด Poroshell 120 EC-C18 ขนาด 4.6 × 100 มิลลิเมตร 2.7 ไมโครเมตร อัตราการไหลเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสระบบ gradient โดยใช้ กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5% และอะซิโตไนไทล์เป็นเฟสเคลื่อนที่ ฉีดตัวอย่างปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และตรวจวัดด้วยยูวี ดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่นช่วง 240, 280, 330 และ 520 นาโนเมตร ส่วนการตั้งค่าของ ESI-QTOF-MS/MS ตรวจวัดมวลประจุ m/z ช่วง 50-1200

negative mode capillary voltage เท่ากับ 4000 V อุณหภูมิเท่ากับ 210 องศาเซลเซียสอัตราการไหลของแก๊สเท่ากับ 8 ลิตรต่อนาที ความดัน 2 bar สำหรับ positive mode capillary voltage เท่ากับ 4500 V อุณหภูมิเท่ากับ 210 องศาเซลเซียสอัตราการไหลของแก๊สเท่ากับ 8 ลิตรต่อนาที ความดัน 2 บาร์ ผลการทดลองพบว่าในเนื้อของน้อยหน่ามีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกหลายชนิด เช่น กรดควินนิก (Quinic acid), คาเทชิน และ อีพิคาเทชิน (Epicatechin) เป็นต้น ส่วนในเปลือกของน้อยหน่ามีสารประกอบฟีนอลิก ตัวอย่างเช่น กรดควินนิก อีพิคาเทชิน รูทิน เคอร์ซิทิน คาเทชิน และเฮสเพอร์ริดิน เป็นต้น ส่วนในเมล็ดของน้อยหน่าพบสาร เช่น กรดควินนิก อีพิคาเทชิน รูทิน คาเทชิน และไมโคนิโอไซด์ เอ (Miconioside A) เป็นต้น

รายงานการวิจัยของ Araya et al. (2002) ได้รายงานว่าองค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้อยหน่าสายพันธุ์ *Annona squamosa* มีหลายอนุพันธุ์ โดยได้ทำการศึกษาอนุพันธุ์ของ squamocin ที่ได้จากการสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วยเมทานอล และทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีด้วยเครื่อง HPLC ด้วยระบบ reversed phase โดยใช้สารผสมระหว่างเมทานอล น้ำ อะซิโตไนล์ไทล์ และไอโซโพรพานอลในอัตราส่วนเท่ากับ 120:30:40:1 ตามลำดับ จากนั้นนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดโดยใช้เทคนิค Infrared Spectroscopy (IR), High resolution fast-atom bombardment mass spectrometry (HR-FAB-MS) และ ^{1}H และ ^{13}C NMR spectroscopy ร่วมกัน พบว่า สาร squamocin ที่มีในน้อยหน่าสายพันธุ์ *Annona squamosa* มี 2 อนุพันธุ์ ได้แก่ Squamocin-O_1 และ squamocin-O_2 เป็นต้น

การศึกษาองค์ประกอบที่สำคัญในน้อยหน่า พบว่าสารประกอบหลายชนิดที่พบเป็นสารประกอบกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดได้อีกด้วย ตัวอย่างเช่น ในรายงานการวิจัยของ Bento et al. (2013) ได้ทำการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยใช้สารสกัดจากใบของ *Annona muricata* ทำการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธีการทดสอบ phytochemical screening พบว่ามีสารกลุ่ม tannins, flavones, และ flavonoids และเมื่อนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พบว่ามีการยับยั้งที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Jayshree et al. (2008) ที่ได้ทำการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยสารสกัดจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ *Annona squamosa* โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่แตกต่างกัน 4 ชนิด และทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธี Agar diffusion โดยทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกสองสายพันธุ์คือ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* และทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบสองสายพันธุ์คือ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าสารสกัดจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ *Annona squamosa* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยมีค่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุด หรือ Minimal Inhibitory Concentration (MIC) เท่ากับ 130

และ165 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเป็นสารสกัดหยาบจากปิโทรเลียมอีเทอร์และเมทานอล ตามลำดับ และยังพบอีกว่าสารสกัดจากเมทานอลยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* โดยพบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

ในการดำเนินงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหาวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดองค์ประกอบทางเคมีของใบน้อยหน่า โดยใช้ใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว ด้วยวิธีการสกัดแบบการแช่ยุ่ย ซอกห์เลต รีฟลักซ์ การสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ และการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด และทำการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 6 ชนิดได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท นำไปวิเคราะห์หาปริมาณของฟีนอลิกรวม และปริมาณของฟลาโวนอยด์รวม โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (UV-Visible Spectroscopy) เพื่อให้ได้ปริมาณของฟีนอลิกรวมและปริมาณของ ฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบที่ดีที่สุด และนำสภาวะการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด ทำการสกัดสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าในใบสายพันธุ์ต่าง ๆ และหาปริมาณของฟีนอลิกรวมและปริมาณของฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าในใบน้อยหน่าสายพันธุ์ต่าง ๆ จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar diffusion โดยทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวกสองสายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) และ *Bacillus cereus* (*B. cereus*) และทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบอีกสองสายพันธุ์คือ *Escherichia coli* (*E. coli*) และ *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) จากนั้นทำศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) ด้วยวิธี broth dilution technique โดยใช้สารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าที่ได้มาทำการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอาร์เรย์ (High performance liquid chromatography-diode array detector; HPLC-DAD) และทำการยืนยันผลการทดลองโดยใช้แมสสเปกโทรเมทรี (Mass Spectrometry; HPLC-MS) ดังต่อไปนี้

เครื่องมือและอุปกรณ์

ในงานวิจัยนี้จะใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือ/อุปกรณ์	รุ่น	ยี่ห้อ	ประเทศ
เครื่องชั่งความละเอียด 2 ตำแหน่ง	AB3002-S	Mettler Toledo	Switzerland
เครื่องชั่งความละเอียด 4 ตำแหน่ง	AB204-S	Mettler Toledo	Switzerland
เครื่องปั่นละเอียด (Blender)	-	Phillips	Thailand
เครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic bath)	8510	Branson	U.S.A
เครื่องไมโครเวฟ (กำลังไฟ 900 วัตต์)	-	Elextrolux	-
เครื่องระเหยความดันต่ำ (Rotary evaporator)	-	-	U.S.A
เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer)	8453	Agilent	U.S.A
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์ (HPLC-DAD)	1100	Agilent	U.S.A
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์-แมสสเปกโทรเมทรี (HPLC-DAD-MS)	1101	Agilent	U.S.A
เตาหลุม (ปรับความร้อนได้ 8 ระดับ)	-	-	-
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	-	Memmert	Germany
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	-	Memmert	Germany
Nylon disc filter ขนาด 0.45 ไมครอน 13 มิลลิเมตร	-	Whatman	England
ไมโครปิเปต ขนาด 20, 100, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร	Reseach	Eppendorf	Germany
ชุดกรองสารละลายเฟสเคลื่อนที่	-	Agilent	U.S.A

สารเคมี

ในงานวิจัยนี้จะใช้สารเคมีดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	ความบริสุทธิ์	บริษัทผู้ผลิต
อะซิโตน (Acetone)	$(CH_3)_2CO$	99.9	Lab scan
เอทานอล (Ethanol)	C_2H_5OH	95.0	World solvent
เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate)	$C_4H_8O_2$	99.9	Lab scan
เฮกเซน (Hexane)	C_6H_{14}	99.9	Lab scan
เมทานอล (Methanol)	CH_3OH	99.9	Lab scan
Folin–Ciocalteus reagent	-	99.0	Sigma-Aldrich
โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)	Na_2CO_3	≥99.0	Sigma-Aldrich
อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride)	$AlCl_3$	99.0	Sigma-Aldrich
โพแทสเซียมอะซิเตท (Potassium acetate)	$C_2H_3KO_2$	99.5	Sigma-Aldrich
กรดแกลลิก (Gallic acid)	$C_7H_6O_5$	99.7	Sigma-Aldrich
กรดแทนนิก (Tannic acid)	$C_{76}H_{52}O_{46}$	99.3	Sigma-Aldrich
คาเทชิน (Catechin)	$C_{15}H_{14}O_6$	99.5	Sigma-Aldrich
รูทิน (Rutin)	$C_{27}H_{30}O_{16}$	99.3	Sigma-Aldrich
ไอโซเคอร์ซิทิน (Isoquercetin)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	99.5	Sigma-Aldrich
เคอร์ซิทิน (Quercetin)	$C_{15}H_{10}O_7$	99.5	Sigma-Aldrich
ไฮโดรควินิน (Hydroquinin)	$C_6H_6O_2$	≥95.0	Sigma-Aldrich
อะพิจินิน (Apiginin)	$C_{15}H_{10}O_5$	≥95.0	Sigma-Aldrich
แคมป์ฟีรอล (Kaempferol)	$C_{15}H_{10}O_6$	≥95.0	Sigma-Aldrich
แอมโมเนียมฟอร์เมท (Ammonium formate)	CH_5NO_2	99.0	Merck
อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)	C_2H_3N	99.9	Lab scan
กรดฟอร์มิก (Formic acid)	CH_2O_2	88.0	Fisher scientific

การเก็บและเตรียมตัวอย่างใบน้อยหน่า

1. เก็บใบน้อยหน่าสดจากต้นในช่วงเดือนกรกฎาคม-เดือนพฤศจิกายน 2556

2. ทำการคัดแยกใบและทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาดผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3. นำตัวอย่างแห้งไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นตัวอย่าง

4. เก็บตัวอย่างใส่ถุงซิปใส เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Satyajit et al., 2006) เพื่อรักษาสภาพตัวอย่างและนำมาใช้ในการวิเคราะห์ ตลอดงานวิจัย

การศึกษาหาวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสม

ในการวิจัยนี้จะทำการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในใบโดยทำการศึกษาหาวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใบน้อยหน่า โดยใช้ใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวมาทำการศึกษาด้วยวิธีการสกัดแบบการแช่ยุ่ย ซอกห์เลต รีฟลักซ์ การใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 6 ชนิดได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท นำไปวิเคราะห์หาร้อยละของสารสกัด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโนอยด์ โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (UV-Visible Spectroscopy) และพิจารณาหาสภาวะในการสกัดที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละการสกัด เพื่อนำมาศึกษาการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัดต่อไป

1. การสกัดหยาบด้วยวิธีแช่ยุ่ย

1.1. นำตัวอย่างใบน้อยหน่าที่ได้จากการปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นตัวอย่าง

1.2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 20 กรัมใส่ขวดขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 6 ขวด

1.3. ทำการสกัดตัวอย่างที่ชั่งมาทั้ง 6 ขวด ด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท โดยการเติมตัวทำละลายแต่ละชนิดปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในขวด เขย่าให้เข้ากัน และแช่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.4. จากนั้นนำมากรองผ่านสำลี ใส่ขวดก้นกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ขวดก้นกลมที่ใช้ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาใส่ตู้ดูดความชื้นประมาณครึ่งชั่วโมง และนำไปชั่งน้ำหนักที่เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จดบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้)

1.5. นำขวดก้นกลมที่มีสารสกัดอยู่ ไปทำการระเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งด้วยสุญญากาศ และนำมาชั่งน้ำหนักที่เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งอีกครั้ง จดบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ ก็จะได้น้ำหนักของสารสกัดหยาบ (Crude extract) ที่ได้จากการสกัด

1.6. คำนวณหาร้อยละของสารสกัด

2. การสกัดหยาบด้วยวิธีซอกห์เลต

2.1. นำตัวอย่างใบน้อยหน่าที่ได้จากการปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นตัวอย่าง

2.2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 20 กรัมใส่ในทิมเบิลที่มีกระดาษกรองเบอร์ 1 จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน จำนวน 6 อัน จากนั้นปิดด้วยสำลี นำไปอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น

2.3. เทตัวทำลายแต่ละชนิดปริมาตร 200 มิลลิลิตร ได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ลงในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร ชนิดละ 1 ขวด (ขวดก้นกลมที่ใช้ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาใส่ตู้ดูดความชื้นประมาณครึ่งชั่วโมง และนำไปชั่งน้ำหนักที่เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จดบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้)

2.4. ตั้งชุดสกัดซอกห์เลต จำนวน 6 ชุด เพื่อทำการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด นำทิมเบิลที่มีตัวอย่างมาใส่ใน extraction chamber จากนั้นเปิดเตาให้ความร้อนและทำการสกัดด้วยความร้อนระดับ 3 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.5. ทำการกรองตามข้อ 1 วิธีการสกัดหยาบด้วยแช่ยุ่ย ข้อ 1.4-1.6

3. การสกัดหยาบด้วยวิธีรีฟลักซ์

3.1. นำตัวอย่างใบน้อยหน่าที่ได้จากการปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นตัวอย่าง

3.2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 20 กรัมใส่ขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 6 ขวด (ขวดก้นกลมที่ใช้ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาใส่ตู้ดูดความชื้นประมาณครึ่งชั่วโมง และนำไปชั่งน้ำหนักที่เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จดบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้)

3.3. เทตัวทำลายแต่ละชนิดปริมาตร 200 มิลลิลิตร ได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ลงในขวดก้นกลมแต่ละขวด เขย่าให้เข้ากัน

3.4. จากนั้นทำการสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์ด้วยความร้อนระดับ 8 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.5. ทำการกรองตามข้อ 1 วิธีการสกัดหยาบด้วยแช่ยุ่ย ข้อ 1.4-1.6

4. การสกัดหยาบด้วยวิธีการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด

4.1. ทำการสกัดเช่นเดียวกับวิธีการแช่ยุ่ยด้วยตัวทำละลายเหมือนข้อ 1 ตั้งแต่ข้อที่ 1.1-1.3 แต่ใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด

4.2. โดยทำการสกัดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.3. ทำการกรองตามวิธีการสกัดหยาบด้วยแช่ยุ่ยข้อ 4-6

5. การสกัดหยาบด้วยเครื่องไมโครเวฟ

5.1. ทำการสกัดเช่นเดียวกับวิธีการแช่ยุ่ยเหมือนข้อ 1 ตั้งแต่ข้อที่ 1.1-1.2 แต่ใช้เครื่องไมโครเวฟช่วยในการสกัดและเอทานอลเป็นตัวทำละลาย

5.2. ทำการสกัดหยาบด้วยเครื่องไมโครเวฟที่ระดับพลังงานตั้งแต่ 50, 100, 200 และ 300 วัตต์ เป็นเวลา 30, 60, 120, 150 และ 300 วินาที

5.3. ทำการกรองตามข้อ 1 วิธีการสกัดหยาบด้วยแช่ยุ่ยข้อ 1.4-1.6

การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธีโฟลิน-ไซโอแคลทู

ดัดแปลงมาจากวิธีของ International Organization for Standardization (2005)

1. การสร้างกราฟมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐานกรดแกลลิก 0.1000 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ จะได้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร เติมสารละลายโฟลิน-ไซโอแคลทูความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงไป 5 มิลลิลิตร และโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

2. การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวมในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าจากวิธีต่าง ๆ

ชั่งสารสกัดหยาบน้ำหนัก 1.0000 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 3-5 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ ปิเปตสารละลายมา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร เติมสารละลายโฟลิน-ไซโอแคลทูความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงไป 5 มิลลิลิตร และโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

การวิเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธีอะลูมิเนียมคลอไรด์คัลเลอริเมตริก

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Khatiwora et al. (2010)

1. การสร้างกราฟมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐานคาเทชิน 0.1000 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ จะได้สารละลายมาตรฐานคาเทชินที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานมา 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเมทานอล 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ลงไป 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตท ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากันด้วย และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

2. การวิเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าจากวิธีต่าง ๆ

ชั่งสารสกัดหยาบน้ำหนัก 1.0000 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ ปิเปตสารละลายมา 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเมทานอล 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ลงไป 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตท ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากันด้วย หรือทำการเจือจางสารละลายให้เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

ศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดน้อยหน่าด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์

ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Peñarrieta et al. (2007)

1. การสร้างกราฟมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐานฟีนอลิกรวม ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน ไฮโดรควินิน อะพิจินิน และแคมป์ฟีรอล ปริมาณสารละ 0.1000 กรัม ชั่งลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมอะซิโตไนไตรล์ 25 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไตรล์จนครบ จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานฟีนอลิกรวมความเข้มข้นเท่ากับ 0, 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมา 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไตรล์จนครบ นำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์

2. ศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์

ศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ ทำได้โดยการเตรียมสารมาตรฐานซึ่งมีค่าต่ำกว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีที่ได้จากข้อ 1 ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ โดยที่ความสูงของพีคที่ตรวจวัดได้ต้องมีค่าอย่างน้อยมากกว่าสามเท่าของเส้นพื้น (base line) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบโดยใช้วิธีการคำนวณ

3. การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวจากวิธีต่าง ๆ

โดยสารสกัดหยาบที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นสารสกัดจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ แต่ละวิธีด้วยตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้การศึกษาการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธีโฟลิน-ไซโอแคลทู และการวิเคราะห์หาสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธีอะลูมิเนียมคลอไรด์คัลเลอริเมทริก เป็นเกณฑ์คัดเลือกสภาวะที่ดีที่สุดของการสกัดแต่ละชนิดเพื่อมาทำการศึกษาต่อ

โดยการชั่งสารสกัดหยาบน้ำหนัก 1.00 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมอะซิโตไนไตรล์ 25 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไตรล์จนครบ หรือทำการเจือจางสารละลายให้เหมาะสม จากนั้นนำไป

วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ โดยสภาวะที่ใช้ในการทดลองคือ

คอลัมน์	ใช้คอลัมน์ชนิด LichroCART RP-18e	
	ขนาด : 150 mm × 4.6 mm ×5.0 μm	
อัตราการไหล	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที	
อุณหภูมิ	30 องศาเซลเซียส	
เฟสเคลื่อนที่	(A) อะซิโตรไนไตรล์	
	(B) แอมโมเนียมฟอร์เมท บัฟเฟอร์ พีเอช 4.0	
	ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	
แกรเดียน	0-5 นาที	B 100% คงที่
	5-10 นาที	จาก A 0% เป็น 20%
	10-20 นาที	A 20% คงที่
	20-60 นาที	จาก A 20% เป็น 40%
ตัวตรวจวัดสัญญาณ	ชนิดไดโอดแอเรย์ (Diode array detector)	
ใช้ความยาวคลื่น	270 นาโนเมตร	

4. การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธีที่เหมาะสมที่สุด

โดยสารสกัดหยาบที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นสารสกัดหยาบที่ได้จากใบน้อยหน่าจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ฝ้ายเขียว สายพันธุ์ฝ้ายครั่ง สายพันธุ์หนังเขียว และสายพันธุ์ออสเตรเลีย มาทำการสกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายในสภาวะที่ดีที่สุด โดยใช้การศึกษาการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวจากวิธีต่าง ๆ ข้อ 3 เป็นเกณฑ์คัดเลือกสภาวะที่ดีที่สุดของการสกัดเพียงสภาวะเดียว มาทำการศึกษาต่อ จากนั้นทำการเตรียมตัวอย่างตามข้อ 3 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์และแมสสเปกโทรมิเตอร์

ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Peñarrieta et al. (2007)

1. การสร้างกราฟมาตรฐาน

ศึกษาโดยใช้สารมาตรฐานฟีนอลิกรวมทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน ไฮโดรควินิน อะพิจินิน และแคมป์ฟีรอล เช่นเดียวกับการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดน้อยหน่าด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี แต่ใช้โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์และแมสสเปกโทรมิเตอร์ในการวิเคราะห์

2. การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่า

หลังจากการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ แล้วนำตัวอย่างน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ได้จากการสกัด มาทำการศึกษาต่อด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์และแมสสเปกโทรมิเตอร์ โดยสภาวะที่ใช้ในการทดลองส่วนของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ ส่วนของแมสสเปกโทรมิเตอร์คือ

MS detector	full scan (m/z 100-700)
Nebulizer pressure	60 psi
Gas N_2 flow	13 L/min
Gas temperature	320°C
Capillary voltage	4000 V (positive)
Mass scan range	full scan (m/z 100-700)
Step size	0.20
Interface	API-ESI mode

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด ด้วยวิธี agar diffusion method

หลังจากได้ทำการสกัดที่สนใจในตัวอย่างน้อยหน่าสายพันธุ์ต่าง ๆ และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมและดีที่สุดในการสกัดแต่ละวิธีในเบื้องต้นแล้วนั้น ทำการสกัดองค์ประกอบทางเคมีของน้อยหน่าสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้มาทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* โดยนำเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลว Mueller-Hinton broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อแบคทีเรียที่บ่มไว้มา streak ลงใน plates ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar จากนั้นใช้ cock borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตรเจาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นจำนวน 3 หลุม (นำชิ้นวุ้นที่เจาะทิ้งไป) จากนั้นดูดสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยเอทานอลจากวิธีรีฟลักซ์ สกัดด้วยเมทานอลจากวิธีรีซอกเลตท์ สกัดด้วยเอทานอลจากวิธีใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด และสกัดด้วยเอทานอลจากวิธีไมโครเวฟ ทำการเจือจางสารสกัดหยาบด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลุม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยมียาเจนตาไมซิน ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสภาวะควบคุมในการทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บข้อมูลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) จากวงใสขอบซ้ายถึงขวาและจากวงใสขอบบนถึงล่าง แล้วนั้นนำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ย ซึ่งได้ดัดแปลงมาจากวิธีการดัดแปลงมาจากวิธีการของ Bauer et al. (1966) และ กนกนาฎ (2556) เพื่อให้เหมาะสมกับสารสกัดหยาบในงานวิจัย

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ด้วยวิธี broth dilution technique

ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Bauer et al. (1966)

1. เตรียมหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อและทำให้แห้ง มาจำนวน 7 หลอด จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับเชื้อ *B. cereus* ใช้อาหารชนิด NB ใส่ลงในหลอดทดลองที่ 2-7 หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยเอทานอลจากวิธีรีฟลักซ์ สารสกัดหยาบด้วยเมทานอลจากวิธีซอกเลตท์ สารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากวิธีใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด และสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากวิธีไมโครเวฟช่วยในการสกัด ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3. ดูดสารสกัดหยาบที่ทำการเจือจางแล้ว ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่ 2 ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ข้างในแล้ว ผสมให้เข้ากัน

4. จากนั้นดูดสารละลายจากหลอดที่ 2 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่ 3 และทำซ้ำอย่างนี้ไปจนถึงหลอดที่ 6 (ให้เปลี่ยนปิเปตที่ใช้ในการดูดสารละลายทุกครั้ง) โดยหลอดที่ 7 จะไม่มีการเติมสารละลายผสมนี้ลงไป มีแค่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม (positive control)

5. เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ลงไปในหลอดการทดลองทุกหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงแล้วให้สังเกตที่อาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกหลอดที่ไม่มีความขุ่น ให้หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6. ทำการทดสอบเหมือนข้างต้นข้อ 1-5 โดยเปลี่ยนจากสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าเป็นยาเจนตามัยซินความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแทน เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมในการทดสอบ

ตัวอย่างการเจือจางความเข้มข้นในการทดสอบแต่ละหลอด

ความเข้มข้นเริ่มต้น	หลอดที่ 1	2	3	4	5
สารสกัดหยาบ (1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	500	250	125	62.5	31.26
ยาเจนตามัยซิน (75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	37.5	18.75	9.37	4.68	2.34

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

ในการดำเนินงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหาวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดองค์ประกอบทางเคมีของใบน้อยหน่า โดยใช้ใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวเป็นตัวแทนในการศึกษาสภาวะในการสกัดที่เหมาะสมในเบื้องต้น ด้วยวิธีการสกัดแบบการแช่ยุ่ย ซอกห์เลต รีฟลักซ์ การใช้ความถี่สูงช่วยในการสกัด และการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด ด้วยตัวทำละลายทั้ง 6 ชนิดได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของฟีนอลิกรวม และปริมาณของฟลาโวนอยด์รวม โดยในการวิเคราะห์ทั้งสองนี้ใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี โดยทำการเปรียบเทียบปริมาณของฟีนอลิกรวม และปริมาณของฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบที่ได้จากแต่ละการสกัด และนำสภาวะการสกัดที่ดีที่สุดมาทำการสกัดใบน้อยหน่า 4 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ฝ้ายเขียว สายพันธุ์ฝ้ายครั่ง สายพันธุ์หนังเขียว และสายพันธุ์ออสเตรเลีย ทำการศึกษาหาปริมาณของฟีนอลิกรวม ปริมาณของฟลาโวนอยด์รวม ศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าโดยใช้โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ และทำการยืนยันผลการทดลองด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี โดยใช้โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์และแมสสเปกโทรมิเตอร์ ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าด้วยเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ด้วยวิธี broth dilution technique มีผลการวิจัยดังต่อไปนี้

การเก็บและเตรียมตัวอย่างใบน้อยหน่า

ในการทดลองจะใช้ใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวและหนังเขียวจากอำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ ส่วนใบน้อยหน่าสายพันธุ์หนังเขียว ฝ้ายครั่ง และออสเตรเลียจากอำเภอดอยหล่อ จังหวัดเชียงใหม่ เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกรกฎาคม-เดือนพฤศจิกายน 2556 หลังจากนั้นเราจะทำการคัดแยกโดยแยกใบอ่อนหรือใบแก่เกินไป ส่วนที่เสียและแห้ง นำไปทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด จากนั้นผึ่งให้แห้ง แล้วไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นตัวอย่าง ซึ่งขั้นตอนนี่ต้องมีการปั่นซ้ำหลาย ๆ ครั้งจนตัวอย่างละเอียดและเข้ากันดีแล้ว เก็บตัวอย่างในถุงซิปใส และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Satyajit et al., 2006) เพื่อเป็นการรักษาสภาพตัวอย่างให้เหมาะสมและสามารถนำมาใช้ได้ตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัย

การศึกษาหาวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสม

ในการวิจัยนี้จะทำการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในน้อยหน่า โดยทำการศึกษาหาวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใบน้อยหน่า โดยใช้ใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว ด้วยวิธีการสกัดแบบการแช่ยุ่ย ซอกห์เลต รีฟลักซ์ การสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ และการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด ด้วยตัวทำละลายทั้ง 6 ชนิดได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณร้อยละของการสกัด

1. การสกัดหยาบด้วยวิธีแช่ยุ่ย

จากการนำตัวอย่างใบน้อยหน่าที่เตรียมตามบทที่ 3 มาทำการทดสอบตามวิธีการด้วยตัวทำลายทั้ง 6 ชนิดได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในขวด เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขั้นตอนนี้เป็นการแช่ตัวอย่างในตัวทำละลาย เพื่อให้ใบน้อยหน่าดูดซับตัวทำละลายเข้าไป ทำให้ใบน้อยหน่าอ่อนนุ่มและเกิดการเปื่อยยุ่ยในที่สุด ซึ่งตัวทำละลายแต่ละชนิดก็สามารถละลายเอาองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ที่มีในใบน้อยหน่าออกมาได้ จึงทำให้สารสกัดที่ได้มีสีเขียวเข้มดังภาพที่ 25 ซึ่งเป็นสีของรงควัตถุที่สำคัญในใบน้อยหน่าออกมาได้เช่นกัน

ภาพที่ 25 ตัวอย่างสารสกัดจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวจากวิธีแช่ยุ่ย ด้วยตัวทำละลาย น้ำ (ก) และ เมทานอล (ข)

ดังนั้นจึงต้องนำตัวอย่างที่ผ่านการแช่ยุ่ยมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่มีสำลีวางอยู่ เพื่อช่วยในการดักจับตะกอนที่มีขนาดเล็กบางส่วนออกไปเหลือแต่ส่วนใสที่อยู่ในขวดก้นกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอนเพื่อให้สะดวก ง่าย และให้ค่าน้ำหนักของสารสกัดที่แน่นอน เพื่อนำมาใช้ในการ

คำนวณหาร้อยละของสารสกัดต่อไป ซึ่งสามารถทำได้โดยนำขวดก้นกลมที่มีสารสกัดอยู่ไปทำการระเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งด้วยสุญญากาศ และนำขวดที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนแห้ง จากนั้นนำออกมาใส่ตู้ดูดความชื้นประมาณครึ่งชั่วโมง และนำมาชั่งน้ำหนักที่เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งอีกครั้ง จดบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้แล้วจึงค่อยนำมาใช้งาน จะได้สารสกัดหยาบใบน้อยหน่าที่มีลักษณะเหนียว มีสีเขียวเข้มปนน้ำตาลอ่อน ดังภาพที่ 26

ภาพที่ 26 สารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยวิธีการแช่ยุ่ย

ผลการศึกษาการสกัดใบน้อยหน่าด้วยวิธีแช่ยุ่ยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยตัวทำละลายน้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ให้ร้อยละของการสกัดดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณร้อยละของการสกัดที่ได้จากการสกัดวิธีแช่ยุ่ย ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (n=3)

ร้อยละของการสกัด / ตัวทำละลาย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
เฮกเซน	0.68	0.55	0.64	0.62	0.07
เอทิลอะซิเตท	0.64	0.6	0.71	0.65	0.05
อะซิโตน	0.88	0.78	0.75	0.8	0.07
เอทานอล	**4.77**	**3.96**	**4.07**	**4.27**	**0.44**
เมทานอล	**4.28**	**4.45**	**4.2**	**4.31**	**0.13**
น้ำ	1.37	1.38	1.52	1.43	0.09

จากการสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียววิธีแช่ยุ่ยด้วยตัวทำละลายน้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน พบว่า การสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลให้ปริมาณร้อยละของการสกัดมากที่สุดคือ 4.31 รองลงมาคือเอทานอล และน้ำให้ปริมาณร้อยละของการสกัดเท่ากับ 4.27 และ 1.43 ตามลำดับ ซึ่งตัวทำละลายกลุ่มนี้เป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว ส่วนตัวทำละลายที่เหลือ อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ให้ปริมาณร้อยละของการสกัดเท่ากับ 0.80 0.62 และ 0.65 ตามลำดับ แสดงว่าการสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยตัวทำละลายที่มีขั้วสามารถสกัดสารจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวได้ดีกว่าตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว

2. การสกัดหยาบด้วยวิธีซอกห์เลต

จากการนำตัวอย่างใบน้อยหน่าที่เตรียมตามบที่ 3 มาทำการทดสอบด้วยตัวทำลายทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร พบว่าในขั้นตอนนี้เป็นวิธีที่ใช้ความร้อนในการสกัดและต้องอาศัยการควบแน่นเข้าช่วย เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง เมื่อตัวทำละลายถูกความร้อนจนระเหยขึ้นไป จากนั้นเมื่อถูกความเย็นก็จะกลั่นตัวลงในทิมเบิลซึ่งภายในมีกระดาษกรองเบอร์ 1 บรรจุใบน้อยหน่าไว้ เมื่อทำตัวละลายใน extracting chamber สูงขึ้นถึงระดับกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับไปในขวดก้นกลมด้วยวิธีกาลักน้ำ ตัวทำละลายถูกความร้อนอีกครั้งก็ระเหยขึ้นแล้วกลั่นตัวกลับมาเป็นตัวทำละลายสกัดสารใหม่ วนเวียนไป โดยมีการจัดชุดอุปกรณ์การสกัดดังภาพที่ 27 ซึ่งตัวทำละลายแต่ละชนิดก็สามารถสกัดเอาองค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ที่มีในใบน้อยหน่าออกมาได้สารสกัดที่มีสีเขียวเข้มคล้ายกับวิธีแช่ยุ่ยเช่นกัน

ภาพที่ 27 ชุดสกัดซอกห์เลต

จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งด้วยสุญญากาศด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าตัวทำละลายจะหมด จะได้สารสกัดหยาบใบน้อยหน่าที่มีลักษณะเหนียว มีสีเขียวเข้มปนน้ำตาลอ่อนคล้ายกับวิธีแช่ยุ่ยเช่นกัน

ผลการศึกษาการสกัดใบน้อยหน่าด้วยวิธีซอกห์เลตเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยตัวทำละลายน้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน พบว่าได้ร้อยละของการสกัด ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณร้อยละของการสกัดที่ได้จากการสกัดวิธีซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (n=3)

ร้อยละของการสกัด / ตัวทำละลาย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
เฮกเซน	1.39	1.20	1.15	1.25	0.13
เอทิลอะซิเตท	1.38	1.10	1.08	1.19	0.17
อะซิโตน	0.85	0.79	0.79	0.81	0.03
เอทานอล	**3.97**	**3.40**	**3.32**	**3.57**	**0.36**
เมทานอล	**3.23**	**2.89**	**2.98**	**3.03**	**0.17**
น้ำ	1.01	0.74	0.75	0.84	0.15

สารสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียววิธีซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายน้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน พบว่า การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลให้ปริมาณร้อยละของการสกัดมากที่สุดคือ 3.57 รองลงมาคือเมทานอลเท่ากับ 3.03 ส่วนน้ำให้ปริมาณร้อยละของการสกัดเท่ากับ 0.84 ซึ่งตัวทำละลายกลุ่มนี้เป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว แต่น้ำสามารถสกัดสารออกมาได้ปริมาณน้อยที่สุด เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีจุดเดือดสูงถึง 100 องศาเซลเซียส จึงใช้ระยะเวลานานที่สุดในการเดือดและระเหยกลายเป็นไอขึ้นไป เพื่อควบแน่นกลับลงมาสกัดตัวอย่างอีกครั้ง ส่วนตัวทำละลายที่เหลือ อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ให้ปริมาณร้อยละของการสกัดเท่ากับ 0.81 1.25 และ 1.19 ตามลำดับ จากปริมาณร้อยละของสารสกัดด้วยวิธีซอกห์เลตตัวทำละลายที่มีขั้วสามารถสกัดสารจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวได้ดีกว่าตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ให้ผลสอดคล้องกับการสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยเช่นกัน

3. การสกัดหยาบด้วยวิธีรีฟลักซ์

จากการนำตัวอย่างใบน้อยหน่าที่เตรียมตามบทที่ 3 มาทำการทดสอบด้วยตัวทำลายทั้ง 6 ชนิดได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร พบว่า วิธีรีฟลักซ์เป็นวิธีที่ใช้ความร้อนในการสกัดและต้องอาศัยการควบแน่นเข้าช่วย เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องคล้ายกับวิธีการสกัดแบบซอกห์เลตคือ เมื่อตัวทำละลายถูกความร้อนจนระเหยขึ้นไปและเมื่อถูกความเย็นก็จะกลั่นตัวกลับลงมาในขวดก้นกลม ซึ่งบรรจุใบน้อยหน่าไว้ และเมื่อตัวทำละลายถูกความร้อนอีกครั้งก็ระเหยขึ้นแล้วกลั่นตัวกลับมาเป็นตัวทำละลายสกัดสารใหม่วนเวียนไป โดยมีการจัดชุดอุปกรณ์การสกัดดังภาพที่ 28 ซึ่งตัวทำละลายแต่ละชนิดก็สามารถสกัดเอาองค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ที่มีในใบน้อยหน่าออกมาได้สารสกัดที่มีสีเขียวเข้มคล้ายกับวิธีแช่ยุ่ยและซอกห์เลตเช่นกัน

ภาพที่ 28 ชุดสกัดรีฟลักซ์

จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งด้วยสุญญากาศด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งจะได้สารสกัดหยาบใบน้อยหน่าที่มีลักษณะเหนียวมีสีเขียวเข้มปนน้ำตาลอ่อนคล้ายกับวิธีแช่ยุ่ยและซอกเลตเช่นกัน

ผลการศึกษาการสกัดใบน้อยหน่าด้วยวิธีรีฟลักซ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยตัวทำละลายน้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ให้ร้อยละของการสกัดดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณร้อยละของการสกัดที่ได้จากการสกัดวิธีรีฟลักซ์ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ(n=3)

ตัวทำละลาย \ ร้อยละของการสกัด	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
เฮกเซน	1.28	1.47	1.36	1.37	0.10
เอทิลอะซิเตท	1.96	1.39	1.29	1.55	0.36
อะซิโตน	3.27	2.92	2.77	2.99	0.26
เอทานอล	**6.26**	**7.29**	**4.91**	**6.15**	**1.19**
เมทานอล	5.17	4.96	4.87	5.00	0.15
น้ำ	1.59	1.37	1.48	1.48	0.11

สารสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียววิธีซอกห์เลตด้วยตัวทำละลายน้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท พบว่า การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลให้ปริมาณร้อยละของการสกัดมากที่สุดคือ 6.15 รองลงมาคือ เมทานอลเท่ากับ 5.00 ส่วนน้ำให้ปริมาณร้อยละของการสกัดเพียง 1.48 ซึ่งตัวทำละลายกลุ่มนี้เป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว แต่น้ำกลับสามารถสกัดสารออกมาได้ปริมาณน้อยที่สุด เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีจุดเดือดสูงถึง 100 องศาเซลเซียส จึงใช้ระยะเวลานานที่สุดในการเดือดและระเหยกลายเป็นไอขึ้นไป เพื่อควบแน่นกลับลงมาสกัดตัวอย่างอีกครั้ง ส่วนตัวทำละลายที่เหลือ อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ให้ปริมาณร้อยละของการสกัดเท่ากับ 2.99 1.37 และ 1.55 ตามลำดับ จากปริมาณร้อยละของสารสกัดด้วยวิธีซอกห์เลตตัวทำละลายที่มีขั้วสามารถสกัดสารจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวได้ดีกว่าตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ให้ผลสอดคล้องกับการสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยและซอกห์เลตเช่นกัน

4. การสกัดหยาบด้วยวิธีการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด

ทำการทดสอบตามวิธีแช่ยุ่ยในบทที่ 3 ด้วยตัวทำลายทั้ง 6 ชนิดได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ปริมาตร 200 มิลลิลิตรและใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัดดังภาพที่ 29 พบว่า ในขั้นตอนนี้เป็นการแช่ตัวอย่างในตัวทำละลาย แต่มีการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด และเมื่อคลื่นนี้ผ่านน้ำจะทำให้เกิดคลื่นน้ำและฟองอากาศเรียกว่า cavitation ซึ่งเป็นการเกิดคลื่นน้ำและฟองอากาศซ้ำแล้วซ้ำอีกในขนาดที่เล็กมาก ประมาณหนึ่งในหนึ่งล้านเมตร (ขนาดไมครอน) ทำให้ได้พลังงานจำนวนมาก เพื่อให้ใบน้อยหน่าดูดซับตัวทำละลายเข้าไปได้ดีขึ้นมากกว่า

วิธีการแช่ยุ่ย ซึ่งตัวทำละลายแต่ละชนิดก็สามารถละลายเอาองค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ที่มีในใบน้อยหน่าออกมาได้มากขึ้น จึงทำให้สารสกัดที่ได้มีสีเขียวเข้มคล้ายกับการสกัดด้วยวิธีอื่น ๆ เช่นกัน

ภาพที่ 29 การใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด

ดังนั้นจึงต้องนำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัดมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่มีสำลีวางอยู่เหมือนกับวิธีแช่ยุ่ย เพื่อช่วยในการดักจับตะกอนที่มีขนาดเล็กบางส่วนออกไปเหลือแต่ส่วนใสที่อยู่ในขวดก้นกลม จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งด้วยสุญญากาศด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายแห้ง จะได้สารสกัดหยาบใบน้อยหน่าที่มีลักษณะเหนียว มีสีเขียวเข้มปนน้ำตาลอ่อนคล้ายกับสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดแบบอื่น ๆ เช่นกัน

ตารางที่ 7 ปริมาณร้อยละของการสกัดที่ได้จากการสกัดวิธีการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (n=3)

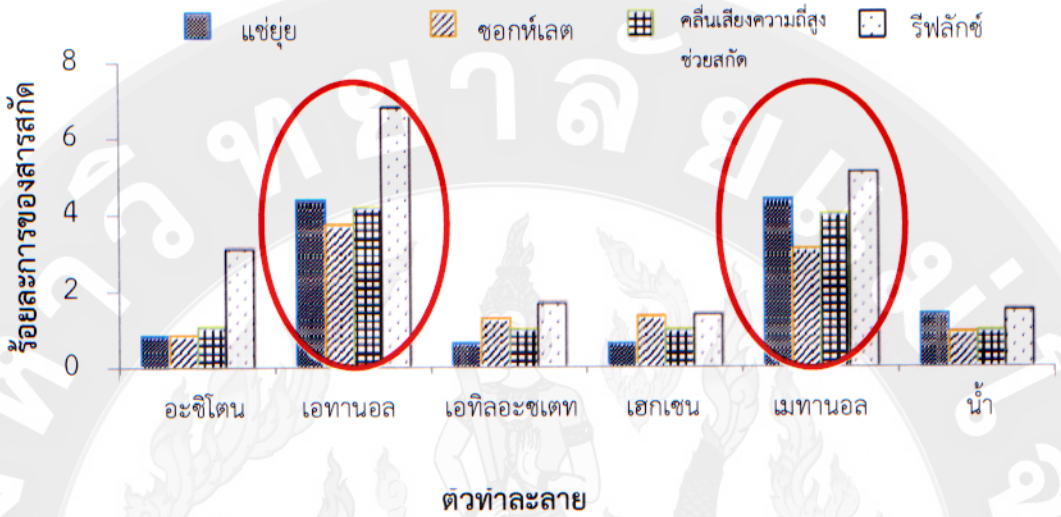
ร้อยละของการสกัด / ตัวทำละลาย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
เฮกเซน	0.96	0.99	0.97	0.97	0.02
เอทิลอะซิเตท	0.97	0.73	0.72	0.81	0.14
อะซิโตน	1.05	1.04	1.06	1.05	0.01
เอทานอล	**4.14**	**3.92**	**3.88**	**3.98**	**0.14**
เมทานอล	3.96	1.23	1.23	2.14	1.58
น้ำ	0.93	1.01	1.04	0.99	0.06

ผลการศึกษาการสกัดใบน้อยหน่าด้วยการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยตัวทำละลายน้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน พบว่าได้ร้อยละของการสกัดดังตารางที่ 7

จากการสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียววิธีการใช้คลื่นความถี่สูงช่วย ด้วยตัวทำละลายน้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน พบว่า การสกัดด้วยตัวทำละลายกลุ่มที่มีขั้ว เอทานอลให้ปริมาณร้อยละของการสกัดมากที่สุดคือ 3.98 รองลงมาคือเมทานอล และน้ำให้ปริมาณร้อยละของการสกัดเท่ากับ 2.14 และ 0.99 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายที่เหลือ ได้แก่ อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ให้ปริมาณร้อยละของการสกัดเท่ากับ 1.05 0.97 และ 0.81 ตามลำดับ แสดงว่าการสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยตัวทำละลายที่มีขั้วสามารถสกัดสารจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวได้ดีกว่าตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเหมือนกับวิธีอื่น ๆ

จากการทดลองทำการสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยวิธีต่าง ๆ โดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 6 ชนิด พบว่า ปริมาณร้อยละของการสกัดที่ได้ในแต่ละวิธี สามารถบอกได้ว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมกับการสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวคือ ตัวทำละลายที่มีขั้ว เนื่องจากให้ปริมาณร้อยละของสารสกัดที่มากกว่าตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้ว ยกเว้นน้ำ ดังภาพที่ 30 ซึ่งอาจเกิดจากระยะที่ใช้ในการทดสอบที่ไม่เหมาะสมในการสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยและการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดด้วยวิธีซอกห์เลตและรีฟลักซ์อาจทำให้น้ำเดือดและกลายเป็นไอได้ช้ากว่าเอทานอลและเมทานอล จึงทำให้น้ำสกัดสารสกัดในใบน้อยหน่าได้น้อยกว่าตัวทำละลายตัวอื่น ๆ ที่มีจุดเดือดต่ำกว่า ดังนั้นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการทดลองนี้คือเมทานอลและเอทานอล แต่เมื่อเปรียบเทียบตัวทำละลายทั้งสองชนิดนี้แล้ว พบว่า เมทานอลมีความเป็นพิษมากกว่าเอทานอลมาก (ข้อมูลสาธารณะสุข

มูลฐาน, 2551) ซึ่งสารสกัดที่ได้อาจมีการนำไปพัฒนาต่อเพื่อนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ได้จริง ดังนั้นในการทดลองต่อจากนี้จึงเลือกใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 30 ร้อยละของสารสกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายต่าง ๆ

5. การสกัดหยาบด้วยคลื่นไมโครเวฟช่วยสกัด

ในการทดสอบทำการเตรียมตัวอย่างเหมือนวิธีการสกัดแบบแช่ยุ่ย จากนั้นทำการสกัดตัวอย่างด้วยเอทานอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในขวด เขย่าให้เข้ากัน ทำการสกัดหยาบด้วยเครื่องไมโครเวฟดังภาพที่ 31 ที่ระดับพลังงานตั้งแต่ 550 700 และ 900 วัตต์ เป็นเวลา 30 60 120 150 และ 300 วินาที ในขั้นตอนนี้เป็นการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด เป็นการสกัดโดยตรงของคลื่นไมโครเวฟต่อโมเลกุล โดยพลังงานจากคลื่นไมโครเวฟมีผลทำให้โมเลกุลเกิดการเคลื่อนไหว โดยเกิดการไมเกรตของไอออนและการหมุนของคู่ขั้ว โดยการหมุนของคู่ขั้วเป็นผลให้เกิดเป็นสนามไฟฟ้าของโมเลกุลทั้งในตัวทำละลายและในตัวอย่างทำให้มีความร้อนเกิดขึ้นอย่างฉับพลัน สารสกัดที่ได้มีสีเขียวเข้มคล้ายกับการสกัดด้วยวิธีอื่น ๆ เช่นกัน

ภาพที่ 31 เครื่องไมโครเวฟช่วยในการสกัด

จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัดมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่มีสำลีวางอยู่เหมือนกับวิธีแช่ยุ่ย เพื่อช่วยในการดักจับตะกอนที่มีขนาดเล็กบางส่วนออกไปเหลือแต่ส่วนใสที่อยู่ในขวดก้นกลม จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งด้วยสุญญากาศด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายแห้งจะได้สารสกัดหยาบใบน้อยหน่าที่มีลักษณะเหนียว มีสีเขียวเข้มปนน้ำตาลอ่อนคล้ายกับสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดแบบอื่น ๆ เช่นกัน

ผลการศึกษาการสกัดใบน้อยหน่าด้วยเอทานอลและใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด เป็นเวลา 30 60 120 150 และ 300 วินาที พบว่าได้ร้อยละของการสกัดดังแสดงในตารางที่ 8

จากการสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยเอทานอลด้วยวิธีการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วย พบว่า เมื่อใช้กำลังไฟ 550 วัตต์ ที่เวลา 300 วินาทีให้ปริมาณร้อยละของการสกัดมากที่สุดคือ 2.02 เมื่อใช้กำลังไฟ 700 วัตต์ที่เวลา 120 วินาทีให้ปริมาณร้อยละของการสกัดมากที่สุดคือ 1.97 และเมื่อใช้กำลังไฟ 900 วัตต์ที่เวลา 300 วินาทีให้ปริมาณร้อยละของการสกัดมากที่สุดคือ 3.18 จากผลการทดลองข้างต้น พบว่า เมื่อให้กำลังไฟเพิ่มมากขึ้น ปริมาณร้อยละของสารสกัดที่ได้ก็จะเพิ่มขึ้นตาม แต่หากให้กำลังไฟที่มากเกินไปคลื่นไมโครเวฟจะทำให้ตัวอย่างโมเลกุลเกิดการเคลื่อนไหวอย่างรุนแรงและทำให้มีความร้อนเกิดขึ้นอย่างฉับพลันจนทำให้เกิดแรงดันภายในขวดมาก อาจเกิดการระเบิดขึ้นได้ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาต่อไปคือ กำลังไฟ 700 วัตต์และใช้เวลา 120 วินาที

ตารางที่ 8 ปริมาณร้อยละของการสกัดที่ได้จากการสกัดวิธีการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วย (n=3)

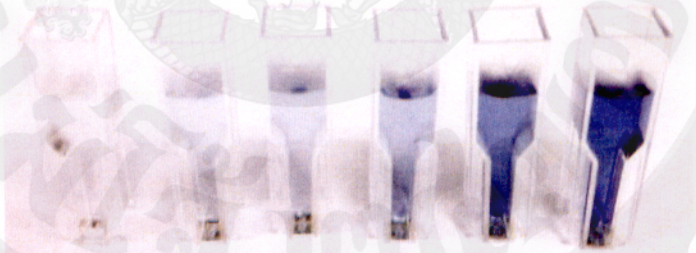
กำลังไฟฟ้า (วัตต์)	เวลา (วินาที)	ร้อยละของการสกัด				
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
550	30	0.98	1.43	1.13	0.88	0.10
	60	1.56	1.70	1.53	1.86	0.19
	120	2.45	2.17	2.05	1.87	0.07
	180	2.15	2.63	2.47	1.76	0.63
	300	**3.01**	**3.19**	**3.35**	**2.02**	**0.24**
700	30	0.84	0.86	0.71	0.80	0.08
	60	1.66	1.52	1.37	1.52	0.14
	120	**1.81**	**1.93**	**2.15**	**1.97**	**0.17**
	180	1.87	1.73	1.93	1.84	0.10
	300	2.20	1.22	1.58	1.67	0.50
900	30	0.78	0.99	0.87	1.11	0.32
	60	1.65	2.01	1.92	1.60	0.09
	120	1.80	1.93	1.90	2.22	0.21
	180	1.04	2.21	2.04	2.42	0.25
	300	**1.46**	**1.82**	**1.68**	**3.18**	**0.17**

การวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธีโฟลิน-ไซโอแคลทู

หลังจากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยมีตัวแปรในการทดสอบเป็นวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว จะได้สารสกัดหยาบที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว จึงนำมาศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธีโฟลิน-ไซโอแคลทูต่อไป

1. การสร้างกราฟมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์คือกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้นเท่ากับ 20 40 60 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยอาศัยหลักการของการเกิดปฏิกิริยารีดักชันและและออกซิเดชัน คือสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะทำปฏิกิริยากับสารละลายโฟลิน-ไซโอแคลทู ซึ่งประกอบด้วย phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents ซึ่งสารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดยกลุ่มไฮดรอกซิลของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินดังภาพที่ 32 และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เพื่อทำการหาศึกษาค่าความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 9



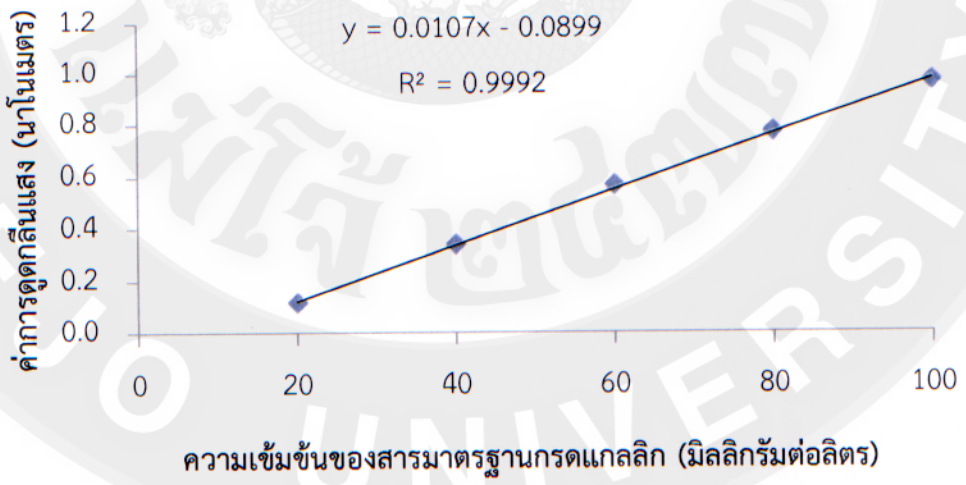
ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 32 ลักษณะการเกิดสีน้ำเงินของสารมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (n=3)

ความเข้มข้น	ค่าการดูดกลืนแสง 765 นาโนเมตร				
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
20	0.11575	0.11528	0.11464	0.1152	0.00
40	0.33741	0.33699	0.33596	0.3368	0.00
60	0.56403	0.56324	0.5619	0.5631	0.00
80	0.76833	0.76771	0.76755	0.7679	0.00
100	0.96966	0.96837	0.95884	0.9656	0.01

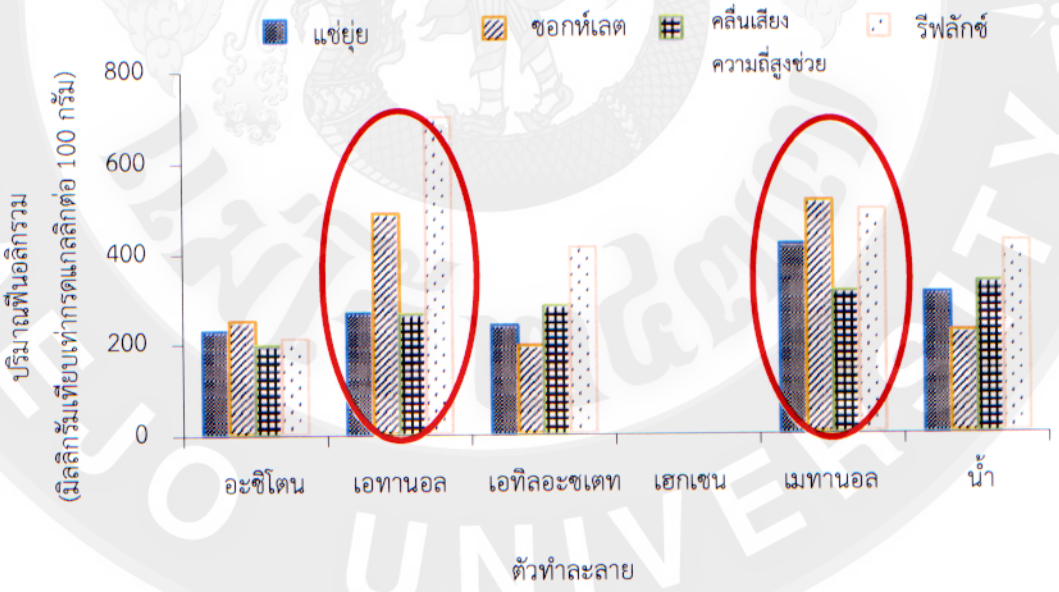
จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดค่าการดุดกลืนแสงมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน พบว่าเมื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกับความเข้มข้นมีความเป็นเส้นตรงช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ (R^2) มากกว่า 0.995 ดังภาพที่ 33



ภาพที่ 33 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (นาโนเมตร) และความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)

2. การวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกรวมในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าจากวิธีต่าง ๆ

โดยใช้สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดในบทที่ 3 มาทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าจากวิธีต่าง ๆ มีความสอดคล้องกับปริมาณร้อยละของสารสกัดที่ได้เช่นกันดังตารางที่ 10 คือตัวทำลายที่มีขั้วสามารถสกัดสารสำคัญออกมาได้ปริมาณมากกว่าตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้ว จากตารางที่ 10 จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบจากการสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยด้วยเมทานอลและเอทานอลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุดคือ 530.35 และ 402.80 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากวิธีใช้คลื่นความถี่สูงช่วยสกัดด้วยเอทานอลและเมทานอลให้ปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุดคือ 358.39 และ 339.21 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากการวิธีซอกห์เลตด้วยเมทานอลและเอทานอลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุดคือ 579.70 และ 543.02 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดหยาบจากวิธีรีฟลักซ์ด้วยเมทานอลและเอทานอลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุดคือ 748.00 และ 575.84 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ ดังภาพที่ 34



ภาพที่ 34 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบด้วยวิธีสกัดและตัวทำละลายต่าง ๆ

ตารางที่ 10 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าจากวิธีต่าง ๆ (n=3)

วิธีการสกัด	ตัวทำละลาย	มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ				
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
แช่ยุ่ย	เฮกเซน	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	เอทิลอะซิเตท	371.0	379.7	375.7	375.5	4.4
	อะซิโตน	294.6	292.8	301.3	296.2	4.5
	เอทานอล	405.8	406.6	396.1	402.8	5.9
	เมทานอล	**533.5**	**526.5**	**531.1**	**530.4**	**3.5**
	น้ำ	362.6	359.7	363.7	362.0	2.1
ความถี่สูงช่วยสกัด	เฮกเซน	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	เอทิลอะซิเตท	**365.1**	**364.7**	**363.8**	**364.5**	**0.7**
	อะซิโตน	243.8	253.6	242.1	246.5	6.2
	เอทานอล	352.3	361.2	361.6	358.4	5.2
	เมทานอล	339.1	339.0	339.5	339.2	0.3
	น้ำ	348.2	348.2	348.2	348.2	0.0
ซอกห์เลต	เฮกเซน	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	เอทิลอะซิเตท	292.6	296.9	292.5	294.0	2.5
	อะซิโตน	346.2	346.4	345.4	346.0	0.5
	เอทานอล	543.4	542.8	542.9	543.0	0.4
	เมทานอล	**583.3**	**577.9**	**578.0**	**579.7**	**3.1**
	น้ำ	360.2	360.1	360.1	360.1	0.1
รีฟลักซ์	เฮกเซน	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	เอทิลอะซิเตท	359.2	360.3	359.1	359.5	0.6
	อะซิโตน	359.5	359.5	359.6	359.5	0.0
	เอทานอล	575.9	575.9	575.8	575.8	0.1
	เมทานอล	**748.2**	**747.9**	**748.0**	**748.0**	**0.1**
	น้ำ	374.2	373.8	373.9	374.0	0.2

จากนั้นนำใบน้อยหน่ามาทำการสกัดเอาสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลและใช้คลื่นไมโครเวฟมาทำการศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิกรวม พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุดคือเมื่อใช้กำลังไฟ 550 วัตต์ ที่เวลา 300 วินาที ให้กำลังไฟ 700 วัตต์ ที่เวลา 120 วินาที และให้กำลังไฟ 900 วัตต์ ที่เวลา 30 วินาที มีค่าเท่ากับ 31.81, 34.04 และ 32.81 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ จากผลการทดลองข้างต้น พบว่า เมื่อให้กำลังไฟต่ำแต่ใช้ระยะเวลาในการสกัดนานขึ้นจะทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมาก แต่หากให้กำลังไฟที่มากขึ้นและใช้ระยะเวลาในการสกัดให้สั้นลงให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงขึ้นเช่นเดียวกัน ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าจากเอทานอลด้วยวิธีการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยสกัด (n=3)

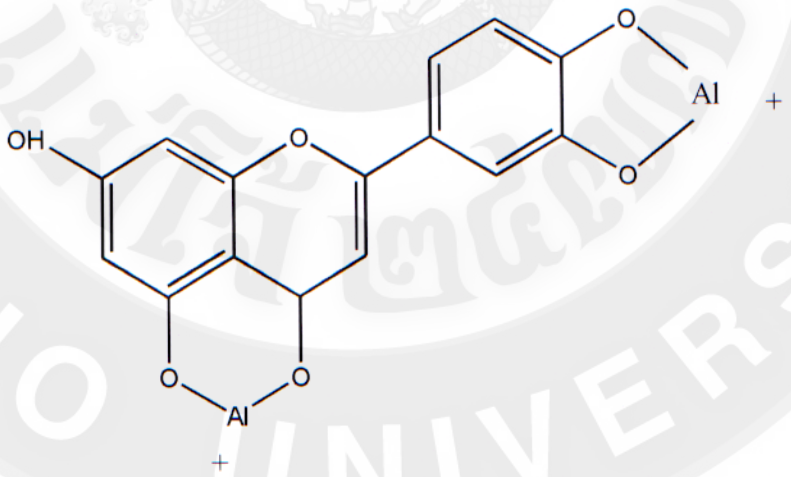
กำลังไฟฟ้า (วัตต์)	**เวลา (วินาที)**	**มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ**				
		1	**2**	**3**	**ค่าเฉลี่ย**	**SD**
550	30	22.23	23.03	22.58	22.61	0.40
	60	29.20	29.12	29.13	29.15	0.04
	120	**31.79**	**31.79**	**31.84**	**31.81**	**0.03**
	180	28.59	28.61	28.44	28.54	0.09
	300	30.62	29.81	29.74	30.05	0.49
700	30	30.09	29.78	29.76	29.88	0.18
	60	26.75	26.70	26.68	26.71	0.03
	120	**33.80**	**34.14**	**34.18**	**34.04**	**0.21**
	180	28.72	28.81	28.71	28.75	0.05
	300	21.50	21.70	21.57	21.59	0.10
900	**30**	**32.68**	**33.09**	**32.66**	**32.81**	**0.24**
	60	29.79	29.77	29.82	29.79	0.03
	120	28.93	28.76	28.80	28.83	0.09
	180	19.01	19.68	19.73	19.47	0.41
	300	20.56	19.12	19.18	19.62	0.81

การวิเคราะห์หาสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี
อะลูมิเนียมคลอไรด์คัลเลอริเมตริก

หลังจากการศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธีโฟลิน-ไซโอแคลทู แล้วนำสารสกัดหยาบที่เหลือมาทำการศึกษาหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธีอะลูมิเนียมคลอไรด์คัลเลอริเมตริกต่อ

1. การสร้างกราฟมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์คือสารคาเทชินที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นจะเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 40 60 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร เป็นแสงที่อยู่ในช่วงแสงวิสิเบิล โดยอาศัยหลักการของการเกิดปฏิกิริยารีดักชันและออกซิเดชันเช่นกัน คือสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จะทำปฏิกิริยากับอะลูมิเนียมคลอไรด์ซึ่งสารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดยสารกลุ่มไฮดรอกซิลของฟลาโวนอยด์ เกิดเป็นสารกลุ่มออโธไดไฮดรอกซิล (Orthodihydroxyl groups) ดังภาพที่ 35 ซึ่งมีสีชมพูและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร (Mabry et al., 1970) จากนั้นนำค่าที่ได้ดังตารางที่ 12 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐานต่อไป

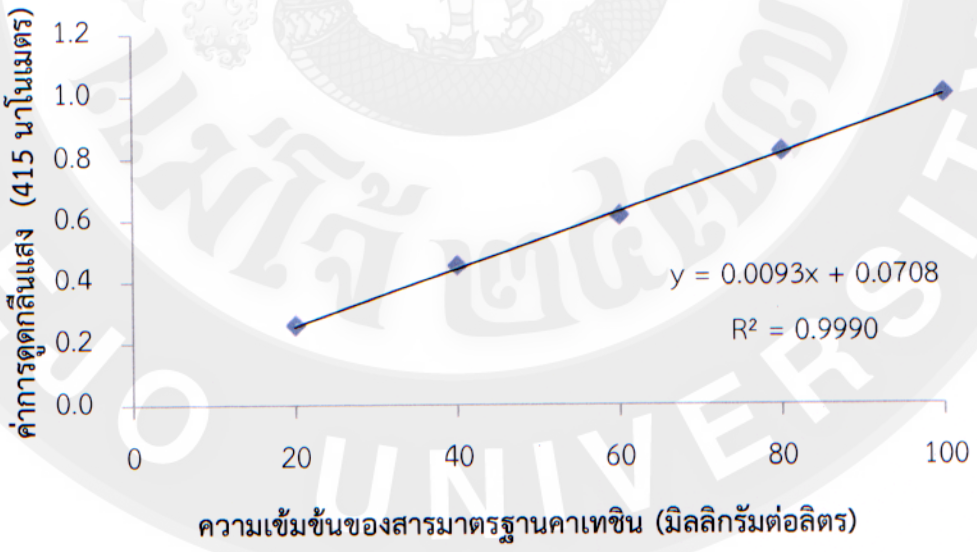


ภาพที่ 35 ตัวอย่างสารกลุ่มออโธไดไฮดรอกซิล

ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานคาเทชิน (n=3)

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 765 นาโนเมตร				
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
20	0.1158	0.1153	0.1146	0.2570	0.00
40	0.3374	0.3370	0.3360	0.4506	0.00
60	0.5640	0.5632	0.5619	0.6126	0.00
80	0.7683	0.7677	0.7676	0.8192	0.00
100	0.9697	0.9684	0.9588	1.0017	0.00

เมื่อนำค่าที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐานคาเทชินที่วัดได้มาสร้างกราฟมาตรฐานพบว่าเมื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกับความเข้มข้นมีความเป็นเส้นตรงช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 0-100 มิลลิกรัมต่อลิตรและมีค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ (R^2) มากกว่า 0.995 ดังภาพที่ 36



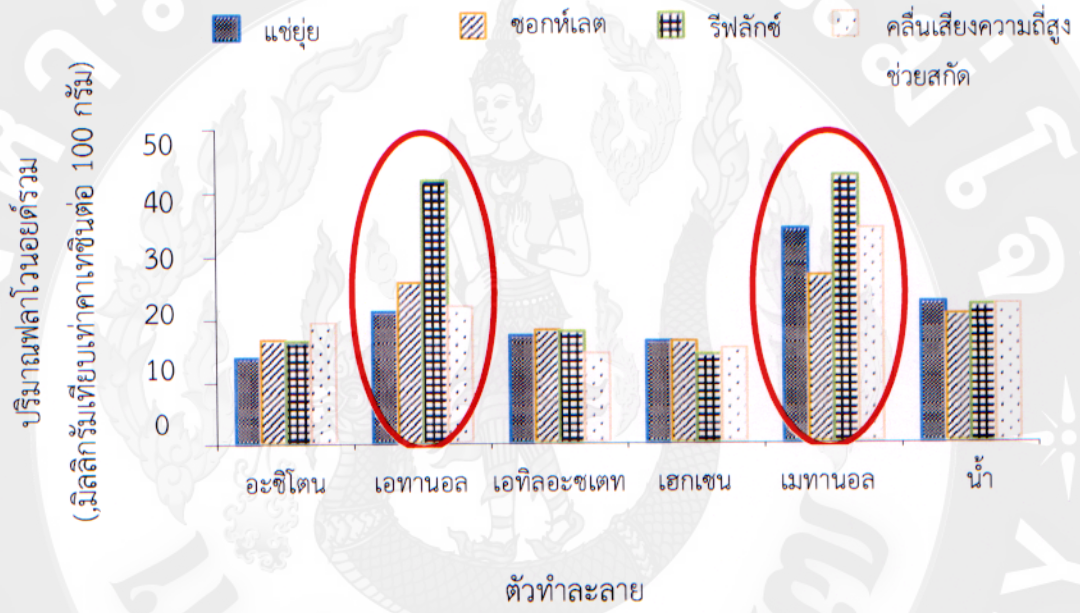
ภาพที่ 36 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (นาโนเมตร) และความเข้มข้นของสารมาตรฐานคาเทชิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

2. การวิเคราะห์หาสารฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าจากวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 13 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าจากวิธีต่าง ๆ (n=3)

วิธีการสกัด	ตัวทำละลาย	มิลลิกรัมเทียบเท่าคาเทชินต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ				
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
แช่ยุ่ย	เฮกเซน	21.88	22.39	21.56	21.94	0.41
	เอทิลอะซิเตท	22.65	22.16	22.30	22.37	0.26
	อะซิโตน	18.89	19.72	18.78	19.13	0.51
	เอทานอล	22.51	22.77	22.25	22.51	0.26
	เมทานอล	**37.82**	**35.97**	**36.17**	**36.65**	**1.01**
	น้ำ	28.52	29.39	28.84	28.92	0.44
ความถี่สูงช่วยสกัด	เฮกเซน	18.80	19.55	18.79	19.04	0.44
	เอทิลอะซิเตท	15.48	15.22	15.23	15.31	0.15
	อะซิโตน	20.24	22.09	19.11	20.48	1.51
	เอทานอล	27.88	28.38	28.04	28.10	0.26
	เมทานอล	**36.26**	**36.23**	**37.17**	**36.55**	**0.53**
	น้ำ	29.16	29.57	29.50	29.41	0.22
ซอกห์เลต	เฮกเซน	20.13	21.67	21.43	21.08	0.83
	เอทิลอะซิเตท	24.09	22.54	23.56	23.39	0.79
	อะซิโตน	18.33	19.20	19.77	19.10	0.73
	เอทานอล	28.21	26.71	27.16	27.36	0.77
	เมทานอล	**43.32**	**42.37**	**42.21**	**42.63**	**0.60**
	น้ำ	23.25	26.88	24.37	24.83	1.86
รีฟลักซ์	เฮกเซน	17.72	18.16	17.75	17.88	0.25
	เอทิลอะซิเตท	23.90	25.75	25.05	24.90	0.93
	อะซิโตน	26.81	26.15	26.09	26.35	0.40
	เอทานอล	**43.19**	**43.97**	**43.45**	**43.54**	**0.40**
	เมทานอล	**45.30**	**44.91**	**44.72**	**44.98**	**0.29**
	น้ำ	29.18	29.17	29.28	29.21	0.06

จากตารางที่ 13 สารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวจากวิธีรีฟลักซ์ด้วยเมทานอลและเอทานอล พบว่าให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 44.98 และ 43.54 มิลลิกรัมเทียบเท่าคาเทชินต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากวิธีซอกห์เลตด้วยเมทานอล และการสกัดแบบแช่ยุ่ยด้วยเมทานอลและการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยสกัดด้วยเมทานอลให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ใกล้เคียงกัน คือ 42.63 36.65 และ 36.55 มิลลิกรัมเทียบเท่าคาเทชินต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ ดังภาพที่ 37



ภาพที่ 37 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบ
ด้วยวิธีการสกัดและตัวทำละลายต่าง ๆ

จากผลการศึกษาร้อยละของการสกัด ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์เปรียบเทียบกัน จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าจากวิธีต่าง ๆ มีความสอดคล้องกัน คือ ไม่ว่าจะใช้ทำการสกัดด้วยวิธีใด ตัวทำลายที่มีขั้วก็จะสามารถสกัดเอาสารสำคัญออกมาได้ปริมาณมากกว่าตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้วและการสกัดด้วยวิธีซอกห์เลตและรีฟลักซ์ก็ให้ร้อยละการสกัดและปริมาณสารที่สนใจปริมาณมากกว่าวิธีอื่น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Waksmundzka – Hajnos et al. (2007) รายงานว่าการสกัดแบบต่อเนื่องจะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยไมโครเวฟและคลื่นเสียงช่วยสกัด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้วิธีการสกัดแบบรีฟลักซ์เพราะเป็นวิธีการ

สกัดแบบต่อเนื่องและให้ปริมาณสารที่สนใจสูง ส่วนตัวทำละลายเลือกใช้เอทานอลเนื่องความเป็นพิษที่น้อยกว่าเมทานอลมาใช้ในการศึกษาต่อไป

จากนั้นนำสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าจากวิธีการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัดด้วยเอทานอลมาทำการศึกษาหาสารฟลาโวนอยด์รวม ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าจากเอทานอลด้วยวิธีการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด (n=3)

กำลังไฟฟ้า (วัตต์)	เวลา (วินาที)	มิลลิกรัมเทียบเท่าคาเทชินต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ				
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
550	30	4.63	4.75	4.69	4.69	0.06
	60	4.54	4.66	4.66	4.62	0.07
	120	5.55	5.54	5.59	5.56	0.02
	180	**6.27**	**6.20**	**6.04**	**6.17**	**0.12**
	300	5.89	5.81	5.93	5.87	0.06
700	30	4.92	5.02	4.81	4.92	0.10
	60	5.02	4.81	4.98	4.94	0.11
	120	**5.75**	**5.73**	**5.83**	**5.77**	**0.05**
	180	5.11	4.98	5.05	5.05	0.06
	300	3.78	3.83	3.73	3.78	0.05
900	30	3.82	3.88	3.86	3.85	0.03
	60	**5.34**	**5.41**	**5.08**	**5.27**	**0.18**
	120	4.46	4.52	4.63	4.54	0.09
	180	4.94	4.98	4.91	4.94	0.03
	300	4.83	4.88	4.89	4.87	0.03

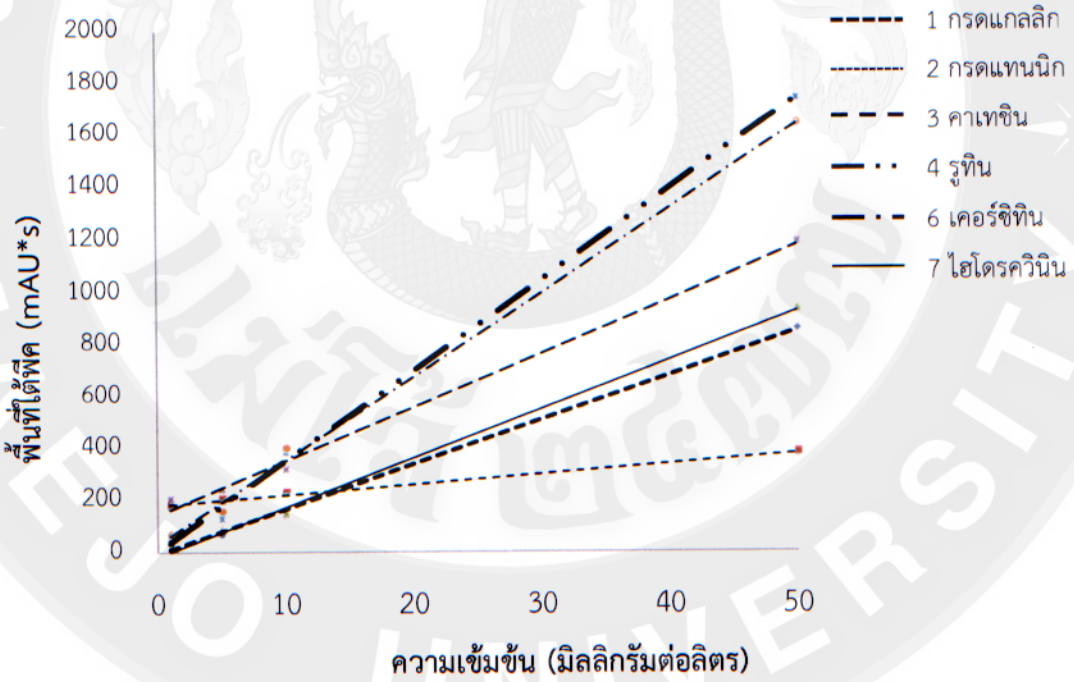
จากการทดสอบสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวแบบการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยด้วยเอทานอล พบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากที่สุด เมื่อใช้กำลังไฟฟ้า 550 วัตต์ เวลา 180 วินาที รองลงมาคือกำลังไฟฟ้า 700 วัตต์ เวลา 120 วินาที และเมื่อใช้กำลังไฟฟ้า 900 วัตต์ ระยะเวลา 60 วินาที คือ 6.17 5.77 และ 5.27 มิลลิกรัมเทียบเท่าคาเทชินต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ สามารถสรุปความสัมพันธ์ของกำลังไฟฟ้าที่ให้กับระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดได้ว่า เมื่อให้กำลังไฟต่ำแต่ใช้ระยะเวลาในการสกัดนานหรือหากให้กำลังไฟที่มากขึ้นแต่ใช้ระยะเวลาในการสกัดให้สั้นลงปริมาณสารฟลาโวนอยด์ก็จะสูงขึ้นเช่นเดียวกัน ผลการทดลองดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาหาปริมาณฟีนอลิกรวม ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยวิธีอื่น ๆ พบว่าสารทั้งสองกลุ่มมีปริมาณน้อยกว่าอย่างชัดเจน แสดงว่าการสกัดผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติด้วยเครื่องไมโครเวฟมีพารามิเตอร์ที่มีอิทธิพลต่อการทดลอง ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ ระดับคลื่นไมโครเวฟที่ใช้ และรวมไปถึงพื้นที่ผิวสัมผัสของตัวอย่าง เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Wang et al. (2010) และ Routray and Orsat (2012) ได้รายงานว่าการสกัดสารฟลาโวนอยด์ด้วยไมโครเวฟเป็นวิธีที่ใช้ปริมาณของตัวทำละลายน้อย ระยะเวลาสั้น ทำในระบบปิด แต่จะต้องมีการศึกษาพารามิเตอร์ที่มีอิทธิพลต่อการทดลองก่อนจึงจะได้สารออกฤทธิ์ปริมาณสูง

การศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากน้อยหน่าด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1. การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์และการสร้างกราฟมาตรฐาน

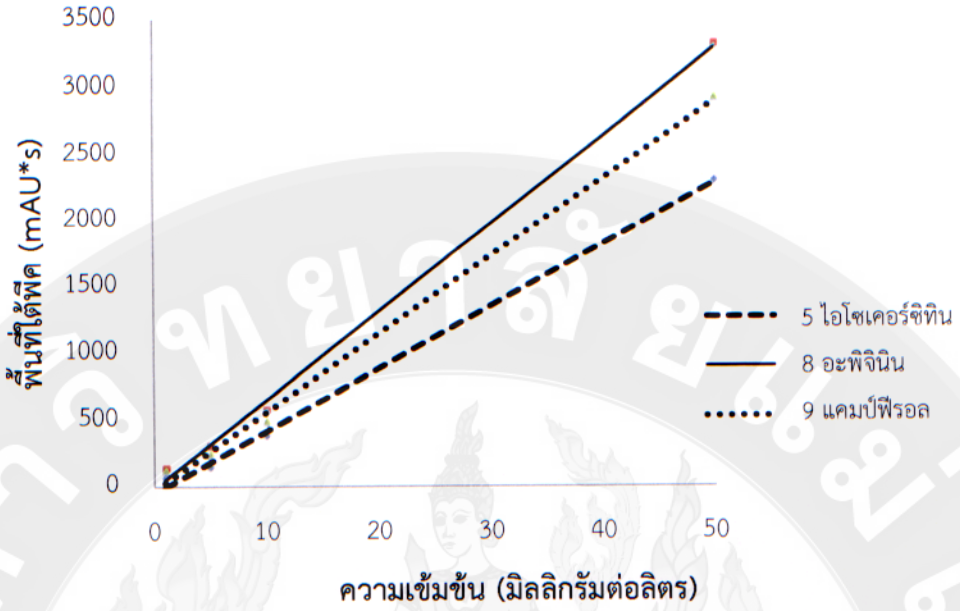
จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานฟีนอลิกรวมที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์ของ กรดแกลลิก กรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน ไฮโดรควินิน อะพิจินิน และแคมป์ฟีรอล โดยใช้ความเข้มข้นช่วง 1-50 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะที่ใช้ในการศึกษา คือ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ด้วยระบบแกรเดียนของเฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตรไนไตรล์และแอมโมเนียมฟอร์เมท บัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิดไดโอดแอเรย์ ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร พบว่ามีลำดับการแยกตามโครมาโทแกรม คือ 6.28 12.38 12.7 14.8 15.87 30.21 32.63 40.65 และ 41.97 นาที ตามลำดับ ดังภาพที่ 38

ภาพที่ 38 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานฟีนอลิกรวมความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์



(ก)

ภาพที่ 39 กราฟมาตรฐานฟีนอลิกรวมด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์ กรดแกลลิก กรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน เคอร์ซิทิน และไฮโดรควินิน (ก) และสารมาตรฐานไอโซเคอร์ซิทิน อะพิจินิน และแคมป์ฟีรอล (ข)



(ข)

ภาพที่ 39 (ต่อ)

จากนั้น สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้น ดังภาพที่ 39 (ก) กราฟมาตรฐานระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีค (mAU*s) และความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก กรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน เคอร์ซิทิน และไฮโดรควินิน และ ภาพที่ 39 (ข) กราฟมาตรฐานระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีค (mAU*s) และความเข้มข้นของสารมาตรฐานไอโซเคอร์ซิทิน อะพิจินิน และแคมป์ฟีรอล พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ (R^2) ของสารมาตรฐานทั้ง 9 ชนิดมีค่ามากกว่า 0.995 ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ลำดับ เวลาการแยก สมการเส้นตรงของกราฟ และค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ของสารมาตรฐานฟีนอลิกรวมด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์ (n=3)

ลำดับ	สารมาตรฐาน	เวลาการแยก (นาที)	สมการเส้นตรงของกราฟ	R^2 (n=3)
1	กรดแกลลิก	6.28	y = 17.20x - 8.30	0.9985
2	กรดแทนนิก	12.38	y = 4.00x + 177.10	0.9978
3	คาเทชิน	12.7	y = 20.70x + 141.00	0.9955
4	รูทิน	14.8	y = 34.70x - 0.20	0.9979
5	ไอโซเคอร์ซิทิน	15.87	y = 47.00x - 54.50	0.9977
6	เคอร์ซิทิน	30.21	y = 32.16x + 27.25	0.9957
7	ไฮโดรควินิน	32.63	y = 19.00x - 22.00	0.9981
8	อะพิจินิน	40.65	y = 66.00x - 16.00	0.9981
9	แคมป์ฟีรอล	41.97	y = 58.36x - 32.32	0.9974

2. การหาขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์ (Limit of detection, LOD)

จากการศึกษาหาค่าขีดต่ำสุดโดยการฉีดสารมาตรฐานของการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์ พบว่า ปริมาณต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าจากวิธีต่าง ๆ

ในการศึกษาใช้สารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวทำการสกัดแบบวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ โดยสภาวะที่ใช้ในการทดลองตามวิธีการทดสอบในบทที่ 3 พบว่า สารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวสกัดจากวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล ให้ปริมาณกรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน และไฮโดรค วินินปริมาณ 87.17±0.32 156.19±0.31 2209.30±1.71 118.23±0.25 และ 3435.02±54.86 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สภาวะที่ใช้ คือ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาทีด้วยระบบแกรเดียน ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตรไนไตรล์และแอมโมเนียมฟอร์เมท บัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 ความเข้มข้น 10 มิลลิโม

ลาร์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ ใช้ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร สามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกรวมได้อย่างเหมาะสม ดังนั้นจะใช้สภาวะดังกล่าวมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบ จากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวทำสกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายที่ดีที่สุดมาทำการศึกษาต่อ คือ วิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล วิธีซอกห์เลตด้วยเมทานอล วิธีสกัดโดยใช้ไมโครเวฟช่วยในการสกัดด้วยเอทานอล และวิธีการสกัดโดยใช้คลื่นความถี่สูงเป็นตัวช่วยสกัดด้วยเอทานอล ตรวจพบกรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน และไฮโดรควินินเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 16 โดยพบสารกลุ่มเคอร์ซิทินปริมาณมากที่สุดในสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าทุกสายพันธุ์ รองลงมาคือ รูทิน คาเทชิน ไอโซเคอร์ซิทิน กรดแทนนิก และไฮโดรควินิน ตามลำดับ

ตารางที่ 16 ปริมาณสารฟีนอลิกวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (N=3)

สารมาตรฐาน	ปริมาณสารฟีนอลิก (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ)			
	รีฟลักซ์ เอทานอล	ซอกห์เลต เมทานอล	คลื่นไมโครเวฟ เอทานอล	ความถี่สูงช่วยสกัด เอทานอล
กรดแกลลิก	ND	ND	ND	ND
กรดแทนนิก	87.17±0.32	28.39±0.28	19.95±0.09	43.77±0.97
คาเทชิน	156.19±0.31	157.35±8.19	109.10±1.68	38.05±1.07
รูทิน	2,209.30±1.71	509.22±9.65	162.35±3.42	626.88±9.19
ไอโซเคอร์ซิทิน	118.23±0.25	54.67±0.28	39.66±0.70	83.66±5.16
เคอร์ซิทิน	3,435.02±54.86	800.20±6.40	736.85±7.51	2,036.48±18.87
ไฮโดรควินิน	60.20±0.86	ND	ND	13.56±1.37
อะพิจินิน	ND	ND	ND	ND
แคมป์ฟีรอล	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND (Not detected) หมายถึง ตรวจไม่พบ

จากนั้นทำการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญทางเคมีในน้อยหน่าสายพันธุ์แตกต่างกัน คือ น้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว สายพันธุ์ฝ้ายครั่ง สายพันธุ์หนังเขียว และสายพันธุ์ออสเตรเลีย ทำการสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล พบว่าในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าทุกสายพันธุ์พบกรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน และไฮโดรควินินเหมือนกัน แต่ปริมาณแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 17 สารสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวพบสาร 6 ชนิด ได้แก่ เคอร์ซิทิน รูทิน คาเทชิน ไอโซเคอร์ซิทิน กรดแทนนิก และไฮโดรควินิน ตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายครั่ง หนังเขียว และออสเตรเลียพบสารเพียง 5 ชนิด คือเคอร์ซิทิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน คาเทชิน และกรดแทนนิก ตามลำดับ

ตารางที่ 17 ปริมาณสารฟีนอลิกวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล (N=3)

สารมาตรฐาน	ปริมาณสารฟีนอลิก (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ)			
	ฝ้ายเขียว *A. squamosa*	ฝ้ายครั่ง *A. squamosa*	หนังเขียว *A. cherimoya*	ออสเตรเลีย *A. atemoya*
กรดแกลลิก	ND	ND	ND	ND
กรดแทนนิก	87.17±0.32	51.31±0.19	54.66±2.10	123.78±0.16
คาเทชิน	156.19±0.31	136.18±0.14	145.76±2.31	107.36±1.84
รูทิน	2,209.30±1.71	1,257.68±5.46	672.99±20.10	814.35±42.46
ไอโซเคอร์ซิทิน	118.23±0.25	105.65±2.40	177.66±12.98	206.11±11.73
เคอร์ซิทิน	3,435.02±54.86	1,890.12±40.83	868.68±9.73	4,036.44±214.88
ไฮโดรควินิน	60.20±0.86	ND	ND	ND
อะพิจินิน	ND	ND	ND	ND
แคมป์ฟีรอล	ND	ND	ND	ND

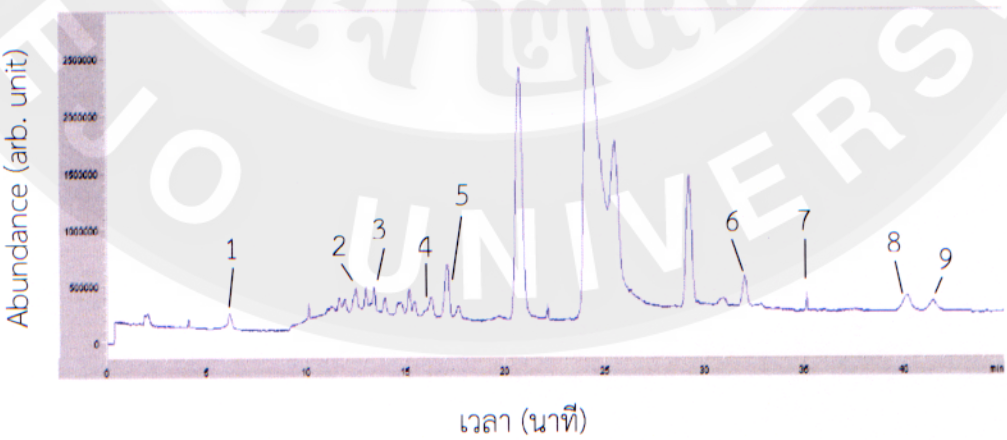
หมายเหตุ ND (Not detected) หมายถึง ตรวจไม่พบ

จากการศึกษาสภาวะและตัวทำละลายที่เหมาะสมในการใช้สกัดองค์ประกอบทางเคมีที่สนใจในตัวอย่างใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ใช้เป็นตัวอย่างทดสอบในงานวิจัยนี้จนได้สภาวะและตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยใช้ร้อยละการได้กลับคืน ปริมาณของสารฟีนอลิกรวมและปริมาณของสารฟลาโวนอยด์รวม ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีเป็นตัวชี้วัดแล้ว ยังคงต้องต้องมีการศึกษาด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์และแมสสเปกโทรมิเตอร์ เพื่อเป็นการยืนยันผลการวิเคราะห์ในงานวิจัยที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

การศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมทรี

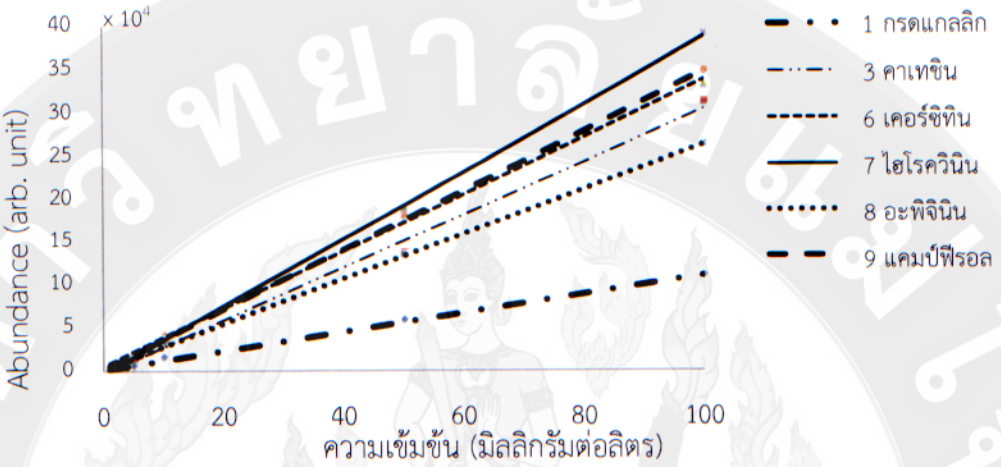
1. การสร้างกราฟมาตรฐาน

ในการศึกษาขั้นตอนนี้ใช้สารมาตรฐานทั้ง 9 ชนิดเหมือนกับการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้สารมาตรฐานความเข้มข้นช่วง 0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้สภาวะในการศึกษาส่วนของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ แต่ส่วนของแมสสเปกโทรมิเตอร์ใช้โหมด full scan ที่มวลต่อประจุช่วง 100-700 Nebulizer pressure เท่ากับ 60 psi ใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นตัวพาที่อัตราการไหลเท่ากับ 13 ลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 320 องศาเซลเซียส ตั้งค่า positive และ negative capillary voltage เท่ากับ 4,000 และ 3,000 V ตามลำดับ โดยตัวอย่างของโครมาโทแกรมไอออนรวมของสารมาตรฐานฟีนอลิกรวมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและแมสสเปกโทรเมทรี ดังภาพที่ 40

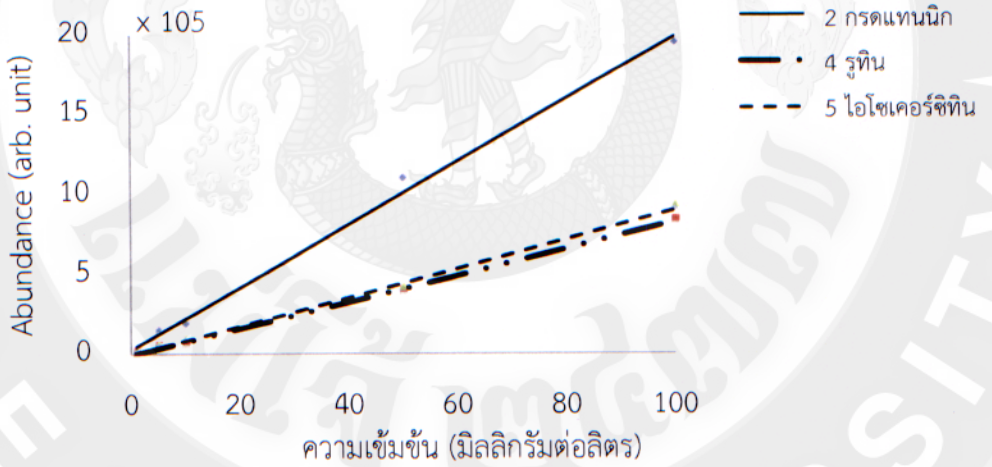


ภาพที่ 40 โครมาโทแกรมไอออนรวมของสารมาตรฐานฟีนอลิกรวมความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและแมสสเปกโทรเมทรี

โดยผลการทดสอบที่ได้เมื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟีนอลิกรวมทั้ง 9 ชนิด พบว่ามีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 41 (ก) และ (ข) ตามลำดับ



(ก)



(ข)

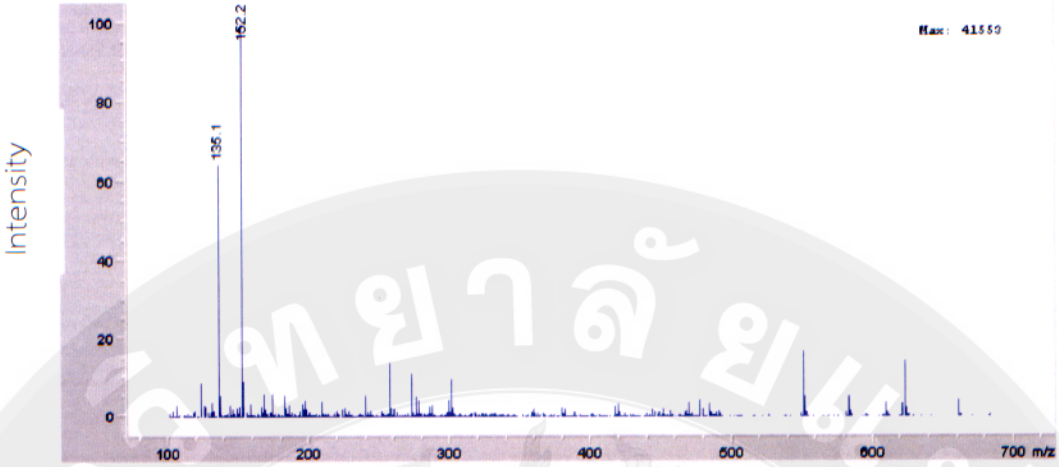
ภาพ 41 กราฟมาตรฐานฟีนอลิกรวมด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์แมสสเปกโทรมิเตอร์ ระหว่างสารมาตรฐานกรดแกลลิก คาเทชิน เคอร์ซิทิน ไฮโดรควินิน อะพิจินิน และแคมป์ฟีรอล (ก) และสารมาตรฐานกรดแทนนิก รูทิน และไอโซเคอร์ซิทิน (ข)

โดยลำดับการแยกในโครมาโทแกรมไอออนรวม คือ กรดแกลลิก กรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน ไฮโดรควินิน อะพิจินิน และแคมป์ฟีรอล เหมือนกับการวิเคราะห์ฟีนอลิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ ส่วนเวลาการแยก 6.4, 12.5, 13.0, 15.2, 16.3, 30.9, 33.2, 40.5 และ 41.4 นาที ตามลำดับ จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของสารมาตรฐานทั้ง 9 ชนิด พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ (R^2) ของสารมาตรฐานมากกว่า 0.995 ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 เวลาการแยก และค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ของสารมาตรฐานทั้ง 9 ชนิด ทำการวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์แมสสเปกโทรมิเตอร์ (n=3)

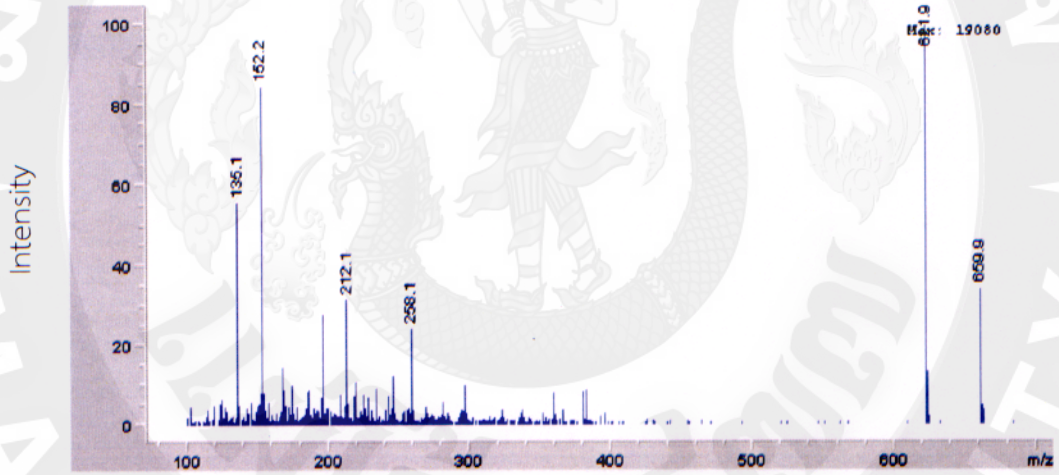
ลำดับ	สารมาตรฐาน	เวลาการแยก (นาที)	สมการเส้นตรงของกราฟ	R^2 (n=3)
1	กรดแกลลิก	6.4	y = 1,081.8x + 1,641.9	0.9986
2	กรดแทนนิก	12.5	y = 19,600.7x + 25,664.7	0.9957
3	คาเทชิน	13.0	y = 3,068.7x - 3,000.1	0.9953
4	รูทิน	15.2	y = 8,339.0x - 6,698.7	0.9992
5	ไอโซเคอร์ซิทิน	16.3	y = 9,062.6x - 8,396.1	0.9969
6	เคอร์ซิทิน	30.9	y = 3,326.3x + 5,696.1	0.9957
7	ไฮโดรควินิน	33.2	y = 3,901.1x - 2,553.6	0.9997
8	อะพิจินิน	40.5	y = 2,614.1x + 2,145.1	0.9999
9	แคมป์ฟีรอล	41.4	y = 3,454.4x + 2,121.4	0.9998

โดยแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานฟีนอลิกทั้ง 9 ชนิดจากโครมาโทแกรมไอออนรวม ได้แสดงไว้ในภาพที่ 42 (ก) – 42 (ฌ)



เวลา (นาที)

(ก)



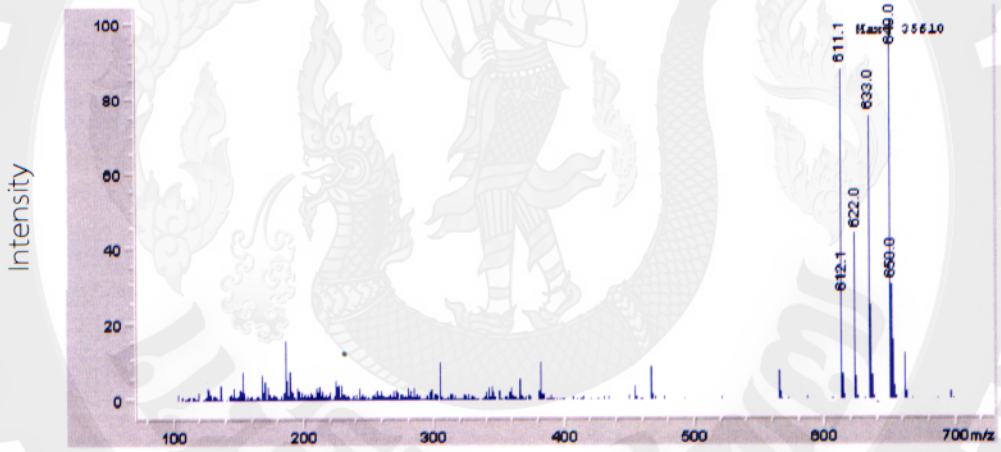
เวลา (นาที)

(ข)

ภาพที่ 42 แมสสเปกตรัมวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์และแมสสเปกโทรมิเตอร์ของสารมาตรฐาน กรดแกลลิก (ก) กรดแทนนิก (ข) คาเทชิน (ค) รูทิน (ง) ไอโซเคอร์ซิทิน (จ) เคอร์ซิทิน (ฉ) ไฮโดรควินิน (ช) อะพิจินิน (ซ) และแคมป์ฟีรอล (ฌ)

เวลา (นาที)

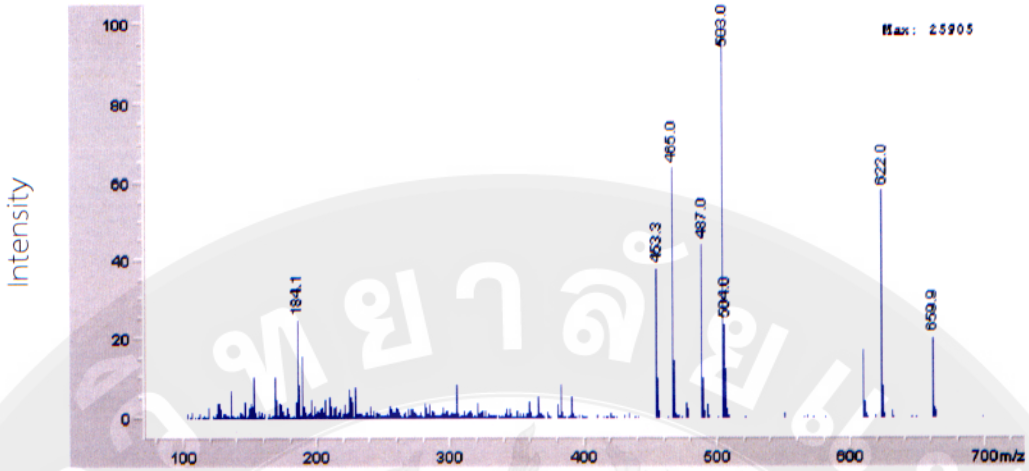
(ค)



เวลา (นาที)

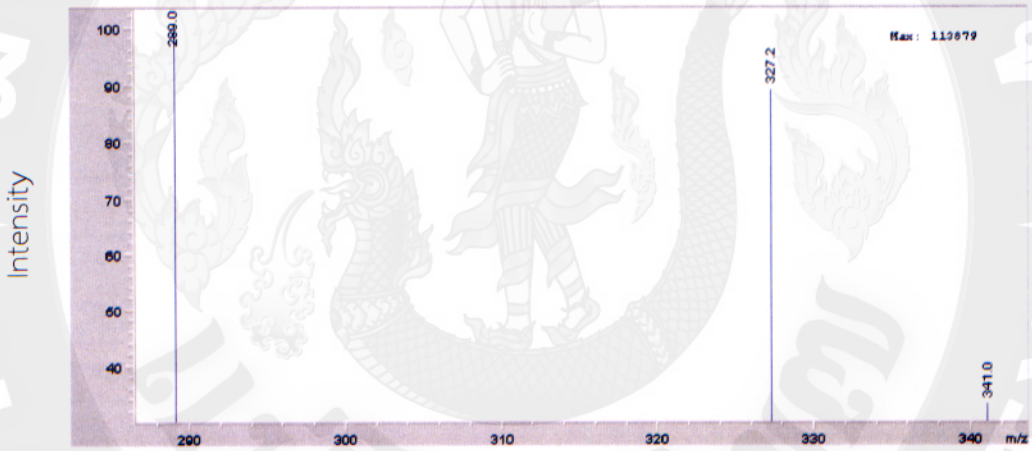
(ง)

ภาพที่ 42 (ต่อ)



เวลา (นาที)

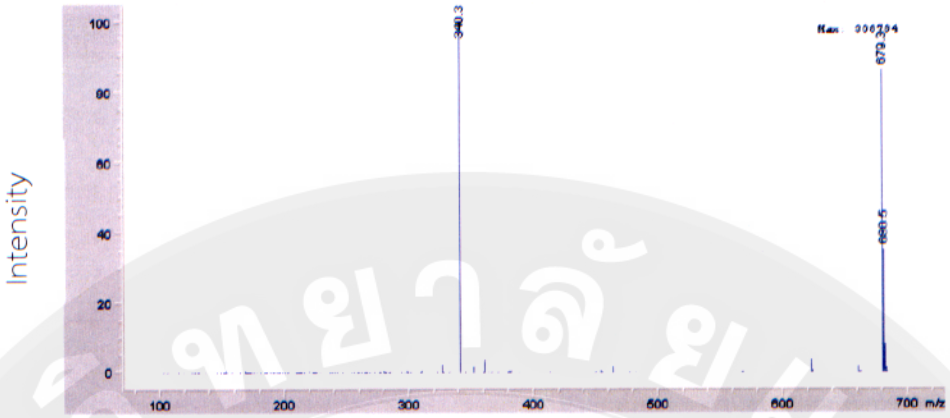
(จ)



เวลา (นาที)

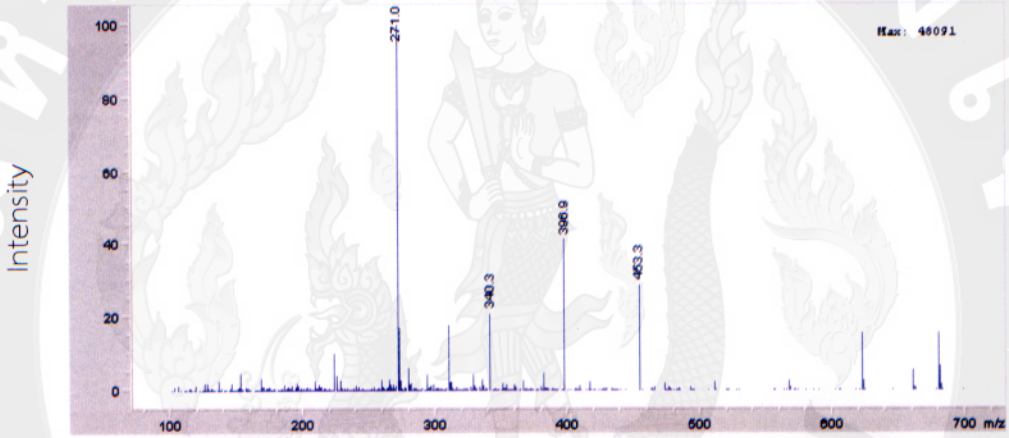
(ฉ)

ภาพที่ 42 (ต่อ)



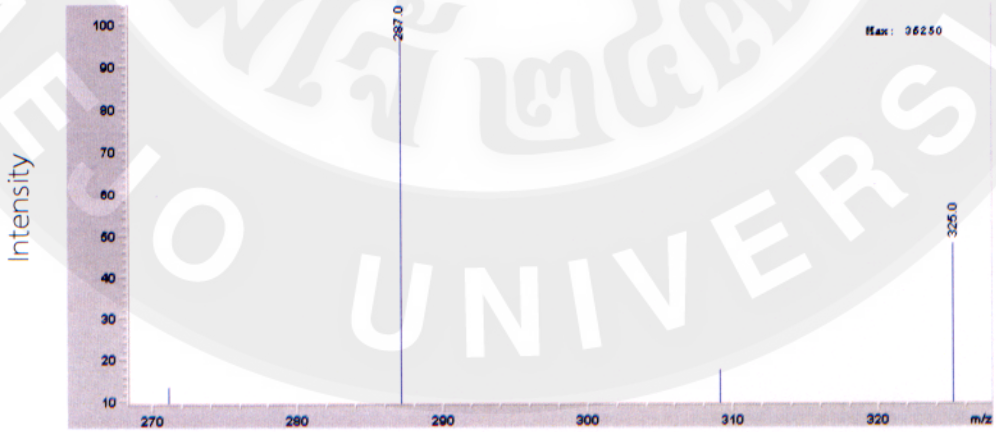
เวลา (นาที)

(ช)



เวลา (นาที)

(ซ)



เวลา (นาที)

(ฌ)

ภาพที่ 42 (ต่อ)

แฟรกเมนต์ไอออนที่แสดงเอกลักษณ์ของสารฟีนอลิกแต่ละชนิดจากแมสสเปกตรัมของสาร มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน ที่สำคัญแสดงค่ามวลต่อประจุ (ความอุดมสัมพัทธ์) ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ลักษณะเฉพาะมวลต่อประจุของสารมาตรฐานฟีนอลิกรวมแต่ละชนิดตามลำดับการแยกวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและแมสสเปกโทรเมทรี

ลำดับ	สารมาตรฐาน	เวลา (นาที)	มวลต่อประจุ (m/z)		สูตรโมเลกุล	มวลโมเลกุล (กรัมต่อโมล)
1	กรดแกลลิก	6.4	135(64)	152(100)	$C_7H_6O_5$	170.12
2	กรดแทนนิก	12.5	152(85)	622(100)	$C_{76}H_{52}O_{46}$	1,701.19
3	คาเทชิน	13.0	291(89)	329(100)	$C_{15}H_{14}O_6$	290.26
4	รูทิน	15.2	649(100)	-	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610.52
5	ไอโซเคอร์ซิทิน	16.3	503(100)	-	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.38
6	เคอร์ซิทิน	30.9	289(100)	327(89)	$C_{15}H_{10}O_7$	302.23
7	ไฮโดรควินิน	33.2	341(100)	-	$C_{20}H_{24}N_2O_2$	342.42
8	อะพิจินิน	40.5	271(100)	-	$C_{15}H_{10}O_5$	270.24
9	แคมป์ฟีรอล	41.4	287(100)	-	$C_{15}H_{10}O_6$	286.23

จากตารางที่ 19 พบว่า กรดแกลลิกมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 170 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 135 (64) และ 152 (100) ตามลำดับ กรดแทนนิกมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 1,701 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 152 (85) และ 622 (100) ตามลำดับ คาเทชินมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 290 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 291 (89) และ 329 (100) ตามลำดับ รูทินมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 610 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 649 (100) ไอโซเคอร์ซิทินมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 464 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 503 (100) เคอร์ซิทินมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 302 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 289 (100) และ 327 (89) ตามลำดับ ไฮโดรควินินมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 342 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 341 (100) อะพิจินินมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 270 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 271 (100) และแคมป์ฟีรอลมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 286 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 287 (100) โดยมวลต่อประจุของสารแต่ละชนิดที่พบ มีลักษณะ

เฉพาะที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้ในการยืนยันความเป็นเอกลักษณ์ของสารนั้น ๆ ได้ในการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของน้อยหน่าแต่ละสายพันธุ์ต่อไป

2. การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าจากวิธีต่าง ๆ ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์และแมสสเปกโทรเมทรี

จากการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในน้อยหน่าสายพันธุ์แตกต่างกันโดยจะใช้สภาวะการวิเคราะห์ดังกล่าวมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกของสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว สายพันธุ์ฝ้ายครั่ง สายพันธุ์หนังเขียว และสายพันธุ์ออสเตรเลีย ด้วยวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่สุดในงานวิจัย คือ วิธีรีฟลักซ์ด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่าเมื่อนำตัวอย่างใบน้อยหน่าทั้ง 4 สายพันธุ์มาทำการสกัดด้วยเอทานอลและนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรีในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าทุกสายพันธุ์พบกรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน และเคอร์ซิทินเหมือนกัน โดยมีมวลต่อประจุที่เป็นเอกลักษณ์ของแต่ละสาร คือ กรดแทนนิก พบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 152 (85) และ 622 (100) ตามลำดับ คาเทชิน พบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 291 (89) และ 329 (100) ตามลำดับ ส่วนรูทินพบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 649 (100) ไอโซเคอร์ซิทินพบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 503 (100) และเคอร์ซิทินพบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 289 (100) และ 327 (89) ตามลำดับ แต่ในน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวจะพบสารฟีนอลิกชนิดไฮโดรควินินเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งชนิด พบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 341 (100) ซึ่งผลการทดสอบทั้งหมดเป็นไปตามผลการทดสอบด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์มาแล้วนั้นจึงสามารถยืนยันผลการทดสอบได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่ารีฟลักซ์ด้วยเอทานอลจะให้ผลการทดสอบเป็นไปในทิศทางเดียวกันทุกครั้ง คือพบกรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน และเคอร์ซิทิน ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก โดยสารกลุ่มนี้เป็นสารประกอบที่มีหมู่ฟีนอลเป็นองค์ประกอบหลักและมีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบรวมอยู่ด้วย ซึ่งสารกลุ่มนี้ถูกจัดอยู่ในสารประกอบชนิดมีขั้ว จึงทำให้เอทานอลหรือตัวทำละลายชนิดมีขั้วสามารถสกัดเอาสารประกอบเหล่านี้ออกมาได้ ทราบได้โดยการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ และทำการยืนยันด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรีจากการเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานกับแมสสเปกตรัมของสารสกัดหยาบชนิดต่าง ๆ ซึ่งผลการทดสอบเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Khanam et al. (2015) ซึ่งพบว่าการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในน้อยหน่าด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบกรดคาเทชิน รูทิน และเคอร์ซิทิน ส่วน Garcia-Salas et al. (2015) ได้ศึกษาน้อยหน่าสายพันธุ์ *A. cherimoya* โดยใช้เทคนิค HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS อัตราการไหลเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้อุณหภูมิ

25 องศาเซลเซียส ด้วยระบบแกรเดียนใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5% และอะซิโตไนไทล์เป็นเฟสเคลื่อนที่ ฉีดตัวอย่าง 0.5 ไมโครลิตร ตั้งค่าตรวจวัดมวลประจุช่วง 50-1,200 ตั้งค่า negative และ positive mode capillary voltage เท่ากับ 4,000 และ 4,500 โวลต์ ตามลำดับ รายงานว่าพบสารประกอบฟีนอลิก กรดควินนิก รูทิน คาเทชิน อีพิคาเทชิน เคอร์ซิทิน และเฮสเพอร์ริดีน เป็นต้น

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป็นการทดสอบการเบื้องต้นโดยได้ทำการสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่สนใจด้วยวิธีการสกัดและเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในแต่ละวิธี เพื่อสกัดองค์ประกอบทางเคมีของใบน้อยหน่า จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ด้วยวิธี Mueller-Hinton agar โดยใช้ยาเจนตาไมซินความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นตัวควบคุม ส่วนสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ทำการสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล วิธีซอกห์เลตด้วยเมทานอล วิธีสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟด้วยเอทานอลและวิธีการสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้คลื่นความถี่สูงเป็นตัวช่วยในการสกัด โดยสารสกัดที่ใช้ในการวิเคราะห์มีความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หยดลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกเจาะขนาด 1.00 เซนติเมตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบด้วยการใช้ไม้บรรทัดวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสจากขอบซ้ายถึงขวาและขอบบนถึงล่าง คำนวณหาค่าเฉลี่ยระหว่างวง พบว่า สารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ทำการสกัดด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละวิธีสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้เพียงชนิดเดียว คือ เชื้อ *B. cereus* โดยสารสกัดหยาบจากวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอลมีการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้มากที่สุด รองลงมาคือวิธีซอกห์เลตด้วยเมทานอล ส่วนวิธีสกัดโดยใช้ไมโครเวฟและความถี่สูงช่วยในการสกัดให้ผลการทดสอบที่เหมือนกัน คือ 2.10, 1.75, 1.54 และ 1.54 เซนติเมตร ตามลำดับ และในการทดสอบได้มีการควบคุมการทดลองด้วยยาเจนตามัยซินความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตรเช่นกัน พบว่ายาเจนตามัยซินชุดควบคุมเกิดวงการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ขนาด 3.00 เซนติเมตร ดังภาพที่ 43 และสรุปผลการวิเคราะห์การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ในสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ทำการสกัดด้วยวิธีและใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 20

ภาพที่ 43 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว ที่ทำการสกัดด้วยวิธีเมทานอลซอกห์เลต และเอทานอลรีฟลักซ์ ทดสอบในเชื้อ *B. cereus* (ก), *E.* coli (ข) *P. aeruginosa* (ค) และ *S. aureus* (ง)

ตารางที่ 20 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อจุลินทรีย์ *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ในสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ทำการสกัดด้วยวิธีและใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

เชื้อจุลินทรีย์	ขนาดของวงการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (เซนติเมตร)				
	control	รีฟลักซ์	ซอกห์เลต	คลื่นไมโครเวฟ	ความถี่สูงช่วยสกัด
	gentamicin*	เอทานอล**	เมทานอล**	เอทานอล**	เอทานอล**
B. cereus	3.00	2.1	1.75	1.54	1.54
E. coli	3.00	-	-	-	-
P. aeruginosa	3.00	-	-	-	-
S. aureus	3.00	-	-	-	-

หมายเหตุ * ยาเจนตาไมซิน ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

** ตัวอย่างสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดสอบทุกตัว ใช้ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- หมายถึง ไม่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว สายพันธุ์ฝ้ายครั่ง สายพันธุ์หนังเขียว และสายพันธุ์ออสเตรเลียที่สกัดจากวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอลมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง พบว่าสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* เช่นเดียวกัน โดยสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ออสเตรเลียเป็นสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้มากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวและฝ้ายครั่งให้ผลการทดสอบเหมือนกัน และสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์หนังเขียวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดดังกล่าวได้น้อยที่สุด ดังตารางที่ 21

จากการทดสอบข้างต้นทำให้ทราบว่าสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้เพียงชนิดเดียวคือ *B. cereus* ดังนั้นจึงใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดดังกล่าวในการศึกษาหาค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อต่อไป

ตารางที่ 21 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อจุลินทรีย์ *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ในสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์แตกต่างกัน

เชื้อจุลินทรีย์	ขนาดของวงการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (เซนติเมตร)				
	control*	ฝ้ายเขียว**	ฝ้ายครั่ง**	หนังเขียว**	ออสเตรเลีย**
	gentamicin	*A. squamosa*	*A. squamosa*	*A. cherimoya*	*A. atemoya*
B. cereus	3.00	2.10	2.10	2.00	2.15
E. coli	3.00	-	-	-	-
P. aeruginosa	3.00	-	-	-	-
S. aureus	3.00	-	-	-	-

หมายเหตุ * ยาเจนตาไมซิน ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

** ตัวอย่างสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดสอบทุกตัว ใช้ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

\- หมายถึง ไม่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ด้วยวิธี broth dilution technique

จากทำการทดลองฤทธิ์ยับยั้งของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวมีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวคือ *B. cereus* จึงเลือกใช้ทำการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

จากการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *B. cereus* ของสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ทำการสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล วิธีซอกห์เลตด้วยเมทานอล วิธีสกัดโดยใช้ไมโครเวฟและใช้คลื่นความถี่สูงเป็นตัวช่วยสกัดด้วยเอทานอล ใช้สารสกัดหยาบความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร โดยทำการเจือจางความเข้มข้นให้ลดลงทีละครึ่งหนึ่งในทุก ๆ หลอดการทดลองเป็นจำนวน 5 หลอด พบว่าสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ทำการสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันด้วยสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองนี้ ให้ผลการทดสอบที่เหมือนกัน คือ มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่การเจือจางในหลอดที่ 3 ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 22 ส่วนตัวยาเจนตามัยซินที่ใช้เป็นชุด

ควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 75 ไมโครกรัมกรัมต่อมิลลิตร พบว่ามีการยับยั้งที่การเจือจางหลอดสุดท้าย ความเข้นข้นเท่ากับ 2.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 22 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *B. cereus* ของสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ทำการสกัดด้วยวิธีและใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

วิธีสกัด	ตัวทำละลายที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ต่ำสุด (มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร)
รีฟลักซ์	เอทานอล	125
ซอกห์เลต	เมทานอล	125
ไมโครเวฟช่วยสกัด	เอทานอล	125
ความถี่สูงช่วยสกัด	เอทานอล	125

นำสารสกัดหยาบด้วยวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอลของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว สายพันธุ์ฝ้ายครั่ง สายพันธุ์หนังเขียว และสายพันธุ์ออสเตรเลีย ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *B. cereus* พบว่าสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าทุกสายพันธุ์ให้ผลการทดสอบที่เหมือนกัน คือ มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่การเจือจางในหลอดที่ 3 ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 23 ส่วนชุดควบคุมความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร พบการยับยั้งที่การเจือจางหลอดสุดท้ายที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการทดสอบเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือสารสกัดหยาบจากการทดลองทุกสภาวะให้ผลการทดสอบเหมือนกัน ดังนั้นอาจต้องทำการสกัดสารสกัดให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นเพื่อให้เกิดการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีมากขึ้นเช่นกัน ซึ่งผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Dholvitayakhun et al. (2012) พบว่าผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดบริสุทธิ์จากน้อยหน่าสายพันธุ์ *A. squamosa* มาทดสอบกับเชื้อ *B. cereus* และให้ผลการทดสอบยับยั้งได้เช่นกันและหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 23 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *B. cereus* ในสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์แตกต่างกัน

ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ปริมาณที่ใช้ต่ำสุด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ฝ้ายเขียว	*A. squamosa*	125
ฝ้ายครั่ง	*A. squamosa*	125
หนังเขียว	*A. cherimoya*	125
ออสเตรเลีย	*A. atemoya*	125

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. ใบน้อยหน่าที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ใช้ใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวและหนังเขียวจากอำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ ส่วนใบน้อยหน่าสายพันธุ์หนังทองและหนังครั่งจากอำเภอดอยหล่อ จังหวัดเชียงใหม่ เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกรกฎาคม-เดือนพฤศจิกายน 2556 หลังจากทำการคัดแยกใบที่เสียและแห้งหรือไม่เหมาะสมออกและนำไปทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด เช็ดหรือผึ่งให้แห้งแล้วจึงนำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นตัวอย่าง เก็บใส่ถุงซิปใส และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการรักษาสภาพตัวอย่างให้เหมาะสมและสามารถนำมาใช้ได้ตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัย

2. การศึกษาหาวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสม

ในการวิจัยนี้จะใช้ใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวเป็นตัวแทนในการศึกษาทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบการแช่ยุ่ย ซอกห์เลต รีฟลักซ์ การใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัด และใช้ไมโครเวฟช่วยในการสกัด ด้วยตัวทำละลาย 6 ชนิดได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณร้อยละของการสกัด สารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าที่ได้มีลักษณะสีเขียวเข้ม ซึ่งเป็นสีของรงควัตถุที่สำคัญในใบน้อยหน่า และเมื่อนำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาร้อยละของสารสกัดต่อไป โดยสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าที่ได้มีลักษณะเหนียว มีสีเขียวเข้มปนน้ำตาลอ่อน

ผลการศึกษาการสกัดใบน้อยหน่าด้วยวิธีแช่ยุ่ยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าจากเมทานอลและเอทานอลให้ปริมาณร้อยละของการสกัดมากที่สุดคือ 4.31 และ 4.27 ตามลำดับ ซึ่งตัวทำละลายกลุ่มนี้เป็นชนิดที่มีขั้ว ส่วนตัวทำละลายที่เหลือ อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ให้ปริมาณร้อยละของการสกัดอยู่ในช่วง 0.62-0.80 แสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยตัวทำละลายที่มีขั้วสามารถสกัดสารจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวได้ดีกว่าตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ยกเว้นน้ำที่เป็นตัวทำละลายชนิดมีขั้วสูงเช่นกันแต่สามารถสกัดได้ร้อยละของการสกัดเพียง 1.43 เท่านั้น

ส่วนผลการศึกษาการสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยวิธีการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมงเป็นการสกัดที่คล้ายคลึงกับการสกัดแบบแช่ยุ่ยแต่มีการให้คลื่นความถี่สูงเข้าไปช่วยให้กระบวนการสกัดดีขึ้น พบว่า ตัวทำละลายกลุ่มที่มีขั้วให้ปริมาณร้อยละของการสกัดมากที่สุดคือเอทานอล และ เมทานอล ให้ร้อยละการสกัดเท่ากับ 3.98 และ 2.14 ส่วนตัวทำละลายที่เหลือ น้ำ อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ให้ปริมาณร้อยละของการสกัดอยู่ในช่วง 0.81-1.05 เท่านั้น

และผลการศึกษาการสกัดใบน้อยหน่าด้วยวิธีซอกห์เลตเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลให้ปริมาณร้อยละของการสกัดมากสุดคือ 3.57 และ 3.03 ส่วนน้ำ อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ให้ปริมาณร้อยละของการสกัดอยู่ในช่วง 0.8-1.25 ซึ่งในการสกัดด้วยวิธีซอกห์เลตเป็นการสกัดแบบกึ่งต่อเนื่องโดยใช้ความร้อนเป็นตัวช่วยในการสกัด ส่วนผลการศึกษาการสกัดใบน้อยหน่าด้วยวิธีรีฟลักซ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่ให้ร้อยละของสารสกัดมากที่สุดในการศึกษา โดยเอทานอลและเมทานอลให้ปริมาณร้อยละของการสกัดที่ 6.15 และ 5.00 ตามลำดับ ส่วนน้ำ อะซิโตน เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ให้ร้อยละของสารสกัดอยู่ในช่วง 1.37-2.99 เนื่องจากการสกัดด้วยวิธีนี้เป็นการสกัดแบบต่อเนื่อง ซึ่งตัวอย่างที่ถูกแช่อยู่ในตัวทำละลายและสัมผัสกับความร้อนที่ให้ในระหว่างกระบวนการสกัดโดยตรงจึงทำให้วิธีนี้เป็นวิธีที่ได้ร้อยละของการสกัดมากที่สุด โดยเลือกใช้ตัวทำละลายชนิดมีขั้ว ยกเว้นน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีจุดเดือดสูงถึง 100 องศาเซลเซียส จึงอาจทำให้ใช้ระยะเวลานานที่สุดในการเดือดและระเหยกลายเป็นไอขึ้นไป เพื่อควบแน่นกลับลงมาสกัดตัวอย่างอีกครั้งจึงทำให้ได้ร้อยละของการสกัดที่น้อยลง

จากการทดลองการสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยวิธีต่างๆ โดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 6 ชนิด พบว่า ปริมาณร้อยละของการสกัดที่ได้ในแต่ละวิธี สามารถบอกได้ว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมกับการสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวคือ ตัวทำละลายชนิดมีขั้ว เนื่องจากให้ปริมาณร้อยละของสารสกัดที่มากกว่าตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้ว ยกเว้นน้ำที่เป็นตัวทำละลายชนิดมีขั้ว แต่กลับให้ร้อยละของการสกัดน้อย ซึ่งอาจเกิดตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลในการทดลอง ตัวอย่างเช่น ระยะเวลาในการสกัด อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบที่ไม่เหมาะสมกับคุณสมบัติของตัวทำละลาย จึงทำให้น้ำสกัดสารสกัดในใบน้อยหน่าได้น้อยกว่าตัวทำละลายตัวอื่น ๆ ที่มีจุดเดือดต่ำกว่า ดังนั้นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการทดลองนี้คือเมทานอลและเอทานอล แต่เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของตัวทำละลายทั้งสองชนิดนี้แล้ว ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่องบัญชีวัตถุอันตราย กลุ่ม 4.1 ประเภท 1 และ 4 พบว่าตัวทำละลายเมทานอลมีความเป็นพิษมากกว่าเอทานอลมาก ซึ่งสารสกัดที่ได้อาจมีการนำไปพัฒนาต่อเพื่อนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ได้จริง ดังนั้นในการทดลองต่อจากนี้จึงเลือกใช้ เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการศึกษาต่อไป

ผลการศึกษาการสกัดใบน้อยหน่าด้วยเอทานอลและใช้ไมโครเวฟช่วยในการสกัด เป็นเวลา 30, 60, 120, 150 และ 300 วินาที พบว่า เมื่อใช้กำลังไฟ 550 วัตต์เป็นเวลา 300 วินาทีให้ปริมาณร้อยละของการสกัดมากที่สุดคือ 2.02 เมื่อใช้กำลังไฟ 700 วัตต์เป็นเวลา 120 วินาทีให้ปริมาณร้อยละของการสกัดมากที่สุดคือ 1.97 และเมื่อใช้กำลังไฟ 900 วัตต์ที่เวลา 300 วินาทีให้ปริมาณร้อยละของการสกัดมากที่สุดคือ 3.18 จากผลการทดลองข้างต้น พบว่า เมื่อให้กำลังไฟเพิ่มมากขึ้น ปริมาณร้อยละของสารสกัดที่ได้ก็จะเพิ่มขึ้นตาม แต่หากให้กำลังไฟที่มากเกินไปคลื่นไมโครเวฟจะทำให้โมเลกุลของตัวอย่างเกิดการเคลื่อนไหวอย่างรุนแรง และทำให้มีความร้อนเกิดขึ้นอย่างฉับพลันจนทำให้เกิด

แรงดันภายในขวดมาก อาจเกิดการระเบิดขึ้นได้ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาต่อไปคือ กำลังไฟ 700 วัตต์ และใช้เวลา 120 วินาที

3. การวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธีโฟลิน-ไซโอแคลทู

การศึกษาหาวิธีและตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วจะทำให้ได้สารสกัดหยาบที่มีองค์ประกอบที่สำคัญทางเคมีของน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวมาก จึงนำมาศึกษาหาปริมาณฟีนอลิกด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโคปีด้วยวิธีโฟลิน-ไซโอแคลทู โดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเป็นสารเทียบเท่า โดยใช้กรดแกลลิกความเข้มข้นช่วง 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาหาค่าความเป็นเส้นตรงของวิธีทดสอบ พบว่ามีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ของสารมาตรฐานมากกว่า 0.995 ดังนั้นจึงสามารถใช้วิธีนี้ในการวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างที่ทำการเจือจางให้เหมาะสมทำปฏิกิริยากับสารละลายวิธีโฟลิน-ไซโอแคลทู และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต โดยอาศัยหลักการของการเกิดปฏิกิริยารีดักชันและและออกซิเดชัน โดยสารฟีนอลิกจะทำปฏิกิริยากับ phosphomolybdic-phosphotungstic acid เกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงิน ที่สามารถดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร พบว่า ปริมาณฟีนอลิกรวมในตัวอย่างสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าที่ทำการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ มีความสอดคล้องกับปริมาณร้อยละของสารสกัด คือ ตัวทำละลายที่มีขั้วสามารถสกัดเอาสารสำคัญจากใบน้อยหน่าออกมาได้ปริมาณมากกว่าตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้ว โดยการสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์ด้วยเมทานอลและเอทานอลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุดคือ 748.00 และ 575.84 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ รองลงมาคือการสกัดด้วยวิธีซอกห์เลต แช่ยุ่ย และการสกัดด้วยวิธีใช้คลื่นความถี่สูงช่วยสกัด ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมอยู่ในช่วง 339.21-543.02 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ

และเมื่อทำการสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวโดยวิธีการใช้ไมโครเวฟช่วยในการสกัดด้วยเอทานอล พบว่า ที่กำลังไฟฟ้า 550 วัตต์ เวลาที่เหมาะสมที่สุดคือ 300 วินาที ถ้าใช้กำลังไฟฟ้า 700 วัตต์เวลาที่เหมาะสมที่สุด 120 วินาที และกำลังไฟฟ้า 900 วัตต์ใช้ระยะเวลา 30 วินาทีที่ทำให้ปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุดคือ 31.81, 34.04 และ 32.81 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิก ต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ จากผลการศึกษาข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าเมื่อให้กำลังไฟฟ้าต่ำแต่ใช้ระยะเวลาที่นานขึ้นอย่างเหมาะสม หรือการให้กำลังไฟฟ้าสูงอาจต้องใช้ระยะเวลาให้น้อยลง จึงจะทำให้ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากได้เช่นกัน

4. การวิเคราะห์หาสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธีอะลูมิเนียมคลอไรด์คัลเลอริเมตริก

หลังจากการศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธีโฟลิน-ไซโอแคลทูแล้วนำสารสกัดหยาบที่เหลือมาทำการศึกษาหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธีอะลูมิเนียมคลอไรด์คัลเลอริเมตริกต่อ โดยสารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์คือคาเทชิน ที่มีความเข้มข้นช่วง 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง พบว่าการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธีอะลูมิเนียมคลอไรด์คัลเลอริเมตริกมีค่าความเป็นเส้นตรงของวิธีอยู่ในช่วง 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ของสารมาตรฐานมากกว่า 0.995 ทำการศึกษาโดยใช้สารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวทำปฏิกิริยากับสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์และสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตท โดยอาศัยหลักการของการเกิดปฏิกิริยารีดักชันและออกซิเดชัน โดยสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์จะทำปฏิกิริยากับอะลูมิเนียมคลอไรด์ โดยถูกรีดิวซ์จากไฮดรอกซิล เกิดเป็นสารกลุ่มออโธไดไฮดรอกซิลซึ่งมีสีชมพูและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวจากวิธีรีฟลักซ์ด้วยเมทานอลและเอทานอล ให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 44.98 และ 43.54 มิลลิกรัมเทียบเท่าคาเทชินต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากวิธีซอกห์เลตด้วยเมทานอล และการสกัดแบบแช่ยุ่ยด้วยเมทานอลและการใช้คลื่นความถี่สูงช่วยในการสกัดด้วยเมทานอลให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ใกล้เคียงกัน คือ 42.63, 36.65 และ 36.55 มิลลิกรัมเทียบเท่าคาเทชินต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีความสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณร้อยละของสารสกัด คือไม่ว่าจะใช้ทำการสกัดด้วยวิธีใด ตัวทำลายที่มีขั้วก็จะสามารถสกัดเอาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญออกมาได้ปริมาณมากกว่าตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้ว โดยเฉพาะเมทานอลและเอทานอล

และเมื่อนำสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยเอทานอลโดยใช้ไมโครเวฟช่วยในการสกัดพบว่า เมื่อใช้กำลังไฟฟ้า 550 วัตต์ เป็นเวลา 180 วินาที รองลงมาคือกำลังไฟฟ้า 700 วัตต์ เวลา 120 วินาที และเมื่อใช้กำลังไฟฟ้า 900 วัตต์ ระยะเวลา 60 วินาที คือ 6.17, 5.77 และ 5.27 มิลลิกรัมเทียบเท่าคาเทชินต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ สามารถสรุปความสัมพันธ์ของกำลังไฟฟ้าที่ให้กับระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดได้ว่า เมื่อให้กำลังไฟต่ำแต่ใช้ระยะเวลาในการสกัดนานหรือหากให้กำลังไฟที่มากขึ้นแต่ใช้ระยะเวลาในการสกัดให้สั้นลงปริมาณสารฟลาโวนอยด์ก็จะสูงขึ้นเช่นเดียวกับผลการทดลองการศึกษาหาปริมาณฟีนอลิกรวม แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยวิธีอื่น ๆ พบว่าสารสกัดด้วยวิธีนี้ให้ปริมาณสาระสำคัญน้อยกว่าวิธีการสกัดอื่น ๆ อย่างชัดเจน แสดงว่าการสกัดผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติด้วยเครื่องไมโครเวฟมีพารามิเตอร์ที่มีอิทธิพลต่อการทดลอง ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ ระดับคลื่นไมโครเวฟที่ใช้ และรวมไปถึงพื้นที่ผิวสัมผัสของตัวอย่าง เป็นต้น

5. การศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากน้อยหน่าด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ศึกษาการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในใบน้อยหน่าโดยใช้สารมาตราฐานฟีนอลิกรวม 9 ชนิด คือ กรดแกลลิก กรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน ไฮโดรควินิน อะพิจินิน และแคมป์ฟีรอล ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 1, 5, 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สภาวะที่ใช้ในการศึกษา คือ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ด้วยระบบแกรเดียนของเฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตรไนไตรล์และแอมโมเนียมฟอร์เมท บัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิดไดโอดแอเรย์ ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร พบว่ามีลำดับการแยกตามโครมาโทแกรม คือ 6.28, 12.38, 12.7, 14.8, 15.87, 30.21, 32.63, 40.65 และ 41.97 นาที ตามลำดับ มีค่าความเป็นเส้นตรงช่วง 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ของสารมาตรฐานทั้ง 9 ชนิดมีค่ามากกว่า 0.995

จากนั้นทำการศึกษาหาค่าขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์ พบว่าปริมาณต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ เท่ากับ 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงสรุปได้ว่าวิธีการวิเคราะห์นี้เหมาะสมสำหรับนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในใบน้อยหน่าได้ เพื่อใช้ในงานวิจัยต่อไป

โดยทำการศึกษาสารสกัดหยาบจากสภาวะที่คัดเลือกในแต่ละวิธีการวิเคราะห์คือ วิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล วิธีซอกห์เลตด้วยเมทานอล วิธีสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟช่วยสกัดด้วยเอทานอล วิธีการสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้คลื่นความถี่สูงช่วยสกัด พบว่าสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวจากวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล พบกรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน และไฮโดรควินิน มีปริมาณ 87.17±0.32, 156.19±0.31, 2209.30±1.71, 118.23±0.25 และ 3435.02±54.86 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ข้างต้นแสดงให้เห็นว่า วิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยสภาวะที่ใช้ในการทดลองสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกรวมได้อย่างเหมาะสม ดังนั้นจะใช้สภาวะดังกล่าวมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการสกัดแต่ละวิธีและเลือกตัวทำละลายที่ดีที่สุดในแต่ละวิธี การสกัดมาทำการศึกษาต่อ คือ วิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล วิธีซอกห์เลตด้วยเมทานอล วิธีสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟช่วยสกัดด้วยเอทานอล วิธีการสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้คลื่นความถี่สูงช่วยสกัด พบว่าสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ทำการสกัดด้วยวิธีที่ต่างกันและตัวทำละลายที่ต่างกันอย่างเหมาะสมพบสารกรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน และไฮโดรควินิน เช่นกัน

จากนั้นจะทำการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในน้อยหน่าสายพันธุ์แตกต่างกันคือ น้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว สายพันธุ์ฝ้ายครั่ง สายพันธุ์หนังเขียว และสายพันธุ์ออสเตรเลีย ทำการสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล พบว่า ในสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าทุกสายพันธุ์ มีกรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน และเคอร์ซิทินเป็นองค์ประกอบ โดยพบสารเคอร์ซิทินปริมาณมากสุดในสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ออสเตรเลียและฝ้ายเขียว คือ 4,036 และ 3,435 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ รองลงมาคือรูทินในสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวและฝ้ายครั่ง ให้ปริมาณ 2,209 และ 1,257 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบจากน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวยังพบไฮโดรควินินปริมาณ 60 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบอีกด้วย ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรีเพื่อเป็นการยืนยันผลการวิเคราะห์ในงานวิจัยที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

6. การศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี

ทำการศึกษาโยใช้สารมาตรฐานและสภาวะเดียวกันกับการศึกษาด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์และมีการต่อพ่วงกับอุปกรณ์แมสสเปกโทรมิเตอร์ โดยใช้สภาวะของแมสสเปกโทรมิเตอร์คือ ใช้โหมด full scan ที่มวลต่อประจุช่วง 100-700 Nebulizer pressure เท่ากับ 60 psi ใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นตัวพาที่อัตราการไหลเท่ากับ 13 ลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 320 องศาเซลเซียส ตั้งค่า positive และ negative capillary voltage เท่ากับ 4,000 และ 3,000 V ตามลำดับ และใช้โหมด API-ESI พบว่า ในการวิเคราะห์สารมาตรฐานฟีนอลิกรวมของ กรดแกลลิก กรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน ไฮโดรควินิน อะพิจินิน และแคมป์ฟีรอล มีลำดับการแยกตามโครมาโทแกรมคล้ายกันกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง คือ 6.4, 12.5, 13.0, 15.2, 16.3, 30.9, 33.2, 40.5 และ 41.4 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของสารมาตรฐานทั้ง 9 ชนิด พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ของสารมาตรฐานผสมมีค่ามากกว่า 0.995

โดยแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานฟีนอลิกแต่ละชนิดที่พบจากโครมาโทแกรมไอออนรวมก็มีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันออกไป ได้แก่ กรดแกลลิกมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 170 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุ 135 (64) และ 152 (100) ตามลำดับ กรดแทนนิกมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 1,701 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุ 152 (85) และ 622 (100) ตามลำดับ คาเทชินมีมวลโมเลกุล 290 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุ 291 (89) และ 329 (100) ตามลำดับ รูทินมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 610 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุ 649 (100) ไอโซเคอร์ซิทินมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 464 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุ 503 (100) เคอร์ซิทินมีมวลโมเลกุล 302 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุ 289 (100) และ 327 (89) ตามลำดับ ไฮโดรควินินมีมวล

โมเลกุลเท่ากับ 342 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุ 341 (100) อะพิจินินมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 270 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุ 271 (100) และแคมป์ฟีรอลมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 286 กรัมต่อโมล พบไอออนที่มีมวลต่อประจุ 287 (100) โดยมวลต่อประจุของสารแต่ละชนิดที่พบมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้ในการยืนยันความเป็นเอกลักษณ์ของสารนั้น ๆ ได้ในการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของน้อยหน่าแต่ละสายพันธุ์ต่อไป

โดยการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในใบน้อยหน่าสายพันธุ์แตกต่างกันคือ สายพันธุ์ฝ้ายเขียว สายพันธุ์ฝ้ายครั่ง สายพันธุ์หนังเขียว และสายพันธุ์ออสเตรเลีย ด้วยวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่สุดในงานวิจัย คือ วิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล นำสารสกัดหยาบจากตัวอย่างใบน้อยหน่าทั้ง 4 สายพันธุ์มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรีในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าทุก ๆ สายพันธุ์พบกรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน และเคอร์ซิทินเหมือนกัน โดยมีมวลต่อประจุที่เป็นเอกลักษณ์ของแต่ละสาร คือ กรดแทนนิก พบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 152 (85) และ 622 (100) ตามลำดับ คาเทชินมีพบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 291 (89) และ 329 (100) ตามลำดับ ส่วนรูทินพบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 649 (100) ไอโซเคอร์ซิทินพบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 503 (100) เคอร์ซิทินพบไอออนที่มีมวลต่อประจุที่ 289 (100) และ 327 (89) ตามลำดับ และไฮโดรควินินพบไอออนที่มีมวลต่อประจุ 341 (100) จึงสามารถยืนยันผลการทดสอบได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าจากวิธีการสกัดแบบรีฟลักซ์ด้วยเอทานอลจะให้ผลการทดสอบเป็นไปในทิศทางเดียวกันทุกครั้ง คือ จะพบปริมาณสารกรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน และไฮโดรควินิน ซึ่งสารสกัดหยาบที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญเหล่านี้ ศึกษาการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

7. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป็นการทดสอบเบื้องต้นโดยได้ทำการสกัดใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่สนใจด้วยวิธีการสกัดและเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในแต่ละวิธี เพื่อสกัดองค์ประกอบทางเคมีของใบน้อยหน่า มาทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* โดยใช้ Mueller-Hinton agar จากนั้นใช้ cock borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร ดูดสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลุมที่เจาะปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยมียาเจนตามัยซินความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เป็นสภาวะควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บข้อมูลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสจากวงใสขอบซ้ายถึงขวาและจากวงใสขอบบนถึงล่าง พบว่าในสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการสกัดทุกวิธีสามารถยับยั้งเชื้อได้เพียงชนิดเดียวคือ *B. cereus* โดยสารสกัดหยาบจากวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอลมี

การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้มากที่สุด รองลงมาคือวิธีซอกห์เลตด้วยเมทานอล ส่วนวิธีสกัดโดยใช้ไมโครเวฟและความถี่สูงช่วยในการสกัดให้ผลการทดสอบที่เหมือนกัน คือ 2.10, 1.75, 1.54 และ 1.54 เซนติเมตร ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดหยาบจากวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอลของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว สายพันธุ์ฝ้ายครั่ง สายพันธุ์หนังเขียว และสายพันธุ์ออสเตรเลียที่สกัดจากวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอลมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง พบว่า สารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* เช่นเดียวกัน โดยสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ออสเตรเลียเป็นสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้มากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวและฝ้ายครั่งให้ผลการทดสอบเหมือนกัน คือ 2.15, 2.10, 2.10 และ 2.00 เซนติเมตร ตามลำดับ จากการทดสอบข้างต้นทำให้ทราบว่าสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้เพียงชนิดเดียวคือ *B. cereus* ดังนั้นจึงใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดดังกล่าวในการศึกษาหาค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อต่อไป

8. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ด้วยวิธี broth dilution technique

จากการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *B. cereus* ของสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ทำการสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล วิธีซอกห์เลตด้วยเมทานอล วิธีสกัดโดยใช้ไมโครเวฟและใช้คลื่นความถี่สูงเป็นตัวช่วยสกัดด้วยเอทานอล ใช้สารสกัดหยาบความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการเจือจางความเข้มข้นให้ลดลงทีละครึ่งหนึ่งในทุก ๆ หลอดการทดลองเป็นจำนวน 5 หลอด พบว่าสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวที่ทำการสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันด้วยสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองนี้ ให้ผลการทดสอบที่เหมือนกัน คือ มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่การเจือจางในหลอดที่ 3 ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนตัวยาเจนตามัยซินที่ใช้เป็นชุดควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 75 ไมโครกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการยับยั้งที่การเจือจางหลอดสุดท้าย ความเข้มข้นเท่ากับ 2.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทดสอบกับสารสกัดหยาบวิธีรีฟลักซ์ด้วยเอทานอลของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียว สายพันธุ์ฝ้ายครั่ง สายพันธุ์หนังเขียว และสายพันธุ์ออสเตรเลียความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าทุกสายพันธุ์ให้ผลการทดสอบที่เหมือนกัน คือ มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่การเจือจางในหลอดที่ 3 ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการทดสอบเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือสารสกัดหยาบจากการทดลองทุกสภาวะให้ผลการทดสอบเหมือนกัน ดังนั้นอาจต้องทำการสกัดสารสกัดให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นเพื่อให้เกิดการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีมากขึ้นเช่นกัน

9. การนำสารสกัดไปใช้ประโยชน์ที่คาดว่าสามารถเป็นไปได้

จากการทดลองจะพบว่าสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าในทุกสายพันธุ์พบองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์หลายชนิดด้วยกัน ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญเหล่านั้นมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิด *B. cereus* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวก หากมีการศึกษาคุณสมบัติด้านอื่นเพิ่มเติมก็จะสามารถนำสารสกัดหยาบของใบน้อยหน่าไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้านด้วยกัน เช่น เป็นสารสกัดที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดกับโรคพืช หรืออาจจะใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืชได้อีกด้วย ซึ่งสารสกัดนี้เป็นสารสกัดจากธรรมชาติมีอันตรายกับสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าสารเคมีที่ใช้ในปัจจุบัน จึงเหมาะแก่การนำมาใช้ในเกษตรกรรมเป็นอย่างยิ่ง

บรรณานุกรม

กนกนาฎ โยคะโส. 2556. **ประสิทธิภาพของสบู่เหลวจากสารสกัดพืชสมุนไพรวงศ์ขิงต่อการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://library.cmu.ac.th/digital_ collection /etheses/fulltext.php?id=7742 (25 มกราคม 2558).

ข้อมูลสาธารณะสุขมูลฐาน. 2551. **สมุนไพรสำหรับงานสาธารณะสุขมูลฐาน.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://blog.taradkaset.com (25 มีนาคม 2556).

ฐานความรู้เรื่องความปลอดภัยด้านสารเคมี สกว. 2546. **เมทานอล**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.chemtrack.org/Chem-Detail.asp?ID=01306&NAME=(methanol) (4 กรกฎาคม 2560).

เต็ม สมิตินันทน์. 2523. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย: (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง)**. กรุงเทพฯ: ฟันนี่พับบลิชชิ่ง.

เต็ม สมิตินันทน์. 2544. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย: ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544**. กรุงเทพฯ: ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

ประไพรัตน์ สีพลไกร. 2555. สารอินโดลแอลคาลอยด์และฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นพญาสัตบรรณ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี,** 14(1), 54-65.

ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. 2556. **น้อยหน่า: พืชสมุนไพรและการนำไปใช้ประโยชน์.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://clgc.rdi.ku.ac.th/index.php/rs/fruit/499-annona (25 มีนาคม 2556).

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2556. **Phenolic compounds/สารประกอบฟีนอล.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compound (12พฤศจิกายน 2557).

พิสุทธิพร ฉ่ำใจ. 2549. **สมุนไพร สรรพคุณและประโยชน์เพื่อการนำไปใช้.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ต้นธรรม.

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง. 2554. **การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผลหมาก.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.mfu.ac.th/school/cosmeticscience/download210856/10.docx (25 มีนาคม 2556).

แม้น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, ยุวดี เชี่ยววัฒนา, อทิตยา ศิริภิญญานนท์, ศรีวไล โอมอภิญญาณ และ อุมาพร สุขม่วง. 2554. **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ Principles and Techniques of Instrumental Analysis PART Spectroscopy.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์.

แม้น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวณิช, ภควดี สุทธิ์ไวยกิจ, มาณพ สิทธิเดช, สายสุนีย์ เหลี่ยวเรืองรัตน์, อุมาพร สุขม่วง และ วันเพ็ญ ช้อนแก้ว. 2555. **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ Principles and Techniques of Instrumental Analysis PART II Chromatography and others.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์.

เรืองศักดิ์ กมขุนทด และ กวิศร์ วานิชกุล. 2553. **พันธุ์น้อยหน่าและน้อยหน่าลูกผสมในประเทศไทยและแนวทางการผลิตน้อยหน่าและน้อยหน่าลูกผสมตามระบบเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP) Cultival Practices (GAP) for Sugar Apple and *Annona* Hybrids.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/04plant/ruangsak/plant_00.html (15 มิถุนายน 2556).

วลี ลือประเสริม. 2550. **มงกุฎของราชินี: ผลไม้เปลือกสีเข้ม โดดเด่นนามมังคุด ถึงยุคสู่ความงาม.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.oknation.net/blog/print.php?id=26828 (25 มีนาคม 2556).

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2556. **ตัวทำละลาย.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%95%E0%B8%B1%E0%B8%A7%E0%B8%97%E0%B8%B3%E0%B8%A5%E0%B8%B0%E0%B8%A5%E0%B8%B2%E0%B8%A2 (25 มีนาคม 2559).

ศิริวัลย์ สร้อยกล่อม, นันทนา ชื่นอิ่ม, พัชราภรณ์ ภู่ไพบูลย์ และ พินิจ ไพรสนธิ์. 2552. **การสกัดแอนโดรกราโฟไลด์ในฟ้าทะลายโจรด้วยคลื่นอุลตราโซนิค.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.rdi.ku.ac.th/kufair50/plant/52_plant/plant52.htm (25 มีนาคม 2556).

สมสุข มัจฉาชีพ. 2542. **พืชสมุนไพร ฉบับปรับปรุง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: แพร่พิทยา.

สำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุ์พืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. 2554. **ข้อมูลพรรณไม้.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.rspg.or.th/plants_data/index.htm (25 มีนาคม 2556).

สุดารัตน์ หอมหวล, ยุวดี ชูประภาวรรณ และ วิรัตน์ จันทร์ตรี. 2554. ฤทธิ์ฆ่าแมลงของพืชต่อเพลี้ยอ่อนถั่ว. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**, 13(4), 22-29.

สุนทรี สิงหบุตรา. 2535. **สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด.** กรุงเทพฯ: คุณ 39.

Andreazza, N. L., Caramano de Lourenço, C., Tasco, Á. J. H., Pinheiro, M. L. B., Stefanello, M. É. A., Costa, E. V. & Salvador, M. J. 2016. Antimicrobial photodynamic effect of extracts and oxoaporphine alkaloid isomoschatoline from *Guatteria blepharophylla*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,** 160, 154-162.

Annegowda, H. V., Anwar, L. N., Mordi, M. N., Ramanathan, S. & Mansor, S. M. 2010. Influence of Sonication on the Phenolic Content and Antioxidant Activity of *Terminalia catappa L.* Leaves. **Pharmacognosy Research,** 2(6), 68-73.

Antunes de Araújo, A., Soares, L. A. L., Ferreira, M. R., Assunção, M., Neto, A., Ribeiro da Silva, G., Fernandes, R., Guerra, G. C. B. & Nunes de Melo, M. C. 2014. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous andacetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology,** 156, 88-96.

Araya, H., Sahai, M., Singh, S., Singh, A. K., Yoshida, M., Hara, N. & Fujimoto, Y. 2002. Squamocin-O_1 and squamocin-O_2, new adjacent bis-tetrahydrofuran acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Phytochemistry,** 61, 999-1004.

Bafor, E. E., Uwumarongie, H. O. & Idiake, J. O. 2010. Antipyretic effects of the aqueous, ethyl acetate and hexane leaf extracts of *Ficus exasperata* (Moraceae) in mice. **Journal of Thermal Biology,** 35(6), 275-279.

Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. & Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology,** 45(4), 493-496.

Bhat, R., Kamaruddin, N., Tze, L. M. & Karim, A. A. 2011. Sonication improves Kasturi Lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. **Ultrasonics Sonochemistry,** 18, 1295–1300.

Biocyclopedia. 2017. **Reflux.** [Online]. Available http://www.eplantscience.com/index/dean/reflux.php (4 July 2017).

Chen, F., Zu, Y. & Yang, L. 2015. A novel approach for isolation of essential oil from fresh leaves of *Magnolia sieboldii* using microwave-assisted simultaneous distillation and extraction. **Separation and Purification Technology,** 154, 271-280.

Chua, L. S., Latiff, N. A. & Mohamad, M. 2016. Reflux extraction and cleanup process by column chromatography for high yield of andrographolide enriched extract. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants,** 3(2), 64-70.

Costa-Machado, A. R. M., Bastos, J. K. & Freitas-Luís, A. P. 2013. Dynamic maceration of *Copaifera langsdorffi* leaves: a technological study using fractional factorial design. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** 23(1), 79-85.

Chemistry Glossary. 2017. **Soxhlet extractor**. [Online]. Available http://glossary.periodni.com/glossary.php?en=Soxhlet+extractor (4 July 2017).

Dean, J. R. 1998. **Extraction Methods for Environmental Analysis**. England: John Wiley & Son.

Dholvitayakhun, A., Cushnie, T. P. & Trachoo, N. 2012. Antibacterial activity of three medicinal Thai plants against *Campylobacter jejuni* and other foodborne pathogens. **Natural Product Research,** 26(4), 356-63.

Dutta, R., Sarkar, U. & Mukherjee, A. 2014. Extraction of oil from *Crotalaria Juncea* seeds in a modified Soxhlet apparatus: Physical and chemical characterization of a prospective bio-fuel. **Fuel,** 116, 794-802.

El-Chaghaby, G. A., Ahmad, A. F. & Ramis, E. S. 2011. Evaluation of the antioxidant and antibacterial properties of various solvents extracts of *Annona squamosa* L. leaves. **Arabian Journal of Chemistry,** 1-7.

García-Salas, P., Gómez-Caravaca, A. M., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. 2015. Identification and quantification of phenolic and other polar compounds in the edible part of *Annona cherimola* and its by-products by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. **Food Research International,** 78, 246-257.

Godoy-Caballero, M. P., Acedo-Valenzuela, M. I. & Galeano-Díaz, T. 2012. Simple quantification of phenolic compounds present in the minor fraction of virgin olive oil by LC–DAD–FLD. **Talanta,** 101, 479-487.

Hamood, A. A. & Hossain, M A. 2015. Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of seeds crude extracts of pigeon pea traditionally used in Oman for the treatment of several chronic diseases. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease,** 5(4), 316-321.

Hasan, M. N., Rahman, M. H., Guo, R. & Hirashima, A. 2015. Hypoglycemic activity of methanolic leaf extract of *Blumea lacera* in Swiss-albino mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease,** 5(3), 195-198.

Hsieha, T., Wub, Y. & Chen, S. 2004. Chemical Constituents from *Annona glabra*. **Journal of the Chinese Chemical Society,** 51, 869-876.

International Organization for Standardization. 2005. **Determination of the total polyphenol content of leaf teas and instant teas by a colorimetric assay using Folin-Ciocalteu phenol reagent.** (ISO 14502-1).

Jahan, I. A., Hossain, H., Rahman, S. E., Sultana, S., Akbar, P. N., Yeasmin, S., Khan, T. A. & Rahma, Md. M. 2014. HPLC profiling of polyphenolic compounds and free randical assy of the ethanolic extract of *Annona reticulate* growing in Bangladesh. **International Journal of Pharmaceutics,** 4(4), 133-139.

Jayshree, D. P. & Kumar, V. 2008. *Annona squamosa* L.: Phytochemical analysis and Antimicrobial Screening. **Indonesian Journal of Chemistry,** 1(1), 34-38.

Kaneria, M. & Chanda, S. 2012. Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of *Manilkara zapota* L. (chiku) leaves by sequential soxhlet extraction method. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,** 2(3), 1526-1533.

Khanam, Z., Sam, K. H., Zakaria, N. H. B. M., Ching, C. H. & Bhat, I. 2015. Determination of polyphenolic content, HPLC analyses and DNA cleavage activity of Malaysian L. fruit extracts. **Journal of King Saud University-Science,** 27(4), 331-337.

Kelebek, H. 2016. LC-DAD–ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in Turkish black tea: Effect of infusion time and temperature. **Food Chemistry,** 204(1), 227-238.

Khatiwora, E., Adsul, V. B., Kulkarni, M. M., Deshpande, N. R. & Kashalkar, R. V. 2010. Spectroscopic determination of total phenol and flavonoid contents of *Ipomoea carnea*. **International Journal of ChemTech Research,** 2(3), 1698-1701.

Kraujaliene, V., Pukalskas, A., Kraujalis, P. & Venskutonis, P. R. 2016. Biorefining of Bergenia crassifolia L. roots and leaves by high pressure extraction methods and evaluation of antioxidant properties and main phytochemicals in extracts and plant material. **Industrial Crops and Products,** 89, 390-398.

Kumar, D., Kumar, S., Kohli, S., Arya, R. & Gupta, J. 2011. Antidiabetic activity of methanolic bark extract of *Albizia odoratissima* Benth. in alloxan induced diabetic albino mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine,** 4(11), 900-903.

Kumar, J. A., Rekha, T., Devi, S. S., Kannan, M., Jaswanth, A. & Gopal, V. 2010. Insecticidal Activity of Ethanolic Extract of Leaves of *Annona squamosa*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research,** 2(5), 177-180.

Lorian, E. V. 1991. **Antibiotic in laboratory medicine.** 3rd ed. Baltimore-London: William & Wilkins.

Mabry, T., Markham, K. R. & Thomas, M. B. 1970. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Mahdavikia, F. & Saharkhiz, M. J. 2015. Phytotoxic activity of essential oil and water extract of peppermint (*Mentha piperita* L. CV. Mitcham). **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants,** 2(4), 146-153.

Manske, R. H. F. 1965. **The Alkaloids. Chemistry and Physiology**. 8th ed. New York: Academic.

Mariod, A. A., Abdelwahab, S. I., Elkheir S., Ahmed, Y. M., Fauzi, P. N. & Chuen, C. S. 2012. Antioxidant activity of different parts from *Annona squamosa*, and *Catunaregam nilotica* methanolic extract. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria,** 11(3), 49-58.

Naczka, M. & Shahidi, F. 2004. ReviewExtraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A,** 1054, 95–111.

Nwaehujor, C. & Udeh, N. 2011. Screening of ethyl acetate extract of *Bridelia micrantha* for hepatoprotective and anti-oxidant activities on Wistar rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine,** 4(10), 796-798.

Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S. & González-Sanjosé, M. L. 2012. Comparative study of the use of maceration enzymes and cold pre-fermentative maceration on phenolic and anthocyanic composition and colour of a Mencía red wine. **LWT - Food Science and Technology,** 481(1), 1-8.

Pandey, N. & Barve, D. 2011. Phytochemical and Pharmacological Review on *Annona squamosa Linn*. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences,** 2(4), 1404-1412.

Park, J., Lee, K., Choi, S., Jeong, M., Kim, B., Lee, J. & Oh, Y. 2015. Sonication-assisted homogenization system for improved lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. **Renewable Energy,** 79, 3-8.

Pinsrithong, S. 2556. **เทคนิคสกัดด้วยไมโครเวฟ (microwave-assisted extraction, MAE)**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://share.psu.ac.th/blog/sci-discus/17171 (25 มีนาคม 2558).

Peñarrieta, J. M., Alvarado, J. A., Åkesson, B. & Bergenståhl, B. 2007. Separation of phenolic compounds from foods by reversed phase high performance liquid chromatography. **Revista Boliviana de Química,** 24(1), 1-4.

Routray, W. & Orsat, V. 2012. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. **Food Bioprocess Technol,** 5, 409–424.

San Diego Miramar College. 2015. **UV-Vis spectrophotometer**. [Online]. Available http://faculty.sdmiramar.edu/fgarces/LabMatters/Instruments/UV_Vis/Cary50.htm (25 มีนาคม 2559).

Satyajit, D., Sarker, Z., Latif, A. & Gray, I. 2006. **Natural product isolation.** 2nd ed. Humana.

Seffrin, R., Shikano, I., Akhtar, Y. & Isman, M. B. 2010. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa L.* against the cabbage looper *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. **Crop Protection,** 29, 20–24.

Shukla, S. & Tiwari, S. K. 2012. The influence of pyrethrum extract on the developmental stages of the rice-moth *Corcyra cephalonica* Stainton (*Lepidoptera: Pyralidae*). **Egyptian Journal of Biology,** 14, 57-62.

Subedi, L., Timalsena, S., Duwadi, P., Thapa, R., Paudel, A. & Parajuli, K. 2014. Antioxidant activity and phenol and flavonoid contents of eight medicinal plants from Western Nepal. **Journal of Traditional Chinese Medicine,** 34(5), 584-590.

Terpinc, P., Cigić, B., Polak, T., Hribar, J. & Požrl, T. 2016. LC–MS analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of buckwheat at different stages of malting. **Food Chemistry,** 210(1), 9-17.

Thakker, M. R., Parikh, J. K. & Desai, M. A. 2016. Microwave assisted extraction of essential oil from the leaves of Palmarosa: Multi-response optimization and predictive modeling. **Industrial Crops and Products,** 86, 311-319.

Vaithiyanathan, V. & Mirunalini, S. 2016. Assessment of anticancer activity: A comparison of dose–response effect of ethyl acetate and methanolic extracts of *Pergularia daemia* (Forsk). **Oral Science International,** 13(1), 24-31.

Vanitha, V., Umadevi, K. J. & Vijayalakshmi, K. 2011. Determination of bioactive components of *Annona squamosa L.* leaf by GC-MS analysis. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research,** 3(4), 309-312.

Waksmundzka–Hajnos, M., Oniszczuk, A., Szewczy, K. & Wianowska, D. 2007. Effect of sample-preparation methods on the HPLC quantitation of some phenolic acids in plant materials. **Acta Chromatographica,** 19, 227-237.

Wang, Q., Liu, H., Du, J., Cui, J., Chen, G. & Liu, Y. 2011. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions using orthogonal matrix design to enhance the antimicrobial activity of extracts from *Cichorium intybus* root. **African Journal of Microbiology Research,** 5, 2353-2358.

Wang, Y., Xi, G., Zheng, Y. & Miao, F. 2010. Microwave-assisted extraction of flavonoids from Chinese herb *Radix puerariae* (Ge Gen). **Journal of Medicinal Plants Research,** 4(4), 304-308.

Wikimedia Common. 2014. **Mass Spectrum**. [Online]. Available https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glucagon_mass.gif/th (14 March 2016).

Wu, R., Ma, F., Zhang, L., Li, P., Li, G., Zhang, Q., Zhang, W. & Wang, X. 2016. Simultaneous determination of phenolic compounds in sesame oil using LC–MS/MS combined with magnetic carboxylated multi-walled carbon nanotubes. **Food Chemistry,** 204(1), 334-342.

Wurangian, F. L. 2005. Determination of annonacyn compound by high performance liquid chromatography on the extract of *Annona muricata* linn seed for pesticide formula. **Indonesian Journal of Chemistry,** 5(3), 215-218.

Yao, H., Du, X., Yang, L., Wang, W., Yang, F., Zhao, C., Meng, X., Zhang, L. & Zu, Y. 2012. Microwave-assisted method for simultaneous extraction and hydrolysis for determination of flavonol glycosides in *ginkgo foliage* using brönsted acidic ionic Liquid $[HO_3S(CH_2)_4mim]$ HSO_4 aqueous solutions. **International Journal of Molecular Sciences,** 13(7), 8775-8788.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลาย

1. การเตรียมสารละลายสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากสาร	1000 มิลลิลิตร	ต้องชั่งมา	1000	มิลลิกรัม
ถ้าต้องการสาร	100 มิลลิลิตร	ต้องชั่งมา	100	มิลลิกรัม

ชั่งสารมาตรฐานกรดแกลลิก 0.1000 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ จะได้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีคำนวณ จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานตั้งต้น

V_1 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่ใช้เตรียม

C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ต้องการเตรียม

V_2 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานที่ต้องการเตรียม

ถ้าต้องการเตรียมสารมาตรฐานความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

แทนค่า $C_1V_1 = C_2V_2$

1000 มิลลิกรัมต่อลิตร x V_1 = 20 มิลลิกรัมต่อลิตร x 5 มิลลิลิตร

V_1 = (20 มิลลิกรัมต่อลิตร x 5 มิลลิลิตร)/1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

V_1 = 0.1 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ

2. การเตรียมสารละลายสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากสาร	1000 มิลลิลิตร	ต้องชั่งมา	1000	มิลลิกรัม
ถ้าต้องการสาร	100 มิลลิลิตร	ต้องชั่งมา	100	มิลลิกรัม

ชั่งสารมาตรฐานคาเทชิน 0.1000 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ จะได้สารละลายมาตรฐานคาเทชินที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีคำนวณ จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานตั้งต้น

V_1 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่ใช้เตรียม

C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ต้องการเตรียม

V_2 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานที่ต้องการเตรียม

ถ้าต้องการเตรียมสารมาตรฐานความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

แทนค่า $C_1V_1 = C_2V_2$

1000 มิลลิกรัมต่อลิตร x V_1 = 20 มิลลิกรัมต่อลิตร x 5 มิลลิลิตร

V_1 = (20 มิลลิกรัมต่อลิตร x 5 มิลลิลิตร)/1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

V_1 = 0.1 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ

3. การเตรียมสารละลายสารมาตรฐานกรดแกลลิก กรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน ไฮโดรควินิน อะพิจินิน และแคมป์ฟีรอล ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากสาร	1000 มิลลิลิตร	ต้องชั่งมา	1000	มิลลิกรัม
ถ้าต้องการสาร	100 มิลลิลิตร	ต้องชั่งมา	100	มิลลิกรัม

ชั่งสารมาตรฐานทั้ง 9 ชนิด ปริมาณ 0.1000 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารอะซิโตไนไตล์ 25 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารอะซิโตไนไตรล์จนครบ จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีคำนวณ จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานตั้งต้น

V_1 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานตั้งต้นที่ใช้เตรียม

C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ต้องการเตรียม

V_2 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานที่ต้องการเตรียม

ถ้าต้องการเตรียมสารมาตรฐานความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

แทนค่า $C_1V_1 = C_2V_2$

1000 มิลลิกรัมต่อลิตร x V_1 = 20 มิลลิกรัมต่อลิตร x 5 มิลลิลิตร

V_1 = (20 มิลลิกรัมต่อลิตร x 5 มิลลิลิตร)/1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

V_1 = 0.1 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 1, 5, 10, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมา 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารอะซิโตไนไตรล์จนครบ

4. การเตรียมสารละลายแอมโมเนียมฟอร์เมต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.0

น้ำหนักโมเลกุล = 63.05 กรัมต่อโมล

ความบริสุทธิ์ = 99.00 เปอร์เซ็นต์

วิธีคำนวณ จากสูตร n = g/MW

เมื่อ n = ความเข้มข้นของสารละลายหน่วยเป็นโมลาร์

g = น้ำหนักของสารที่ใช้หน่วยเป็นกรัม

MW = น้ำหนักโมเลกุลหน่วยเป็นกรัมต่อโมล

โดย 1000 มิลลิโมลาร์ เท่ากับ 1 โมลาร์

ถ้า 10 มิลลิโมลาร์ เท่ากับ 0.01 โมลาร์

แทนค่า n = g/MW

0.01 โมลาร์ = g / 63.05 กรัมต่อโมล

g = 0.01 โมลาร์ x 63.05 กรัมต่อโมล

g = 0.6305 กรัม

ถ้าต้องการเตรียมสาร 1000 มิลลิลิตร ต้องชั่งสารมา 0.6305 กรัม

สารมีความบริสุทธิ์ 99.00 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสาร 100 กรัม มีเนื้อสารอยู่ 99 กรัม

ถ้าอยากได้สารบริสุทธิ์ 99 กรัม ต้องชั่งสาร 100 กรัม

ถ้าอยากได้สารบริสุทธิ์ 0.6305 กรัม ต้องชั่งสาร (100 กรัม x 0.6305 กรัม)/99 กรัม

= 0.6369 กรัม

ชั่งสารแอมโมเนียมฟอร์เมต ปริมาณ 0.6369 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน 25 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย เทลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน 700 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.0±0.1 จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

1. การคำนวณหาปริมาณร้อยละของสารสกัดหยาบ

ใบน้อยหน่าที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ เมื่อนำไปประเหยเอาตัวทำละลายออกจนหมดแล้ว จะได้สารสกัดสีเขียวเข้ม มีลักษณะข้นหนืด เป็นของแข็งกึ่งเหลว จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณร้อยละของสารสกัดหยาบจากสูตร

ร้อยละของสารสกัดหยาบ = (น้ำหนักของสารสกัด×100)/น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้

ตัวอย่างการคำนวณ ในการสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ใช้ใบน้อยหน่า 20.0158 กรัม เติมตัวทำละลายเฮกเซน 200 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองแยกกากออกจนได้สารละลายในขวดที่มีน้ำหนักเท่ากับ 105.7793 กรัม นำไประเหยจนแห้งชังน้ำหนักได้น้ำหนักเท่ากับ 105.9146 กรัม จะได้นำหนักสารสกัดหยาบเท่ากับ 0.1353 กรัม นำมาคำควณตามสูตร จะได้ค่าดังแสดงในตารางผนวกที่ 1

ร้อยละของสารสกัดหยาบ = (น้ำหนักของสารสกัด×100)/น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้
ร้อยละของสารสกัดหยาบ = (0.1353×100)/20.0158
ร้อยละของสารสกัดหยาบ = 0.68

ตารางผนวกที่ 1 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยวิธีแช่ยุ่ย ครั้งที่ 1

ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวดที่มีสารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
เฮกเซน	20.0158	105.7793	105.9146	0.1353	0.68
เอทิลอะซิเตท	20.0631	103.4211	103.5496	0.1285	0.64
อะซิโตน	20.0248	107.4789	107.6544	0.1755	0.88
เอทานอล	20.0107	108.2206	109.1759	0.9553	4.77
เมทานอล	20.0195	107.0327	107.8892	0.8565	4.28
น้ำ	20.0418	107.5675	107.8429	0.2754	1.37

ตารางผนวกที่ 2 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยวิธีแช่ยุ่ย ครั้งที่ 2

ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวดที่มีสารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
เฮกเซน	20.0365	105.9991	106.1084	0.1093	0.55
เอทิลอะซิเตท	20.0368	105.2367	105.3564	0.1197	0.60
อะซิโตน	20.0245	105.5689	105.7244	0.1555	0.78
เอทานอล	20.0357	106.5478	107.3412	0.7934	3.96
เมทานอล	20.0971	108.6578	109.5512	0.8934	4.45
น้ำ	20.0554	105.3375	105.6142	0.2767	1.38

ตารางผนวกที่ 3 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยวิธีแช่ยุ่ย ครั้งที่ 3

ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวดที่มีสารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
เฮกเซน	20.0493	105.3913	105.5191	0.1278	0.64
เอทิลอะซิเตท	20.0135	105.3577	105.4989	0.1412	0.71
อะซิโตน	20.0455	105.4352	105.5858	0.1506	0.75
เอทานอล	20.0557	105.479	106.2953	0.8163	4.07
เมทานอล	20.0071	105.7169	106.5572	0.8403	4.20
น้ำ	20.0349	104.9773	105.2828	0.3055	1.52

ตารางผนวกที่ 4 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยวิธีซอกห์เลต ครั้งที่ 1

ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวดที่มีสารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
เฮกเซน	20.0094	107.7327	108.0113	0.2786	1.39
เอทิลอะซิเตท	20.0172	108.6281	108.9043	0.2762	1.38
อะซิโตน	20.0198	107.7553	107.9246	0.1693	0.85
เอทานอล	20.0542	109.5224	110.3195	0.7971	3.97
เมทานอล	20.0214	105.9984	106.6442	0.6458	3.23
น้ำ	20.0453	106.7983	107.0017	0.2034	1.01

ตารางผนวกที่ 5 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยวิธีซอกห์เลต ครั้งที่ 2

ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวดที่มีสารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
เฮกเซน	20.0014	105.3349	105.5759	0.241	1.20
เอทิลอะซิเตท	20.0569	104.3541	104.5745	0.2204	1.10
อะซิโตน	20.0584	105.2348	105.3937	0.1589	0.79
เอทานอล	20.0112	106.4471	107.1283	0.6812	3.40
เมทานอล	20.0354	107.5993	108.1777	0.5784	2.89
น้ำ	20.0357	107.2205	107.3692	0.1487	0.74

ตารางผนวกที่ 6 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยวิธีซอกห์เลต ครั้งที่ 3

ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวดที่มีสารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
เฮกเซน	20.078	105.4935	105.7248	0.2313	1.15
เอทิลอะซิเตท	20.0342	106.781	106.9967	0.2157	1.08
อะซิโตน	20.0133	105.7822	105.9411	0.1589	0.79
เอทานอล	20.0411	106.4321	107.0978	0.6657	3.32
เมทานอล	20.0631	105.3379	105.9362	0.5983	2.98
น้ำ	20.0149	105.279	105.4293	0.1503	0.75

ตารางผนวกที่ 7 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยวิธีรีฟลักซ์ ครั้งที่ 1

ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวดที่มีสารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
เฮกเซน	20.0339	108.0071	108.1993	0.1922	0.96
เอทิลอะซิเตท	20.0263	107.3302	107.5249	0.1947	0.97
อะซิโตน	20.0817	105.4381	105.6491	0.211	1.05
เอทานอล	20.0704	105.2119	106.0432	0.8313	4.14
เมทานอล	20.0324	107.716	108.5091	0.7931	3.96
น้ำ	20.0641	105.3228	105.5091	0.1863	0.93

ตารางผนวกที่ 8 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยวิธีรีฟลักซ์ ครั้งที่ 2

ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวดที่มีสารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
เฮกเซน	20.0391	104.5802	104.8749	0.2947	1.47
เอทิลอะซิเตท	20.0487	109.7543	110.0332	0.2789	1.39
อะซิโตน	20.0954	105.2347	105.8221	0.5874	2.92
เอทานอล	20.0321	105.2110	106.6711	1.4601	7.29
เมทานอล	20.0078	105.6899	106.6823	0.9924	4.96
น้ำ	20.0472	107.5699	107.8455	0.2756	1.37

ตารางผนวกที่ 9 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยวิธีรีฟลักซ์ ครั้งที่ 3

ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวดที่มีสารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
เฮกเซน	20.0581	105.8756	106.1492	0.2736	1.36
เอทิลอะซิเตท	20.0342	104.9876	105.2455	0.2579	1.29
อะซิโตน	20.0387	105.4937	106.0480	0.5543	2.77
เอทานอล	20.4935	105.6327	106.6396	1.0069	4.91
เมทานอล	20.0175	105.3179	106.2933	0.9754	4.87
น้ำ	20.0225	105.6429	105.9385	0.2956	1.48

ตารางผนวกที่ 10 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยวิธีใช้คลื่นความถี่สูงช่วยสกัด ครั้งที่ 1

ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวดที่มีสารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
เฮกเซน	20.0002	107.4776	107.7329	0.2553	1.28
เอทิลอะซิเตท	20.0802	105.6891	106.0820	0.3929	1.96
อะซิโตน	20.0954	107.2306	107.8884	0.6578	3.27
เอทานอล	20.0321	107.1357	108.3888	1.2531	6.26
เมทานอล	20.002	107.0780	108.1121	1.0341	5.17
น้ำ	20.0954	107.5780	107.8975	0.3195	1.59

ตารางผนวกที่ 11 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยวิธีใช้คลื่นความถี่สูงช่วยสกัด ครั้งที่ 2

ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวดที่มีสารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
เฮกเซน	20.0339	107.7327	107.9313	0.1986	0.99
เอทิลอะซิเตท	20.0263	108.6281	108.7743	0.1462	0.73
อะซิโตน	20.0817	107.7553	107.9646	0.2093	1.04
เอทานอล	20.0704	109.5224	110.3095	0.7871	3.92
เมทานอล	20.0324	105.9984	106.2442	0.2458	1.23
น้ำ	20.0641	106.7983	107.0017	0.2034	1.01

ตารางผนวกที่ 12 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยวิธีใช้คลื่นความถี่สูงช่วยสกัด ครั้งที่ 3

ตัวทำละลาย	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวดที่มีสารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
เฮกเซน	20.0578	105.8713	106.0666	0.1953	0.97
เอทิลอะซิเตท	20.0145	104.9973	105.1407	0.1434	0.72
อะซิโตน	20.0871	105.879	106.0924	0.2134	1.06
เอทานอล	20.0268	104.9873	105.7638	0.7765	3.88
เมทานอล	20.0334	105.5001	105.7456	0.2455	1.23
น้ำ	20.0431	105.3671	105.575	0.2079	1.04

ตารางผนวกที่ 13 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยเครื่องไมโครเวฟช่วยสกัด ครั้งที่ 1 (n=3)

กำลังไฟฟ้า (วัตต์)	เวลา (วินาที)	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวด+สารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
550	30	10.0012	107.3217	107.4201	0.0984	0.98
	60	10.0042	105.4432	105.5990	0.1558	1.56
	120	10.0125	106.9328	107.1784	0.2456	2.45
	180	10.0099	106.4481	106.6629	0.2148	2.15
	300	10.0001	107.2134	107.5142	0.3008	3.01
700	30	10.0012	105.4236	105.5072	0.0836	0.84
	60	10.0042	107.7413	107.9075	0.1662	1.66
	120	10.0125	105.6642	105.8458	0.1816	1.81
	180	10.0099	107.1227	107.3099	0.1872	1.87
	300	10.0001	107.9941	108.2145	0.2204	2.20
900	30	10.0012	107.4325	107.5110	0.0785	0.78
	60	10.0042	106.5594	106.7241	0.1647	1.65
	120	10.0125	107.4329	107.6127	0.1798	1.80
	180	10.0099	107.3382	107.4426	0.1044	1.04
	300	10.0001	106.4478	106.5941	0.1463	1.46

ตารางผนวกที่ 14 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยเครื่องไมโครเวฟช่วยสกัด ครั้งที่ 2 (n=3)

กำลังไฟฟ้า (วัตต์)	เวลา (วินาที)	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวด+สารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
550	30	10.004	107.4691	107.6119	0.1428	1.43
	60	10.0062	106.4312	106.6010	0.1698	1.70
	120	10.001	107.2821	107.4994	0.2173	2.17
	180	10.008	107.9816	108.2451	0.2635	2.63
	300	10.0011	105.4355	105.7550	0.3195	3.19
700	30	10.0091	107.4227	107.5091	0.0864	0.86
	60	10.0142	107.1892	107.3417	0.1525	1.52
	120	10.0044	106.7214	106.9148	0.1934	1.93
	180	10.0071	107.9712	108.1440	0.1728	1.73
	300	10.0003	107.6724	107.7944	0.1220	1.22
900	30	10.0067	107.3991	107.4982	0.0991	0.99
	60	10.0144	107.4410	107.6420	0.2010	2.01
	120	10.0002	107.0079	107.2011	0.1932	1.93
	180	10.0004	107.9914	108.2120	0.2206	2.21
	300	10.0017	107.3271	107.5095	0.1824	1.82

ตารางผนวกที่ 15 การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยเครื่องไมโครเวฟช่วยสกัด ครั้งที่ 3 (n=3)

กำลังไฟฟ้า (วัตต์)	เวลา (วินาที)	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	นน.ขวดเปล่า (กรัม)	นน.ขวด+สารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด
550	30	10.0002	105.3486	105.4621	0.1135	1.13
	60	10.0458	105.4586	105.6123	0.1537	1.53
	120	10.0145	107.3480	107.5529	0.2049	2.05
	180	10.0325	107.3548	107.6024	0.2476	2.47
	300	10.0289	105.5593	105.8952	0.3359	3.35
700	30	10.0341	105.3176	105.3887	0.0711	0.71
	60	10.0158	105.3897	105.5272	0.1375	1.37
	120	10.0164	106.7161	106.9318	0.2157	2.15
	180	10.0435	107.1587	107.3522	0.1935	1.93
	300	10.0352	105.4813	105.6399	0.1586	1.58
900	30	10.0432	105.2364	105.3235	0.0871	0.87
	60	10.0148	104.5891	104.7814	0.1923	1.92
	120	10.0113	105.7375	105.9274	0.1899	1.90
	180	10.0283	105.6483	105.8528	0.2045	2.04
	300	10.0349	105.1864	105.3547	0.1683	1.68

2. การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบ

สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดแต่ละวิธี นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความคลื่น 760 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ จากสูตร

สารประกอบฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ)

= (C mg/L) × (100 mL) × (1 L/1000mL) x (1/W g) x (100 g)

โดย C = ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

W = น้ำหนักสารสกัด (กรัม)

ตัวอย่างการคำนวณ ในการสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ชั่งสารสกัดหยาบน้ำหนัก 1.1328 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 3-5 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ ทำการเจือจาง 10 เท่า ปิเปตสารละลายมา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโฟลิน-ไซโอแคลทู ความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงไป 5 มิลลิลิตร และโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 60 นาที หรือทำการเจือจางสารละลายให้เหมาะสม จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ได้ค่าความเข้มข้นจากกราฟเท่ากับ 42.0217 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาคำควณตามสูตร จะได้ค่าดังแสดงในตารางผนวกที่ 16

สารประกอบฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ)

= (C mg/L) × (100 mL) × (1 L/1000mL) x (1/W g) x (100 g)

= (42.0217 mg/L) × (100 mL) × (1 L/1000mL) x (1/1.1328 g) x (100 g)

= 370.95 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ

ตารางผนวกที่ 16 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยวิธีแช่ยุ่ย ซอกห์เลต รีฟลักซ์ และใช้คลื่นความถี่สูงช่วยสกัด (n=3)

วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	นน. สารสกัด (กรัม)	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัม)				
			1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
แช่ยุ่ย	เฮกเซน	1.5535	0.0000	0.0000	0.0000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทิลอะซิเตท	1.1328	42.0217	43.0154	42.5587	370.95	379.73	375.69	375.46	4.39
	อะซิโตน	1.3755	40.5260	40.2750	41.4425	294.63	292.80	301.29	296.24	4.47
	เอทานอล	1.1155	45.2635	45.3547	44.1789	405.77	406.59	396.05	402.80	5.86
	เมทานอล	1.1756	62.7134	61.8940	62.4350	533.46	526.49	531.09	530.35	3.54
	น้ำ	1.0175	36.8911	36.5970	37.0110	362.57	359.68	363.74	362.00	2.09
ซอกห์เลต	เฮกเซน	1.1056	0.0000	0.0000	0.0000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทิลอะซิเตท	1.0103	29.5576	29.9954	29.5477	292.56	296.90	292.46	293.97	2.53
	อะซิโตน	1.0276	35.5789	35.5913	35.4971	346.23	346.35	345.44	346.01	0.50
	เอทานอล	1.1149	60.5860	60.5142	60.5244	543.42	542.78	542.87	543.02	0.35
	เมทานอล	1.1073	64.5893	63.9942	63.9989	583.30	577.93	577.97	579.74	3.09
	น้ำ	1.1186	40.2867	40.2796	40.2759	360.15	360.09	360.06	360.10	0.05

ตารางผนวกที่ 16 (ต่อ)

วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	นน. สารสกัด (กรัม)	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัม)				
			1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
รีฟลักซ์	เฮกเซน	1.1356	0.0000	0.0000	0.0000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทิลอะซิเตท	1.1449	41.1245	41.2457	41.1148	359.20	360.26	359.11	359.52	0.64
	อะซิโตน	1.1067	39.7856	39.7865	39.7911	359.50	359.51	359.55	359.52	0.03
	เอทานอล	1.0983	63.2547	63.2451	63.2347	575.93	575.85	575.75	575.84	0.09
	เมทานอล	1.1783	88.1541	88.1204	88.1356	748.15	747.86	747.99	748.00	0.14
	น้ำ	1.0998	41.1541	41.1144	41.1258	374.20	373.84	373.94	373.99	0.19
ใช้คลื่นความถี่สูงช่วยสกัด	เฮกเซน	1.1958	0.0000	0.0000	0.0000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทิลอะซิเตท	1.1547	42.1597	42.1087	42.0091	365.11	364.67	363.81	364.53	0.66
	อะซิโตน	1.1435	27.8813	28.9954	27.6841	243.82	253.57	242.10	246.50	6.18
	เอทานอล	1.1385	40.1140	41.1258	41.1671	352.34	361.23	361.59	358.39	5.24
	เมทานอล	1.1167	37.8711	37.8541	37.9142	339.13	338.98	339.52	339.21	0.28
	น้ำ	1.155	40.2201	40.2155	40.2194	348.23	348.19	348.22	348.21	0.02

ตารางผนวกที่ 17 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวใช้ไมโครเวฟช่วยสกัดด้วยเอทานอล (n=3)

กำลังไฟ (วัตต์)	เวลา (วินาที)	นน. สารสกัด (กรัม)	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัม)				
			1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
550	30	1.1056	24.5791	25.461	24.9591	222.31	230.29	225.75	226.12	4.00
	60	1.1147	32.5472	32.455	32.468	291.98	291.15	291.27	291.47	0.45
	120	1.1056	35.149	35.147	35.204	317.92	317.90	318.42	318.08	0.29
	180	1.1045	31.573	31.599	31.408	285.86	286.09	284.36	285.44	0.94
	300	1.1565	35.411	34.471	34.392	306.19	298.06	297.38	300.54	4.90
700	30	1.1894	35.784	35.419	35.399	300.86	297.79	297.62	298.76	1.82
	60	1.1796	31.553	31.498	31.473	267.49	267.02	266.81	267.11	0.35
	120	1.1368	38.421	38.814	38.856	337.98	341.43	341.80	340.40	2.11
	180	1.1899	34.177	34.279	34.158	287.23	288.08	287.07	287.46	0.55
	300	1.1735	25.233	25.47	25.31	215.02	217.04	215.68	215.92	1.03

ตารางผนวกที่ 17 (ต่อ)

กำลังไฟ (วัตต์)	เวลา (วินาที)	นน. สารสกัด (กรัม)	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัม)				
			1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
	30	1.1482	37.519	37.991	37.499	326.76	330.87	326.59	328.08	2.43
	60	1.1889	35.412	35.399	35.458	297.86	297.75	298.24	297.95	0.26
900	120	1.1794	34.119	33.9232	33.9712	289.29	287.63	288.04	288.32	0.87
	180	1.1124	21.1429	21.894	21.9517	190.07	196.82	197.34	194.74	4.06
	300	1.1466	23.5711	21.925	21.994	205.57	191.22	191.82	196.20	8.12

3. การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบ

สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดแต่ละวิธี นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความคลื่น 415 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ จากสูตร

สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (มิลลิกรัมเทียบเท่าคาเทชินต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ)

= (C mg/L) × (100 mL) × (1 L/1000mL) x (1/W g) x (100 g)

โดย C = ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

W = น้ำหนักสารสกัด (กรัม)

ตัวอย่างการคำนวณ ในการสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ยด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ชั่งสารสกัดหยาบน้ำหนัก 1.1285 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ ปิเปตสารละลายมา 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเมทานอล 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ลงไป 0.1 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมอะซิเตท ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 30 นาที หรือทำการเจือจางสารละลายให้เหมาะสม จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ได้ค่าความเข้มข้นจากกราฟเท่ากับ 2.5566 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาคำควณตามสูตร จะได้ค่าดังแสดงในตารางผนวกที่ 18

สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (มิลลิกรัมเทียบเท่าคาเทชินต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ)

= (C mg/L) × (100 mL) × (1 L/1000mL) x (1/W g) x (100 g)

= (2.5566 mg/L) × (100 mL) × (1 L/1000mL) x (1/1.1285 g) x (100 g)

= 22.65 มิลลิกรัมเทียบเท่าคาเทชิน 100 กรัมสารสกัดหยาบ

ตารางผนวกที่ 18 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยวิธีแช่ยุ่ย ซอกห์เลต รีฟลักซ์ และใช้คลื่นความถี่สูงช่วยสกัด (n=3)

วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	นน. สารสกัด (กรัม)	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ฟลาโวนอยด์รวม (มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ)				
			1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
แช่ยุ่ย	เฮกเซน	1.1352	2.48	2.54	2.45	21.88	22.39	21.56	21.94	0.41
	เอทิลอะซิเตท	1.1285	2.56	2.50	2.52	22.65	22.16	22.30	22.37	0.26
	อะซิโตน	1.1404	2.15	2.25	2.14	18.89	19.72	18.78	19.13	0.51
	เอทานอล	1.1042	2.49	2.51	2.46	22.51	22.77	22.25	22.51	0.26
	เมทานอล	1.1056	4.18	3.98	4.00	37.82	35.97	36.17	36.65	1.01
	น้ำ	1.1275	3.22	3.31	3.25	28.52	29.39	28.84	28.92	0.44
ซอกห์เลต	เฮกเซน	1.1278	2.27	2.44	2.42	20.13	21.67	21.43	21.08	0.83
	เอทิลอะซิเตท	1.1276	2.72	2.54	2.66	24.09	22.54	23.56	23.39	0.79
	อะซิโตน	1.1692	2.14	2.24	2.31	18.33	19.20	19.77	19.10	0.73
	เอทานอล	1.1039	3.11	2.95	3.00	28.21	26.71	27.16	27.36	0.77
	เมทานอล	1.1645	5.04	4.93	4.92	43.32	42.37	42.21	42.63	0.60
	น้ำ	1.1203	2.60	3.01	2.73	23.25	26.88	24.37	24.83	1.86

ตารางผนวกที่ 18 (ต่อ)

วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	นน. สารสกัด (กรัม)	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ฟลาโวนอยด์รวม (มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ)				
			1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
รีฟลักซ์	เฮกเซน	1.1255	1.99	2.04	2.00	17.72	18.16	17.75	17.88	0.25
	เอทิลอะซิเตท	1.1392	2.72	2.93	2.85	23.90	25.75	25.05	24.90	0.93
	อะซิโตน	1.1657	3.12	3.05	3.04	26.81	26.15	26.09	26.35	0.40
	เอทานอล	1.1013	4.76	4.84	4.79	43.19	43.97	43.45	43.54	0.40
	เมทานอล	1.1034	5.00	4.96	4.93	45.30	44.91	44.72	44.98	0.29
	น้ำ	1.1319	3.30	3.30	3.31	29.18	29.17	29.28	29.21	0.06
ใช้คลื่นความถี่สูงช่วยสกัด	เฮกเซน	1.1255	2.12	2.20	2.11	18.80	19.55	18.79	19.04	0.44
	เอทิลอะซิเตท	1.1039	1.71	1.68	1.68	15.48	15.22	15.23	15.31	0.15
	อะซิโตน	1.1065	2.24	2.44	2.11	20.24	22.09	19.11	20.48	1.51
	เอทานอล	1.1271	3.14	3.20	3.16	27.88	28.38	28.04	28.10	0.26
	เมทานอล	1.1034	4.00	4.00	4.10	36.26	36.23	37.17	36.55	0.53
	น้ำ	1.1319	3.30	3.35	3.34	29.16	29.57	29.50	29.41	0.22

ตารางผนวกที่ 19 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวใช้ไมโครเวฟช่วยสกัดด้วยเอทานอล (n=3)

กำลังไฟ (วัตต์)	เวลา (วินาที)	นน. สารสกัด (กรัม)	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ฟลาโวนอยด์รวม (มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ)				
			1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
	30	1.1003	0.51	0.52	0.52	4.63	4.75	4.69	4.69	0.06
	60	1.1045	0.50	0.51	0.51	4.54	4.66	4.66	4.62	0.07
550	120	1.1192	0.62	0.62	0.63	5.55	5.54	5.59	5.56	0.02
	180	1.1923	0.75	0.74	0.72	6.27	6.20	6.04	6.17	0.12
	300	1.1211	0.66	0.65	0.66	5.89	5.81	5.93	5.87	0.06
	30	1.1047	0.54	0.55	0.53	4.92	5.02	4.81	4.92	0.10
	60	1.1050	0.55	0.53	0.55	5.02	4.81	4.98	4.94	0.11
700	120	1.1002	0.63	0.63	0.64	5.75	5.73	5.83	5.77	0.05
	180	1.1239	0.57	0.56	0.57	5.11	4.98	5.05	5.05	0.06
	300	1.1222	0.42	0.43	0.42	3.78	3.83	3.73	3.78	0.05

ตารางผนวกที่ 19 (ต่อ)

กำลังไฟ (วัตต์)	เวลา (วินาที)	นน. สารสกัด (กรัม)	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ฟลาโวนอยด์รวม (มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ)				
			1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
	30	1.1034	0.42	0.43	0.43	3.82	3.88	3.86	3.85	0.03
	60	1.1055	0.59	0.60	0.56	5.34	5.41	5.08	5.27	0.18
900	120	1.1217	0.50	0.51	0.52	4.46	4.52	4.63	4.54	0.09
	180	1.1229	0.55	0.56	0.55	4.94	4.98	4.91	4.94	0.03
	300	1.1475	0.55	0.56	0.56	4.83	4.88	4.89	4.87	0.03

4. การคำนวณหาปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่วิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์

ใช้สารสกัดหยาบด้วยวิธีรีฟลักซ์จากเอทานอล นำมาวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์ ที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร นำค่าความเข้มข้นที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารฟีนอลิกรวม คือ กรดแกลลิก กรดแทนนิก คาเทชิน รูทิน ไอโซเคอร์ซิทิน เคอร์ซิทิน ไฮโดรควินิน อะพิจินิน และแคมป์ฟีรอล จะได้ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีเท่ากับ จากสูตร

ปริมาณสารที่พบ (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ)

= (C mg/L) × (100 mL) × (1 L/1,000mL) x (1/W g) x (100 g)

โดย	C	=	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
	W	=	น้ำหนักสารสกัดหยาบชั่งมา 1.00 (กรัม)

ตัวอย่างการคำนวณ ใช้สารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยวิธีรีฟลักซ์จากเอทานอล ชั่งสารสกัดหยาบน้ำหนัก 1.00 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมอะซิโตไนไตรล์ 25 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย จากนั้นเทสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรจนครบ กรองด้วยชุดกรองขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ลงในขวดขนาด 2 มิลลิลิตรปิดฝาให้สนิท นำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์มีค่าความเข้มข้นจากกราฟเท่ากับ 9.0866 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาคำควณตามสูตร จะได้ค่าดังแสดงในตารางผนวกที่ 21

ปริมาณสารที่พบ (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ)

= (C mg/L) × (100 mL) × (1 L/1,000mL) x (1/W g) x (100 g)

= (9.0866 mg/L) × (100mL) x (1 L/1,000mL) x (1/1.00 g) x (100 g)

= 90.87 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัดหยาบ

ตารางผนวกที่ 20 พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดไดโอดแอเรย์ (n=3)

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้พีค (mAU*s)				
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
กรดแกลลิก	1	10.16	6.04	12.19	9.46	3.14
	5	47.31	61.70	48.61	52.54	7.96
	10	91.45	100.80	99.34	97.20	5.03
	50	517.75	530.63	512.57	520.32	9.30
กรดแทนนิก	1	7.58	6.65	6.16	6.80	0.72
	5	27.77	34.58	28.53	30.29	3.73
	10	63.88	61.09	63.42	62.80	1.50
	50	304.92	293.08	301.23	299.74	6.06
คาเทชิน	1	15.11	13.21	14.51	14.28	0.97
	5	47.89	57.25	49.51	51.55	5.01
	10	104.41	107.32	110.88	107.54	3.24
	50	1,002.74	984.86	983.12	990.24	10.86
รูทิน	1	12.09	9.57	10.70	10.79	1.263
	5	48.69	72.02	63.44	61.38	11.80
	10	89.59	91.14	102.43	94.39	7.01
	50	1,511.59	1,534.89	1,558.42	1534.97	23.42
ไอโซเคอร์ซิทิน	1	16.15	13.10	11.92	13.72	2.18
	5	63.52	94.90	84.44	80.95	15.98
	10	131.06	130.66	149.11	136.94	10.54
	50	2,880.77	2,867.45	2,898.39	2,882.21	15.52

ตารางผนวกที่ 20 (ต่อ)

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้พีค (mAU*s)				
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
เคอร์ซิทิน	1	10.56	9.74	10.88	10.40	0.59
	5	105.36	142.09	100.65	116.04	22.69
	10	278.05	273.07	285.55	278.89	6.28
	50	1,634.26	1,633.13	1,602.26	1623.21	18.16
ไฮโดรควินิน	1	6.33	6.42	5.88	6.21	0.29
	5	46.81	58.59	54.38	53.26	5.97
	10	104.88	109.70	114.62	109.74	4.87
	50	842.93	852.33	842.76	846.01	5.48
อะพิจินิน	1	47.74	40.69	49.72	46.05	4.75
	5	236.60	284.33	233.89	251.61	28.37
	10	538.47	535.27	554.79	542.84	10.47
	50	3,273.90	3,290.64	3,211.62	3,258.72	41.64
แคมป์ฟีรอล	1	50.96	47.37	48.00	48.78	1.91
	5	193.08	222.65	201.67	205.80	15.21
	10	446.22	433.17	463.40	447.59	15.17
	50	2,712.75	2,747.54	2,650.65	2,703.65	49.08

ตารางผนวกที่ 21 องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยวิธีรีฟลักซ์จากเอทานอล (n=3)

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ปริมาณสารที่พบ (มิลลิกรัมต่อ100กรัมสารสกัดหยาบ)				
	1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
กรดแกลลิก	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
กรดแทนนิก	9.09	8.54	8.52	90.87	85.43	85.24	87.18	3.19
คาเทชิน	15.98	15.42	15.46	159.76	154.23	154.58	156.19	3.10
รูทิน	221.63	222.17	218.99	2,216.35	2,221.71	2,189.86	2,209.30	17.05
ไอโซเคอร์ซิทิน	12.12	11.66	11.70	121.15	116.57	117.00	118.24	2.53
เคอร์ซิทิน	375.05	280.16	375.30	3,750.49	2,801.55	3,753.02	3,435.02	548.60
ไฮโดรควินิน	5.84	6.96	5.26	58.41	69.57	52.63	60.20	8.61
อะพิจินิน	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
แคมป์ฟีรอล	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND (Not detected) หมายถึง ตรวจไม่พบ

ตารางผนวกที่ 22 องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยวิธีซอกห์เลตจากเมทานอล (n=3)

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ปริมาณสารที่พบ (มิลลิกรัมต่อ100กรัมสารสกัดหยาบ)				
	1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
กรดแกลลิก	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
กรดแทนนิก	2.54	2.90	3.09	25.36	28.96	30.87	28.40	2.79
คาเทชิน	10.33	11.72	25.16	103.26	117.17	251.64	157.35	81.95
รูทิน	56.47	56.52	39.78	564.72	565.17	397.77	509.22	96.52
ไอโซเคอร์ซิทิน	5.30	5.80	5.31	52.96	57.96	53.11	54.67	2.85
เคอร์ซิทิน	77.16	75.55	87.36	771.59	755.47	873.57	800.21	64.04
ไฮโดรควินิน	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
อะพิจินิน	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
แคมป์ฟีรอล	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND (Not detected) หมายถึง ตรวจไม่พบ

ตารางผนวกที่ 23 องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยวิธีไมโครเวฟช่วยสกัดจากเอทานอล (n=3)

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ปริมาณสารที่พบ (มิลลิกรัมต่อ100กรัมสารสกัดหยาบ)				
	1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
กรดแกลลิก	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
กรดแทนนิก	2.06	2.04	1.89	20.60	20.39	18.86	19.95	0.95
คาเทชิน	11.99	11.77	8.97	119.90	117.72	89.71	109.11	16.84
รูทิน	18.06	18.36	12.29	180.61	183.58	122.89	162.36	34.22
ไอโซเคอร์ซิทิน	4.34	4.40	3.16	43.36	44.00	31.64	39.66	6.96
เคอร์ซิทิน	77.11	78.87	65.08	771.09	788.72	650.77	736.86	75.07
ไฮโดรควินิน	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
อะพิจินิน	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
แคมป์ฟีรอล	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND (Not detected) หมายถึง ตรวจไม่พบ

ตารางผนวกที่ 24 องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายเขียวด้วยวิธีความถี่สูงช่วยสกัดจากเอทานอล (n=3)

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ปริมาณสารที่พบ (มิลลิกรัมต่อ100กรัมสารสกัดหยาบ)				
	1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
กรดแกลลิก	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
กรดแทนนิก	4.41	4.27	4.46	44.06	42.69	44.56	43.77	0.97
คาเทชิน	3.72	3.92	3.77	37.20	39.25	37.71	38.05	1.07
รูทิน	61.69	63.49	62.89	616.86	634.89	628.91	626.88	9.19
ไอโซเคอร์ซิทิน	7.87	8.33	8.90	78.69	83.29	88.99	83.66	5.16
เคอร์ซิทิน	205.79	202.93	202.23	2,057.89	2,029.26	2,022.29	2,036.48	18.87
ไฮโดรควินิน	1.36	1.22	1.49	13.56	12.19	14.94	13.56	1.37
อะพิจินิน	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
แคมป์ฟีรอล	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND (Not detected) หมายถึง ตรวจไม่พบ

ตารางผนวกที่ 25 องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบจากเอทานอลด้วยวิธีรีฟลักซ์ของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ฝ้ายครั่ง (n=3)

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ปริมาณสารที่พบ (มิลลิกรัมต่อ100กรัมสารสกัดหยาบ)				
	1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
กรดแกลลิก	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
กรดแทนนิก	5.30	5.18	4.92	52.99	51.78	49.19	51.32	1.94
คาเทชิน	13.68	13.46	13.71	136.80	134.63	137.13	136.19	1.36
รูทิน	132.07	122.89	122.35	1,320.66	1,228.87	1,223.53	1,257.68	54.60
ไอโซเคอร์ซิทิน	7.80	11.84	12.06	78.00	118.37	120.60	105.66	23.98
เคอร์ซิทิน	145.02	196.33	225.69	1,450.23	1,963.31	2,256.85	1,890.13	408.26
ไฮโดรควินิน	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
อะพิจินิน	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
แคมป์ฟีรอล	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND (Not detected) หมายถึง ตรวจไม่พบ

ตารางผนวกที่ 26 องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบจากเอทานอลด้วยวิธีรีฟลักซ์ของใบน้อยหน่าสายพันธุ์หนังเขียว (n=3)

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ปริมาณสารที่พบ (มิลลิกรัมต่อ100กรัมสารสกัดหยาบ)				
	1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
กรดแกลลิก	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
กรดแทนนิก	6.07	3.13	7.20	60.67	31.29	72.04	54.67	21.03
คาเทชิน	17.17	12.74	13.82	171.70	127.41	138.19	145.77	23.09
รูทิน	90.38	57.90	53.62	903.80	578.95	536.23	673.00	201.02
ไอโซเคอร์ซิทิน	14.20	6.94	32.15	142.03	69.42	321.55	177.66	129.79
เคอร์ซิทิน	76.72	96.13	87.76	767.21	961.28	877.59	868.69	97.34
ไฮโดรควินิน	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
อะพิจินิน	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
แคมป์ฟีรอล	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND (Not detected) หมายถึง ตรวจไม่พบ

ตารางผนวกที่ 27 องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบจากเอทานอลด้วยวิธีรีฟลักซ์ของใบน้อยหน่าสายพันธุ์ออสเตรเลีย (n=3)

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้นจากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			ปริมาณสารที่พบ (มิลลิกรัมต่อ100กรัมสารสกัดหยาบ)				
	1	2	3	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
กรดแกลลิก	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
กรดแทนนิก	12.36	12.39	12.38	123.62	123.95	123.78	123.78	0.16
คาเทชิน	10.92	10.55	10.74	109.21	105.52	107.36	107.36	1.84
รูทิน	85.68	77.19	81.43	856.82	771.90	814.35	814.35	42.46
ไอโซเคอร์ซิทิน	19.44	21.79	20.61	194.38	217.85	206.11	206.11	11.73
เคอร์ซิทิน	425.13	382.16	403.64	4,251.32	3,821.56	4036.44	4036.44	214.88
ไฮโดรควินิน	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
อะพิจินิน	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
แคมป์ฟีรอล	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND (Not detected) หมายถึง ตรวจไม่พบ

ภาคผนวก ค

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อสกุล-นามสกุล	นางสาวสุพรรษา กัณทวงศ์
เกิดเมื่อ	5 เมษายน 2527
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2550-2551 ผู้ช่วยนักวิจัย คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2551- ปัจจุบัน นักวิทยาศาตร์ บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาเชียงใหม่
ผลงานการเผยแพร่	ตีพิมพ์วารสารประเภทผลงานวิชาการ (Proceeding) เรื่อง The study of chemical components in *Annona squamosa* Linn. leaves by LC-DAD
การนำเสนอผลงาน	1. งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The Pure and Applied Chemistry International Conference 2014 (PACCON 2014) ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ระหว่างวันที่ 8-10 มกราคม 2557 ประเภทการนำเสนอแบบปากเปล่า 2. งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The Pure and Applied Chemistry International Conference 2016 (PACCON 2016) เรื่อง The study of chemical components in *Annona squamosa* Linn. leaves by LC-DAD ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 9-11 กุมภาพันธ์ 2559 ประเภทการนำเสนอแบบโปสเตอร์

The study of chemical components in *Annona squamosa* Linn. leaves by LC-DAD

Supansa Kantawong,[1] Somsak Tharatha,[2] Supaporn Sangsrichan*[,1]
[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, 50290, Thailand*
[2]*Central Laboratory (Thailand) Co.,Ltd., Chiang Mai, 50180, Thailand*
*e-mail: iamsupaporn@yahoo.com, Tel. +66 5387 3530

Abstract:

Annona squamosa Linn. has been used as drugs and pesticides. Phenolic compounds were one of active substances. In this research, the determination of phenols and flavonoids in *A. squamosa* Linn. leaves was studied using extraction methods such as maceration, Soxhlet, reflux and ultra sonication assisted extraction with methanol and ethanol as solvents. Determination of total phenolic compounds by Folin-Ciocalteu's phenol reagent assay was also performed. The ethanolic reflux extraction was selected as it provided the higher %crude yield, and total phenolic and total flavonoid contents but less toxicity than did methanolic one. Chemical components of the crude extracts were analysed by using HPLC-DAD. Gradient mobile phases were consisted of 10 mM ammonium formate buffer pH 4.0:acetonitrile. Tannic acid, catechin, rutin, isoquercetin and quercetin were found in ethanolic crude extracts.

1. Introduction

Annonaceae family has more than 2,000 species in the world.[1] It is one of the most important subtropical fruits from warm weather countries. The plants can be commonly grown in many provinces in Thailand. *Annona squamosa* Linn. or sugar apple is one of the most popular species of *Annona spp.* The tree can grow up to 3-5 metre high. The trunk is short and the bark is light brown. The leaves are thin and green color on both surfaces,[2] 7-13 centimetre long and 3-6 centimetre wide.

Annona spp. has been used as drugs and pesticides, those based on secondary metabolite compounds commonly called natural products.[3] Several bioactive chemical components such as alkaloids, flavonoids, phenolic compounds, phytosterols and tannins in this plant[4] have been reported. These compounds were known to have antibiotic, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. The antioxidants help to prevent some diseases such as cancer.[5] However, amino acids, carbohydrates, lipids, proteins, terpenes and essential oils were also typically found in these plants.[6]

The extraction methods were used liquid-liquid extractions such as maceration, Soxhlet extraction, reflux, sonication assisted extraction and microwave assisted extraction.[7] Common solvents were used ethyl acetate, hexane, acetone, ethanol, methanol, water and mix solvents.[8]

This research aimed to study the extraction conditions for flavonoids and phenolic compounds in *A. squamosa* leaves. Various type of solvents and extraction methods were optimized to achieve the high % yield, total phenolic and total flavonoid contents by colorimetry. Crude extracts obtained from optimal extraction conditions were further analyzed by using HPLC-DAD.

2. Materials and Methods

2.1 Raw materials

Leaves of *A. squamosa* from Chiang Mai province, Thailand were collected and cleaned by water, then dried

at room temperature, blended and kept at -20 °C in the dark until use.[9]

Ethanol and methanol solvents were purchased from Merck, USA. Gallic acid, tannic acid, catechin, rutin, isoquercetin, quercetin, hydroquinin, apiginin and kaempferol used in this experiment were purchased from Sigma-Aldrich company, Germany.

UV-Visible spectroscopy was analzed by Agilent technologies 8453 series, Germany. High performance liguid chromatography was performed by Agilent technologies 1100 series, Germany. Column was employed by a LichroCART RP-18e 150 × 4.6 mm, 5 micron Purospher STAR Merck, USA.

2.2 Sample extraction

Leaves of *Annona squamosa* Linn. were mixed with ethanol or methanol solvents at the ratio of 1:10 for all extraction methods. Four extraction methods were maceration by soaking at room temperature for 24 hours according to the method described by Z. Rafiee et.al.[10] sonication at room temperature for 1 hour according to the method described B. Yingngam et. al.[11] Soxhlet for 3 hours and reflux for 3 hours according to the method described by S. Zeidan et.al.[12]

The extracts were filtered by Whatman No.1 filter and evaporation to dryness at 60 °C by rotary evaporator. Crude extracts were obtained and kept in the dark below -20 °C until use.

2.3 Determination of total phenolic contents

Total phenolic content of crude extracts were determined according to the method reported by F. Menichini et.al.[13] The sample was prepared by dissolving 0.1 g of crude extract in 10 mL volumetric flask and adjusted to volume with water. 1 mL aliquot of crude extracts were taken into a test tube. Then 5 mL of 10% Folin–Ciocalteu reagent and 4 mL of 7% Na_2CO_3 were added sequentially in each tube. The solutions were incubated at room temperature for 60 minutes, and the absorbance was measured at 765 nm. The absorbance obtained was converted to gallic acid equivalent in mg per 100 gram of dry material (mg GAE/100 g) using gallic acid standard curve.

2.4 Determination of total flavonoid contents

Total flavonoid contents of crude extract were determined according to the method described by M. Kiranmai et.al.[14] Sample was prepared as the same as in 2.3. 0.5 mL aliquots of crude extract were taken into a test tube. Then 1.5 mL methanol, 0.1 mL of 1% aluminum chloride reagent and 0.1 mL of 1 M potassium acetate were added sequentially in each tube. The solutions were allowed to stand at room temperature for 30 minutes, and the absorbance was measured at 415 nm. The absorbance obtained was converted to catechin equivalent in mg per gram of dry material (mg catechin/100 g) using catechin standard curve.

2.5 Determination of polyphenolic compound by HPLC-DAD

A standard mixtures of gallic acid, tannic acid, catechin, rutin, isoquercetin, eriodictyol, quercetin, hydroquinin, apiginin and kaempferol at 1, 5, 10, 50 and 100 mg/L were injected into LC-DAD. The calibration curves were plotted between areas and concentrations of each components. In this work presents the determination of different phenolic substances was established based on the method of J. M. Peñarrieta et. al.[15]

Crude extracts were prepared by dissolving 0.1 g of dry crude in 50 mL acetonitrile and filtered by 0.45 µm Nylon filter prior to analysis.

LC-DAD conditions modified from J. M. Peñarrieta et al[15] were used. Mobile phase system consisted of acetonitrile (A) and 10 mM ammonium formate buffer pH 4.0 (B

LC-DAD conditions:

Inject volume: 20.0 µL
Flow rate: 1.0 ml/min
Column: LichroCART RP-18e 150 × 4.6 mm, 5 micron
Column temp.:40°C

Detector: diode array detector at 270 nm

Eluents: (A) acetonitrile
(B) 10 mM ammonium formate pH 4.0 adjust with formic acid

Gradient Conditions:

Time (min)	A%	B%
0-5	0	100
10-20	20	80
60	40	60

3. Results & Discussion

3.1 % crude yield

A. squamosa leaves were extracted with ethanol and methanol by maceration, Soxhlet, reflux and sonication were obtained as the %crude yield as seen in Table 1. Ethanolic reflux extraction gave the highest crude yield of 6.15%. The high % crude yield of ethanolic extract was reported by M. R. G. Vega et.al[16]. Reflux extraction gave high % yield when using both ethanol and methanol.

3.2 Determination of total phenolic content.

Standard curve of gallic acid for determination of total phenolic contents was shown in Figure 1. The linear equation for this curve was y = 0.0107x – 0.0899 (R^2 = 0.9992). Methanolic reflux extraction gave the highest total phenolic contents was 748 mg gallic acid/100 g (see Table 1).

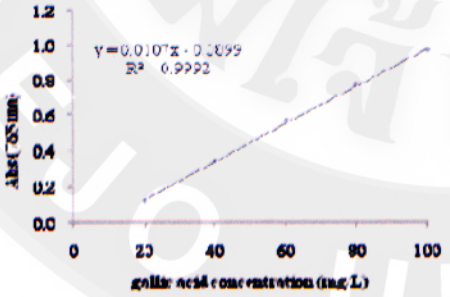


Figure 1. Gallic acid standard calibration curve.

3.3 Determination of total flavonoid contents

Catechin standard calibration curve for determination of total flavonoid content was shown in Figure 2. The equation for the this curve was y = 0.0098x + 0.0521 (R^2 = 0.9964). Methanolic and ethanolic reflux extraction gave high total flavonoid contents of 197.89 and 191.57 mg catechin/100g, respectively (see Table 1).

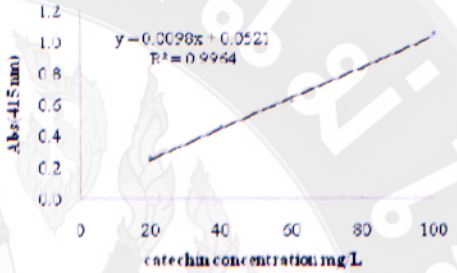


Figure 2. Catechin standard calibration curve.

However, methanol was toxic more than ethanol,[17,18] then ethanolic reflux could be used because it gave the highest total phenolic and total flavonoids contents. Our report agreed well with those reported.[19–21] The chemical components of the crude extracts were analysed by using HPLC-DAD and confirmed the result by using mass spectrometry.

3.4 Determination of polyphenolic compounds by HPLC-DAD

Standard calibration curves of gallic acid, tannic acid, catechin, rutin, isoquercetin, eriodictyol, quercetin, hydroquinin, apiginin and kaempferol were found $R^2 \geq 0.995$. Crude extracts analysed by using HPLC-DAD were found to contain tannic acid, catechin, rutin, isoquercetin and quercetin at 87.17, 156.19, 2209.30, 118.23 and 3435.02 mg/kg, respectively as seen in Table 2. The chemical component in *A.squamosa* were agreed with the previous reports.[22–24]

Table 1. % crude yield, total phenolic and total flavonoids contents in various types of solvents and extraction methods.

solvent	extraction method	% yield	total phenolic content (mg gallic acid/100g)	total flavonoid content (mg catechin/100g)
ethanol	maceration	4.27±0.44	402.8±5.86	99.03±1.15
	sonication	3.98±0.14	358.39±5.24	123.64±1.13
	Soxhlet	3.57±0.36	543.02±0.35	120.39±3.39
	reflux	6.15±1.19	575.84±0.09	191.57±1.74
methanol	maceration	4.31±0.13	530.35±3.54	161.28±4.45
	sonication	2.14±1.58	339.21±0.28	160.83±2.35
	Soxhlet	3.03±0.17	579.74±3.09	187.58±2.63
	reflux	5.00±0.15	748.00±0.14	197.89±1.30

Table 2. Chemical components of the crude extracts were analyzed by using HPLC-DAD.

Phenolic compound	RT (min)	equation of standard curve	R^2 (n=3)	crude ethanolic extract (mg/kg)
gallic acid	6.4	y = 1,081.8x + 1,641.9	0.9986	-
tannic acid	12.5	y = 19,600.7x + 25,664.7	0.9957	87.17±0.32
catechin	13.0	y = 3,068.7x - 3,000.1	0.9953	156.19±0.31
rutin	15.2	y = 8,339.0x - 6,698.7	0.9992	2209.30±1.71
isoquercetin	16.3	y = 9,062.6x - 8,396.1	0.9969	118.23±0.25
quercetin	30.9	y = 3,326.3x + 5,696.1	0.9957	3435.02±54.86
hydroquinin	33.2	y = 3,901.1x - 2,553.6	0.9997	-
apiginin	40.5	y = 2,614.1x + 2,145.1	0.9999	-
kaempferol	41.4	y = 3,454.4x + 2,121.4	0.9998	-

4. Conclusion

Good extraction solvents for *A. squamosa* Linn. leaves were both ethanol and methanol. However, methanol is toxic more than ethanol, hence ethanol would be an extracted solvent. Ethanolic reflux extraction at 3 hours was the best condition that gave the highest crude yield of 6.15%, total phenolic contents was 575.84 mg gallic acid/100g and total flavonoid content was 191.57 mg CE/100g. Tannic acid, catechin, rutin, isoquercetin and quercetin were identification by comparision with authentic standard compounds. Tannic acid, catechin, rutin, isoquercetin and quercetin were found at 87.17, 156.19, 2209.30, 118.23 and 3435.02 mg/kg, respectively in *A. squamosal*.

Acknowledgements

This research was supported by Department of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand and Central Laboratory (Thailand) Co.,Ltd., Chiang Mai, 50180, Thailand.

References

1. Xu, F.; Ronse De Craene, L. *Ann. Bot.* **2010**, *106*, 591–605.
2. Julián-Loaeza, A. P.; Santos-Sánchez, N. F.; Valadez-Blanco, R.; Sánchez-Guzmán, B. S.; Salas-Coronado, R. *Ind. Crops Prod.* **2011**, *34*, 1262–1268.
3. Williams, D. A.; Lemke, T. L. Chapter 1: Natural Products: Foye's Principles of Medicinal Chemistry; Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, **2002**, pp 25.

4. Jamkhande, P. G.; Wattamwar, A. S. *J Tradit. Complement Med.* **2015**, *5*, 144–152.
5. Loizzo, M. R.; Tundis, R.; Bonesi, M.; Menichini, F.; Mastellone, V.; Avallone, L.; Menichini, F. *J. Food Compos. Anal.* **2012**, *25*, 179–184.
6. Nava-Dı´az, C. S.; Osada-Klavasoe, S.; Redo´ n-Sa´ nchez, G.; Ayala-Escobar, V. *Agrocie´ncia* **2000**, *34*, 217–226.
7. Dean J. R. Extraction Methods for Environmental Analysis. John wiley and son, 1998, pp 15–166.
8. Chemat, F.; Vian, M. A.; Cravotto, G. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 8615–8627.
9. Markert, B. *Sci. Total Environ.* **1995**, *176*, 45–61.
10. Rafiee, Z.; Jafari, S. M.; Alami, M.; Khomeiri, M. *J. Anim. Plant Sci.* **2011**, *21*, 738–745.
11. Yingngam, B.; Monscheinl, M.; Brantner, A. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2014**, *7*, 497–505.
12. Zeidan, S.; Hijazil, A.; Rammal, H.; Kobaissi, A.; Badran, B. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *3*, 1889–1898.
13. Menichini, F.; Tundis, R.; Bonesi, M.; Loizzo, M. R.; Conforti, F.; Statti, G.; de Cindio, B.; Houghton, P. J. *Food Chem.* **2009**, *114*, 553–560.
14. Kiranmai, M.; Usha Sri, B.; Ibrahim, M.; Mahendra Kumar, C. B. *J. Med. Plants Res.* **2012**, *6*, 5737–5742.
15. Peñarrieta, J. M.; Alvarado, J. A.; Kesson, B.; Bergenståhl, B. *Bolivian Journal of Chemistry* **2007**, *24*, 1–4.
16. Vega, M. R. G.; Esteves-Souza, A.; Vieira, I. J. C.; Mathias, L., Braz-Filhob, R.; Echevarria, A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 1554–1559.
17. Juna, C.; Xueb, Y.; Liua, R.; Wanga, M. *Molecular and Biomolecular* **2011**, *79*, 1406–1410.
18. https://en.wikipedia.org/wiki/Methanol . (retrieved 25 December 2015)
19. Wong-Paza, J. E.; Contreras-Esquivela, J. C.; Rodríguez-Herreraa, R.; Carrillo-Inungarayb, M. L.; Lópeza, L. I.; Nevárez-Moorillónc, G. V.; Aguilara, C. N. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2015**, *8*, 104–111.
20. Jorgea, A. J.; Heliodoro De La Garzab, T.; Cruz Alejandroa, Z.; Rutha, B. C. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2013**, *3*, 436–442.
21. Zhang, S.; Bi, H.; Liu, C. *Sep. Purif. Technol.* **2007**, *57*, 277–282.
22. Roesler, R.; Catharino, R. R.; Malta, L. G.; Eberlin, M. N.; Pastore, G. *Food Chem.* **2007**, *104*, 1048–1054.
23. García-Salas, P.; Gómez-Caravaca, A. M.; Morales-Soto, A.; Segura-Carretero A. *Food research International* 2015
24. Pandey, N.; Barve, D. *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* **2011**, *2*, 1404–4012.

The study of chemical components in *Annona squamosa* Linn. leaves by LC-DAD

Supansa Kantawong[1], Somsak Tharatha[2], Supaporn Sangsrichan[1]*

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, 50290, Thailand

[2]Central Laboratory (Thailand) Co.,Ltd., Chiang Mai, 50180, Thailand

*e-mail: iamsupaporn@yahoo.com, Tel. +66 5587 3530

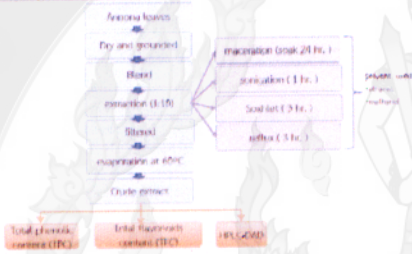
Introduction

Annonaceae family have more than 2,000 species in the world. It is one of the most important subtropical fruits from warm weather countries. The plants can be commonly found in many provinces in Thailand. *Annona squamosa* Linn. or sugar apple is one of the most popular species of Annona spp.

Annona spp. has been used as drugs and pesticides. These have secondary metabolite components commonly called natural products. Several bioactive chemical components such as alkaloids, flavonoids, phenolic compounds, polyisoprenes and terpene in this plant have been reported. These components were antibiotic activity, antimycobial, insecticidal activity and antioxidants. The antioxidants help to prevent many diseases such as cancer. However, amino acids, carbohydrates, lipids, proteins, terpenes and essential oils were also typically found in these plants.

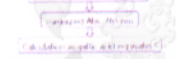
This research was aimed to study the extraction conditions for flavonoids and phenolic compounds in *Annona* leaves. Various type of solvents and extraction methods were optimized to achieve the high % yield, total phenolic and total flavonoid contents by colorimetry. Crude obtained from optimal extraction conditions were further analysed by using HPLC-DAD.

Methodology



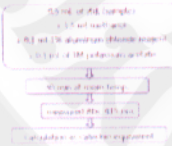
I. Determination of total phenolic contents

Standard curve: Gallic acid 20, 40, 60, 80 and 100 mg/L



II. Determination of total flavonoid contents

Standard curve: Catechin 20, 40, 60, 80 and 100 mg/L



III. Determination of polyphenolic compound by HPLC-DAD

A standard mixtures of gallic acid, tannic acid, catechin, rutin, isoquercitrin, vitexin, quercetin, hydroxycamin, apigenin and kaempferol at 1, 5, 10, 50 and 100 mg/L were injected into LC-DAD.

LC-DAD condition:

Inject volume:	20.0 µl
Flow rate:	1.0 ml/min
Column:	Luna® AQ, 85-Å, 150 × 4.6 mm, 5 micron
Column temp:	25°C
Detector:	diode array detector at 270 nm
Eluents:	(A) acetonitrile
	(B) 10 mM ammonium formate pH 4.0

Gradient Conditions:

Time (min)	A%	B%
0-5	5	100
15-20	20	80
40	40	60

Results & Discussion

Annona squamosa leaves extracted with ethanol and methanol by maceration, soxhlet, reflux and sonication were obtained the crude yield as seen in Figure 1.

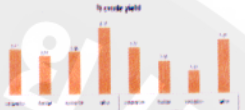


Figure 1. % crude yield were various type of solvents and extraction method

Standard curve of gallic acid for determination of total phenolic content and catechin standard calibration curve for determination of total flavonoid content are shown in Figure 2 and 3.

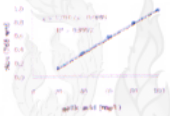


Figure 2. Gallic acid standard calibration curve.

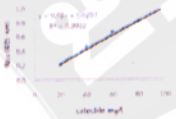


Figure 3. Catechin standard calibration curve.

Methanolic reflux extraction gave the highest total phenolic contents (at 748 mg gallic acid/100g). Methanolic and ethanolic reflux extraction gave the highest total flavonoid contents were 197.89 and 191.57 mg catechin/100g, respectively (see Figure 4).

Figure 4. The determination of total phenolic and total flavonoid contents

Determination of polyphenolic compound by HPLC-DAD

Standard calibration curves of gallic acid, tannic acid, catechin, rutin, isoquercitrin, chlorogenic, quercetin, hydroxycamin, apigenin and kaempferol were found $R^2 \geq 0.995$. Crude extracts analysed by using HPLC-DAD were found tannic acid, catechin, rutin, isoquercitrin and quercetin at RT: 15.6 (), 22.9 30, 11.8 23 and 38.5 62 min, respectively as seen in Table 1. The chemical compounds in *Annona squamosa* Linn. were agreed with reported by other authors[2].

Table 1 Chemical components of the crude extracts were analysed by using HPLC-DAD

Phenolic compounds	RT (min)	equation of standard curve	R^2 (n=3)	Concentration (mg/kg)
gallic acid	6.4	y = 1,788.8x + 1,441.3	0.9986	[illegible]
tannic acid	12.3	y = 18,669.7x + 25,664.7	0.9951	87,1[illegible].32
catechin	15.0	y = 3,268.1x + 1,890.1	0.9955	156,[illegible].31
rutin	18.2	y = 8,498.6x + 6,498.3	0.9992	2,079,[illegible].13
isoquercitrin	18.3	y = 7,282.6x + 8,374.1	0.9969	118,[illegible].29
quercetin	38.8	y = 3,325.3x + 3,698.1	0.9957	365,[illegible].86
hydroxycamin	41.2	y = 2,991.1x + 2,503.8	0.9970	
apigenin	45.5	y = 2,615.1x + 2,149.1	0.9999	
kaempferol	51.8	y = 3,844.8x + 7,171.4	0.9998	

Conclusion

Good extraction solvents for *Annona squamosa* Linn. leaves were both ethanol and methanol. However, methanol is more than ethanol, hence ethanol would be a solvent of choice. Ethanolic reflux extraction at 3 hours was the best condition that gave the highest crude yield of 6.1%. Total phenolic contents was 575.98 mg gallic acid/100g and total flavonoid content was 191.57 mg CT/100g. Identification were carried out by using authentic standard chemical compounds in *Annona squamosa* Linn. Tannic acid, catechin, rutin, isoquercitrin and quercetin were found in ethanolic crude extracts at RT 11, 15.6 19, 22.9 30, 11.8 23 and 38.5 62 min/s, respectively.

Acknowledgements

This research was supported by Department of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai of Thailand and Central Laboratory (Thailand) Co.,Ltd., Chiang Mai, 50180, Thailand.

References

1. Kanthiya, P., Tyrchi, N., Sinsua, W., Chinn, M.M., Vichitphan, K., Vichitphan, O., Vichitphan, W., Food Chemistry 2009, 114, 550-560.
2. Inkhong, M., 2006, M. S. Thesis, M. Mahanthi Higher Co. ed. Journal of Medicinal Plants Research 2012, vol.6(1), 5797-5782.
3. Pongsamart, S., Phasuk, J., Sriwan, S., Sangsrikul, K. Science Journal of Chemistry Thai, 2011, 1-4.
4. Rosette, R., Gathumbi, K. K., Mathu, C., G. Ebuchi, M. N., Parkinson, G. Food Chemistry 2007, 104, 1048-1054.

PACCON 2016