

รายงานการวิจัย
ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2549-2550

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ด้านการเกิดอนุมูลอิสระ และสารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากผัก
พื้นบ้านของไทย

(Investigation of antimicrobial and antioxidative activity and major active compounds of Thai local
vegetable extracts)



RCH
RS
180
- T5
๗86๗๓

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... **84476**
วัน,เดือน,ปี..... **13 ต.ค. 2551**

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

๖. 11๙๙๒๖๑๐

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ขออนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้านไทยจำนวน 20 ชนิดและคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด 19 ชนิดพบว่าสารสกัดหยาบจากพืช 4 ชนิดซึ่งสกัดด้วยเมทานอลได้แก่ ใบชะมวง (*Garcinia cowa*) ใบขี้เหล็ก (*Cassia siamea*) ใบแขยง (*Limnophila aromatica*) และใบแพรว (*Polygonum odoratum*) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านจุลินทรีย์ได้ดีจึงได้คัดเลือกมาศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ ต่อไปได้แก่ ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (cytotoxicity) และคุณสมบัติการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งช่องปาก (human oral epidermal carcinoma, KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (breast adenocarcinoma, MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (small cell lung carcinoma, NCI-H187) แบคทีเรียชนิดที่มีความไวต่อการถูกยับยั้งด้วยสารสกัดผักเหล่านี้คือ *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* ในบรรดาสารสกัดทั้งหมดที่นำมาวิเคราะห์ สารสกัดจากใบแพรวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดและมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 315.35 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากใบแพรวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ทดสอบ (vero cells) โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ในระดับปานกลาง ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นได้วิเคราะห์หาชนิดของสารสำคัญในใบแพรวโดยใช้วิธี HPLC พบสารฟลาโวนอยด์หลัก ๆ จำนวน 5 ชนิดได้แก่ รูทีน คาเทชิน ควอเซทิน เคมเฟอรอล และไอโซเรเมนิทิน โดยสารชนิดที่พบมากที่สุดในใบแพรวคือ รูทีน ซึ่งมีปริมาณร้อยละ 3.77 น้ำหนักโดยน้ำหนักของสารสกัดแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Twenty species of Thai local vegetables were screened for their antioxidant and antimicrobial activities against 19 microbial strains. Methanolic extracts of four plant species, leaves of *Garcinia cowa*, *Cassia siamea*, *Limnophila aromatica* and *Polygonum ordoratum* showing high activities were selected to determine the minimum inhibitory concentration, and evaluate for their cytotoxicity and anticancer activity against human oral epidermal carcinoma (KB), breast adenocarcinoma (MCF-7) and small cell lung carcinoma (NCI-H187). The sensitive bacteria to these vegetable extracts were *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Of all extracts tested, the extract of *P. ordoratum* had the highest phenolic content and antioxidant activity with EC₅₀ value of 315.35 µg extract/ mg DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). In addition, cytotoxicity of *P. ordoratum* extract against vero cells was not found (IC₅₀ value of > 50 µg/ml), and this extract was moderately active against breast adenocarcinoma (IC₅₀ value of 6.01 µg/ml). Major types of active compounds were identified by HPLC method. Main types of flavonoids found in *P. ordoratum* were rutin, catechin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin. Among all compounds, rutin was found in the highest amount (3.77% w/w dry extract).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	33
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	41
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	56
บรรณานุกรม	58
ภาคผนวก	63



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 โครงสร้างสารต้านออกซิเดชันชนิดต่างๆ	3
รูปที่ 2.2 กลไกการทำงานของ phenolic antioxidant ในไขมันหรือน้ำมัน	4
รูปที่ 2.3 สารฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันแยกได้จาก <i>Polygonum hydropiper</i>	6
รูปที่ 2.4 คอุมาริน (Coumarin) สารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ	7
รูปที่ 2.5 แซนโทนที่แยกได้จาก <i>Garcinia subelliptica</i>	7
รูปที่ 2.6 แผนภาพแสดงการจำแนกชนิดของโครมาโตกราฟีโดยแบ่งตามธรรมชาติของ mobile phase, stationary phase เทคนิคการจัดวาง stationary phase และกลไกการแยก	12
รูปที่ 2.7 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC	17
รูปที่ 2.8 การหาจำนวนเพลททางทฤษฎีของคอลัมน์	25
รูปที่ 2.9 resolution ในโครมาโตแกรม liquid chromatography	26
รูปที่ 2.10 การหาค่าความสมมาตรของพีค	26
รูปที่ 2.11 การเลือก Mode ของการแยกตามธรรมชาติของตัวอย่าง	28
รูปที่ 4.1 โครมาโตแกรมของสารสำคัญที่พบในสารสกัดจากผักแพรว: วัดการดูดกลืนแสงที่ 297 นาโนเมตร	52
รูปที่ 4.2 โครมาโตแกรมของสารสำคัญที่พบในสารสกัดจากผักแพรว: วัดการดูดกลืนแสงที่ 368 นาโนเมตร	53
รูปที่ 4.3 โครงสร้างของสารสำคัญที่พบในสารสกัดจากผักแพรว	54
รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานของ catechin	78
รูปที่ ง.2 กราฟมาตรฐานของ Rutin	79
รูปที่ ง.3 กราฟมาตรฐานของ Quercetin	80
รูปที่ ง.4 กราฟมาตรฐานของ Kaempferol	81
รูปที่ ง.5 กราฟมาตรฐานของ Isorhamnetin	82
รูปที่ ง.6 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน catechin ในการทำกราฟมาตรฐาน	87
รูปที่ ง.7 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน (1) rutin (2) quercetin (3) kaempferol และ (4) isorhamnetin	87
รูปที่ ง.8 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน (1) rutin (2) quercetin (3) kaempferol และ (4) isorhamnetin ในการทำกราฟมาตรฐาน	88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

ผักพื้นบ้าน หมายถึงพรรณพืชผักพื้นบ้านหรือพรรณไม้พื้นเมืองในท้องถิ่นที่ชาวบ้านนำมาบริโภค เป็นผักตามวัฒนธรรมการบริโภคของท้องถิ่น ในแหล่งธรรมชาติ สวนไร่นาหรือชาวบ้านนำมาปลูกไว้ใกล้บ้านเพื่อสะดวกในการเก็บมาบริโภค ผักพื้นบ้านที่พบเห็นโดยทั่วไปนั้น มีทั้งผักที่เป็นของไทยแต่ดั้งเดิมและ ผักที่นำเข้ามาจากต่างประเทศซึ่งได้นำมาปลูกในประเทศไทยนานจนปรับเข้ากับสภาพแวดล้อมของไทย ได้มีผู้สำรวจผักพื้นบ้านที่วางขายในตลาดสดในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทยพบว่าผักพื้นบ้านชนิดต่างๆ 240 ชนิด ประชาชนได้นำผักพื้นบ้านชนิดต่างๆมาบริโภคกันมาก กองโภชนาการ กระทรวงสาธารณสุข ได้วิเคราะห์หาสารอาหารในผักพื้นบ้าน พบว่าผักพื้นบ้านส่วนใหญ่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง นอกจากนี้ยังมีเส้นใยอาหารช่วยป้องกันท้องผูก และช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ด้วย (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน, 2538)

ในปัจจุบัน ได้มีผู้ตระหนักถึงคุณค่าของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากผักพื้นบ้านที่เป็นสมุนไพรกันมาก เพื่อใช้เป็นอาหารและยารักษาโรค และอาจใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยผักพื้นบ้านบ้างแต่ยังไม่มากนัก ดังเช่นการรายงานของ Triratana และ Thaweboon (1987) ได้ศึกษาเกี่ยวกับผลการยับยั้ง *Streptococcus* โดยสมุนไพรบางชนิดนอกจากนี้ Limsong และคณะ (2004) ยังได้รายงานถึงผลการยับยั้ง *Streptococcus mutans* โดยสารสกัดจากสมุนไพรทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *Andrographis paniculata*, *Cassia alata*, *Camellia sinensis* (ชาจีน), *Psidium guajava* (ฝรั่ง), *Harrisonia perforata* และ *Streblus asper* ซึ่งพบว่า ชาจีนมีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะของ *S. mutans* ได้ดีที่สุดใน รองลงมาคือ *Andrographis paniculata*, *Cassia alata* และ *Harrisonia perforata* สำหรับคุณสมบัติการต้านการเกิดอนุมูลอิสระในพืช ผัก ัธุ์พืช ชา และอาหารอื่น ๆ นั้น ได้มีผู้รายงานไว้เช่นกัน (Larson, 1988; Shahidi, 2000) สารต้านอนุมูลอิสระมีหน้าที่ช่วยป้องกันการทำลายขององค์ประกอบเซลล์ ซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระ (Ames และคณะ, 1990) สารต้านอนุมูลอิสระที่มีในพืชชั้นสูง เป็นสารโพลีฟีนอล (polyphenols) สารนี้ช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ ด้านมะเร็ง ด้านการอักเสบ ด้านไวรัส ด้านการแพ้ และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ เป็นผลเนื่องมาจากคุณสมบัติรีดออกซ์ของสารโพลีฟีนอลซึ่งสารนี้กระทำตัวเป็นสารรีดิวซิ่ง เป็นตัวให้ไฮโดรเจน และขจัดอนุมูลออกซิเจนเดี่ยวนอกจากนี้โพลีฟีนอลยังมีบทบาทเกี่ยวกับ metal chelation อีกด้วย (Larson, 1988; Parr และ Bolwell, 2000) นักวิจัยหลายท่าน ได้ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในผักสมุนไพรบ้าง แต่ยังมีข้อมูลไม่มากนัก จึงน่าสนใจที่จะศึกษาคุณสมบัติดังกล่าวในผักพื้นบ้านของไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายชนิดที่มีสรรพคุณทางยาเช่น ชะอม ผักชีลาว ยี่หระ ขี้เหล็ก บัวบก ตำลึง หอมแฮ้ ผักกูด ผักชีฝรั่ง
ชะมวง ผักหนาม ผักแขยง มะระจีน กยอ แมงลัก ผักเพรว ดอกแค โสน ผักคราด และย่านาง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหายาจากผักพื้นบ้านของไทยต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหายาจากผักพื้นบ้านของไทยต่อการต้านอนุมูลอิสระ
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติการต้านมะเร็งและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดหายาจากผักพื้นบ้าน
ที่คัดเลือก
4. เพื่อจำแนกชนิดและหาปริมาณสารสำคัญซึ่งออกฤทธิ์ในผักพื้นบ้านที่มีคุณสมบัติสูงในการต้าน
จุลินทรีย์ ต้านการเกิดอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็ง



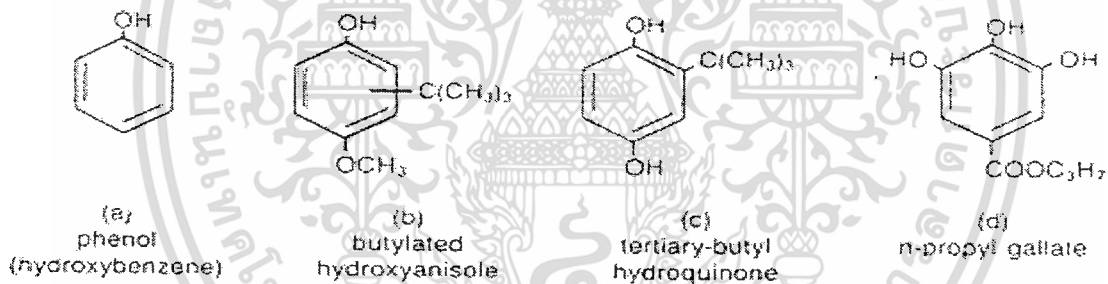
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

2.1 สารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

สารต้านออกซิเดชันในอาหาร (food antioxidants) เป็นสารประกอบที่ช่วยในการยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (free-radical autooxidation reaction) ซึ่งทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยานี้เป็นพื้นฐานของการเกิดออกซิเดชันของกลีเซอไรด์ (glyceride oxidation) ความสามารถในการต้านออกซิเดชันเกิดขึ้นจากโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก หรือ Phenolic configuration ภายในโครงสร้างของโมเลกุล (รูปที่ 2.1) ดังนั้นสารต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหลักในอาหารประเภทไขมันและน้ำมันหรืออาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบคือสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) และโดยทั่วไปแล้วสารประกอบฟีนอลิกก็คือ phenolic antioxidant (Sherwin, 1990)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างสารต้านออกซิเดชันชนิดต่างๆ

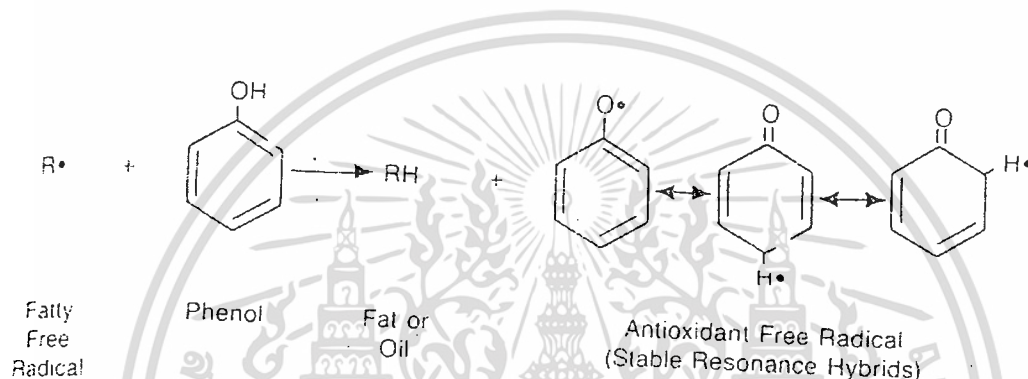
(a) ฟีนอล (b, c, d) ฟีนอลิกแอนติออกซิเดนต์

ที่มา: Sherwin (1990)

กิจกรรมของสารประกอบฟีนอลิกในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังรูปที่ 2.2 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าฟีนอลทำหน้าที่เป็นตัวให้โปรตอน (proton donor) ซึ่งจะชะลอการสร้างอนุมูลอิสระของกรดไขมัน (R') ในขั้นแรก ดังนั้นจึงช่วยชะลอการเริ่มต้นของการเกิดออกซิเดชันของไขมันหรือน้ำมัน (RH) อนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยานี้ไม่เหมือนกับอนุมูลอิสระของกรดไขมันคือไม่มีความสามารถในการเริ่มต้นหรือทำให้ออกซิเดชันของไขมันหรือน้ำมันดำเนินต่อไปได้ สิ่งนี้ชี้ให้เห็นว่าสารต้านออกซิเดชันไม่ได้ช่วยในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพียงแต่ช่วยชะลอการเริ่มต้นของปฏิกิริยาเท่านั้น การชะลอให้ปฏิกิริยาเกิดช้าลงนี้ขึ้นอยู่กับกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันที่เฉพาะและความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันและยังขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ความร้อน แสง โลหะ และสารโปรออกซิแดนซ์ (prooxidant) ที่มีอยู่ และมีรายงานว่า การใช้สารต้านออกซิเดชันที่เป็นสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic antioxidant) จะให้ประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อเติมลงไปอย่างรวดเร็วทันทีเพียงพอที่ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระของกรดไขมันซึ่งเป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ สารประกอบนี้ไม่ได้ทำหน้าที่เป็นตัวดูดออกซิเจน (oxygen absorber) แต่ช่วยป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระของกรดไขมันที่จะทำปฏิกิริยาหรือดูดออกซิเจนในกระบวนการออกซิเดชัน (Sherwin, 1990)



รูปที่ 2.2 กลไกการทำงานของ phenolic antioxidant ในไขมันหรือน้ำมัน
ที่มา: Sherwin (1990)

2.1.1 สารต้านออกซิเดชันจากผักและผลไม้

อนุมูลอิสระ (free radicals) ถูกสร้างขึ้นในร่างกายจากเมแทบอลิซึมปกติของร่างกาย ตัวอย่างเช่น ซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot -}$) และไนตริกออกไซด์ (NO^{\cdot}) ซึ่งมีหน้าที่ที่สำคัญทางสรีรวิทยา โดยทั่วไป อนุมูลอิสระสามารถทำปฏิกิริยาได้สูง (highly reactive) และสามารถกระทำกับไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ ให้อนุมูลคาร์บอน (carbon radical) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนให้อนุมูลเปอร์ออกซิล (peroxyl radical) ซึ่งอาจกระทำกับกรดไขมันที่อยู่ติดกันให้อนุมูลคาร์บอน โมเลกุลใหม่ กระบวนการนำไปสู่การเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ให้ผลิตภัณฑ์จาก lipid peroxidation (Halliwell, 1994) โดยวิธีนี้อนุมูลอิสระอาจทำลายหลายๆ โมเลกุล โดยเป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาลูกโซ่ของ lipid peroxidation การที่ธรรมชาติของอนุมูลอิสระซึ่งมีศักยภาพสูงในการเข้าทำลาย ร่างกายจึงมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) คตะเลส (catalase) มีการขนส่งธาตุเหล็ก ทองแดงและโปรตีนที่เก็บไว้ (storage protein) และ โมเลกุลของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่ละลายได้ในน้ำและละลายได้ในไขมัน ร่างกายอาจเกิด oxidative stress ขึ้นได้ถ้ากลไกเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การต้านอนุมูลอิสระไม่สามารถต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้และอาจเป็นผลจากการกระทำของสารพิษบางชนิดหรือการกระทำของสภาพเครียด (physiological stress) ของร่างกาย (Halliwell, 1994)

ในผักและผลไม้มีสารต้านออกซิเดชันหลายชนิดที่ผลดีต่อสุขภาพ ผักและผลไม้เป็นแหล่งของสารแอนติออกซิเดนต์ที่ช่วยเพิ่มความสามารถของพลาสมาในการต้านการออกซิเดชัน (plasma antioxidant capacity) เป็นผลให้เกิดการต้านโรค atherosclerosis related diseases ในคน (Cao และคณะ, 1998) สารต้านออกซิเดชันที่พบส่วนใหญ่ในผักผลไม้เป็นสารฟลาโวน (flavone) แอนโทไซยานิน (anthocyanin) และสารที่เกี่ยวข้อง (Davidson และ Zivanovic, 2003) จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารที่อยู่ในผักและผลไม้มีส่วนช่วยไม่ให้เกิดโรคกระเพาะและโรคหัวใจ ได้มีการศึกษาคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันในผักหลายชนิด ได้แก่ ผักที่มาจากรากและหัว เช่น แครอท มันฝรั่ง มันเทศ เรดบีท (red beet) ผักกะหล่ำปลี ถั่วถั่วฝักยาว บร็อคโคลี่ ผักกาดหอม ผักโขม (spinach) หัวหอม มันฝรั่ง และผักชนิดอื่นๆ (Yanishlieva - Maslarova, 2001) Karakaya และ Kavas (1999) ได้รายงานไว้ว่า ส่วนประกอบ (dietary component) ที่มีอยู่ในผักและผลไม้ที่กระทำตัวในฐานะของสารแอนติออกซิเดนต์ได้แก่ เส้นใยอาหาร (fibre) โพลีฟีนอล (polyphenol) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) คอนจูเกตไอโซเมอร์ของกรดลิโนเลอิก (conjugated isomers of linoleic acid) ดี-ลิโมนีน (D-limonene) อีพิแกลโลคาเทชิน (epigallocatechin) คาเทชิน (catechin) แกลเลต (gallate) โปรตีนจากถั่วเหลือง ไอโซฟลาโวน (isoflavones) วิตามิน เอ บี ซี อี (vitamins A, B, C, E) โทโคเฟอรอล (tocopherols) แคลเซียม คลอโรฟิลลิน (chlorophyllin) อะลิฟาริน (alipharin) ซัลไฟด์ (sulphides) เตตราไฮโดรคูเรคูมิน (tetrahydrocurecumin) ซีซามินอล (sesaminol) กลูตาไทโอน (glutathione) กรดยูริก อินโดล (indoles) ไทโอไซยาเนต (thiocyanates) และสารยับยั้งโปรตีเอส (protease inhibitors)

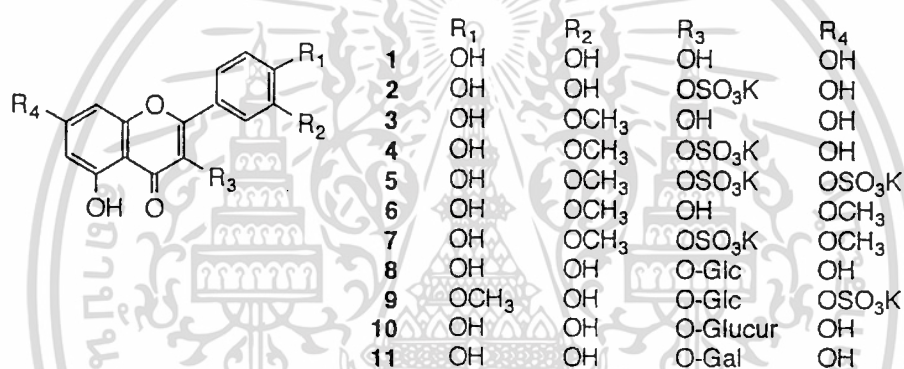
สารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และกรดฟีนอลิก (phenolic acid) ที่มีอยู่ในผักผลไม้ สามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ และที่สำคัญที่สุดคือเป็นตัวจับอนุมูลอิสระ โดยสารโพลีฟีนอลสามารถทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ (free radical chain reaction) สำหรับสารที่จะเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้จะต้อง 1) เมื่อมีอยู่ในระดับความเข้มข้นต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ oxidizable substrate จะสามารถชะลอหรือป้องกันการเกิดออกซิเดชันของสับสเตรทได้ และ 2) อนุมูลอิสระที่เกิดจากสารโพลีฟีนอลจะต้องคงตัวเพื่อจะได้ป้องกันตัวเองในการเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain propagating radical) (Halliwell และคณะ, 1995) กรดฟีนอลิกอาจเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยเฉพาะสารที่มีโครงสร้างประเภท catechol-type structure เช่นกรดคาเฟอิก (caffeic acid)

2.1.1.1 ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่พบตามธรรมชาติ สารประกอบฟีนอลิกพบได้หลากหลายชนิดในพืชชั้นสูงและปกติพบในผัก ผลไม้ เครื่องดื่ม (ชา และไวน์) คุณสมบัติของฟลาโวนอยด์ในการต้านออกซิเดชันและการจับกับอนุมูลอิสระได้มีการศึกษากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่อผู้เห็นว่าเป็นประโยชน์ในการค้นคว้าวิจัยใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างดีแล้ว การศึกษาก่อนหน้านี้ Haraguchi และคณะ (1992) ได้แยกสารฟลาโวนอยด์ออกจากพืชสกุลเดียวกันกับผักแพรวที่มีชื่อว่า *Polygonum hydropiper* พืชชนิดนี้เป็น medicinal herb ที่ใช้เป็นเครื่องเทศในการปรุงอาหารญี่ปุ่น สารที่แยกได้จากพืชชนิดนี้คือ sulfated, methylated and glycosidal flavonoids สารประกอบเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) และป้องกันการสร้าง superoxide anion ในบรรดาสารฟลาโวนอยด์หลายชนิดที่พบในพืชชนิดนี้พบว่า สารควอเซทิน (quercetin) (หมายเลข 1 ในรูปที่ 2.3) ไอโซรามาเนทิน (isorhamnetin) (หมายเลข 3 ในรูปที่ 2.3) และเรามาซีน (rhamnazin) (หมายเลข 6 ในรูปที่ 2.3) มีศักยภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันซึ่งถูกชักนำโดย Fe (III) ADP/NADPH (Haraguchi, 2001)

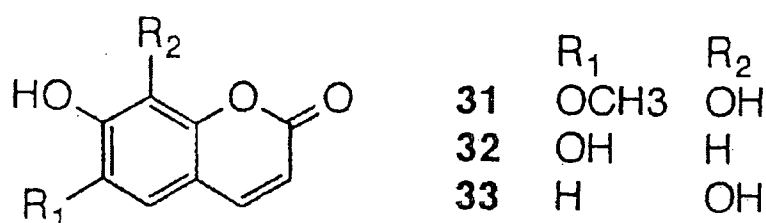


รูปที่ 2.3 สารฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันแยกได้จาก *Polygonum hydropiper* ที่มา : Haraguchi (2001)

2.1.1.2 ควอมาริน

สารควอมาริน (coumarins) ซึ่งเป็นเบนโซไพโรน (α -pyrone) เป็นสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มใหญ่ซึ่งพบมากในพืช (รูปที่ 2.4) Payá และคณะ (1992) ได้ทดสอบผลของควอมารินกับสารที่ใช้ทดแทนอื่นๆต่อการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมันและอนุมูลอิสระของออกซิเจนบางชนิด ซึ่งในบรรดาควอมารินที่ได้จากพืชพบว่าสาร fraxetin (หมายเลข 31 ในรูปที่ 2.4) esculetin (หมายเลข 32 ในรูปที่ 2.4) และ dephnetin (หมายเลข 33 ในรูปที่ 2.4) ซึ่งเป็น *o*-dihydroxy substitutions ที่มีประสิทธิภาพในการเป็นตัวยับยั้งของปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (microsomal lipid peroxidation) ซึ่งชักนำโดย Fe³⁺ - ascorbate

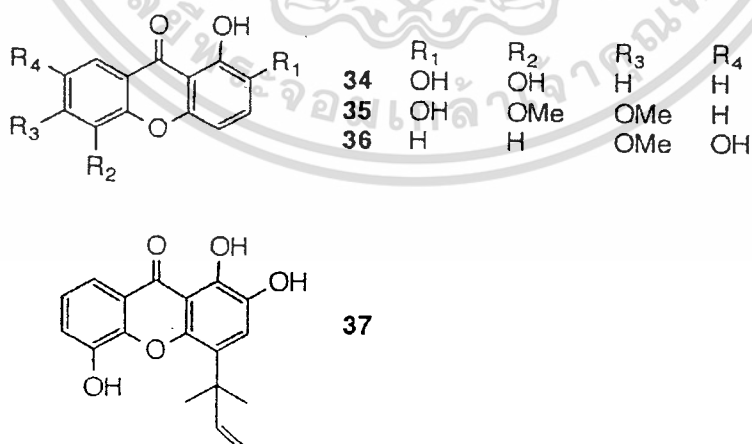
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 คอวาริน (Coumarin) สารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ
ที่มา : Haraguchi (2001)

2.1.1.3 แซนโทน

แซนโทน (xanthenes) ประกอบด้วย γ -pyrone เหมือนกับฟลาโวนอยด์ และมีกิจกรรมชีวภาพกว้าง Minami และคณะ (1994) ได้แยกสารไฮดรอกซีแซนโทน hydroxyxanthone จากเนื้อไม้ของต้นพืชสกุลเดียวกับชะมวงคือ *Garcinia subelliptica* และได้ศึกษาคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันของพืชชนิดนี้ ในบรรดาสารแซนโทนต่างๆ ที่พบ ปรากฏว่า สาร 1,2-dihydroxy-5,6-dimethoxyxanthone (หมายเลข 35 ในรูปที่ 2.5) และสาร 1,8-dihydroxy-6-dimethoxyxanthone (หมายเลข 36 ในรูปที่ 2.5) มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในสมองของหนู (rat brain homogenate) และสาร 1,2,5-trihydroxy xanthone (หมายเลข 34 ในรูปที่ 2.5) เป็นสารที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH และ O₂⁻ ที่ได้จาก Xanthine-xanthine oxidase system และยังพบว่าสาร globuxanthone (หมายเลขที่ 37 ในรูปที่ 2.5) มีประสิทธิภาพในการจับอนุมูล O₂⁻ และป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (Haraguchi, 2001)



รูปที่ 2.5 แซนโทนที่แยกได้จาก *Garcinia subelliptica*
ที่มา : Haraguchi (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กลไกการทำงานของสารต้านออกซิเดชัน

สารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระสามารถจำแนกได้อย่างกว้าง ๆ จากกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิและสารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ บางปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกการทำงานมากกว่า 1 กลไกและจะทำหน้าที่หลาย ๆ อย่างในแต่ละกลไก ปฏิกิริยาต่าง ๆ ของสารต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างผันแปรมากและสามารถทำปฏิกิริยาได้ทุกขั้นตอนในปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ หรือ chain-breaking antioxidant เป็นตัวรับอนุมูลอิสระที่ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันอัตโนมัติในขั้นตอนแรกเกิดความล่าช้าหรือถูกยับยั้งได้ การเริ่มต้นของ autoxidation เริ่มแรกจะเกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลของ α -methylene hydrogen ถูกดึงจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวออกมาอยู่ในรูปของกรดไขมันอิสระ (R^\cdot) ดังสมการที่ 1



กรดไขมันอิสระนี้จะเกิดปฏิกิริยาได้สูง สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของเปอร์ออกไซด์อิสระ (ROO^\cdot) ดังสมการที่ 2



ในระหว่างปฏิกิริยาการถ่ายเทอนุมูลเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไขมันทำให้เกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์และได้อนุมูลของกรดไขมันอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรดังสมการที่ 3 กรดไขมันอิสระนี้จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนให้อนุมูลเปอร์ออกไซด์อิสระอีกตัวหนึ่ง ปฏิกิริยานี้จะมีกลไกดังสมการที่ 4

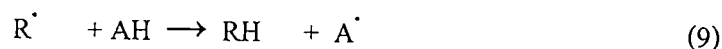
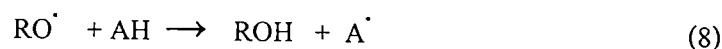
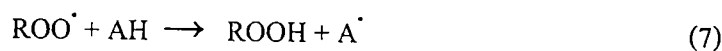


ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ไม่เสถียรและสามารถแตกสลายให้อนุมูลที่จะไปเร่งปฏิกิริยาต่อไป ปฏิกิริยาเหล่านี้คือปฏิกิริยาถูกโซ่ในสมการที่ 5 และ 6



ไฮโดรเปอร์ออกไซด์แตกสลายทำให้เกิดกลินและรสชาติไม่ดีคล้าย ๆ กับการเกิดกลินเหม็นหืนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลไขมันและเปอร์ออกไซด์อิสระจะเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปที่เสถียรมากขึ้น สารต้านอนุมูลอิสระจะให้อะตอมของไฮโดรเจนแก่กรดไขมันอิสระทำให้เกิดอนุมูลไขมันและอนุมูลอิสระจากสารต้านอนุมูลอิสระ (A^\cdot) ซึ่งจะมีเสถียรและมีน้อยลงที่จะไปทำปฏิกิริยา autoxidation สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิในฐานะที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนจะมีความเฉพาะเจาะจงกับเปอร์ออกไซด์อิสระมากกว่าไขมัน ดังนั้นปฏิกิริยา autoxidation ที่เกิดขึ้นต่อกันจะถูกยับยั้งโดยสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ (ดังสมการ 7 และ 8) สารต้านอนุมูลอิสระจะมีปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระโดยตรง (ดังสมการ 9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



อนุมูลของสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเมื่อให้ไฮโดรเจนไปแล้วจะมีความเสถียรโดยจะทำปฏิกิริยากับไขมันได้น้อยมากซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อไปได้น้อย อนุมูลของสารต้านออกซิเดชันสามารถเข้าร่วมในปฏิกิริยาสุดท้ายโดยทำปฏิกิริยากับอนุมูลเปอร์ออกซี (สมการที่ 10) ออกซี (สมการที่ 11) และอนุมูลของสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ (สมการที่ 12) ปฏิกิริยาเหล่านี้คือการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระอัตโนมัติ



ก่อนที่จะเริ่มปฏิกิริยา autoxidation จะต้องผ่านช่วงเวลาเหนียวนำซึ่งจะมีการเกิดอนุมูลอิสระและสารต้านออกซิเดชันถูกใช้ไป ดังนั้น สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิจะมีประสิทธิภาพมากถ้ามีการเติมลงไปในช่วงแรกของการเกิดออกซิเดชันเมื่อยังไม่เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป การเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปไขมันซึ่งมีปริมาณเปอร์ออกไซด์สูงอยู่แล้วจะเป็นผลให้สารต้านอนุมูลอิสระสูญเสียการทำงานไปอย่างรวดเร็ว นอกเหนือจากหน้าที่ในการจับอนุมูลอิสระแล้วสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมียังสามารถรีดิวซ์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นสารประกอบไฮดรอกซี อย่างไรก็ตามกลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านก็คือการจับกับอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิเป็น mono หรือ polyhydroxy phenols ที่มีหลายวงแหวนแทนที่หมู่ที่ให้อิเล็กตรอน (ortho และ para) ไปเป็นหมู่ไฮดรอกซีของฟีนอลจะช่วยกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ การแทนที่ของหมู่ butyl หรือหมู่ ethyl para ไปเป็นหมู่ hydroxyl จะช่วยเพิ่มกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ ส่วนใหญ่สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิในอาหารจะเป็นสารประกอบที่สังเคราะห์ขึ้น ตัวอย่างของสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ ได้แก่ butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), propyl gallate (PG) และ tertiary butylhydroquinone (TBHQ) อย่างไรก็ตามองค์ประกอบธรรมชาติในอาหารจะมีกระบวนการทำงานเหมือนกับสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ วิตามินอีส่วนใหญ่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิตามธรรมชาติ แลโรทีนอยด์ก็จะเป็นสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิจากธรรมชาติถึงแม้ว่ากลไกการทำงานจะแตกต่างกับสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปของสารประกอบฟีนอลก็ตาม

2.3 สารแอนติออกซิเดนต์ที่ใช้ในอาหาร

สารแอนติออกซิเดนต์ที่ใช้ในอาหาร (food antioxidants) หลายชนิดทั้งชนิดที่ได้จากธรรมชาติและชนิดสังเคราะห์ได้ถูกนำมาทดลองใช้ในอาหาร แต่มีเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่ได้รับการยอมรับว่าเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำมาใช้ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ผลที่ดีในการนำมาใช้ พบว่าสารแอนติออกซิแดนท์ 4 ชนิดแรกในตารางที่ 2.1 ใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันกันมากในอาหารประเภทไขมันและน้ำมัน มักจะใช้เพียงชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกับกรดบางชนิดซึ่งมักเป็นกรดซิตริก กรดจะกระทำตัวในฐานะของ metal chelating agent หรือเป็นสารช่วยเสริมฤทธิ์ (synergist) ตัวทำละลาย (solvent) ที่ใช้เป็นส่วนประกอบในสูตรผสมของสารแอนติออกซิแดนท์และกรดคือ โพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) น้ำมันพืช โมโนกลีเซอไรด์ (monoglycerides) และเอทิลแอลกอฮอล์ (Sherwin, 1990)

ตารางที่ 2.1 สารต้านออกซิเดชันที่ยอมรับสำหรับให้ใช้ในอาหาร

ชนิดของสารต้านออกซิเดชัน

BHA (butylated hydroxyanisole)
 BHT (butylated hydroxytoluene)
 Propyl gallate (บางประเทศใช้ octyl gallate และ dodecyl gallate)
 TBHQ (tertiary butylhydroquinone)
 Tocopherols
 Lecithin
 Gum or resin guaiaic
 THBP (trihydroxybutyrophenone)
 4-Hydroxymethyl-2,6-di-*tert*-butyl phenol
 Thiodipropionic acid and dilauryl thiodipropionate
 Glycine

ที่มา: Sherwin (1990)

2.4 การตรวจหาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สาร DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นการตรวจวัดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง โดยทำการตรวจสอบการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (absorbance) 515 นาโนเมตรซึ่งเกิดปฏิกิริยารีดักชัน โดยสารตัวอย่างที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (AH) ดังสมการ



ในการตรวจสอบ สาร DPPH จะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วในช่วงแรกแต่ต่อมาปฏิกิริยาจะเกิดช้าลง หากในสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีสารต้านอนุมูลอิสระจะมีการลดลงของค่าการดูดกลืนแสง ดังนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

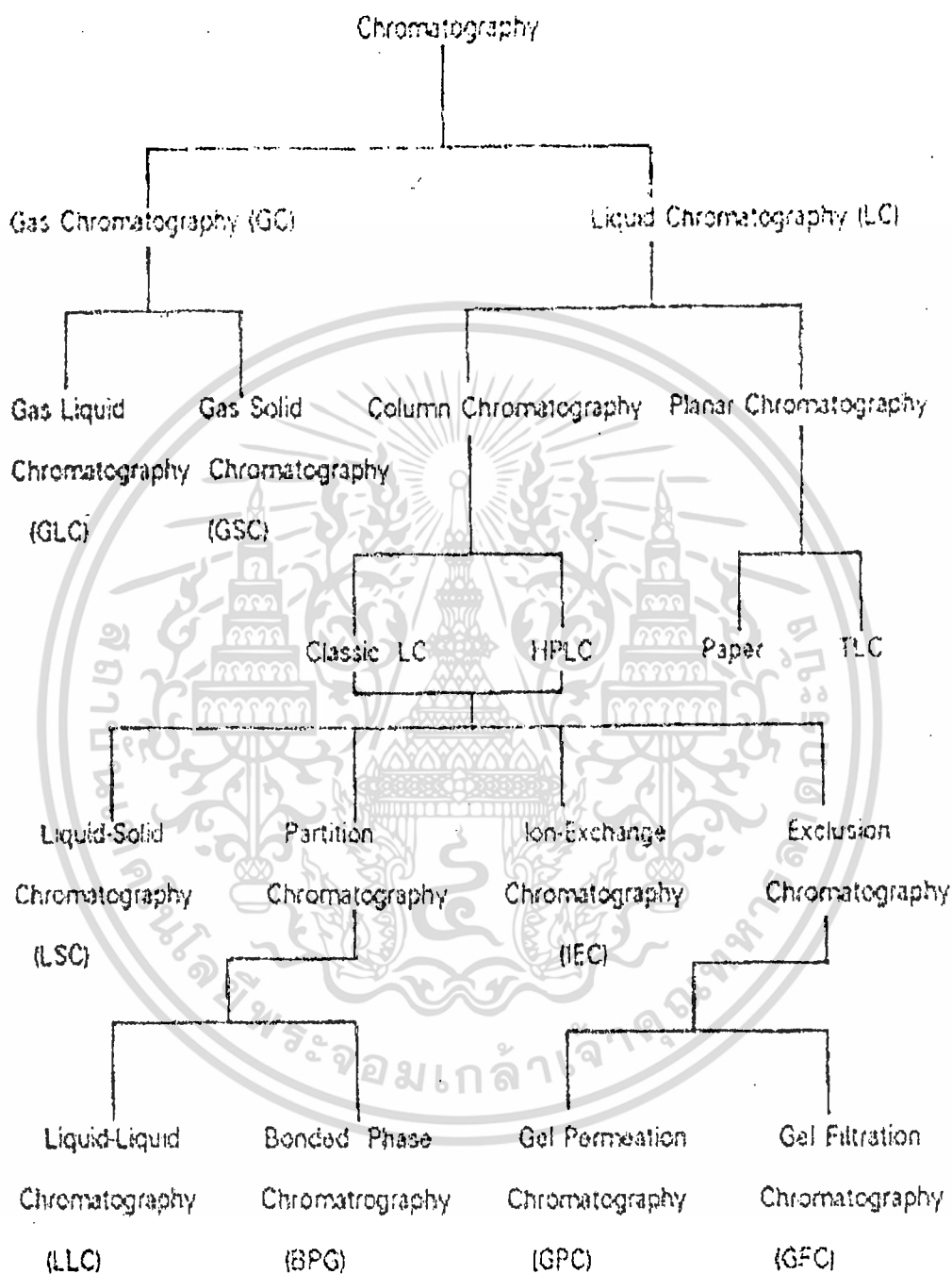
สภาวะที่เสถียรจะเกิดขึ้น โดยใช้เวลาไม่นาน พบว่าจะเกิดหลังจากเวลาผ่านไป 15-30 นาที (Pokomy, 2001)

2.5 การวิเคราะห์หาสาระสำคัญในพืชด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

2.5.1 ทฤษฎีเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

โครมาโตกราฟี เป็นเทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารผสมแบบกายภาพเคมี (physiochemical method) การแยกเกิดขึ้นได้เนื่องจากอันตรกิริยา (interaction) หรือการกระจายตัวที่แตกต่างของแต่ละองค์ประกอบในสารประกอบในสารผสมระหว่าง 2 เฟส คือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่มีคุณสมบัติเป็นของไหลซึ่งอาจเป็นของเหลว (Liquid chromatography, LC) หรือเป็นแก๊ส (Gas chromatography, GC) เป็นตัวพาตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านอีกเฟสหนึ่งซึ่งอยู่กับที่ (stationary phase) ที่มีพื้นผิวมากทำหน้าที่เป็นตัวแยก ซึ่งอาจจะเป็นของแข็งเจล (gel) หรือของเหลวบนผิวของแข็งโดยที่ stationary phase อาจอยู่ในรูปแบบที่บรรจุในคอลัมน์ (Column chromatography) หรืออลูมินา (Thin layer chromatography) หรือบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Paper chromatography) ซึ่งการกระจายตัวที่แตกต่างกันขององค์ประกอบระหว่าง 2 เฟสเกิดจากความแตกต่างของคุณสมบัติทางกายภาพหรือสมบัติทางเคมี เช่น จุดเดือด การละลาย ความมีขั้ว เป็นต้น ทำให้แต่ละองค์ประกอบเคลื่อนที่ผ่าน stationary phase ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน และนำไปสู่การแยกในที่สุด

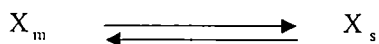
ในเทคนิค HPLC นี้ mobile phase ที่เป็นของเหลวจะถูกบีบผ่านคอลัมน์แยกสารที่เป็นท่อบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งทำหน้าที่เป็น stationary phase เมื่อตัวอย่างซึ่งมีองค์ประกอบหลายชนิดละลายอยู่ถูกนำเข้าสู่ระบบ โดยการฉีดด้วยปริมาตรจำกัดที่จุดฉีด (injection) ก่อนเข้าสู่คอลัมน์และแพร่กระจายเข้าสู่ระบบการไหล หน้าที่ของ mobile phase คือ พาตัวอย่างในขณะไหลผ่านคอลัมน์ ทำให้เกิดการแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดออกจากกัน อันเนื่องมาจากความแตกต่างของแรงที่เกิดเนื่องด้วยอันตรกิริยาขององค์ประกอบกับ stationary phase และ mobile phase แต่ละองค์ประกอบจะใช้เวลาที่เป็นคุณสมบัติเฉพาะตัว (characteristic time) ของแต่ละสาร



รูปที่ 2.6 แผนภาพแสดงการจำแนกชนิดของโครมาโตกราฟีโดยแบ่งตามธรรมชาติของ mobile phase, stationary phase เทคนิคการจัดวาง stationary phase และกลไกการแยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กฎโดยทั่วไปเกี่ยวกับการแยก คือองค์ประกอบใดที่สามารถเกิดอันตรกิริยาหรือสามารถกระจายอยู่ในชั้นของ stationary phase ได้ดีกว่าจะใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์ได้นานกว่า และในทางตรงกันข้าม สารใดที่มีอันตรกิริยาหรือสามารถกระจายตัวเข้าไปอยู่ในกระแสของ mobile phase ได้ดีกว่าก็จะถูกชะ (elute) ออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าหรือใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์น้อยกว่า กระบวนการนี้แสดงได้ดังสมการ



X_m คือ องค์ประกอบ X ใน mobile phase

X_s คือ องค์ประกอบ X ใน stationary phase

ค่า distribution coefficient, K_x ขององค์ประกอบ X แสดงดังสมการ

$$K_x = [X_s]/[X_m]$$

ถ้า K_x มีค่ามากกว่าแสดงว่าองค์ประกอบ X กระจายตัวอยู่ใน stationary phase มากกว่า mobile phase ดังนั้นองค์ประกอบดังกล่าวจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้า

ถ้า K_x มีค่าน้อยกว่าแสดงว่าองค์ประกอบ X กระจายตัวอยู่ใน mobile phase ได้ดีกว่า stationary phase ดังนั้นองค์ประกอบดังกล่าวจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้เร็ว

จากหลักการดังกล่าวสามารถนำมาใช้ทำให้เกิดการแยกขององค์ประกอบต่างๆ ในสารประกอบ และสามารถทำการวัดความเข้มข้นขององค์ประกอบแต่ละชนิดที่ออกมาจากคอลัมน์โดยใช้โครมาโตแกรมซึ่งเป็นกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นขององค์ประกอบต่างๆ กับเวลา

เทคนิค Liquid chromatography สามารถจำแนกตามกลไกของการแยก (separation mechanism) ที่เกิดต่อองค์ประกอบของสารที่ถูกเหนี่ยวนำ โดยสารบรรจุในคอลัมน์แบ่งออกเป็นหลายแบบได้ดังนี้

1. Steric Exclusion Chromatography (SEC)

SEC เป็นกลไกการแยกที่อาศัยหลักการแยกตามขนาดของโมเลกุลสารตัวอย่าง ถ้ามีขนาดใหญ่กว่าขนาดรูของอนุภาค (pore size) ของ stationary phase ก็จะไม่สามารถแพร่เข้าไปได้และถูกขับออกมา (exclude) ดังนั้นโมเลกุลขนาดใหญ่จะใช้เวลาอยู่ใน mobile phase และเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ไปอย่างรวดเร็ว ในขณะที่โมเลกุลที่มีขนาดเล็กพอที่จะเข้าไปอยู่ในรูของอนุภาคได้ ก็จะใช้เวลาส่วนใหญ่อยู่ใน stationary phase และเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ไปอย่างช้าๆ กลไกการชนิด SEC ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง ในกรณีที่ใช้สารตัวอย่างที่ไม่ละลายน้ำ เรียกว่า Gel

Permeation Chromatography (GFC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Ion-Exchange Chromatography (IEC)

IEC เป็นกลไกการแยกที่เกี่ยวข้องกับสมดุลของการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างไอออนตัวอย่างกับไอออนที่ล้อมรอบ (counter ion) ของไอออนตัวแลกเปลี่ยน (ion exchange) ทำหน้าที่เป็น stationary phase และมีสารละลายบัฟเฟอร์ (aqueous buffer) เป็น mobile phase และมีไอออนบัฟเฟอร์ (buffer ion) ซึ่งเป็นไอออนชนิดเดียวกับไอออนตัวอย่าง ดังในกรณีการแยกแคทไอออนจะเป็นตัวแข่งขันกับไอออนตัวอย่างในการแลกเปลี่ยน หรือจับบนผิวของไอออนตัวแลกเปลี่ยน ซึ่งจะนำไปสู่การแยกในทางปฏิบัติเราสามารถปรับรูปร่างเฉพาะเจาะจงในการแยกใน IEC ได้โดยการเปลี่ยนแปลง pH ความแรงของไอออน และบางครั้งอาจจะปรับแต่งใช้เพื่อลดการจับที่แน่นเกินไปบนผิวตัวแลกเปลี่ยนไอออน โมเลกุลสารประกอบที่แตกตัวได้ซึ่งไม่ค่อยจะละลายน้ำ และยากในการชะโดยสารละลายตามลำพังซึ่งสารที่บรรจุใน IEC มีอยู่ 2 ชนิด คือ เรซินอินทรีย์และเรซินอนินทรีย์ ซึ่งส่วนใหญ่ทำมาจากซิลิกา

โดยทั่วไปไอออนแลกเปลี่ยนประจุลบจะประกอบด้วยหมู่ quaternary ammonium ในขณะที่ไอออนแลกเปลี่ยนประจุบวกนั้นมีหมู่ sulphonic

Ion Chromatography (IC) คือ เทคนิคการแลกเปลี่ยนไอออนที่ใช้คอลัมน์ที่มีความจุต่ำกับเครื่องตรวจวัดชนิดวัดค่าการนำไฟฟ้า เพื่อใช้ในการตรวจหาสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ที่มีประจุนิยมใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์หาแคทไอออนหรือแอนไอออนที่มีปริมาณต่ำๆ ในสารละลาย การใช้คอลัมน์ที่มีความจุต่ำจะเหมาะกับการใช้บัฟเฟอร์ที่มีความแรงไอออนต่ำเป็น mobile phase ในทางปฏิบัติจะมี IC อยู่ 2 ชนิด คือ

2.1 suppressed หรือ dual column IC

dual column IC เป็นเทคนิคที่ใช้คอลัมน์ 2 ชนิดต่อกันแบบอนุกรม ด้วยเทคนิคทางไอออนโครมาโตกราฟี คอลัมน์ (separator) ทำหน้าที่แยก คอลัมน์ถัง (suppressor) เป็นเรซิน กรดแก่ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนไอออน H^+ กับแคทไอออนที่แยกได้ เพื่อให้มีค่าการนำไฟฟ้าสูงขึ้น เทคนิคนี้นิยมใช้กับเครื่องตรวจวัดชนิดวัดค่าการนำไฟฟ้า

ข้อดีของเทคนิคที่ใช้ 2 คอลัมน์ คือ ค่าการนำไฟฟ้าของ mobile phase จะลดน้อยลง ทำให้สามารถวัดปริมาณแอนไอออนในสารละลายตัวอย่างในตัวกลางที่นำไฟฟ้าต่ำได้ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มสภาพไวของการวิเคราะห์ไอออนให้ดีขึ้นด้วย

ข้อเสียของเทคนิคที่ใช้ 2 คอลัมน์ คือ จะต้องมีการ regenerate suppressed column เป็นครั้งคราวและมีส่วนทำให้ฟีกกว้างขึ้น

2.2 non suppressed หรือ single column IC

ในเทคนิคนี้จะใช้เพียงคอลัมน์เดียว และ mobile phase จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์บน คือ คอลัมน์แอนไอออนแล้วเข้าสู่เครื่องตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าโดยตรงเลย ข้อดีของเทคนิคนี้คือทำได้ง่าย

และมีประสิทธิภาพของการแยกที่ดี ข้อเสียคือความยากในการวัดไอออนที่มีปริมาณน้อยๆ ในสารตัวอย่างที่อยู่ในตัวกลางซึ่งนำไฟฟ้าได้ดี และมีข้อจำกัดในการเลือก mobile phase ด้วย

3. Adsorption Chromatography

Adsorption Chromatography เป็นโครมาโตกราฟีที่มีกลไกการแยกแบบการดูดซับ เทคนิคนี้บางครั้งเรียกว่า liquid – solid chromatography หรือ normal phase chromatography เป็นเทคนิคที่ใช้ stationary phase ชนิดที่มีขั้ว (polar) และใช้ mobile phase ชนิดที่ไม่มีขั้ว (non-polar) การเหนียวรั้งและความจำเพาะของการแยก เกิดเนื่องจากอันตรกิริยาของ stationary phase ซึ่งเป็นตัวดูดซับกับหมู่ฟังก์ชันนัลของโมเลกุลสารตัวอย่างชนิดมีขั้ว หรือที่สามารถเกิดสภาพขั้ว (polarization) การเหนียวรั้งจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนและชนิดของหมู่ฟังก์ชันนัลที่มีขั้ว สำหรับกรณีของ silica gel โมเลกุลของสารตัวอย่างที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนอย่างแข็งแรงกับหมู่ silinol (Si-OH) อิสระที่ผิวของอนุภาคซิลิกาจะถูกเหนียวรั้งอยู่ในคอลัมน์นานกว่า

4. Liquid-Liquid Chromatography, (LLC)

LLC จะเกี่ยวข้องกับกลไกการแยกสารใน LC โดยปกติใช้พวกของเหลวอินทรีย์ที่มีขั้ว (polar organic liquid) เคลือบเป็นฟิล์มอยู่บนอนุภาคซิลิกาที่ทำหน้าที่เป็นของแข็งรองรับ (solid support) ใช้ตัวทำละลายไม่มีขั้วเป็น mobile phase กลไกการแยกเกิดเนื่องจากความแตกต่างของความแบ่งส่วน (partition) ของแต่ละองค์ประกอบใน stationary phase และ mobile phase อันเนื่องจากการละลาย (solubility) ดังเช่น วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) องค์ประกอบที่ละลายใน stationary phase ได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่อย่างช้าๆ และออกจากคอลัมน์ทีหลัง

ในปัจจุบันอนุภาคที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ นิยมนำเอาเฟสอยู่กับที่ไปทำให้เกิดพันธะทางเคมีกับวัสดุหรืออนุภาคที่ใช้เป็นตัวรองรับ ซึ่งอนุภาคชนิดนี้เรียกว่า bonded-phase มากกว่าการใช้ของเหลวเคลือบบนผิวของของแข็งรองรับวิธีการนี้ เรียกว่า Bonded-Phase Chromatography (BPC)

5. Bonded Phase Chromatography (BPC)

เทคนิค LLC มีข้อจำกัดในเรื่องความเสถียรของ stationary phase ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาโดยใช้ bonded phase column ขึ้นมาคือแทนที่จะเคลือบ liquid phase บนผิวของของแข็งรองรับ ด้วยวิธีเชิงกล เช่นใน LLC ในกลไก BPC นั้นมีการทำปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้ liquid phase เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ที่แข็งแรงกับหมู่ silinol ที่เป็น active site ของผลึกซิลิกา (solid support) ทำให้ stationary phase นั้นเสถียรไม่มีข้อจำกัดทางอุณหภูมิและการละลาย แต่ไม่เหมาะสำหรับใช้ที่ pH ต่ำกว่า 2 และที่ pH สูงกว่า 7.5 และสามารถใช้ gradient elution ได้นับว่าเป็นข้อดีของ BPC

Bonded Phase Chromatography แบ่งออกได้เป็น 2 เทคนิคซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพสัมพัทธ์ (relative polarity) ของ stationary phase และ mobile phase ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1 Normal-Phase BPC

Normal-Phase BPC เป็นเทคนิคที่มี stationary phase เช่น aminopropyl ที่มีสภาพขั้วมากกว่า mobile phase เช่น hexane สารประกอบที่ไม่มีขั้วละลายใน mobile phase ได้มากกว่า ดังนั้นจะผ่านออกมาจากคอลัมน์มาเป็นลำดับแรกๆ และสารประกอบที่มีขั้วจะถูกหน่วงเหนี่ยวให้อยู่ในคอลัมน์ได้นาน เนื่องจากเกิดอันตรกิริยากับ stationary phase ซึ่งมีสภาพขั้วเช่นกันทำให้ถูกชะออกจากคอลัมน์ทีหลัง

5.2 Reverse-Phase BPC

Reverse-Phase BPC เป็นเทคนิคที่มี stationary phase เป็นพวกไม่มีขั้ว เช่น octadecyl silane และ mobile phase เป็นพวกมีขั้ว เช่น น้ำ methanol acetonitrile เป็นต้น ลำดับของการชะล้างมีลักษณะตรงกันข้ามกับที่เกิดใน normal-phase BPC ดังนั้นสารประกอบที่มีขั้วจะถูกชะล้างออกมาก่อน เนื่องจากเป็นสารประกอบที่ละลายใน mobile phase ได้ดีกว่า ส่วนสารประกอบที่ไม่มีขั้วจะถูกยึดอยู่ในคอลัมน์ทำให้ถูกชะล้างออกมาทีหลัง เทคนิคนี้จะเหมาะสมอย่างมากกับสารประกอบที่ไม่ละลายหรือละลายได้เล็กน้อยในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์หรือตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ดี เนื่องจากสารประกอบอินทรีย์เป็นจำนวนมากมีพฤติกรรมของการละลายในลักษณะนี้ ดังนั้น BPC จึงใช้เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้อย่างมากในเทคนิค HPLC ทั้งนี้เพราะ

1. สามารถนำมาใช้แยกพวก nonionic, ionic และสารประกอบที่แตกตัวเป็นไอออนได้ บางครั้งสามารถแยกสารประเภทนี้พร้อมๆ กันได้โดยใช้คอลัมน์ และ mobile phase อย่างเดียวกัน
2. Bonded-phase คอลัมน์ค่อนข้างเสถียรแต่ควรระวังเกี่ยวกับการควบคุม pH ของ mobile phase เนื่องจากจะทำให้องค์ประกอบของ mobile phase เปลี่ยนไป
3. Mobile phase ที่นิยมใช้ เช่น น้ำมีราคาถูก และสารที่เป็น mobile phase ตัวอื่นๆ ก็หาได้ง่าย
4. ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ค่อนข้างนิยมใช้กันมาก คือ เมทานอล ซึ่งราคาไม่แพงนัก และมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง
5. สามารถทำนายลำดับของการที่จะถูกชะ (elute) ออกจากคอลัมน์ได้ เพราะว่า retention time จะเพิ่มขึ้นตามสมบัติของสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ
6. สมดุลที่เกิดขึ้นในคอลัมน์จะเร็วทำให้เหมาะแก่การ gradient elution

กลไกการแยก BPC โดยเฉพาะชนิด Reverse-Phase Chromatography นั้นเป็นวิธีการแยกที่ได้รับความนิยมสูงสุด ทั้งนี้เนื่องจากมีความคล่องตัวสูง โดยเวลาที่ใช้ในการทำให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุล (column equilibrium time) ใน BPC นั้นเร็วกว่าใน LSC มาก ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลงสัดส่วนผสมของ mobile phase ใน gradient elution ได้อย่างรวดเร็ว ตัวอย่างของสารบรรจุที่ใช้กันอยู่ประจำ สำหรับกรณีของ reverse-phase ได้แก่ ชนิด C-18 และ C-8 สำหรับ normal-phase ได้แก่ ชนิดสารประกอบไซยาไนด์ และสารประกอบเอมีน ซึ่งการเตรียมสารบรรจุเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิด BPC ทำได้โดยการทำปฏิกิริยาของหมู่ silinol ที่ผิวอนุภาคซิลิกาด้วย silinol derivatizing reagent

- Column C-18

คอลัมน์ reverse-phase ชนิด C-18 หรือ ODS จะมี octadecylsilane bonded phase เช่น Novapak C-18 ในขณะที่ C-8 นั้นจะมี octylsilane bonded phase และ C-1 หรือ TMS นั้นมี trimethyl bonded phase นอกจากนี้ TMS ยังถูกใช้เป็น end-capping reagent โดยทำหน้าที่กำจัดหมู่ silinol อิสระที่หลงเหลือจากการทำปฏิกิริยา bonded-phase อีกด้วย

สารบรรจุชนิด “reverse phase” เป็นสารประเภทไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) โดยทั่วไปใช้กับ mobile phase ที่เป็น methanol หรือ acetonitrile ผสมน้ำในคอลัมน์ประเภทนี้จะเกิดการเหนียวรั้ง เนื่องจากอันตรกิริยาของ stationary phase กับโมเลกุลสารตัวอย่างที่ไม่มีขั้ว

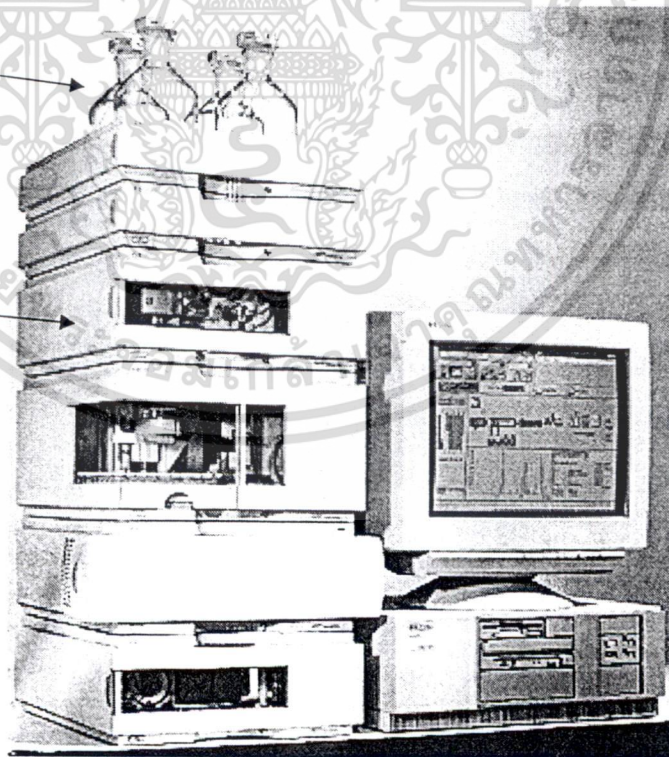
สารบรรจุประเภท reverse-phase จำนวนมากมีพื้นผิวของอนุภาคเป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เนื่องจากหมู่ silinol อิสระที่ยังเหลืออยู่โดยไม่ได้ถูกปกคลุมหรือถูกทำพันธะ

2.5.2 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC (HPLC-System)

เครื่อง HPLC ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ที่สำคัญดังนี้

1. ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir)

2. ระบบของปั๊ม (pumping system)



รูปที่ 2.7 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.1 ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir)

ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ การวิเคราะห์โดยทั่วไปควรมีความจุประมาณ 1 ลิตร หรือมากกว่า ขวดที่ใส่เฟสเคลื่อนที่นี้จะมีอุปกรณ์สำหรับใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่น แก๊สออกซิเจน จุดประสงค์ของการไล่อากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่คือ ต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจนซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้หรือแม้แต่เฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนี้ยังเป็นการลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจวัดขณะทำการทดลอง การไล่แก๊สที่ละลายอยู่จะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นพวกสารมีขั้ว (polar solvent) และมีบางบริษัทที่สามารถผลิตเครื่อง HPLC ซึ่งสามารถใช้กับระบบที่ไม่ต้องไล่แก๊สออกซิเจนก่อนได้

2.5.2.2 ระบบของปั๊ม (pumping system)

ใน HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ไหลผ่านคอลัมน์ เนื่องจากคอลัมน์ขนาดเล็กและมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลจะมากเมื่อใช้อนุภาคขนาดเล็กๆ และคอลัมน์มีขนาดเล็ก จึงจำเป็นที่จะต้องใช้ความดันสูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไปโดยใช้ปั๊ม

ปั๊มชนิดนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

Mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

Pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่หลักในการเลือก pumping system เพื่อใช้กับ HPLC มีดังนี้คือ

1. ปั๊มและส่วนประกอบควรจะทำด้วยวัสดุที่ทนต่อการสึกกร่อนด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่
2. ควรจะต้องสามารถปั๊มเฟสเคลื่อนที่ที่มีปริมาตรมากๆ ได้อย่างต่อเนื่อง โดยไม่มีการขัดข้อง
3. สามารถให้ความดันได้ถึง 4000-6000 psi หรืออย่างน้อยต้องให้ความดันถึงขนาด 500 psi
4. สามารถให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้สูงอย่างน้อย 3 มิลลิลิตรต่อนาทีและคงที่
5. ความคลาดเคลื่อนของการควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต้องไม่เกิน 1-2 %
6. ควรมีปริมาตรภายในต่ำเพื่อความสะดวกรวดเร็วในการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่
7. ต้องไม่มีพัลส์ (pulse) หรือตัวที่ใช้ลดพัลส์ (pulse damper) หรือไม่ทำให้เกิดสัญญาณรบกวนที่เครื่องตรวจวัด

2.5.2.3 เครื่องตรวจวัด (Detector)

สิ่งที่ต้องการสำหรับเครื่องตรวจวัดใน LC สมัยใหม่ คือ ความไวของเครื่องตรวจวัด ซึ่งสามารถทำการตรวจวัดสิ่งที่ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นเครื่องตรวจวัดในอุดมคติของ LC สมัยใหม่ ควรจะมีลักษณะดังนี้ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. มีความไวสูงและสัญญาณตอบรับ (response) ที่คาดคะเนได้
2. ให้สัญญาณตอบรับ (response) ได้กับสารทุกชนิด
3. ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ และอัตราเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่
4. มีความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นกับสัญญาณตอบรับของเครื่องตรวจวัดควรเป็นเส้นตรง (linearity) ในช่วงกว้าง
5. ไม่ทำลายสารตัวอย่าง
6. ให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพวิเคราะห์

เครื่องตรวจวัดของ LC ในปัจจุบันจะมีคุณสมบัติไม่ครบตามที่กล่าวมาข้างต้น เครื่องตรวจวัดใน LC สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

การวัดคุณสมบัติโดยรวมคือ การเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่รวมกับของตัวถูกละลาย เช่น refractive index และ conductivity detectors เป็นต้น

การวัดคุณสมบัติของสารตัวอย่างคือ การเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เช่น การวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล (uv-vis) fluorescence หรือการวัดคุณสมบัติทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical detectors) เป็นต้น

พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัด

1. สัญญาณรบกวน (noise) อาจจะมาจากรูปกรณ์ไฟฟ้า การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ เพิ่มขึ้น-ลดลง ของ line voltage การเปลี่ยนแปลงจากเครื่องวัด การเปลี่ยนแปลงของการไหล pulse จากปั๊ม เป็นต้น
2. การเบี่ยงเบนของเครื่องตรวจวัด (detector drift) ซึ่งจะเป็นการเคลื่อนที่ของ baseline ขึ้นหรือลง ทั้งนี้เนื่องจากสัญญาณรบกวนจากคลื่นความถี่สูง (high frequency noise) ซึ่งจะปรากฏเป็นฝอย (frizz) บนส่วนของ baseline และ short term noise ซึ่งจะปรากฏคล้ายกับฟีกและเป็นเนินขึ้นๆ ลงๆ บนส่วนของ baseline นอกจากนี้ยังมี up scale drift อีกด้วย
3. Absolute Sensitivity คือการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ทางกายภาพเพื่อต้องการทำให้ปากกาของเครื่องบันทึกผล (recorder) เกิดการหันเห (deflection) เต็มสเกลที่ความไวสูงสุด โดยกำหนดให้สัญญาณรบกวน (noise) มีค่า ๆ หนึ่ง
4. Detection Limit คือความเข้มข้นต่ำสุดของตัวถูกละลายที่ควรจะตรวจวัดได้โดยทั่วไปทางโครมาโตกราฟี นิยมใช้ทำปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ (Minimum Detection Quantity, MDQ) ซึ่งก็คือความเข้มข้นต่ำสุดของตัวถูกละลายที่ทำให้ฟีกมีความสูงเป็น 2 เท่าของสัญญาณรบกวน (noise) ในโครมาโตแกรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของ Detector

1. ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ (UV-VIS Detectors)

หลักการการทำงานของเครื่องตรวจหาชนิดนี้อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง เครื่องชนิดนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางใน HPLC เพราะเครื่องตรวจชนิดนี้มีลักษณะพิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลและอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างจะมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่

ในปัจจุบันยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

1.1 Fixed-wavelength UV detector

ดีเทคเตอร์ชนิดนี้ประกอบด้วย flow-through cell และแหล่งกำเนิดแสง (light source) ที่ใช้เป็นแบบหลอดที่ทำด้วยปรอทที่ความดันต่ำ ซึ่งจะให้แสงที่ปล่อยออกมาที่มีความยาวคลื่น 254 nm โดยทำให้เป็นลำแสงด้วยเลนส์ที่ทำด้วยควอทซ์ แล้วให้แสงนี้ผ่านเซลล์ของสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่าง แสงที่ผ่านออกมาจะผ่านการกรองด้วยฟิลเตอร์ แล้วจึงผ่านไปยังโฟโตเซลล์ (photo cell) หรือโฟโตไดโอด 2 ตัว โดยทั่วไป flow-through cell จะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 mm และยาว 10 mm และมีปริมาตร 8 μ l

นอกจาก mercury lamp แล้วอาจใช้แหล่งกำเนิดแสงอย่างอื่นที่ใช้ได้กับ fixed-wavelength UV detector ได้แก่ Zn lamp (206 nm) และ Cd lamp (214 nm) สำหรับ D₂ lamp จะเปล่งแสงออกมาอย่างต่อเนื่องในช่วงยูวี (200-400 nm) และบางช่วงของวิสิเบิล ดีเทคเตอร์ที่ใช้ฟิลเตอร์กรองแสง หรือใช้โมโนโครเมเตอร์แยกแสงให้ได้ความยาวคลื่นที่ต้องการ จะใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็น D₂ lamp

1.2 variable UV-VIS detector

ดีเทคเตอร์ชนิดนี้ค่อนข้างจะมีประโยชน์ในการนำมาใช้เป็น LC detector ซึ่งประกอบด้วย D₂ และ W lamp หลอดทั้งสองนี้สามารถใช้วัดแสงได้ในช่วง 190-800 nm นอกจากนี้ยังมีโมโนโครเมเตอร์ เพื่อใช้สำหรับเลือกความยาวคลื่นตามที่ต้องการได้ ดังนั้น เครื่องดีเทคเตอร์นี้จึงมีประโยชน์มาก สามารถใช้ตรวจหาสารตัวอย่างได้ทั่วไป เพราะสามารถเลือกความยาวคลื่นที่สารตัวอย่างดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด และเหมาะสมในการนำมาใช้กับ gradient elution และตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่นำมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่จะไม่ดูดกลืนแสงยูวี เช่น อะซิโตรไนไตร์ สามารถดูดกลืนแสงยูวีได้ที่ความยาวคลื่นต่ำกว่า 190 nm ดังนั้นจึงไม่มีข้อจำกัดที่จะเลือกตัวทำละลายมาใช้กับเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ เครื่องยูวีดีเทคเตอร์นี้มีประโยชน์มาก ในการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ โดยที่ตัวทำละลายหรือสารประกอบที่ปนอยู่ไม่ดูดกลืนแสงยูวีจึงไม่รบกวนการวิเคราะห์นั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 Photodiode-array detector (PDA)

ดีเทคเตอร์นี้จัดว่าเป็น solid state detector ซึ่งประกอบด้วยโฟโตไดโอดจำนวนมาก สามารถวัดแสงได้หลายๆ ความยาวคลื่นในขณะเดียวกัน ระบบทางเดินของแสงจะแตกต่างจากยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์โดยทั่วไป กล่าวคือ ระบบทางเดินของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง “Reverse Optics” คือแสงจากแหล่งกำเนิดหรือจากหลอดยูวีจะผ่านไปยัง flow-through cell ก่อนที่จะไปยังโมโนโครเมเตอร์หรือเกรตติง เมื่อแสงที่ตกกระทบบนเกรตติงจะกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่างๆ แล้วจะไปตกกระทบกับแผงของโฟโตไดโอด เนื่องจากเครื่องดีเทคเตอร์นี้สามารถ scan UV-VIS spectrum ได้รวดเร็วมาก (ประมาณ 10 m sec ต่อ 1 สเปกตรัม) ดังนั้น การนำเอาเครื่องดีเทคเตอร์นี้มาใช้กับ HPLC จะทำให้ทราบข้อมูลของพีคต่างๆ ในยูวีสเปกตรัมที่อยู่ในโครมาโตแกรมได้อย่างดี ในการตรวจหาสารประกอบที่อยู่ในสารประกอบที่อยู่ในสารตัวอย่างว่าเป็นอะไรนั้น อาจนำไปเปรียบเทียบกันสารประกอบที่คิดว่าน่าจะเป็นไปได้ แล้วยังสามารถเปรียบเทียบสเปกตรัมที่เป็น 3 มิติ ซึ่งเป็นสเปกตรัมที่แสดงค่าแอมพลิจูดกับความยาวคลื่นและกับเวลา นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากสเปกตรัมยังใช้ตรวจหาสารเจือปนได้อีกด้วย

2. เครื่องดีฟเฟอเรนเชียลรีแฟรคโตมิเตอร์ (Differential Refractometers)

ดีฟเฟอเรนเชียลรีแฟรคโตมิเตอร์ เป็นเครื่องที่ได้รับความนิยมมากใน HPLC รองมาจากเครื่องยูวี ดีเทคเตอร์ซึ่งใช้ตรวจสอบความแตกต่างของดัชนีหักเห (refractive index, RI) อย่างต่อเนื่อง ระหว่างเฟสเคลื่อนที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลายอยู่ขณะผ่านออกจากคอลัมน์ เนื่องจากดีเทคเตอร์ชนิดนี้จัดอยู่ในแบบ general detector ดังนั้น มันจึงให้สัญญาณกับตัวทำลายได้ทั้งหมด ตรงที่ตัวถูกละลายมีค่าดัชนีหักเหต่างจากเฟสเคลื่อนที่

เครื่องวัด RI ที่สำคัญๆ มีอยู่ 3 ชนิด คือ

2.1 Fresnel Refractometer

2.2 Deflection Refractometer

2.3 Interferometric Refractometer

2.1 เครื่อง Fresnel Refractometer

หลักการการทำงานของเครื่องดีเทคเตอร์ชนิดนี้ คือ ปริมาณของแสงที่สะท้อน (reflected) ออกมาจากที่แก้วและของเหลวที่ประกบกันอยู่จะเปลี่ยนตามมุมของแสงที่ตกกระทบ และค่าดัชนีหักเหของของเหลวและของแก้วนั้น เพื่อให้ได้สภาพไวของเครื่องสูงสุด และเป็น linearity นั้น ต้องให้มุมตกกระทบของแสงบนแก้วที่ประกบอยู่กับของเหลวเป็นมุมที่น้อยกว่ามุมวิกฤตเล็กน้อย การลดความไม่แน่นอนของสัญญาณที่เกิดจากสัญญาณรบกวนและอุณหภูมิให้ม่น้อยที่สุดนั้นทำได้ด้วยการวัดเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าดัชนีหักเหของสารตัวอย่างกับของสารละลายเปรียบเทียบ

(reference) อยู่ตลอดเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ที่ใช้ใน fresnel RI detector มีขนาดเล็กมาก และทำให้สะอาดได้โดยการผ่านเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้น ดีเทคเตอร์นี้จึงมีความเหมาะสมอย่างมากที่ใช้ใน HPLC แต่ดีเทคเตอร์ก็มีขีดจำกัดของช่วงที่เป็นเส้นตรง และการใช้ปริซึมที่แตกต่างกัน 2 ชนิดเพื่อให้ครอบคลุมค่าดัชนีหักเหตั้งแต่ 1.33 – 1.63

2.2 เครื่อง Deflection Refractometer

Deflection Refractometer เป็นดีเทคเตอร์ที่ธรรมดาที่สุดของ RI ดีเทคเตอร์ แสงจากแหล่งกำเนิดแสง A จะถูกจำกัดด้วยการผ่านเครื่องกั้นแสง (mask) B แล้วแสงที่ออกมาจะถูกรวมให้เป็นลำแสง โดยผ่านเลนส์ C และจะผ่านต่อไปยังเซลล์ของเครื่องดีเทคเตอร์ D ในเซลล์นี้จะมีที่สำหรับใส่สารตัวอย่างและสารละลายเปรียบเทียบกับแยกออกจากกัน ด้วยแผ่นแก้วที่ตัดทแยงมุม เมื่อส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ในเซลล์ที่ใส่สารตัวอย่างเปลี่ยนไป ค่าดัชนีหักเหก็จะเปลี่ยนแปลงไปด้วย ทำให้แสงที่ออกมากระทบกระจก E เกิดการเบนไป (deflection) แล้วทำให้แสงที่ตกกระทบบนโฟโตดีเทคเตอร์ F เกิดการเบนไปด้วยค่าดัชนีหักเหที่แตกต่างจากการที่แสงผ่านสารตัวอย่างและสารละลายเปรียบเทียบกับจะออกมาเป็นสัญญาณไฟฟ้าจากดีเทคเตอร์ D แล้วเข้าเครื่องขยาย (amplifier) และส่งต่อไปยัง recorder เพื่อบันทึกโครมาโตแกรม

เครื่องดีเทคเตอร์แบบนี้มีข้อดีที่ช่วงของ RI ที่เป็นเส้นตรงนั้นกว้าง และจะใช้เซลล์เพียงอันเดียวตลอดช่วงของการวัด RI

2.3 เครื่อง Interferometric Refractometer

Interferometric Refractometer เป็นดีเทคเตอร์ที่ใช้หลักการของ shearing interferometer ในการวัดลำแสงจากแหล่งกำเนิดแสง (เช่น 546 nm) จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ลำแสงด้วย beam splitter แล้วถูกโฟกัสด้วยเลนส์ให้ลำแสงผ่านสารตัวอย่างและผ่านสารละลายเปรียบเทียบ ซึ่งปกติจะใส่ไว้ในเซลล์ขนาด 5 μL กว้าง 3.2 มม. หลังจากนั้นลำแสงจะถูกนำมารวมกันด้วยเลนส์ และ beam splitter ชุดที่สองเพื่อให้แสงตกลงบน interferometer detector ค่าดัชนีหักเหที่ต่างกันของสารตัวอย่างและของสารละลายเปรียบเทียบทำให้เกิดความแตกต่างของระยะทางที่แสงผ่าน ซึ่งวัดได้ด้วย interferometer เป็นเศษส่วนของความยาวคลื่นแสง (fraction of the wavelength)

ลักษณะเฉพาะของเครื่องดีเทคเตอร์ประเภทนี้สามารถใช้ได้กับตัวถูกละลายได้แทบทุกชนิด แต่มีสภาพไวต่ำไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาสารที่มีปริมาณน้อยๆ ดีเทคเตอร์นี้ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ จึงจำเป็นจะต้องควบคุมให้อุณหภูมิของ flow cell คงที่ แต่ดีเทคเตอร์ชนิดนี้ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหล เป็นเครื่องที่ใช้ง่าย เชื่อถือได้ ไม่มีการทำลายสาร แต่ไม่เหมาะที่จะใช้กับ gradient elution สำหรับการเพิ่มสภาพไวของดีเทคเตอร์นี้ สามารถทำได้โดยพิจารณาจากการเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ให้มีค่า RI ต่างจากสารตัวอย่างที่สนใจให้มากที่สุด ถึงแม้ว่าเครื่องดีเทคเตอร์นี้จะมีขีดจำกัดบ้างในกรณี เช่น การใช้กับ gradient elution ไม่ได้ก็ตาม แต่ก็ยังเป็นที่ยอมรับกันมากใน HPLC โดยเฉพาะใช้เป็นดีเทคเตอร์สำหรับ Gel Chromatography

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ดีเทคเตอร์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent Detector)

ดีเทคเตอร์ชนิดนี้จะมีสภาพไวสูงและเฉพาะ (selective) เนื่องจากมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้ออกมาจากตัวถูกละลายบางชนิดเมื่อถูกกระตุ้น (excited) ด้วยแสงยูวี แสงยูวี จากแหล่งกำเนิดให้ผ่านเครื่องกรองแสง หรือโมโนโครเมเตอร์ เพื่อให้แสงที่มีความยาวตามที่ต้องการ ผ่านเข้าไปยัง flow cell ที่ใส่สารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์ สารตัวอย่างจะให้ฟลูออเรสเซนซ์ ออกมาซึ่งมีความยาวคลื่นเฉพาะจะผ่านไปยังฟิลเตอร์หรือโมโนโครเมเตอร์เพื่อตัดแสงที่ไม่ต้องการ ออก จากนั้นจึงให้แสงผ่านเข้าไปยังดีเทคเตอร์ซึ่งเป็นโฟโตเซลล์ ดีเทคเตอร์ชนิดนี้มีประโยชน์มากเมื่อนำมาใช้ตรวจหาสารในสารตัวอย่างทางชีวภาพ (biological samples) ต่างๆ ที่มีปริมาณน้อยๆ

2.5.3 ประสิทธิภาพการแยกใน HPLC

2.5.3.1 Capacity Factor (K)

Capacity Factor เป็นตัวบ่งบอกถึงการเหนี่ยวรั้งองค์ประกอบต่างๆ ของสารตัวอย่างใน คอลัมน์ว่าสารตัวอย่างใช้เวลาอยู่ใน stationary phase นานเป็นกี่เท่าของเวลาที่อยู่ใน mobile phase ค่า K เป็นค่าเฉพาะของสารๆ หนึ่ง โดยขึ้นอยู่กับ stationary phase, mobile phase, อุณหภูมิ, คุณภาพของสารบรรจุและอื่นๆ ซึ่งจะวัดได้จากตำแหน่งพีคของสารตัวอย่างในโครมาโตแกรม

2.5.3.2 ความจำเพาะเจาะจงในการแยก (selectivity, α)

Selectivity หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า separation factor เป็นอัตราส่วนของค่า capacity factor ต่อค่าองค์ประกอบอ้างอิง ซึ่งค่า α ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ขององค์ประกอบตัวอย่าง ค่า α ไม่ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของคอลัมน์ ได้แก่ ความยาว คุณภาพของสารบรรจุ ความหนาของฟิล์ม ของ stationary phase และค่าความเร็วของ mobile phase แต่ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและคุณสมบัติของ stationary phase นอกจากนี้สารปนเปื้อนใน mobile phase เช่น น้ำ จะมีผลอย่างมากต่อค่า α

$$\alpha = K_2 / K_1$$

เมื่อ K_1 = capacity factor ขององค์ประกอบที่ 1

K_2 = capacity factor ขององค์ประกอบที่ 2

เพื่อให้สามารถแยกองค์ประกอบทั้ง 2 ชนิดออกจากกันได้ แต่ละตัวจะต้องมีค่าหรือ retention time ที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3.3 ความเร็วเชิงเส้นตรงของตัวทำละลาย (Linear Solvent Velocity, U)

ความเร็วเชิงเส้นตรงของตัวทำละลาย เป็นค่าอัตราการไหลของ mobile phase ในหน่วย เซนติเมตรต่อนาที เนื่องจากเป็นค่าที่ไม่ขึ้นอยู่กับพื้นที่หน้าตัดของคอลัมน์ และเป็นสัดส่วนโดยตรง กับค่าความดันย้อนกลับในคอลัมน์สามารถคำนวณ linear velocity ได้จากค่า dead time, t_0 ดัง สมการ

$$U = L / t_0$$

เมื่อ L = ความยาวของคอลัมน์

t_0 = dead time หรือ mobile phase hold-up time

2.5.3.4 ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (Column Efficiency)

ประสิทธิภาพของคอลัมน์ เป็นความสามารถของระบบ โครมาโตกราฟี ในการให้พีคที่แคบ หรือแหลมคม ซึ่งการที่จะได้พีคที่แคบนั้น ก็ต่อเมื่อจะต้องทำให้โซนหรือแถบขององค์ประกอบของ ตัวอย่างขณะเดินทางผ่านคอลัมน์นั้น มีการเจือจางของแถบหรือการขยายตัวของแถบ (band broadening) นั้น เกิดขึ้นน้อยที่สุด การขยายตัวของแถบนั้นเกิดขึ้นเนื่องจากการเจือจางของ องค์ประกอบของตัวอย่างอย่างต่อเนื่องในขณะที่พีคเหล่านั้นเคลื่อนผ่านคอลัมน์ ดังนั้นระบบที่ให้พีค กว้างจึงเป็นระบบที่ไม่มีประสิทธิภาพ

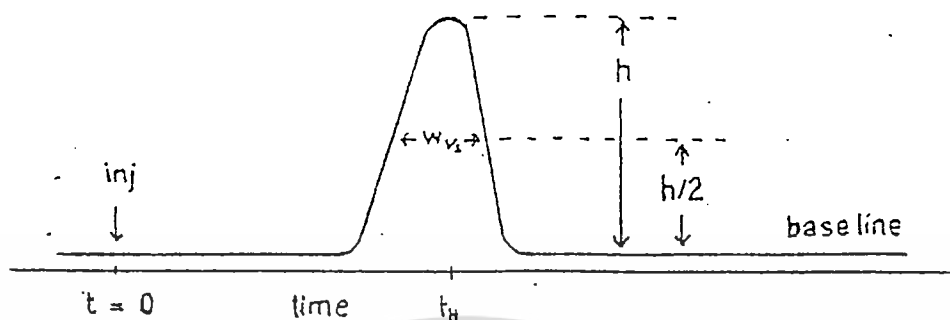
ประสิทธิภาพของคอลัมน์ เป็นการวัดจำนวน plate ทางทฤษฎี (number of theoretical plates) หรือค่า N ของระบบแสดงได้ดังสมการและระบบที่ให้พีคแคบจะมีค่า N มาก ส่วนระบบที่ ให้พีคกว้างจะมีค่า N น้อย

$$N = 5.54 (t_R / w_{1/2})^2$$

เมื่อ w = ความกว้างของพีคที่ครึ่งหนึ่งของความสูง

สำหรับคอลัมน์ใดที่มีค่า N สูง จะสามารถนำมาใช้แยกตัวอย่างที่ซับซ้อนได้มากขึ้นบางครั้ง เราอาจจะระบุประสิทธิภาพในหน่วย N ต่อความยาวคอลัมน์ (L) เรียกว่า ความสูงของ plate ทาง ทฤษฎี (Height Equivalent to Theoretical Plate, HETP) ซึ่งหาได้จากสมการ

$$HETP = L / N$$



รูปที่ 2.8 การหาจำนวนเพลททางทฤษฎีของคอลัมน์

2.5.3.5 ความสามารถในการแยก (Resolution, R)

Resolution ของคอลัมน์เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถในการแยกระหว่าง 2 พีคหรือองค์ประกอบที่อยู่ติดกันของคอลัมน์ ความเฉพาเฉาะจงของคอลัมน์และค่า capacity factor (K') สำหรับสารนั้นๆ และค่า R_s แสดงได้ดังสมการ

$$R_s = (1/4)(\alpha - 1)N^{1/2}(K' / 1 + K')$$

เมื่อ K' คือ ค่าเฉลี่ยของค่า K ทั้งสองพีค

การหาค่า Resolution จากโครมาโตแกรมสามารถทำได้โดยคำนวณจากสมการ

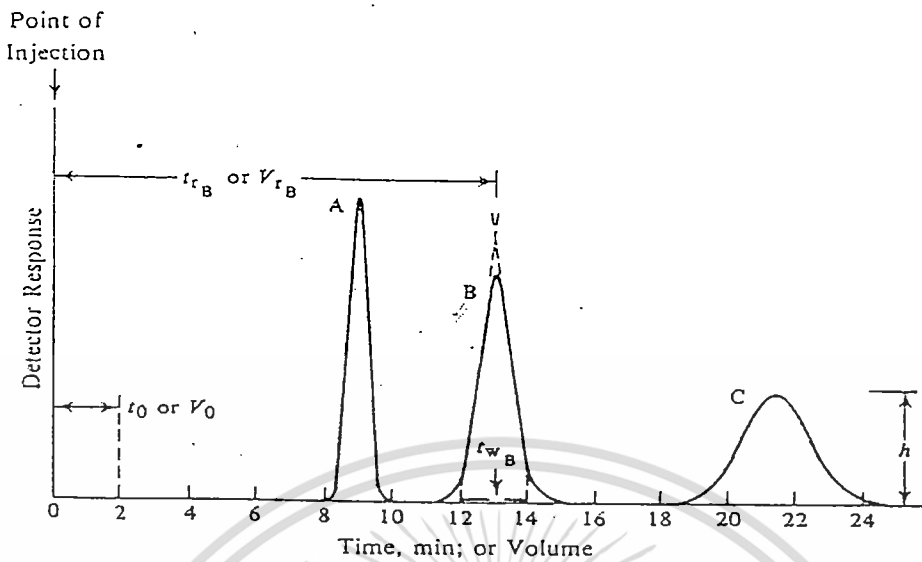
$$R_s = 2(t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$$

เมื่อ t_1 และ t_2 คือ ค่า retention time (t) ของพีค 1 และพีค 2

W_1 และ W_2 คือ ความกว้างของพีค 1 และพีค 2

โดยทั่วไปถ้าค่า R ของทั้ง 2 พีคมีค่ามากกว่า 1.25 ก็ถือว่าแยกกันได้ดีและในขณะเดียวกันค่า R ที่น้อยกว่าจะบ่งบอกถึงการซ้อนกันของพีคสามารถแสดงตัวอย่างผลของค่า resolution ต่อโครมาโตแกรมดังรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

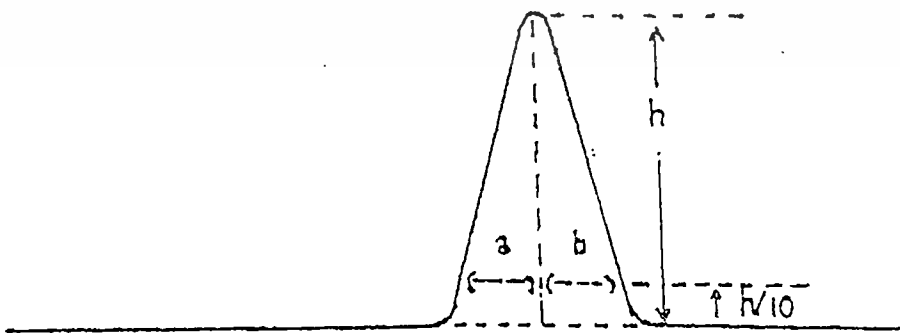


รูปที่ 2.9 resolution ในโครมาโตแกรม liquid chromatography

2.5.3.6 ความสมมาตรของพีค (Peak Symmetry)

เพื่อความสะดวกต่อการวัดในทางปฏิบัติ ความสมมาตรของพีคที่จะวัดที่ 10% ของความสูงของพีค โดยที่ a คือระยะจากต้นพีคถึงตำแหน่งที่ตรงกับจุดสูงสุดของพีค และ b คือ ระยะจากตำแหน่งที่ตรงกับจุดสูงสุดของพีคถึงระยะปลายพีค

$$\text{ความสมมาตรของพีค (peak symmetry, A)} = b / a$$



รูปที่ 2.10 การหาค่าความสมมาตรของพีค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับพีกที่สมมาตรจะได้ค่า $A = 1.0$ ส่วนพีกที่เป็นหาง (tailing peak) จะมี A จะมี A น้อยกว่า 1.0 การที่รูปร่างพีกที่ได้ไม่สมมาตรจะทำให้อำนาจในการแยกสารของคอลัมน์ลดลง เนื่องจากลักษณะของพีกที่เป็นหางอาจจะไปรบกวนและซ้อนทับพีกอื่นได้

2.5.4 การประยุกต์ใช้เทคนิค HPLC

2.5.4.1 การทำคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative Analysis)

จุดประสงค์สำคัญของการทำโครมาโตกราฟี ก็เพื่อจะวิเคราะห์สารตัวอย่างว่าเป็นสารอะไร มีกี่ชนิด และเป็นสารใดบ้าง โดยทั่วไปในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC นั้นมักจะใช้วิธีเปรียบเทียบค่า retention time ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน โดยเริ่มต้นด้วยการวิเคราะห์สารตัวอย่างเสียก่อนจนได้การแยกที่ดี แล้วจึงใช้สารมาตรฐานวิเคราะห์ที่สภาวะเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบ การเปรียบเทียบนี้อาจจะเป็นเพียงการให้ข้อมูลขั้นแรกเท่านั้นเพราะสารต่างชนิดกัน อาจจะให้ค่า retention time เท่ากันได้ดังนั้นอาจจะต้องวิเคราะห์อีกครั้งหนึ่งโดยใช้พารามิเตอร์ต่างกัน คือใช้คอลัมน์ใหม่ ตัวทำละลาย และอัตราเร็วของการไหลใหม่หรือมีฉะนั้นก็ใช้ LC เทคนิคอื่น เพื่อเปรียบเทียบจะทำให้แน่ใจในผลการวิเคราะห์มากขึ้น

อีกวิธีที่นิยมใช้กันในการบ่งชี้พีก (identify peak) ในโครมาโตแกรมคือใช้เทคนิคที่เรียกว่า “Spiking” ซึ่งเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการที่จะบอกว่าพีกไหนเป็นของสารใดในของผสมที่ทราบชนิดต่างๆ ของสารแล้วแต่ไม่ทราบตำแหน่งของพีก เช่น มีของผสมวิตามินบี 1 กับบี 2 เมื่อวิเคราะห์ด้วย LC ได้ 2 พีก ซึ่งถ้าอยากทราบว่าพีกไหนเป็นของบี 1 หรือบี 2 ใช้เทคนิค Spiking จะบอกได้อย่างชัดเจนโดยเติมวิตามินบี 1 หรือบี 2 ลงในสารตัวอย่าง เช่น เติมบี 1 ลงไปถ้าโครมาโตแกรมที่ได้พีกใดมีพื้นที่มากขึ้นหรือสูงขึ้น ก็แสดงว่าพีกนั้นเป็นของบี 1

เทคนิคอื่นๆ ที่สามารถช่วยทำให้การวิเคราะห์นั้นถูกต้องแม่นยำขึ้นโดยนำสารละลายที่ได้จากการแยกเป็นส่วนๆ จาก LC ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นๆ เช่น MS IR NMR UV Spectrophotometer หรือปฏิกิริยาการเกิดสี เป็นต้น

2.5.4.2 การทำปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative Analysis)

ในการทำปริมาณวิเคราะห์จำเป็นต้องเพิ่มอุปกรณ์เข้าไปจากการทำคุณภาพวิเคราะห์ที่สามารถอ่านค่าบางค่าได้เพื่อนำไปทำปริมาณวิเคราะห์คือ จะต้องใช้ recorder และ integrator เพื่อใช้คำนวณพื้นที่พีก หรือความสูงของพีก

ความสูงของพีก (peak height; h') ซึ่งได้จากสัญญาณไฟฟ้าของเครื่องตรวจวัดมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่ผ่านเข้าไปในเซลล์ จึงสามารถนำไปใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างได้ วิธีนี้นับว่าเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด และทำได้รวดเร็ว แต่ก็มีข้อเสียหลายอย่างคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสูงของพีค โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าพีคตกสเกลทำให้วัดไม่ได้ ตัวอย่างการทำปริมาณวิเคราะห์โดยการวัดความสูงของพีคจาก base line

พื้นที่ของพีค (peak area) การใช้พื้นที่เพื่อนำไปหาปริมาณของสารตัวอย่างได้จากการอาศัยความจริงที่ว่า ปริมาณของสารหรือความเข้มข้นของสารจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับพื้นที่พีคดังสมการ

$$C_i = f_i A_i$$

เมื่อ C_i = ความเข้มข้น

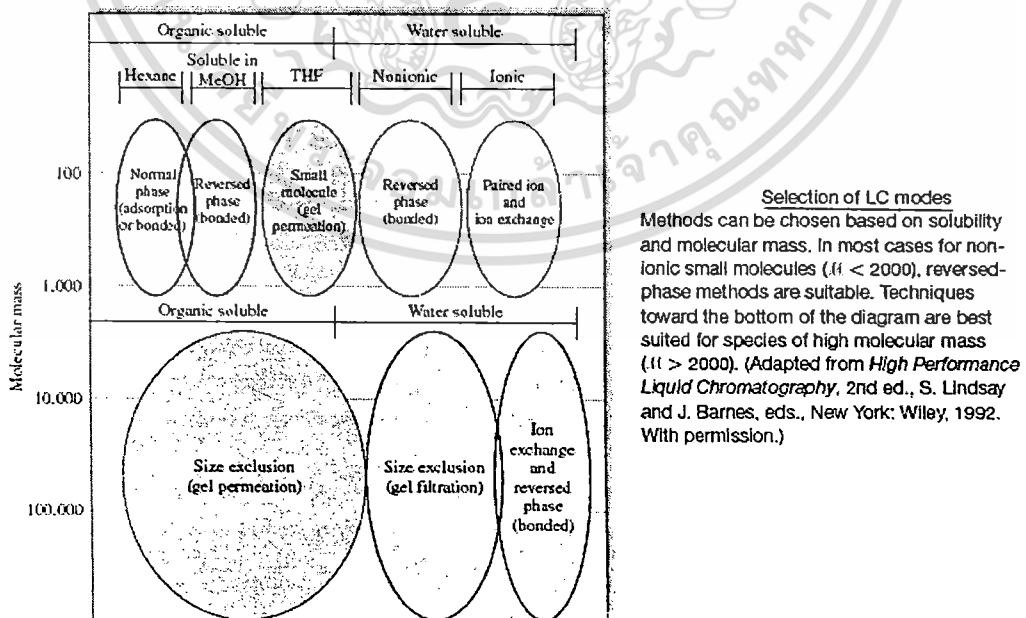
A_i = พื้นที่ของพีค

f_i = detector response factors

2.5.5 การปรับสภาวะการแยกใน HPLC

การปรับสภาวะของการแยก โดยการปรับพารามิเตอร์ของคอลัมน์ซึ่งได้แก่ K' , α และ ค่า N การจำแนกชนิดตัวอย่างแรกสุด ใช้ค่าน้ำหนักโมเลกุลเป็นเกณฑ์ในการพิจารณา ในกรณีที่มีมากกว่า 2000 ควรทดลองกับ Mode การแยกชนิด EC (Exclusion Chromatography) เนื่องจากเป็น Mode การแยกที่เหมาะสมกับ โมเลกุลขนาดใหญ่

พิจารณาการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ให้ใช้ Mode การแยกชนิด GPC หรือ Gel Permeation Chromatography โดยอนุภาคใน GPC นั้นเป็นพอลิเมอร์อินทรีย์ที่มีรูพรุน (organic porous polymer) ซึ่งเหมาะกับสารละลายอินทรีย์



รูปที่ 2.11 การเลือก Mode ของการแยกตามธรรมชาติของตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนของศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ถ้าตัวอย่างละลายน้ำควรใช้ mode การแยก exclusion ชนิด GFC หรือ Gel Filtration Chromatography ซึ่งใช้น้ำเป็น mobile phase อนุภาคของ GFC มีคุณสมบัติพองตัวในน้ำ

Normal phase chromatography เป็น mode การแยกที่ใช้อนุภาคบรรจุชนิดมีขั้ว เช่น silica gel และใช้ตัวทำละลายชนิดที่ไม่มีขั้ว เช่น hexane เราจำแนกตัวอย่างต่อโดยเราพิจารณาว่าเป็นสารอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) ซึ่งสามารถนำไฟฟ้าได้ หรือไม่เป็นสารอิเล็กโทรไลต์ (non-electrolyte) ซึ่งไม่นำไฟฟ้า ถ้าไม่เป็นสารอิเล็กโทรไลต์ ให้ทดลองใช้คอลัมน์ BPC ชนิด reverse phase โดยทั่วไป หรืออาจใช้คอลัมน์ reverse phase ชนิดพิเศษโดยเฉพาะ เช่น คอลัมน์สำหรับแยกน้ำตาล ถ้าตัวอย่างเป็นสารอิเล็กโทรไลต์ เราจะต้องเลือกเอาระหว่าง mode การแยกชนิด IE (Ion Exchange) หรือ IPC (Ion Pair Chromatography) IE เป็น mode การแยกที่เหมาะสมกับตัวอย่างไอออนิกที่ละลายน้ำโดยทั่วไป โดยใช้สารละลาย buffer เป็น mobile phase

ในการพัฒนาวิธีสำหรับคอลัมน์ใดๆ นั้น ให้พิจารณาจากสมการของ basic resolution, $R = (K'/1+K')(\alpha-1/\alpha)(\sqrt{N}/4)$, capacity selectivity column efficiency จะเห็นว่าค่า resolution ขึ้นอยู่กับ 3 เทอมด้วยกัน คือ เทอม capacity factor เทอม selectivity และเทอม column efficiency ดังนั้นเราสามารถเพิ่มค่า resolution ได้โดยการปรับ (optimize) แต่ละเทอมในสมการนี้ การปรับเทอม capacity factor หรือค่า K' ซึ่งหาได้จาก t_R/t_0 ให้อยู่ในระหว่าง 2-10

ตารางที่ 2.2 ผลของค่า K' ต่อเทอม $K'/(1+K')$

K'	$K'/(1+K')$
0	0
1	0.5
2	0.67
3	0.75
10	0.91
α	1.00

ตารางที่ 2.2 แสดงว่า เมื่อค่า K' เป็นศูนย์ เทอม $K'/(1+K')$ จะเป็นศูนย์ ทำให้เทอมของ resolution เป็นศูนย์ และเมื่อ K' เข้าใกล้ α เทอมนี้จะเข้าใกล้ 1.00 ซึ่งเป็นค่าสูงสุดที่เป็นไปได้ กฎโดยทั่วไปแรกสุดในกระบวนการ optimization คือการปรับ polarity ของ mobile เพื่อให้ได้ค่า K' อยู่ระหว่าง 2-10 เนื่องจากที่ค่า K' น้อยกว่าเทอม $K'/(1+K')$ จะลดลงอย่างมาก แต่ถ้าค่า K' มากกว่า 10 จะทำให้ค่า resolution เพิ่มขึ้นได้เพียงเล็กน้อย และต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์นานเกินไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขั้นตอนที่ 2 ซึ่งถือว่าเป็นขั้นตอนที่ถือว่ามีความสำคัญมาก ได้แก่ ขั้นตอน optimization เพื่อเพิ่มค่า selectivity หรือค่า α ซึ่งหาได้จาก

$$\alpha = \text{selectivity} = t'_{R2} / t'_{R1}$$

α เป็นอัตราส่วนของค่า adjusted retention time ของพีคสองพีค ค่า $\alpha = 1$ หมายถึง พีคสองจะ elute ออกมาพร้อมๆ กัน ซึ่งจะทำให้เทอม selectivity คือ $(\alpha - 1/\alpha)$ เป็นศูนย์ และทำให้เทอม resolution เป็นศูนย์ไปด้วย

ตารางที่ 2.3 ผลของค่า $\alpha - 1/\alpha$

α	$\alpha - 1/\alpha$
1.00	0
1.05	0.05
1.10	0.09
1.50	0.33

ตารางที่ 2.3 แสดงให้เห็นว่า เมื่อค่า α เพิ่มจาก 1.05 ไปเป็น 1.50 เทอม selectivity จะเพิ่มจาก 0.05 ไปเป็น 0.33 และทำให้ค่า resolution เพิ่มขึ้นเกือบ 7 เท่า เราสามารถปรับค่า α ได้โดย (1) การเปลี่ยนสัดส่วนผสมของ mobile phase (2) โดยการ activation คอลัมน์ และ (3) โดยการเปลี่ยนคอลัมน์ และขั้นตอนสุดท้าย ในการปรับค่า resolution สามารถทำได้โดย (1) การปรับปรุงประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency) (2) โดยการใช่วัสดุคอลัมน์ที่ยาวขึ้น ซึ่งอาจนำคอลัมน์สองอันมาต่อกันเป็นอนุกรม (3) โดยการใช้อัตราการไหลของ mobile phase ช้าลงหรือ (3) โดยการใช่วัสดุคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น คอลัมน์ที่ใช้อินนุภาคบรรจุเล็กลง

ต่อไปนี้เป็นตัวอย่างของขั้นตอน optimization ของการแยก โดยคอลัมน์ LSC Adsorption
 ขั้นตอนที่ 1 - โดยการใช้คอลัมน์ที่มีความยาวประมาณ 15 cm และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในประมาณ 3-4 mm ที่บรรจุด้วยอนุภาค totally porous silica gel

ขั้นตอนที่ 2 - เลือกสารมาตรฐานซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สนใจ หรือที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด แล้วฉีดในปริมาณเล็กน้อยเพียง 2-3 ไมโครกรัมใน 10 ไมโครลิตร โดยใช้ mobile phase ที่ polar และใช้อัตราการไหลสูงๆ ประมาณ 1.0-1.5 ml/min

ขั้นตอนที่ 3 - ภายใต้สภาวะดังกล่าว สารมาตรฐานควรจะ elute ออกมาจากคอลัมน์ โดยใช้เวลาเพียงไม่กี่นาที แต่ถ้าไม่เป็นเช่นนั้นแสดงว่าตัวอย่าง polar มากเกินไป สำหรับกรณีนี้ ควรหันเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปใช้คอลัมน์ชนิด reverse phase แทน แต่ถ้าตัวอย่าง elute ออกมาอย่างรวดเร็ว แสดงว่าเลือก mode การแยกถูกต้องแล้ว ให้ไปทำต่อในขั้นตอนที่ 4

ขั้นตอนที่ 4 - ให้ลดความแรงหรือ polarity ของ mobile phase จนกระทั่งได้ค่า K' อยู่ระหว่าง 2-10

ขั้นตอนที่ 5 - ฉีดตัวอย่างแล้ววัดค่า α ของพีคที่สนใจ ถ้าได้ค่าที่พอเพียงแล้ว โดยประมาณ 1.2 หรือมากกว่า ให้ทำต่อในขั้นตอนที่ 6 แต่ถ้ายังไม่ดีขึ้นให้พยายามเพิ่มค่า α โดยการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนผสมของ mobile phase หรือโดยการใช้ silica gel ที่ active มากขึ้น ซึ่งอาจใช้วิธีการ activate คอลัมน์โดยการป้อนตัวทำละลายที่แห้งผ่านคอลัมน์ ประมาณ 1 ชั่วโมง หรือโดยการเลือก silica gel ที่มีพื้นที่ผิวมากๆ

ขั้นตอนที่ 6 - เพิ่มจำนวนเพลท N โดยการใช้อัตราการไหลช้าลง โดยการใช้คอลัมน์ยาวขึ้น การใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่า หรือ โดยการใช้คอลัมน์ใหม่ ทั้งนี้เนื่องจากคอลัมน์โดยเฉพาะคอลัมน์ silica gel จะเสื่อมสภาพไปกับอายุ ดังนั้นคอลัมน์ใหม่ๆ โดยทั่วไปจึงสามารถแยกตัวอย่างได้ดีกว่า

อีกตัวอย่างหนึ่งของขั้นตอน optimization แต่เป็นกรณีของคอลัมน์ชนิด reverse phase สามารถสรุปขั้นตอนได้ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 - เริ่มต้นด้วยคอลัมน์ C-18 bonded phase ยาว 15 cm ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาด 3-4 mm ขนาดอนุภาคบรรจุ 5 ไมโครเมตร

ขั้นตอนที่ 2 - เลือกสารมาตรฐาน และฉีดสารละลายเจือจาง โดยใช้ methanol บริสุทธิ์เป็น mobile phase ถ้าสารมาตรฐานออกมาอย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่กี่นาที ให้ทำต่อในขั้นตอนที่ 3-5 แต่ถ้าพีค elute ออกมาช้ามาก แสดงว่าเลือกคอลัมน์ไม่เหมาะสม ให้ไปทดลองกับคอลัมน์ชนิด normal phase แทน

ขั้นตอนที่ 3 - เพิ่มเปอร์เซ็นต์น้ำใน methanol จนกระทั่งได้สารละลายผสมของ mobile phase ที่ให้ค่า K' ประมาณ 5

ขั้นตอนที่ 4 - ฉีดตัวอย่างโดยใช้ mobile phase ที่เลือกได้ในขั้นตอนที่ 3 และวัดค่า α ถ้าค่า α ที่ได้น้อยกว่า 1.2 ให้ทดลองกับระบบตัวทำละลายอื่นๆ พบว่าสารละลายผสมของ acetonitrile และน้ำ หรือ ternary mixture ของ methanol น้ำ และ acetonitrile มักจะให้ค่า α ต่างๆ มากกว่า สารละลายผสมของ methanol กับน้ำ

ขั้นตอนที่ 5 - ถ้าได้ค่า α เป็นที่น่าพอใจ แต่ยังคงต้องการปรับปรุงค่า resolution ก็สามารถทำได้โดยการเพิ่มค่าจำนวนเพลท N, โดยการใช้อัตราการไหลช้าลง ใช้คอลัมน์ยาวขึ้นหรือการใช้คอลัมน์ใหม่

แนวทางการแก้ปัญหาใน HPLC ที่ถือว่ามีประสิทธิภาพมากที่สุด อาจจะแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. การหาสาเหตุและการแก้ปัญหา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การป้องกันมิให้เกิดปัญหาขึ้นมาใหม่
 3. ทราบว่าควรขอความช่วยเหลือ ในกรณีพิเศษจากใครและในสถานการณ์อย่างไร
- หลังจากการแก้ปัญหาโปรดยาลัมที่จะบันทึกปัญหาที่เกิดขึ้น และการแก้ไขไว้ในสมุดบันทึกประจำเครื่อง สำหรับในที่นี่เป็นการนำเสนอการแก้ไขปัญหาทั่วไปที่เกิดขึ้นใน HPLC ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือปัญหาทางโครมาโตกราฟฟีและปัญหาในทางการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ชะอม (*Acacia pennata* subsp. *insuavis*) ผักชีลาว (*Anethum graveolens* Linn.) ยี่หระ (*Carum carvi* Linn.) ขี้เหล็ก (*Cassia siamea* Lamk.) บัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) ตำลึง (*Coccinia grandis* (L.) Voigt) หอมเฒ่า (*Coriadrum* sp.) ผักถูด (*Diplazium esculentum* (Retz.) Swartz) ผักชีฝรั่ง (*Eryngium foetidum* Linn.) ชะมวง (*Garcinia cowa* Roxb.) ผักหนาม (*Lasia spinosa* Thw.) ผักแขยง (*Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr) มะระจีน (*Momordica chrantina* Linn.) ขย (*Morinda citrifolia* Linn.) แมงลัก (*Ocimum americana* Linn.) ผักเพรว (*Polygonum odoratum* Lour.) ดอกแค (*Sesbania grandiflora* Desv.) โสน (*Sesbania javanica* Miq.) ผักคราด (*Spilanthes acmella* Murr.) และย่านาง (*Tiliacora triandra* Diels.) จากตลาดในกรุงเทพมหานครและชลบุรี

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ แบคทีเรีย 13 ชนิดและยีสต์ 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Enterobacter aerogenes* DMST 8841, *Escherichia coli* DMST 4212, *Klebsiella pneumoniae* DMST 8216, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076, *Salmonella* Rissen DMST 7097, *Salmonella* Typhimurium DMST 0562 และ *Yersinia enterocolitica* DMST 9380 ได้มาจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข สำหรับเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISIR 118, *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Pediococcus pentosaceus* TISTR 414, *Candida lipolytica* TISTR 5655, *Hanseniaspora uvarum* TISTR 5153, *Pichia membranaefaciens* TISTR 5093, *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159, *Schizosaccharomyces pombe* TISTR 5205 และ *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ได้แก่ Tryptic Soy Agar/ Tryptic Soy Broth (TSA/TSB, pH 7.3 ± 0.2, Difco), deMan Rogosa Sharpe Agar (MRS, pH 6.5 ± 0.2 Difco), Mueller Hinton Agar/ Mueller Hinton Broth (MHA/MHB, pH 7.3±0.2 Difco), Brain Heart Infusion (BHI, pH 7.4 ± 0.2, Difco) และ Saboraud Dextrose Agar /Saboraud Dextrose Broth (SDA/SDB, pH 5.6 ± 0.2, Difco)

ตารางที่ 3.1 ผักพื้นบ้านของไทยและส่วนของพืชที่ใช้วิเคราะห์

ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนของพืช
ชะอม	<i>Acacia pennata</i> subsp. <i>insuavia</i>	ใบ
ผักชีลาว	<i>Anethum graveolens</i> Linn.	ใบ
ยี่หระ	<i>Carum carvi</i> Linn.	ใบ
ชีเหล็ก	<i>Cassia siamea</i> Lamk.	ใบ
บัวบก	<i>Centella asiatica</i> (Linn.) Urban	ใบ
ตำลึง	<i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt.	ใบ
หอมแย้	<i>Coriadrum</i> sp.	ใบ
ผักกูด	<i>Diplazium esculentum</i> (Retz.) Swartz	ใบ
ผักชีฝรั่ง	<i>Eryngium foetidum</i> Linn.	ใบ
ชะมวง	<i>Garcinia cowa</i> Roxb.	ใบ
ผักหนาม	<i>Lasia spinosa</i> Thw.	ใบ
ผักแขยง	<i>Limnophila aromatica</i> (Lamk.) Merr	ใบ
ขอ	<i>Morinda citrifolia</i> Linn.	ใบ
มะระขี้นก	<i>Momordica chrantina</i> Linn.	ผล
แมงลัก	<i>Ocimum americana</i> Linn.	ใบและดอก
ผักแพรว	<i>Polygonum odoratum</i> Lour.	ใบ
แค	<i>Sesbania grandiflora</i> Desv.	ดอก
โสน	<i>Sesbania javanica</i> Miq.	ดอก
ผักคราด	<i>Spilanthes acmella</i> Murr.	ใบและดอก
ย่านาง	<i>Tiliacora triandra</i> Diels.	ใบ

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ได้แก่ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), DMSO (dimethyl sulphoxide) เมทานอล เพนนิซิลินจี (penicillin G) แอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B, Bistol-Myers Squibb) วิตามินอี (α -tocopherol), Folin-Ciocalteu (folin-ciocalteu's phenol) กรดแกลลิก (gallic acid, Fluka) และ Sodium carbonate (Na_2CO_3 , Ajax Finechem)

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ ได้แก่ เครื่องปั่นเหวี่ยง เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator, BUCHI Rovapor R-200/205 รุ่น R205V800) ตู้อบลมร้อน ไมโครเวฟ ตู้บ่มเชื้อ ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow) หม้อนึ่งความดัน เครื่องเย้า เครื่องฟรีสตรายซ์ (freeze drier, Labconco Model LypH.Lockb) เครื่อง microplate reader (iEMS Reader MF, Labsystems) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนเพื่อการค้าและอยู่ภายใต้การคุ้มครองตามกฎหมายว่าด้วยการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายเปปโตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันกับเซลล์ นำไปปั่นเหวี่ยงและเทส่วนใสทิ้งไปเป็นการล้างเซลล์ 1 ครั้ง จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วยขั้นตอนเช่นเดียวกันนี้อีกหนึ่งครั้ง ทำให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอยของเซลล์ด้วยสารละลายเปปโตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับความขุ่นของเซลล์ให้เท่ากันทุกหลอดด้วย McFarland Standard เบอร์ 5 ยกเว้นแบคทีเรียกรดแลคติกปรับความขุ่นด้วย McFarland Standard เบอร์ 0.5 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^7 CFU ต่อ มิลลิลิตร

3.2.1.3 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผักพื้นบ้านด้วยเทคนิคการแพร่บนอาหารวุ้น (agar diffusion technique)

ทำการทดลองด้วยวิธีการของ Jorgensen และคณะ (1999) ดังนี้ เขียนระบุตำแหน่งที่วางแผ่นกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรบนจานอาหาร MHA (สำหรับแบคทีเรีย) หรืออาหาร SDA (สำหรับยีสต์) ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารแขวนลอยของเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ทำการถู (swab) ให้ทั่วผิวอาหาร MHA หรือ SDA ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที จากนั้นใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรวางตรงตำแหน่งที่ระบุไว้ หยดสารสกัดแต่ละชนิดที่จะทดสอบความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกระดาษกรองรวมทั้งหยดสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ซึ่งใช้เป็น Negative control หยดสารละลายเพนิซิลินจี (ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และแอมพิเทอริซินบี (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งใช้เป็น Positive control ลงบนแผ่นกระดาษกรองที่วางลงบนผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้ 15 นาที สังเกตดูว่าสารสกัดซึมเข้าสู่ผิวหน้าอาหารแล้วจากนั้นจึงคว่ำจานอาหาร และกรณีที่ใช้ที่ทดสอบเป็นแบคทีเรีย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อยีสต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาด โซนใสรอบๆ แผ่นกระดาษกรองที่หยดสารสกัดจากผักพื้นบ้าน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.1.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธีการเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution technique)

ทำการทดลองด้วยวิธีการของ Jorgensen และคณะ (1999) ดังนี้ สำหรับการทดลองที่ใช้เชื้อแบคทีเรียทดสอบ เติมอาหาร MHB ลงในจานหลุมที่ปราศจากเชื้อ (96-well microtiter plate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นเติมสารสกัดหยาบของผักพื้นบ้านแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ซึ่งมีความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรกของแต่ละแถว (หนึ่งแถวต่อสารสกัดหนึ่งชนิด) ทำการเจือจางสารสกัด 2 เท่า (2-fold dilution) ด้วยอาหาร MHB ที่เติมไว้แล้วไปเรื่อยๆ จนครบ 8 หลุม จากนั้นเติมสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมไว้ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดสุดท้ายเป็น 166.7, 83.3, 41.7, 20.8, 10.4, 5.2, 2.6 และ 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับในแต่ละหลุม ในกรณีที่ใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียทดสอบ ใช้อาหารเอกสาร เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนักผู้ดำเนินการไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MRS แทนอาหาร MHB ทำการเจือจางกับสารสกัดเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น สำหรับ Positive control ใช้สารปฏิชีวนะ คือ เพนนิซิลินจี โดยทำการเจือจางเพนนิซิลินจี 10 เท่า (10-fold dilution) ตั้งแต่ 100,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ไปเรื่อยๆจนกระทั่งได้ความเข้มข้นเป็น 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปิเปตเพนนิซิลินจีแต่ละความเข้มข้นลงไปในหลุมของ microtiter plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำการเจือจาง 2 เท่าไปเรื่อยๆ จนครบ 8 หลุมจะได้ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี โดยเรียงตามลำดับความเข้มข้นจากมากไปหาน้อย ดังนี้ ความเข้มข้น 50000, 5000, 500, 50, 5, 0.5, 0.05 และ 0.005 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเติมสารแขวนลอยของเซลล์ 20 ไมโครลิตร สำหรับ Negative control เติมสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรแทนสารสกัดหยาบจากผัก จากนั้นนำ Microtiter plate ทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Microplate reader ก่อนที่จะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader อีกครั้ง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านไทยที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ คือค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ถ้าหากสารสกัดหยาบของผักพื้นบ้านไทยสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ จะมีค่าการดูดกลืนแสงหลังบ่มน้อยกว่าหรือเท่ากับค่าการดูดกลืนแสงก่อนบ่ม

3.2.2 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน

3.2.2.1 การวิเคราะห์หาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน

ทำการทดลองตามวิธีการทดลองของ Brand-Williams และคณะ (1995) โดยนำตัวอย่างของสารสกัดแต่ละชนิดที่ได้จากข้อ 3.2.1.1 นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 5 ระดับ ได้แก่ 1000, 500, 100, 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 75 ไมโครลิตรมาผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.025 กรัมต่อลิตร (ในเมทานอล) ปริมาตร 2.925 มิลลิลิตร ในคิวเวตแต่ละอันและใช้เมทานอลแทนสารสกัดเพื่อใช้เป็นแบลนค์ (Blank) จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ หลังบ่มในที่มืดเป็นเวลา 0 และ 30 นาที และทำกราฟมาตรฐานของ DPPH โดยเตรียมสาร DPPH ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.003125, 0.0015625 และ 0.00078125 กรัมต่อลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร นำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ DPPH พร้อมทั้งหาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

คำนวณหาความเข้มข้นของ DPPH ที่เหลืออยู่จากปฏิกิริยาในคิวเวตแต่ละอันของสารสกัดแต่ละความเข้มข้นจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของ DPPH ที่ความเข้มข้นต่างๆ การหาเปอร์เซ็นต์ของ DPPH ที่เหลือ (% DPPH_{REM}) คำนวณได้โดยใช้สมการดังนี้

$$\% \text{DPPH}_{\text{REM}} = \frac{[\text{DPPH}]_{\text{T}}}{[\text{DPPH}]_{\text{T=0}}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่ให้ผู้อื่นนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ $[DPPH]_t$ หมายถึงความเข้มข้นของ $[DPPH]$ ที่เวลาใดๆ และ $[DPPH]_{t=0}$ หมายถึงความเข้มข้นของ $DPPH$ ที่เวลา 0 นาที จากนั้นจึงนำค่าเปอร์เซ็นต์ของ $DPPH$ ที่เหลือของสารสกัดแต่ละชนิด ณ ที่เวลาเสถียร (ที่เวลา 30 นาที) มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดต่อความเข้มข้นของ $DPPH$ (ไมโครกรัมของสกัดต่อมิลลิกรัมของ $DPPH$) หาสมการเส้นตรงจากกราฟเพื่อคำนวณหาค่า EC_{50} (effective concentration) ของสารสกัดแต่ละชนิด ค่า EC_{50} คือปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารสกัดที่จำเป็นต้องใช้ในการรีดิวซ์หรือลดปริมาณ สาร $DPPH$ เริ่มต้นไปร้อยละ 50 และหาค่า AE (antiradical efficiency) ซึ่งมีค่าเท่ากับ $1/EC_{50}$

3.2.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดหายาจากผักพื้นบ้านไทย

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดตามวิธีการของ Tepe และคณะ (2005) ดังนี้ เตรียมสารสกัดหายาของผักให้มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปิดสารสกัดความเข้มข้นนี้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่เติมน้ำกลั่น 46 มิลลิลิตรและเติมสาร Folin-Ciocalteu reagent ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นเติมสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงไป ทิ้งไว้นาน 2 ชั่วโมง เขย่าเป็นระยะๆ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก การทำกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกทำได้ดังนี้

ทำการเตรียมสารละลายกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 100, 50, 25, 10, 1 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองตามวิธีการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น แต่ใช้สารละลายกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้นต่างๆ แทนสารสกัดจากผัก เมื่อได้ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตรของสารละลายกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิกจะได้กราฟเส้นตรง หาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของตัวอย่างที่วิเคราะห์

3.2.3 การศึกษาคุณสมบัติการต้านมะเร็งและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดหายาจากผักพื้นบ้าน

การทดลองขั้นนี้ได้คัดเลือกสารสกัดจากผักพื้นบ้านจำนวน 4 ชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ เพื่อนำมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ฤทธิ์ในการต้านมะเร็งช่องปาก (oral cancer) มะเร็งเต้านม (breast cancer) และมะเร็งปอด (lung cancer)

3.2.3.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านมะเร็งช่องปากและมะเร็งเต้านม

การศึกษาการยับยั้งการเจริญของ KB (Human epidermal carcinoma of cavity, ATCC CCL-

17) และ MCF7 (Human breast adenocarcinoma, ATCC HTB-22) ทำได้โดยใช้วิธี Colorimetric เอกสารฉบับนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์หรือข้อบกพร่องในการคัดลอกเอกสารฉบับนี้ กรุณาแจ้งผู้จัดทำเอกสารทราบเพื่อปรับปรุงแก้ไขเอกสารฉบับนี้ให้ดียิ่งขึ้น

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cytotoxicity assay ซึ่งวัดการเจริญของเซลล์จากปริมาณโปรตีนในเซลล์ตามวิธีของ Skehan และคณะ (1990) โดยใช้ ellipticine และ doxorubicin เป็น positive control และใช้ DMSO เป็น negative control ในการทดลอง ได้นำเซลล์ที่เจริญอยู่ในระยะ logarithmic phase มาเจือจางให้ได้ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่และผสมให้เข้ากัน นำสารสกัดผักที่จะทดสอบมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปิเปต 200 ไมโครลิตรใส่ในหลุมของ microtiter plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากบ่มแล้วตรึงเซลล์ด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรแอซิดิก (trichloroacetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 50 นำ microtiter plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วยน้ำประปา และทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำ plate มาย้อมด้วย sulforhodamine B (SRB) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ในกรดแอซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 1 จากนั้นขจัด SRB ด้วยกรดแอซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 1 ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศก่อนที่จะละลายสีที่ถูกตรึงไว้ด้วย Tris base ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 นาทีบนเครื่องเขย่า วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร การทดสอบนี้วิเคราะห์โดย Bioassay Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (Biotec) และในการทดสอบได้ใช้ตัวอย่างของสารสกัดผัก 2 ตัวอย่าง (สกัด 2 ครั้ง) ต่อผัก 1 ชนิดและทดสอบคุณสมบัติด้านมะเร็งทั้งหมด 3 ซ้ำต่อสารสกัดผัก 1 ตัวอย่าง

3.2.3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านมะเร็งปอด

การศึกษาการยับยั้งการเจริญของ NCI-H187 (Human small cell lung carcinoma, ATCC CRL-5804) ทำได้โดยใช้วิธี MTT assay ตามวิธีของ Plumb และคณะ (1989) โดยใช้ ellipticine และ doxorubicin เป็น positive control และใช้ DMSO เป็น negative control ในการทดลองได้นำเซลล์ มาเจือจางให้ได้ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างสารสกัดผักที่จะทดสอบมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปิเปตตัวอย่าง 200 ไมโครลิตรใส่ในหลุมของ microtiter plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นเติมสารละลาย MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazole blue) ลงในแต่ละหลุม ห่อหลอดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ บ่มเป็นเวลา 4 วัน หลังบ่มนำเพลทมาปั่นที่ $200 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที ขจัดสารละลาย MTT ออกและละลาย formazan crystals ใน DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ Sorensen's buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร การทดสอบนี้วิเคราะห์โดย Bioassay Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (Biotec) และในการทดสอบได้ใช้ตัวอย่างของสารสกัดผัก 2 ตัวอย่าง (สกัด 2 ครั้ง) ต่อผัก 1 ชนิดและทดสอบคุณสมบัติด้านมะเร็งทั้งหมด 3 ซ้ำต่อสารสกัดผัก 1 ตัวอย่าง

3.2.3.3 การตรวจหาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (cytotoxicity assay)

นำตัวอย่างสารสกัดจากผักพื้นบ้านมาตรวจสอบ cytotoxicity ต่อวีโรเซลล์ (vero cells, African green monkey fibroblast) ใน microtiter plate โดยทำการเจือจางตัวอย่าง 2 เท่า (2-fold serial dilution) ไปเรื่อยๆ ความเข้มข้นสูงสุดของตัวอย่างที่ทดสอบเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมตัวอย่างที่แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และสารแขวนลอยของวีโรเซลล์ (vero cell suspension) ความเข้มข้น 1.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 190 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ใช้ ellipticine เป็น positive control และใช้ DMSO เป็น negative control นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากบ่มแล้วตรวจสอบ cytotoxicity โดยวิธี colorimetric ตามวิธีของ Skehan และคณะ (1990) การทดสอบนี้วิเคราะห์โดย Bioassay Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (Biotech) โดยแสดงผลของการทดสอบ cytotoxicity ในรูปของ IC_{50} (50% inhibitory concentration) ซึ่งเป็นความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับ untreated cells ในการแปลผลจะพิจารณาจากค่า % cell viability ตามหลักเกณฑ์ดังนี้คือ ถ้า % cell viability มากกว่า 50% รายงานผลเป็นค่า $IC_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$ และถ้า % cell viability น้อยกว่า 50% รายงานผลเป็นค่า IC_{50} ที่ได้จากการทำ 2-fold serial dilution

3.2.4 การวิเคราะห์หาสารสำคัญในผักพื้นบ้านด้วยเทคนิค HPLC

ซั่งสารสกัดหยาบของผักพื้นบ้านชนิดที่คัดเลือกมา 0.05 กรัม เจือจาง 10 เท่าด้วย mobile phase ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมของ methanol-acetonitrile-water ในอัตราส่วน 40: 15 :45 (v/v/v) ที่มีกรดแอสซิติคความเข้มข้นร้อยละ 1 ใช้ elution system เป็น isocratic ผ่าน column (ZORBAX SB-C18 analytical HPLC column, 4.6 mm \times 250 mm i. d.) ฉีดสารตัวอย่างนี้ (injection volume 20 ไมโครลิตร) เข้าเครื่อง HPLC ของบริษัท Variance Postar ที่อุณหภูมิห้องด้วย flow rate เท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที และ detector ที่ใช้เป็น Ultraviolet absorption detector สารมาตรฐานที่ใช้ 5 ชนิด ได้แก่ Catechin (CA) วัดการดูดกลืนแสงที่ 297 นาโนเมตร สำหรับ Rutin (RU), Quercetin (QU), Kaempferol (KA) และ Isorhamnetin (IS) วัดการดูดกลืนแสงที่ 368 นาโนเมตร

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผักพื้นบ้าน

4.1.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านด้วยเทคนิคการแพร่บนอาหารวุ้น

จากผลการทดลองศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมด 20 ชนิด ของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านไทยด้วยเทคนิค agar diffusion ดังตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบชะมวงมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์สูงกว่าสารสกัดจากผักชนิดอื่น โดยสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้มากที่สุดถึง 8 ชนิด รองลงมาเป็นสารสกัดหยาบจากใบแขวงและใบแพรวยับยั้งเชื้อได้ 6 ชนิด สารสกัดหยาบจากใบชะอมและใบขี้เหล็กยับยั้งจุลินทรีย์ได้ 2 ชนิด ซึ่งจุลินทรีย์ที่ไวต่อการยับยั้ง โดยสารสกัดจากผักมากที่สุด คือ *B. cereus* โดยที่สารสกัดจากใบแขวงยับยั้ง *B. cereus* ได้ดีที่สุด (เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 21.0 มิลลิเมตร) รองลงมาคือ สารสกัดจากใบชะมวง (20.2 มิลลิเมตร) สารสกัดจากใบแพรว (15.3 มิลลิเมตร) สารสกัดจากใบชะอม (8.5 มิลลิเมตร) และสารสกัดจากใบขี้เหล็ก (9.3 มิลลิเมตร) ส่วนสารสกัดหยาบจากผักอีก 15 ชนิด ได้แก่ ใบผักชีลาว ใบยี่ห่วย ใบบัวบก ใบตำลึง ใบหอมแฮ้ ใบผักกูด ใบผักชีฝรั่ง ใบผักหนาม ผลมะระขี้นก ใบข่อย ใบและดอกแมงลัก ดอกแค ดอกโสน ใบผักคราด และใบย่านางไม่พบว่าเกิดวงใสจากการยับยั้ง

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านไทย พบว่าสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านไทยทั้งหมด 20 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งยีสต์ สารสกัดหยาบจากใบชะมวงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้ดีที่สุด (20.2 มิลลิเมตร) รองลงมาคือ *P. fluorescens*, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. Rissen* และ *E. coli* ตามลำดับ (8.2-13.3 มิลลิเมตร) สารสกัดหยาบจากใบแขวงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้ดีที่สุด (21.0 มิลลิเมตร) รองลงมาคือ *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *P. fluorescens* และ *S. Typhimurium* (8.7-12.2 มิลลิเมตร) ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากใบแพรวมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* ได้ดีที่สุด (15.3 มิลลิเมตร) และมีความสามารถในการยับยั้ง *L. monocytogenes*, *S. aureus* และ *Y. enterocolitica* ได้ใกล้เคียงกัน (11.0-11.5 มิลลิเมตร) แต่ยับยั้ง *P. fluorescens* และ *E. coli* ได้น้อยกว่า (8.2-10.2 มิลลิเมตร) สารสกัดหยาบจากใบชะอมสามารถยับยั้ง *B. cereus* และ *L. plantarum* ได้ (7.7-8.5 มิลลิเมตร) สารสกัดหยาบจากใบขี้เหล็กมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* และ *L. monocytogenes* (7.5-9.3 มิลลิเมตร) ดังนั้นจากผลการทดลองนี้จึงได้คัดเลือกสารสกัดจากใบขี้เหล็ก ใบแขวง ใบชะมวง ใบชะอมและใบแพรว ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ต่อไป สำหรับผลการตรวจสอบของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Negative control โดยใช้ DMSO ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทุกชนิดที่ทดสอบ ส่วนการใช้เพนนิซิลินจีเป็น Positive control พบว่าให้ผลยับยั้งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ได้ดี (9.67-41.67 มิลลิเมตร) ยกเว้น *E. aerogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae* และ *P. fluorescens*

ตารางที่ 4.1 คุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านไทยด้วยเทคนิค agar diffusion

เชื้อจุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร) ^a						
	ชะอม	ผักชีลาว	ยี่หระ	ชีเหล็ก	บัวบก	ตำลึง	ใบหอมแย้
<i>Bacillus cereus</i>	8.5±1.0	^b	-	9.3±1.6	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	7.5±0.5	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Rissen</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7.7±0.8	-	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pediococcus pentosacus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida lipolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hansiniaspota uvarum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia membranaefaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	-	-	-	-	-	-	-

^a ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

^b ไม่พบการยับยั้ง (เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส < 6 มิลลิเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 คุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านไทยด้วยเทคนิค agar diffusion (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร) ^a						
	ผักกูด	ผักชีฝรั่ง	ใบ ชะมวง	ผักหนาม	ผักแขยง	มะระ จีนก	ใบยอ
<i>Bacillus cereus</i>	^b	-	20.2±3.6	-	21.0±5.2	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	8.2±1.3	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	9.7±1.5	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	11.0±1.0	-	12.2±3.4	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	13.3±0.8	-	9.7±4.2	-	-
<i>Salmonella Rissen</i>	-	-	8.5±1.3	-	-	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	-	-	-	8.7±0.6	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	10.2±0.3	-	12.5±2.5	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	12.2±4.3	-	11.2±3.9	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pediococcus pentosaccus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida lipolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hansiniaspora uvarum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia membranaefaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	-	-	-	-	-	-	-

^a ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

^b ไม่พบการยับยั้ง (เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส < 6 มิลลิเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 คุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านไทยด้วยเทคนิค agar diffusion (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร) ^a							Amphotericin B
	แมงลัก	ใบแพรว	ดอกแค	ดอกโสน	ผักคราด	ใบย่านาง	Penicillin G	
<i>Bacillus cereus</i>	^b	15.3±5.5	-	-	-	-	17.67±0.6	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	8.2±0.3	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	11.5±0.9	-	-	-	-	38.67±1.1	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	10.2±2.8	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Rissen</i>	-	-	-	-	-	-	9.67±0.6	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	22.67±0.6	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	11.2±2.9	-	-	-	-	41.67±0.6	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	11.0±4.1	-	-	-	-	34.0±0.0	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	23.83±2.3	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	-	-	-	-	24.33±3.1	-
<i>Pediococcus pentosaccus</i>	-	-	-	-	-	-	22.33±2.3	-
<i>Candida lipolytica</i>	-	-	-	-	-	-	15.0±1.0	-
<i>Hansiniaspota uvarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	15.33±0.6
<i>Pichia membranaefaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	10.17±0.3
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	-	-	-	-	-	22.00±0.0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-	-	-	-	-	-	21.68±1.1
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	-	-	-	-	-	-	-	22.17±0.3

^a ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

^b ไม่พบการยับยั้ง (เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส < 6 มิลลิเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธีเจือจางในอาหารเหลว

คุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยแต่ละชนิด พิจารณาได้จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC) ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่นำมาทดสอบ ค่า MIC ที่ต่ำแสดงถึงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดี จากการหาค่า (MIC) ของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทย 5 ชนิด ซึ่งสกัดโดยเมทานอล ได้แก่ ใบขี้เหล็ก ใบแขยง ใบชะมวง ใบชะอมและใบแพรวในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งหมด 10 ชนิด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2 เมื่อพิจารณาจากค่า MIC โดยรวมพบว่าสารสกัดจากใบแขยง ใบชะมวงและใบแพรวสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี (ค่า MIC ส่วนใหญ่น้อยกว่า 166.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร) กว่าสารสกัดจากใบชะอมและใบขี้เหล็ก (ค่า MIC ส่วนใหญ่มากกว่า 166.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร) และเมื่อพิจารณาค่า MIC ของใบแขยง ใบชะมวงและใบแพรว พบว่าใบแขยงและใบชะมวงมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์สูงกว่าใบแพรว เนื่องจากมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ต่ำกว่าของใบแพรว

เมื่อพิจารณาความไวของเชื้อต่อสารสกัดผักที่นำมาทดสอบการยับยั้ง พบว่า *B. cereus* และ *S. aureus* มีความไวต่อสารสกัดจากใบแขยงมากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร รองลงมาคือ *S. Typhimurium* (ค่า MIC 10.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) *L. monocytogenes* และ *Y. enterocolitica* มีความไวต่อสารสกัดจากใบชะมวงมากที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 5.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร รองลงมาคือ *K. pneumoniae*, *P. fluorescens* และ *S. Rissen* (ค่า MIC 10.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) เชื้อ *B. cereus* และ *L. monocytogenes* มีความไวต่อสารสกัดจากใบขี้เหล็ก (ค่า MIC เท่ากับ 5.2 และ 20.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ) มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น *L. plantarum* มีความไวต่อสารสกัดจากใบชะอมและใบแพรวมากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 20.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร สำหรับผลการตรวจสอบของ Negative control โดยใช้ DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 พบว่าไม่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทุกชนิดที่ทดสอบ ส่วนการใช้เพนิซิลลินจีเป็น Positive control พบว่า *S. Typhimurium* มีความไวต่อเพนิซิลลินจีมากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร รองลงมาคือ *B. cereus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *S. Rissen* และ *L. plantarum* (ค่า MIC อยู่ในช่วง 500-50,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) สำหรับ *P. fluorescens*, *S. aureus* และ *Y. enterocolitica* มีค่า MIC มากกว่า 50,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)

สารสกัดจากใบชะมวงมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกับสารสกัดจากเปลือกชะมวงตามการรายงานของ Joseph และคณะ (2005) ซึ่งได้พบว่าสารสกัดจากเปลือกชะมวง สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus* ได้โดยมีค่าเท่ากับ MIC 3000 ppm และยังสามารถยับยั้งการสร้างสารพิษ aflatoxin B1 จากการทดลองนี้ การที่พบว่าใบชะมวงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดสอดคล้องกับผลการทดลองของ Negi และ Jayaprakasha (2004) ได้พบว่า สารสกัดจากพืชสกุลเดียวกับชะมวง คือ *Garcinia indica* สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์ขอสงวนสิทธิ์ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

E. coli และ *Y. enterocolitica* และเมื่อเร็วๆ นี้ Negi และคณะ (2008) ได้รายงานว่าการเปลือกของผลชะมวงสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ และได้มีผู้ทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อมาลาเรียของ xanthone จากชะมวง (Likhitwitayawuid และคณะ, 1998)

การที่สารสกัดจากใบชะมวงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ อาจเป็นเพราะพืชสกุล *Garcinia* ประกอบด้วย xanthones, benzophenones, biflavanoids, atroviridin, garcinia acid, γ -lactone และ hydroxycitric acid นอกจากนี้ Panthong และคณะ (2006) ยังได้รายงานว่าการพบ tetraoxygenated xanthones (cowaxanthones A-E) รวมทั้ง tetraoxygenated xanthones เดิมที่เคยพบและรายงานไว้แล้วอีก 10 ชนิดจากสารสกัดหยาบของผลชะมวงที่สกัดด้วยเฮกเซน (hexane) และสารสกัดหยาบจากผลชะมวงมีคุณสมบัติต้านแบคทีเรียได้

สำหรับสารสกัดจากใบแยง พบว่ามีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดใกล้เคียงกับใบชะมวง อาจเป็นเพราะว่าพืชชนิดนี้ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ เนื่องจากผักแยงประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยที่ไม่มีสีปริมาณร้อยละ 0.1 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย น้ำมันหอมระเหยนี้ประกอบด้วย limonene และ perill-aldehyde เป็นองค์ประกอบหลัก และฟลาโวน (flavone) ในผักแยงเป็นส่วนผสมของ nevadensin (5,7-dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavone) และ salvigenin (5-hydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone)

ตารางที่ 4.2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผักพื้นบ้าน ไทย

ชนิดของจุลินทรีย์	ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)/(ยูนิิตต่อมิลลิลิตร)*					
	ใบชะมวง	ใบจีเหล็ก	ใบชะมวง	ใบแยง	ใบแพรว	Penicillin G
<i>Bacillus cereus</i>	41.7	5.2	20.8	2.6	41.7	5.0x10 ³
<i>Escherichia coli</i>	>166.7	>166.7	20.8	>166.7	166.7	5.0x10 ³
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>166.7	>166.7	10.4	>166.7	83.3	5.0x10 ³
<i>Listeria monocytogenes</i>	>166.7	20.8	5.2	20.8	83.3	5.0x10 ³
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	>166.7	>166.7	10.4	20.8	83.3	>5.0x10 ⁴
<i>Salmonella</i> Typhimurium	>166.7	>166.7	>166.7	10.4	>166.7	5.0
<i>Salmonella</i> Rissen	>166.7	>166.7	10.4	>166.7	>166.7	5.0x10 ⁴
<i>Staphylococcus aureus</i>	>166.7	>166.7	41.7	2.6	83.3	>5.0x10 ⁴
<i>Yersinia enterocolitica</i>	>166.7	>166.7	5.2	41.7	166.7	>5.0x10 ⁴
<i>Lactobacillus plantarum</i>	20.8	>166.7	166.7	83.3	20.8	5.0x10 ⁴

* ยูนิิตต่อมิลลิลิตรเฉพาะ Penicillin G

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 คุณสมบัติของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทย

4.2.1 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

ในการทดลองนี้ได้ศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยทั้งหมด 20 ชนิด ได้แก่ ชะอม ผักชีลาว ยี่ห่วย ชี้อเหล็ก บัวบก ตำลึง หอมเย้ ผักกูด ผักชีฝรั่ง ชะมวง ผักหนาม ผักแขยง มะระขี้นก ขอ แมงลัก ผักแพรว ดอกแค โสน ผักคราด และย่านาง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.3 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้านไทยแสดงได้ในรูปของค่า EC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดที่จำเป็นต้องใช้ในการลดความเข้มข้นของ DPPH เริ่มต้นลงร้อยละ 50 (Sanchez และคณะ, 1998) ค่า EC_{50} เป็นค่าที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สำหรับค่า AE (antiradical efficiency, $AE = 1/EC_{50}$) หรือ Antiradical power (ARP) เป็นอีกค่าหนึ่งที่ใช้ในการวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ถ้าหากค่า EC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระยิ่งต่ำมากเท่าใดหรือมีค่า AE ยิ่งสูงมาก นั่นแสดงว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารนั้นก็ยิ่งมาก (Brand-Williams และคณะ, 1995) จากการทดลองเมื่อพิจารณาค่า EC_{50} และค่า AE จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากใบแพรวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่า EC_{50} เท่ากับ 315.35 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH) รองลงมาเป็นสารสกัดจากใบชี้อเหล็ก ใบแขยง ใบขอ ใบชะมวง ใบและดอกแมงลัก ใบหอมเย้ ดอกโสน ใบผักชีลาว ใบผักหนาม ใบยี่ห่วย ใบผักกูด ใบชะอม ใบย่านาง ผลมะระขี้นก ใบผักชีฝรั่ง ใบผักคราด ใบบัวบก ใบตำลึงและดอกแค ตามลำดับ สำหรับ Positive control ที่ใช้ คือ วิตามินอี มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าใบแพรว คือ มีค่า EC_{50} เท่ากับ 322.42 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH

4.2.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากผักพื้นบ้าน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทย ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยที่มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงที่สุด คือ ใบแพรว (52.00 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด) รองลงมาเป็นสารสกัดจากใบชะอม ใบแขยง ใบชี้อเหล็ก ใบและดอกแมงลัก ใบคราด ใบยี่ห่วย ใบตำลึง ใบหอมเย้ ใบย่านาง ใบผักชีลาว ดอกแค ใบบัวบก ใบผักกูด ใบผักชีฝรั่ง ผลมะระขี้นก ใบชะมวง ใบผักหนาม ดอกโสน และใบขอ

จากการทดลองนี้การที่พบว่า สารสกัดจากใบแพรวมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูง การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลในใบแพรว ซึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่า สารสกัดจากใบแพรวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด 52.00 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด สำหรับสารสกัดจากใบชี้อเหล็ก พบว่ามีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงรองจากใบแพรวโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 349.90 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อ ไมโครกรัมของ DPPH มีรายงานว่าชี้อเหล็กประกอบด้วย

สารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ barakol, emodin, β -sitosterol, γ -sitosterol, lupenol, luteolin, D-pinitol, เอ็กสารนี้เป็นเอ็กสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการรักษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอ็กสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

chromone alkaloids, flavinoid glycosides, anthraquinones และ bianthraquinones (Ahn และคณะ, 1978; Shafiullah และคณะ, 1995) ขี้เหล็กเป็นพืชที่ปลูกมากในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หลายๆ ส่วนของต้นขี้เหล็กใช้ประโยชน์ในทางรักษาโรคเช่น โรคนอนไม่หลับ โรคเบาหวาน โรคเครียด และโรคหืดเป็นต้น บาราคอล (barakol) เป็นสารสำคัญที่แยกได้จากใบและดอกของขี้เหล็ก ในปี ค.ศ. 1969 บาราคอลได้ถูกสกัดขึ้นเป็นครั้งแรกและจำแนกว่าเป็นสาร 3a,4-dihydro-3a,8-dihydroxy-2,5-dimethyl-1,4-dioxaphenalene (Thongsaard และคณะ, 2001) นอกจากนี้ Kaur และคณะ (2006) ได้พบว่าสารสกัดของดอกขี้เหล็กมีสาร โพลีฟีนอลปริมาณมาก ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี ซึ่งอาจใช้ในการป้องกัน oxidative damage ในตับได้

สำหรับสารสกัดจากใบแขงพบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงเช่นเดียวกัน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Sribusarakum และคณะ (2004) ซึ่งได้รายงานว่ามีน้ำมันหอมระเหยจากใบแขงและสารสกัดหยาบของใบแขงซึ่งสกัดด้วยเมทานอลมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของ DPPH และไนตริกออกไซด์ได้ การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากในใบแขงมีสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) หลายชนิดซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดี Bui และคณะ (2004) ได้รายงานว่ามีฟลาโวนอยด์ (flavonoids) หลายชนิดในแขง ได้แก่ Nevadensin 7-O-glycoside และ 8-hydroxylated flavones ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะผักและผลไม้ (Haraguchi, 2001) และในการทดลองนี้พบว่าใบชะมวงมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในระดับปานกลางโดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 1597.51 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อไมโครกรัมของ DPPH คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของใบชะมวงน่าจะเกี่ยวข้องกับการที่ใบชะมวงประกอบด้วย xanthone หลายชนิดซึ่งมีหมู่ฟีนอลิก Lee และ Chan (1977) และ Na-Pattalung และคณะ (1994) ได้พบ prenylated xanthones 5 ชนิด ได้แก่ cowanin, cowanol, norcowanin, cowaxanthone, 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2,5-bis(prenyl) xanthone จากต้นชะมวง นอกจากนี้ Likhitwitayawuid และคณะ (1997) ได้พบ 7-O-methyl-garcinone E จากเปลือกของต้นชะมวง และเมื่อเร็วๆ นี้ Mahabusarakam และคณะ (2005) ได้แยกสาร xanthones 5 ชนิด ชื่อว่า cowagarcinone A-E และ xanthones อีก 6 ชนิด ที่ได้มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้จากยางของต้นชะมวง สารนี้อาจทำปฏิกิริยาในทำนองเดียวกับสารรีดักโทน (reductones) โดยเป็นตัวให้อิเล็กตรอนและทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระเพื่อที่จะเปลี่ยนให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัวมากขึ้น ซึ่งจะหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระในที่สุด สาร garcinol ที่พบในพืชสกุลเดียวกับชะมวงมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ สารนี้ที่มีโครงสร้างที่คล้ายกับสาร curcumin ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่รู้จักกันดี (Sang และคณะ, 2002) คุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของ xanthones จากพืชในสกุลเดียวกับชะมวงได้มีรายงานไว้เช่นเดียวกัน (Minami และคณะ, 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทย

ชนิดของผัก	EC ₅₀ (ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH) ± SD	AB (× 10 ⁻⁵) ± SD	ปริมาณสารประกอบฟีนอล ^a (ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด)
ใบชะอม	3,565.70±41.54	28.05±0.33	45.33±5.77
ผักชีลาว	2,297.79±80.39	43.56±1.51	12.00±0.00
ใบยี่หระ	3,321.38±54.86	30.11±0.49	14.44±1.92
ใบชีเหล็ก	349.90±5.66	285.85±4.66	35.33±5.77
ใบบัวบก	6079.96±80.46	16.45±0.22	7.78±1.92
ใบตำลึง	6,640.30±52.42	15.06±0.12	14.44±1.92
ใบหอมเฒ่า	1,868.77±62.33	53.55±1.78	13.33±0.00
ใบผักกูด	3,353.25±50.61	29.83±0.045	3.67±2.89
ใบผักชีฝรั่ง	4,739.71±61.28	21.10±0.27	3.67±2.89
ใบชะมวง	1597.51±99.25	62.76±4.02	2.00±0.00
ใบผักหนาม	3,105.6±45.90	32.20±0.48	2.00±0.00
ใบแขยง	550.52±12.23	181.71±4.04	42.00±0.00
ใบมะระขี้นก	4,230.79±33.87	23.64±0.19	3.67±2.89
ใบยอ	990.54±26.14	101.00±2.67	0.33±2.89
ใบแมงลัก	1,817.30±61.30	55.07±1.84	25.33±5.77
ใบแพรว	315.35±18.81	317.90±19.5	52.00±0.00
ดอกแค	13,425.86±97.02	7.45±0.05	12.00±0.00
ดอกโสน	2,265.65±83.04	48.96±1.94	2.00±0.00
ใบผักคราด	4,963.66±79.87	20.15±0.33	18.67±2.89
ใบย่านาง	3,903.89±32.90	25.62±0.22	13.33±0.00
วิตามินอี	322.42±0.62	310.87±0.42	-

^a ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

สำหรับสารสกัดจากใบยอ ในการทดลองนี้พบว่าสารสกัดจากใบยอมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ปานกลางโดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 990.54 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อไมโครกรัมของ DPPH มีรายงานว่าใบยอประกอบด้วยสารประกอบเคมีต่างๆประมาณ 160 ชนิดและพบสารอาหารโมเลกุลเล็กส่วนใหญ่คือสารประกอบฟีนอล กรดอินทรีย์และอัลคาลอยด์ สารประกอบฟีนอลชนิดสำคัญที่พบในใบยอได้แก่ anthraquinones (damnacanthal, morindone และ morindin เป็นต้น) และยังประกอบด้วย aucubin, asperuloside และ scopoletin (Wang และ Su, 2001) กรดอินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบได้แก่ กรดคาเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรอิก (caproic acid) และกรดคาโปรอิก (caprylic acid) (Dittmar, 1993) อัลคาลอยด์ส่วนใหญ่ที่พบคือ ซีโรนิน (xeronine) (Heinicke, 1985)

4.2.3 คุณสมบัติการต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน

จากการที่พบว่าสกัดจากใบแพรว ใบจี้เหล็ก ใบแขยง และใบชะมวง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับผักชนิดอื่นที่นำศึกษา จึงได้คัดเลือกสารสกัดจากผักทั้ง 4 ชนิดนี้แพรว นำมาวิเคราะห์หาคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากใบจี้เหล็ก ใบชะมวงและใบแขยง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดยกเว้น สารสกัดจากใบแพรวมีประสิทธิภาพสูงปานกลาง (moderately active) ในการต้านการเจริญเฉพาะเซลล์มะเร็งเต้านมเท่านั้นซึ่งมีค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญร้อยละ 50) เท่ากับ 6.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า IC_{50} ของ ellipticine และ doxorubicine ซึ่งใช้เป็น positive control ในการยับยั้ง MCF-7 มีค่าเท่ากับ 0.64 และ 0.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) ข้อมูลนี้ได้จากการทดสอบสารสกัดผักทั้งสองครั้ง แสดงในภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปาก มะเร็งเต้านมและมะเร็งปอดของสารสกัดหยาบของผักพื้นบ้าน

ชนิดของสารสกัดผัก	การต้านมะเร็ง (IC_{50} , $\mu\text{g/ml}$) ^b		
	KB ^c	MCF-7 ^c	NCI-H187 ^c
ใบจี้เหล็ก	>20.0	>20.0	>20.0
ใบชะมวง	>20.0	>20.0	>20.0
ใบแขยง	>20.0	>20.0	>20.0
ใบแพรว	>20.0	6.01 \pm 0.08	>20.0
Ellipticine	0.61 \pm 0.10	0.64 \pm 0.39	0.60 \pm 0.00
Doxorubicine	0.18 \pm 0.18	0.23 \pm 0.10	0.03 \pm 0.00

^aค่าเฉลี่ยของผลการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ

^bสารสกัดที่มีค่า IC_{50} >20 = inactive, >10.0-20.0 = active, 5.0-10.0 = moderately active และ < 5.0 = strongly active

^cCell lines: KB=oral human epidermal carcinoma; MCF-7=human breast adenocarcinoma; NCI-H187=human small cell lung

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 คุณสมบัติการเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดของใบจีเหล็ก ใบชะมวง ใบแขยงและ ใบแพรวพบว่า สารสกัดจากพืชทั้ง 4 ชนิดนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ใช้ในการทดสอบ (vero cell line) เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีมากกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไวรัส

ชนิดของสารสกัดพืช	Cytotoxicity (IC ₅₀ , µg/ml)
ใบจีเหล็ก	>50
ใบชะมวง	>50
ใบแขยง	>50
ใบแพรว	>50

4.2.5 ชนิดของสารสำคัญที่พบในสารสกัดพืชที่คัดเลือกมาวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

จากการที่พบว่าสารสกัดของผักแพรวมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ได้ดีที่สุดประกอบกับการที่พบว่าผักแพรวเป็นพืชชนิดเดียวที่พบว่าให้ผลบวก (moderately active) ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมจึงได้คัดเลือกมาวิเคราะห์หาชนิดของสารสำคัญในผักแพรวด้วยวิธี HPLC ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่า ผักแพรวประกอบด้วยสารประกอบโพลีฟีนอลที่สำคัญหลายชนิด สารที่ตรวจพบเป็นสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่จัดอยู่ในกลุ่ม flavanols ได้แก่ คาเทชิน (catechin, ภาพที่ 4.1) โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 297 นาโนเมตรและสารอีก 4 ชนิดจัดอยู่ในกลุ่ม flavonols ได้แก่ ไอโซแรมเน็ติน (isorhamnetin) เคมเฟอรอล (kaempferol) ควอเซทิน (quercetin) และรูทีน (rutin) โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 368 นาโนเมตร ภาพที่ 4.2 (ก) เป็นโครมาโตแกรมที่ได้จากการฉีดสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นสูง 500 ppb ทำให้เห็นพีคที่ 2-4 ซึ่งเป็นพีคของควอเซทิน เคมเฟอรอลและ ไอโซแรมเน็ติน ได้ชัดเจนตามลำดับ แต่พีคที่ 1 ซึ่งเป็นรูทีน ซึ่งมีปริมาณมากกว่าและมีความไวสูงกว่าทำให้เกิดพีคที่สูงตกขอบออกไปทางด้านบน ส่วนภาพที่ 4.2 (ข) เป็นโครมาโตแกรมที่ได้จากการฉีดสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่ำเพียง 100 ppb ก็ทำให้เห็นพีคของรูทีนและควอเซทินได้ชัดเจน ซึ่งการจำแนกและหาปริมาณสารเหล่านี้ทำโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (กราฟมาตรฐานและการคำนวณแสดงในภาคผนวก ง) สารฟลาโวนอยด์ชนิดที่ตรวจพบว่ามีมากที่สุด ผักแพรวคือ รูทีน ซึ่งมีปริมาณมากถึงร้อยละ 3.77 (น้ำหนักโดยน้ำหนักของสารสกัดแห้ง) รองลงมาเป็น คาเทชิน (ร้อยละ 0.34) ควอเซทิน (ร้อยละ 0.079) ส่วนไอโซแรมเน็ตินและ เคมเฟอรอลพบน้อย (ตารางที่ 4.6) สารสำคัญในผักแพรว (*Polygonum odoratum*) ยังไม่เคยมีผู้ใดที่ทำการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ ยกเว้นในพืชชนิดอื่นที่อยู่ในสกุลเดียวกับผัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

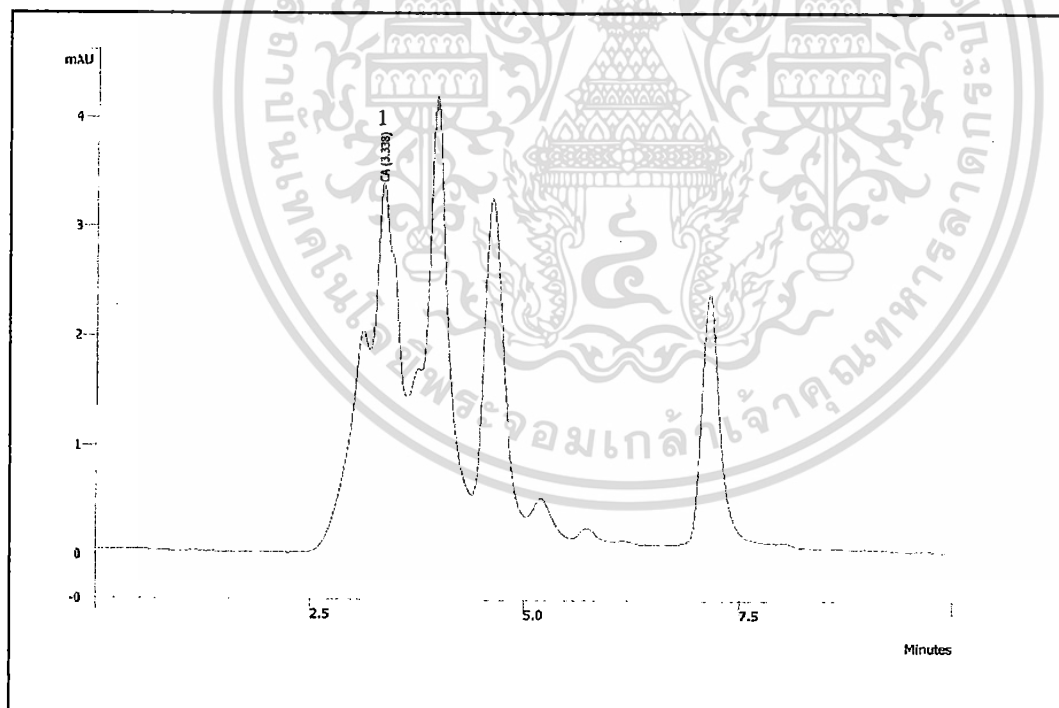
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แพรวคือ *Polygonum hydropiper* ก็มีรายงานว่าพบสารฟลาโวนอยด์ (sulfated, methylated and glycosidal flavonoids) ซึ่งมีควอเซทิน และไอโซแรมเนตินรวมอยู่ด้วย (Haraguchi, 2001)

ตารางที่ 4.6 ชนิดของสารสำคัญที่พบในสารสกัดหยาบของผักแพรว

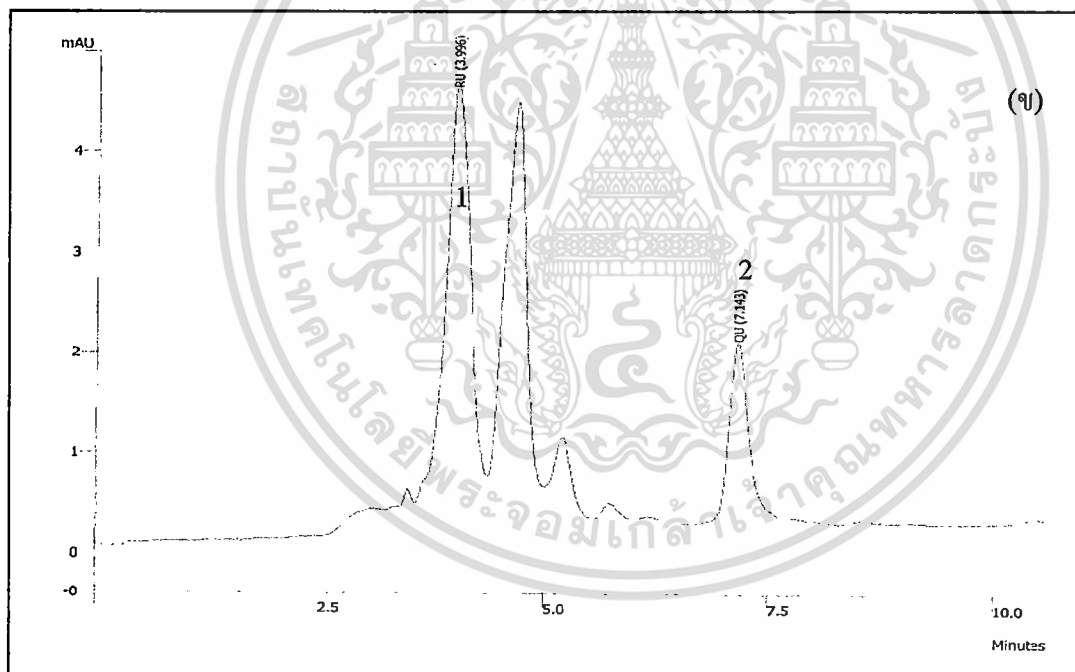
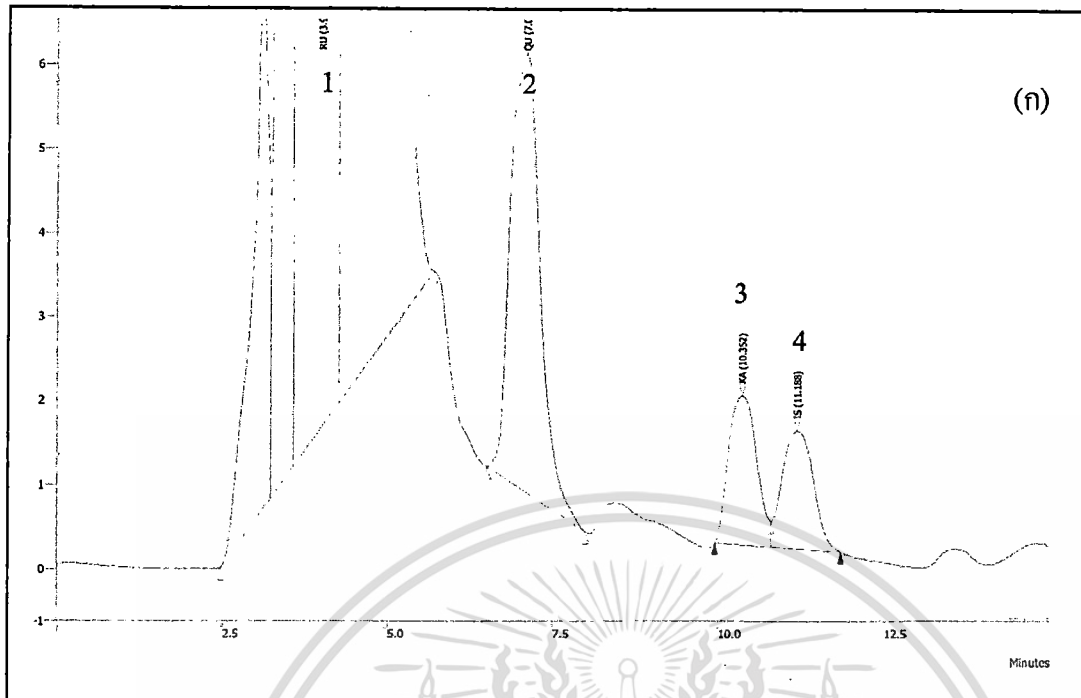
ชนิดของสารสำคัญ	ปริมาณที่พบ [ร้อยละ (น้ำหนักโดยน้ำหนักของสารสกัดแห้ง)] ^a
Rutin	3.77 ± 0.27
Catechin	0.34 ± 0.02
Quercetin	0.079 ± 0.00
Kaempferol	0.009 ± 0.00
Isorhamnetin	0.007 ± 0.00

^aค่าเฉลี่ยของผลการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.1 โครมาโตแกรมของสารสำคัญที่พบในสารสกัดจากผักแพรว:
วัดการดูดกลืนแสงที่ 297 นาโนเมตรและความเข้มข้นของ
สารสกัดจากผักแพรวที่ฉีดเท่ากับ 100 ppb (พีค 1: catechin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 โครมาโตแกรมของสารสำคัญที่พบในสารสกัดจากผักแพรว:

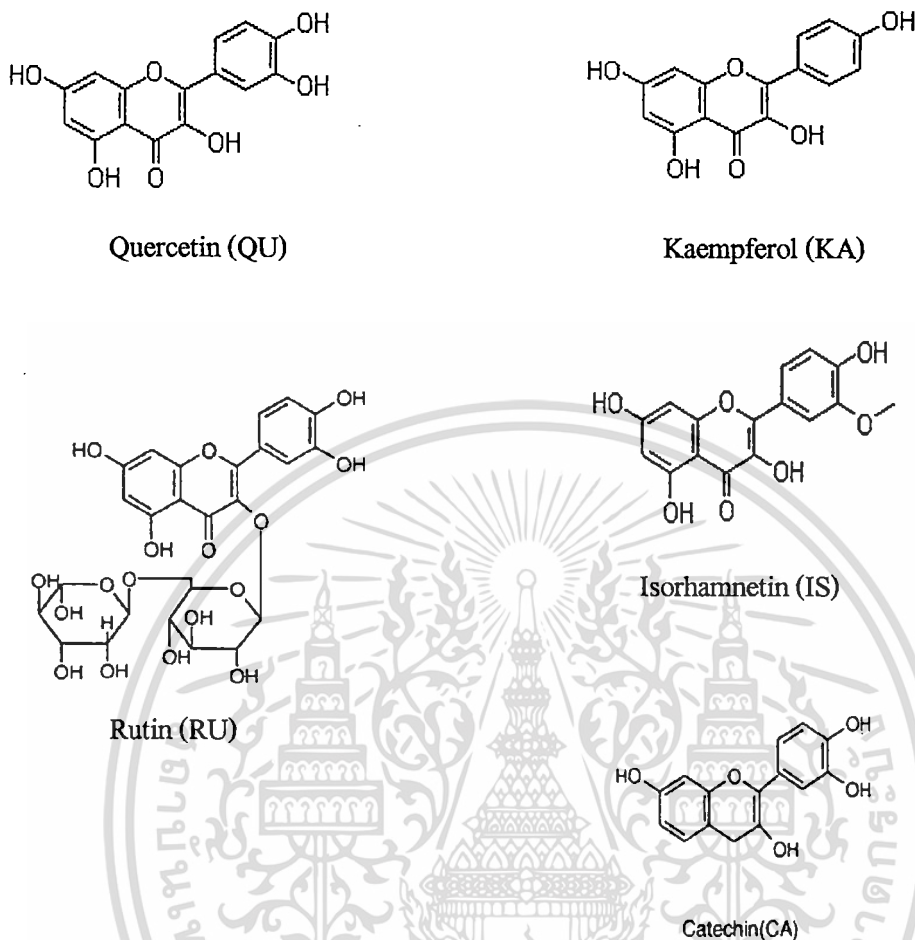
วัดการดูดกลืนแสงที่ 368 นาโนเมตร

(ก) ความเข้มข้นของสารสกัดจากผักแพรวที่ฉีดเท่ากับ 500 ppb

(พีค 1: rutin; พีค 2: quercetin; พีค 3: kaempferol; พีค 4: isorhamnetin)

(ข) ความเข้มข้นของสารสกัดจากผักแพรวที่ฉีดเท่ากับ 100 ppb (พีค 1: rutin; พีค 2: quercetin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 โครงสร้างของสารสำคัญที่พบในสารสกัดจากผักแพรว

จากผลการทดสอบนี้ที่แสดงว่าสารสกัดจากผักแพรวมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดีและสามารถต้านมะเร็งเต้านมได้เป็นสิ่งที่น่าสนใจ จากการที่ทราบว่าผักแพรวมีสารฟลาโวนอยด์เช่น catechin, rutin, quercetin, isorhamnetin และ kaempferol (สูตรโครงสร้างแสดงในภาพที่ 4.3) เป็นส่วนประกอบ อาจมีความสัมพันธ์กับการที่สารสกัดจากผักแพรวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็งเต้านมได้ ซึ่งอาจเป็นผลของสารสำคัญเหล่านี้ร่วมกันในการต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง Alía และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของ quercetin และ rutin ต่อการเจริญและระบบต่อต้านอนุมูลอิสระของ human hepatoma cell line (HepG2) ซึ่งได้สรุปว่าสารทั้งสองนี้สามารถชักนำการเปลี่ยนแปลงที่ดีในของ antioxidant defense system ของเซลล์ HepG2 ที่ได้เพาะเลี้ยงไว้ซึ่งสามารถช่วยป้องกันหรือชะลอ cellular oxidative stress และได้เคยมีผู้วิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติการต้านมะเร็งของสารเหล่านี้มาแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า สารสกัดจากไวน์และสาร โพลีฟีนอล (polyphenols) ที่แยกได้เช่น resveratrol, quercetin, catechin และ epicatechin (Damianaki และคณะ, 2000; Kampa และคณะ, 2000) รวมทั้งกรดฟีนอลิกที่พบในน้ำมันมะกอกเช่น กรด caffeic, sinapic, syringic, protocatechuic, ferulic และ 3,4-dihydroxy-phenylacetic (Kampa และคณะ, 2004) สามารถลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cells) เช่น T47D, MCF7 และ MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็ง prostate เช่น DU-145, PC3 และ LNCaP

การที่ผักแพรวมีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมได้ ส่วนหนึ่งอาจเป็นผลของสาร quercetin ที่มีในผักแพรว มีผู้ศึกษาพบว่า quercetin และ stilbene resveratrol เป็นสารที่สำคัญที่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดี โดยมีผู้ศึกษาผลของสาร โพลีฟีนอลทั้งสองชนิดนี้ในการต้านมะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งเต้านม คับ ลำไส้ใหญ่ ผิวหนัง เม็ดเลือดขาว (Kampa และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า quercetin เป็นสาเหตุให้เกิด cell cycle arrest ใน late G1 phase ของ human leukemic T cells และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งเต้านมและมะเร็งรังไข่ (Yoshida และคณะ, 1992; Scambia และคณะ, 1990)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมด 20 ชนิด ของสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านไทยพบว่า สารสกัดจากใบแขยง ใบชะมวงและใบเพรวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบชะอมและใบขี้เหล็ก สารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านไทยทั้งหมด 20 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งยีสต์ *B. cereus* และ *S. aureus* มีความไวต่อสารสกัดจากใบแขยงมากที่สุด *L. monocytogenes* และ *Y. enterocolitica* มีความไวต่อสารสกัดจากใบชะมวงมากที่สุด *B. cereus* และ *L. monocytogenes* มีความไวต่อสารสกัดจากใบขี้เหล็กมากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น

การศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยพบว่า สารสกัดจากใบเพรวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (ค่า EC_{50} เท่ากับ 315.35 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH) รองลงมาเป็นสารสกัดจากใบขี้เหล็ก ใบแขยง ใบยอ ใบชะมวง ใบและดอกแมงลัก ใบหอมแย้ ดอกโสน ใบผักชีลาว ใบผักหนาม ใบยี่หระ ใบผักถูด ใบชะอม ใบย่านาง ผลมะระขี้นก ใบผักชีฝรั่ง ใบผักคราด ใบบัวบก ใบคำลิ่งและดอกแค และสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยที่มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงที่สุด คือ ใบเพรว (52.00 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด) รองลงมาเป็นสารสกัดจากใบชะอม ใบแขยง ใบขี้เหล็ก ใบและดอกแมงลัก ใบคราด ใบยี่หระ ใบคำลิ่ง ใบหอมแย้ ใบย่านาง ใบผักชีลาว ดอกแค ใบบัวบก ใบผักถูด ใบผักชีฝรั่ง ผลมะระขี้นก ใบชะมวง ใบผักหนาม ดอกโสน และใบยอ

การวิเคราะห์หาคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ของสารสกัดหยาบจากใบชะมวง ใบขี้เหล็ก ใบแขยง และใบเพรว (*Polygonum ordoatum*) พบว่าสารสกัดจากใบขี้เหล็ก ใบชะมวงและใบแขยง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดยกเว้น สารสกัดจากใบเพรวมีประสิทธิภาพสูงปานกลาง (moderately active) ในการต้านการเจริญเฉพาะเซลล์มะเร็งเต้านมเท่านั้น มีค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญร้อยละ 50) เท่ากับ 6.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดของใบขี้เหล็ก ใบชะมวง ใบแขยงและใบเพรวพบว่า สารสกัดจากพืชทั้ง 4 ชนิด ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ใช้ในการทดสอบ (vero cell line) เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีมากกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

การวิเคราะห์หาชนิดของสารสำคัญในผักเพรวด้วยวิธี HPLC พบว่า ผักเพรวประกอบด้วยสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ชนิดหลักๆ ที่จัดอยู่ในกลุ่ม flavanols ได้แก่ คาเทชิน (catechin) และสารอีก 4 ชนิดจัดอยู่ในกลุ่ม flavonols ได้แก่ ไอโซแรมเนติน (isorhamnetin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคมเฟอรอล (kaempferol) ควอเซทิน (quercetin) และรูทีน (rutin) สารฟลาโวนอยด์ชนิดที่ตรวจพบว่ามีมากที่สุดในผักแพรวคือ รูทีน ซึ่งมีปริมาณมากถึงร้อยละ 3.77 (น้ำหนักโดยน้ำหนักของสารสกัดแห้ง) รองลงมาเป็น คาเทชิน (ร้อยละ 0.34) ควอเซทิน (ร้อยละ 0.079) ส่วนไอโซแรมนีทินและเคมเฟอรอลพบน้อยเพียงร้อยละ 0.007-0.009 อย่างไรก็ตามสารที่พบนี้เป็นเพียงสารหลักๆ ที่มีมากในผักแพรวเท่านั้น ผักแพรวยังประกอบด้วยสารชนิดอื่นๆ อีกซึ่งยังต้องศึกษาในขั้นต่อไป และการที่ผักแพรวประกอบด้วยรูทีน ควอเซทิน และคาเทชิน ปริมาณสูงก็เป็นที่น่าสนใจที่จะแยกสารเหล่านี้ออกมาใช้ประโยชน์และศึกษาเน้นถึงผลของสารเหล่านี้เดี่ยวๆ เกี่ยวกับคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง หรืออาจศึกษาถึงปริมาณของผักแพรวที่ควรรับประทานในแต่ละวันต่อน้ำหนักตัวของร่างกายเพื่อที่จะให้ร่างกายได้รับสารออกฤทธิ์ในผักแพรวที่จะให้ผลต้านมะเร็งได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- วันดี กฤษณพันธ์. (2541). สมุนไพรน่ารู้. ศูนย์หนังสือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2538). ผักพื้นบ้าน: ความหมายและภูมิปัญญาของสามัญชนไทย. สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ.
- Ahn, B. Z., Degen, U., Lienjayetz, C., Pachaly, P., & Zymalkowski, F. (1978). Constituents of *Cassia siamea*. *Archives of Pharmacology*, 311, 569-578.
- Alía, M., Mateos, R., Ramos, S., Lecumberri, E., Bravo, L., & Goya, L. (2006). Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *European Journal of Nutrition*, 45, 19-28.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., & T.M. Hagen. (1990). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 7915-7922.
- Arts, I. C. W., & Hollman, P. C. H. (1998). Optimization of a quantitative method for the determination of catechins in fruits and legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5156-5162.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Bersert, E. C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel wissenschaft and-Technologie*, 28(1), 25-30.
- Bui, M-L., Grayer, R.J., Veitch, N.C., Kite, G.C., Tran, H., & Nguyen, Q. K. (2004). Uncommon 8-oxygenated flavonoids from *Linnophila aromatica* (Scrophulariaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 943-947.
- Cao, G., Booth, S. L., Sadowski, J. A., & Prior, R. L. (1998). Increase in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruits and vegetables. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 1081-1087.
- Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Kampa, M., Notas, G., Hatzoglou, A., Panagiotou, S., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P. M., & Castanas, E. (2000). Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 78, 429-441.
- Davidson, P.M., & Zivanovic, S. (2003). The use of natural antimicrobials. In P. Zeuthen, & L. Bøgh – Sørensen, *Food presentation techniques* (pp. 5-30). Cornwall, England: TJ International Limited Padstow.
- Dittmar, A. (1993). *Morinda citrifolia* L. –Use in indigenous Samoan medicine. *Journal of Herbs, Spices and Medicine Plants*, 1, 77-92.
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*, 344, 721-724.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J. & Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chemical Toxicology*, 33, 601-617.
- Haraguchi, H., Hashimoto, K., & Yagi, A. (1992). Antioxidative substances in leaves of *Polygonum hydropiper*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 40, 1349-1351.
- Haraguchi, H. (2001). Antioxidative plant constituents. In: Tringali, C. *Bioactive compound from natural sources* (pp. 339-377). London: Taylor & Francis Group.
- Heinicke, R. M. (1985). The pharmacologically active ingredient of Noni. *Bulletin of the National Tropical Botanical Garden*, 15, 10-14.
- High Performance Liquid Chromatography (HPLC): A Users Guide
<http://www.pharm.uky.edu/ASRG/HPLC/HPLCMYTRY.html>
- Jorgensen, J.H., Turnidge, J. D., & Washington, J. A. (1999). Antibacterial susceptibility test: dilution and disk diffusion methods. In: Murray, P. R., Barron, E. R., Praller, M. A., Tenover, F. C. and Tenover, R. H., Eds. *Manual of clinical Microbiology* (pp. 1526-1562). Washington, D.C.: ASM Press.
- Joseph, G.S., Jayaprakasha, G.K., Selvi, A.T., Jena, B.S., & Sakariah, K.K. (2005). Antiaflatoxigenic and antioxidant activities of *Garcinia* extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 153-160.
- Kampa, M., Hatzoglou, A., Notas, G., Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P. M., & Castanas, E. (2000). Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutrition and Cancer*, 37, 223-233.
- Kampa, M., Alexaki, V. I., Notas, G., Nifli, A. P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A., & Castanas, E. (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Research*, 6, R63-74.
- Kampa, M., Nifli, A.-P., Notas, G., & Castanas, E. (2007). Polyphenols and cancer cell growth. *Reviews of Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 159, 79-113.
- Karaya, S., & Kavas, A. (1999). Antimutagenic activities of some foods. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 79, 237-242.
- Kaur, G., Alam, M. S., Jabbar, Z., Javed, K., & Athar, M. (2006). Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 340-348.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lee, H-H., & Chan, H.-K. (1977). 1,3,6-Trihydroxy-7-methoxy-8-(3,7-dimethyl-2,6-octadienyl)xanthone from *Garcinia cowa*. *Phytochemistry*, *16*, 2038-2040.
- Larson, R.A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, *27*, 969-978.
- Likhitwitayawuid, K., Phadungcharoen, T., Mahidol, C., & Ruchirawat, S. 1997. 7-O-Methylgarcinone E from *Garcinia cowa*. *Phytochemistry*. *45*, 1299-1301.
- Likhitwitayawuid, K., Phadungcharoen, T. and Krungkrai, J. 1998. Antimalarial xanthenes from *Garcinia cowa*. *Planta Medica*, *64*, 70-72.
- Limsong, J., E. Benjavongkulchai, & J.Kuvatanasuchai. (2004). Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. *Journal of Ethnopharmacology*, *92*, 281-289.
- Liquid Chromatography (Chapter 28): <http://www.cem.msu.edu/~cem333/Week16.pdf>
- Mahabusarakam, M., Chairerk, P., & Taylor, W.C. 2005. Xanthenes from *Garcinia cowa* Roxb. Latex. *Phytochemistry*, *66*, 1148-1153.
- Meyer, V. R. (2004). Practical High-performance Liquid Chromatography. New York: John Wiley and Sons.
- Minami, H., Kinoshita, M., Fukuyama, Y., Kodama, M., Yoshizawa, T., Sugiura, M., Nakagawa, K., & Taga, H. (1994). Antioxidant xanthenes from *Garcinia subellipica* *Phytochemistry*, *36*, 501-506.
- Negi, P.S., & Jayaprakasha, G.K. (2004). Control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria by *Garcinol* and *Garcinia indica* extracts, and their antioxidant activity. *Journal of Food Science*. *69*, 61-65.
- Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., & Jena B. S. (2008). Antibacterial activity of the extracts from the fruit rinds of *Garcinia cowa* and *Garcinia pedunculata* against foodborne pathogen and spoilage bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, *xx*, 1-5.
- Na Pattalung, P., Thongtheeraparp, W., Wiriyachitra, P., & Taylor, W.C. (1994). Xanthenes of *Garcinia cowa*. *Planta Medica*, *60*, 365-368.
- Panthong, K., Pongcharoen, W., Phongpaichit, S., & Taylor, W. C. (2006). Tetraoxygenated xanthenes from the fruits of *Garcinia cowa*. *Phytochemistry*, *67*, 999-1004.
- Parr, A., & Bolwell, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man: The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of food and Agriculture*, *80*, 985-1012.
- Payá, M., Halliwell, B., & Houl, J.R.S. (1992). Interaction of a series of coumarins with reactive oxygen species. *Phytochemistry*, *31*, 115-122.
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้เอาไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

oxygen species. *Biochemical & Pharmaceutical Bulletin*, 44, 205-214.

- Plumb, J. A., Milroy, R., & Kaye, S. B. (1989). Effect of the pH dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Research*, 49, 4435-4440.
- Pokorny, J. (2001). Antioxidants in food. In: Yanishlieva, N. and Gardon, M., eds. Practical application. USA: CRC Press.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
- Sang, S., Liao, C.-H., Pan, M.-H., Rosen, R.T., Lin-Shiau, S.-Y., Lin, J.-K., & Ho, C.-T. (2002). Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: analysis of radical reaction products of garcinol with peroxy radicals and their antitumor activities. *Tetrahedron*, 58, 10095-10102.
- Scambia, G., Ranelletti, F. O., Panici, P. B. et al. (1990). Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II oestrogen binding sites in primary ovarian tumours and cultured cells. *British Journal of Cancer*, 62, 942-946.
- Shafiullan, M., Parveen, M., Kamil, M., & Ilyas, M. (1995). A new isoflavone C-glycoside from *Cassia siamea*. *Fitoterapia*, 65, 339-341.
- Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, 44, 158-163.
- Sherwin, E.R. (1990). Antioxidants. In A.L. Branen, P.M. Davidson, & S. Salminen, *Food additives* (pp. 139-183). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Skehan, P., Ritsa, S., Dominic, S. et al. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 1107-1112.
- Sribusarakum, A., Bunyapraphatsara, N., Vajragupta, O., & Watanabe, H. (2004). Antioxidant activity of *Limnophila aromatica* Merr. *Thai Journal of Phytopharmacy*, 11(2), 11-17.
- Szepesi, G. (1991). HPLC in Pharmaceutical analysis: General consideration. Vol.1. Boston: CRC press.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90, 333-340.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Thongsard, W., Chainakul, S., Bennett, G. W., & Marsden, C. A. (2001). Determination of barakol extracted from *Cassia siamea* by HPLC with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 853-859.
- Triratana, T., & B. Thaweboon (1987). The testing of crude extracts of *Streblus asper* (Koi) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius*. *Journal of the Dental Association of Thailand*, 37, 119-125.
- Wang, M. Y., & Su, C. (2001). Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). *Annals of the New York Academy of Sciences*. 952: 161-168.
- Weisburger, J. H. (1997). *Vitamin Antioxidants and Disease Prevention*. USA: AOCS Press.
- Yanishlieva-Maslarova, N.V. (2001). Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. In: J. Pokorny, J. & Yanishlieva, N. *Antioxidants in food: Practical applications* (pp. 210-262). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Yoshida, M., Yamamoto, M., & Nikaido, T. (1992). Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Research*, 52, 6676-6681.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมตัวอย่าง การทำกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากผักพื้นบ้าน

1. การเตรียมสารสกัดหยาบของผักพื้นบ้านและสารละลาย α -tocophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชั่งสารตัวอย่าง 0.125 กรัม จากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของเริ่มต้นเท่ากับ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจาง 10 เท่าไปเรื่อยๆ ด้วยเมทานอลจนได้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 1,000, 500, 100, 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การทำกราฟมาตรฐานของ DPPH

2.1 การเตรียมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชั่ง DPPH 0.025 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 1 ลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารละลาย DPPH เริ่มต้นเท่ากับ 0.025 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำมาทำการเจือจาง 10 เท่าไปเรื่อยๆ ด้วยเมทานอลจนได้ความเข้มข้นของสารละลาย DPPH เป็น 0.025 , 0.0125 , 6.25×10^{-3} , 3.125×10^{-3} , 1.5625×10^{-3} และ 7.8125×10^{-4} กรัมต่อลิตร

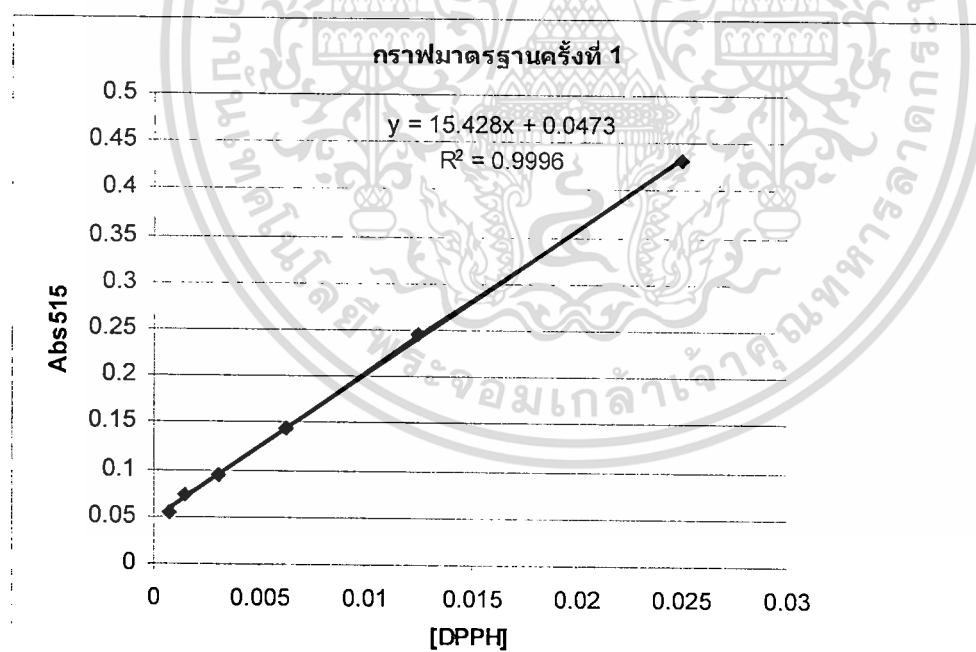
2.2 การทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย DPPH

ปีเปตสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.025 , 0.0125 , 6.25×10^{-3} , 3.125×10^{-3} , 1.5625×10^{-3} และ 7.8125×10^{-4} กรัมต่อลิตร ลงในคิวเวตต์แต่ละอันปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็นแบลนด์ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของ DPPH พร้อมหาสมการเส้นตรงของกราฟ ซึ่งได้กราฟมาตรฐานดังนี้

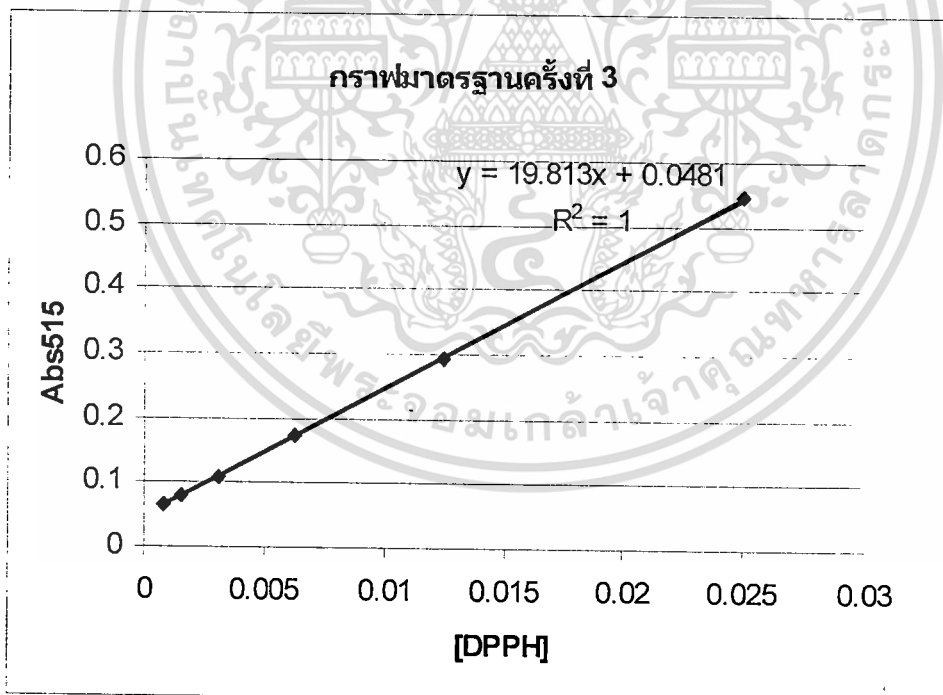
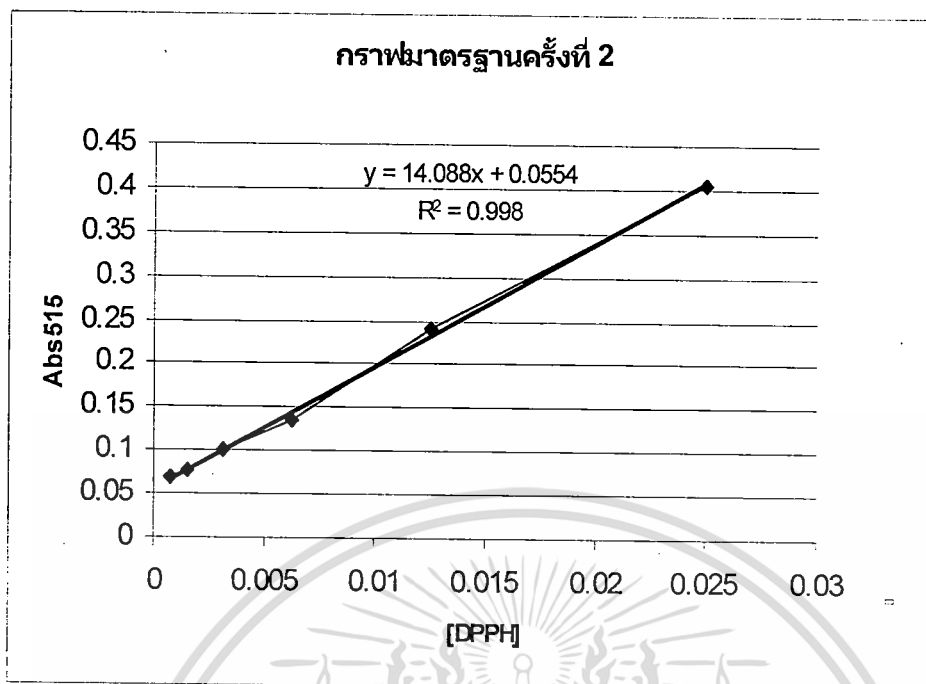
ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ของสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลาย DPPH (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ^a		
	กราฟมาตรฐาน 1	กราฟมาตรฐาน 2	กราฟมาตรฐาน 3
0.025	0.431	0.405	0.544
0.0125	0.245	0.240	0.294
0.00625	0.144	0.134	0.172
0.003125	0.095	0.100	0.110
0.0015265	0.073	0.076	0.079
0.00078125	0.055	0.069	0.064

^aค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของผลการทดลอง 3 ครั้ง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมตัวอย่าง การทำกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของ
สารสกัดจากผักพื้นบ้าน

1. การเตรียมสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชั่งกรดแกลลิก 0.125 กรัม จากนั้นเติมเอทานอลปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจาง 10 เท่าไปเรื่อยๆ ด้วยเอทานอลจนได้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 1,000, 100, 50, 25, 1 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก

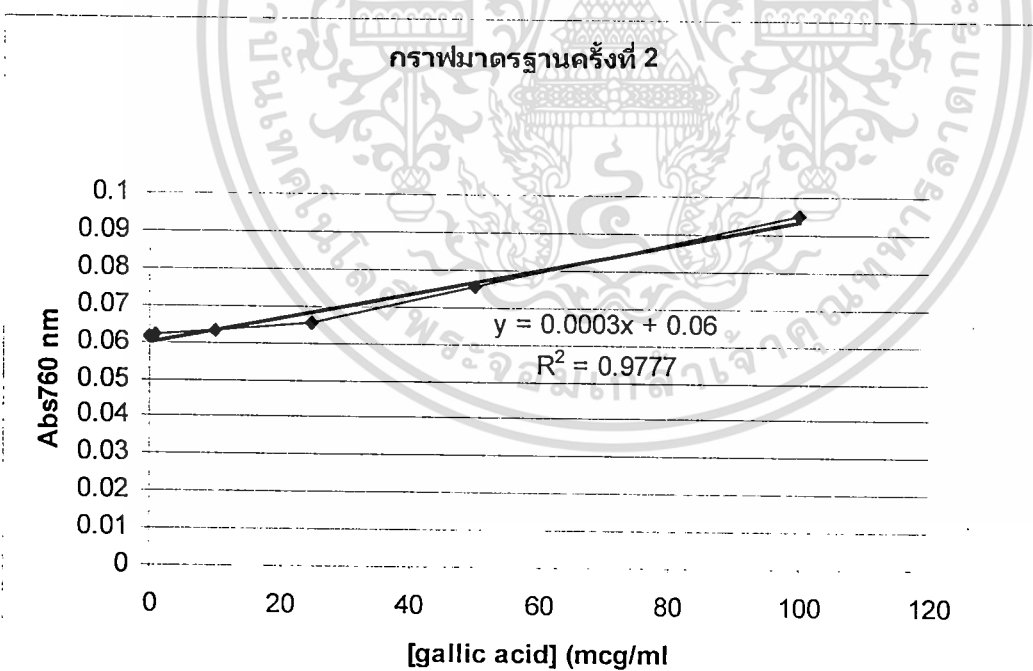
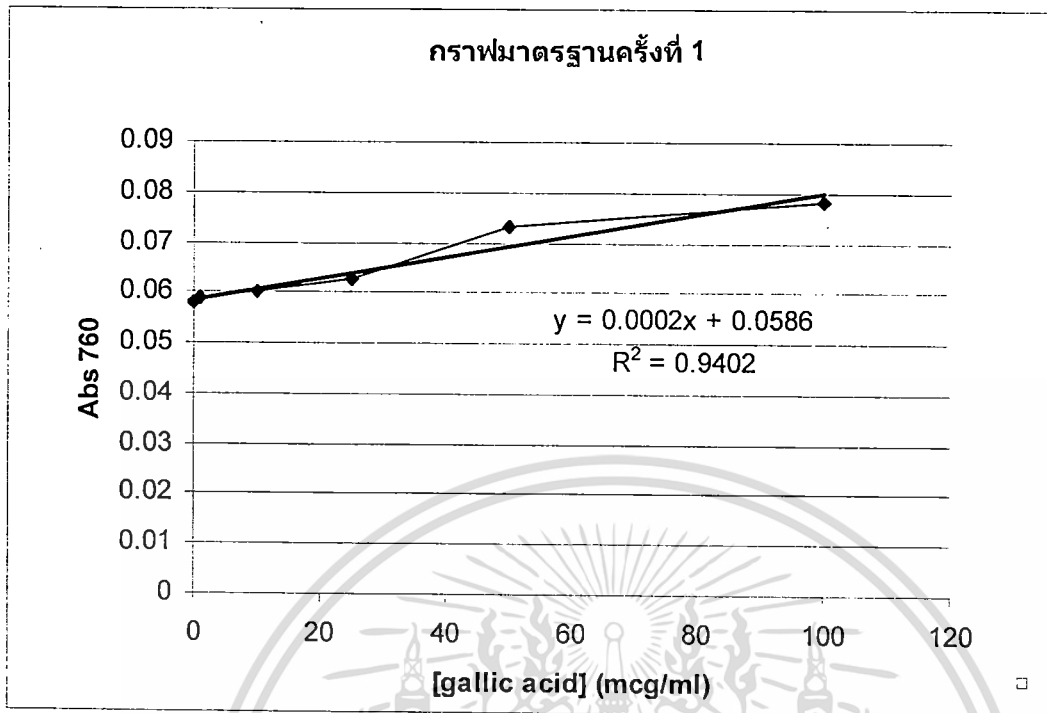
นำสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 10, 1 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองตามวิธีการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดจากผักพื้นบ้าน แต่ใช้สารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆแทนสารสกัดจากผัก เมื่อได้ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตรของสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาพลอตกราฟกับความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิกจะได้กราฟมาตรฐานที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง

ตารางที่ ข.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตรของสารละลายกรดแกลลิก

ความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ^a	
	กราฟมาตรฐาน 1	กราฟมาตรฐาน 2
100	0.078	0.095
50	0.073	0.075
25	0.063	0.065
10	0.060	0.063
1	0.059	0.062
0.1	0.058	0.061

^aค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ผลการทดสอบคุณสมบัติการต้านมะเร็งและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดจากใบชะมวง
ผักแขยง ผักแพรว และใบขี้เหล็ก

1. ผลการทดสอบคุณสมบัติการต้านมะเร็งครั้งที่ 1

1.1 ผลการทดสอบการต้านมะเร็งช่องปาก (Anti-KB) และมะเร็งเต้านม (Anti-MCF-7)



Bioassay Laboratory

Bioassay Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (Biotech)

National Science and Technology Development Agency Building

113 Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

Telephone 02-5646700 ext. 3465,3467 Fax 02-5646707

Customer Name : ผศ.สุรีย์ นานาสสมบัติ
Customer Address : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ ลาดกระบัง
Testing : Anti-cancer (Oral human epidermal carcinoma : KB and human breast adenocarcinoma : MCF-7)
Method : Colorimetric method ; Sulforodamine B assay (SRB)
Report by : Lardpornmatulee N.
Date : August 31, 2006
Total no. of tested samples : 4 sample

No.	Screening	Original	Anti-KB		Anti-MCF-7	
	code		code	Activity	IC ₅₀ : (ug/ml)	Activity
1	V 3254	C	inactive	-	inactive	-
2	V 3255	K	inactive	-	inactive	-
3	V 3256	P	inactive	-	Moderately active	5.95 ± 1.44
4	V 3257	I	inactive	-	inactive	-

รหัสตัวอย่าง (Original code): C = สารสกัดใบชะมวง; K = สารสกัดใบแขยง;

P = สารสกัดใบแพรว; I = สารสกัดใบขี้เหล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Positive Controls

Anti-cancer human breast adenocarcinoma : MCF-7

Ellipticine $IC_{50} = 0.642 \mu\text{g/ml}$ and Doxorubicine $IC_{50} = 0.298 \mu\text{g/ml}$

Anti-cancer Oral human epidermal carcinoma: KB

Ellipticine $IC_{50} = 0.681 \mu\text{g/ml}$ and Doxorubicine $IC_{50} = 0.268 \mu\text{g/ml}$

หมายเหตุ sample v 3256 ที่ทดสอบกับ MCF-7 ได้ค่า IC_{50} ดังนี้ 4.45, 6.07 และ 7.32 ค่าที่ใส่ในตารางคือเฉลี่ยของ $IC_{50} \pm SD$

Intpretationค่า IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)

> 20

> 10 - 20

5 - 10

< 5

Activity

Inactive

Weakly active

Moderately active

Strongly active

ASSAYED BY

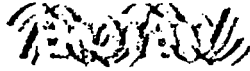
APPROVED BY

DATE

ดิษฐ์ศิริ
 ศักดิ์เกษม วัฒนัท
 31/8/๐๖

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ผลการทดสอบการต้านมะเร็งปอด (Anti-NCI-H187)



Bioassay Laboratory

Bioassay Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)
National Science and Technology Development Agency Building (NSTDA)
113 Pahonyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand
Telephone 02-5646700 ext. 3463 Fax 02-5646707

Customer Name : ผศ.สุรีย์ นานาสมบัติ
Customer Address : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
Testing : Anti-NCI-H187 (Human, small cell lung cancer)
Method : Colorimetric Method;3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Assay
Reported by : auncharoen p.
Date : 8 สิงหาคม 2549
Total no. of tested samples : 4 samples

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง NCI-H187 (Human, small cell lung cancer)

Item	screening code	sample code	Anti-NCI-H187	
			Activity	IC ₅₀ : (ug/ml)
1	V3254	C	Inactive	-
2	V3255	K	Inactive	-
3	V3256	P	Inactive	-
4	V3257	I	Inactive	-

Positive Controls

Anti-NCI-H187 ใช้ Ellipticine, Doxorubicin เป็น positive control

Ellipticine : IC₅₀ = 0.596 ug/ml และ Doxorubicin : IC₅₀ = 0.025 ug/ml

การแปลผลการทดสอบ

ค่า IC ₅₀ (ug/ml)	Activity
> 20	Inactive
> 10 - 20	Weakly active
5 - 10	Moderately active
< 5	Strongly active

หมายเหตุ : -

ASSAYED BY B A

APPROVED BY [Signature]

DATE 8/8/06

รหัสตัวอย่าง (Original code): C = สารสกัดใบชะมวง; K = สารสกัดใบแขวง;

P = สารสกัดใบแปะ; I = สารสกัดใบขี้เหล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเพื่อการวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการทดสอบคุณสมบัติการต้านมะเร็งครั้งที่ 2

2.1 ผลการทดสอบการต้านมะเร็งเต้านม (Anti-MCF-7)

Bioassay laboratory TEST REPORT

BIOTEC
a member of NSTDA

Customer name : สุรีย์ นานาสสมบัติ
Customer Address : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
Phone No. : 02-7373000 ต่อ 6264
Fax No. : 02-3264414
E-mail : knsuree@kmitl.ac.th

Test: Anti-Cancer (BC-Breast cancer)
Method: Sulforhodamine B (SRB) assay
Negative control: media
IC₅₀ of positive control: Ellipticine = 0.134 ug/ml, Doxorubicin = 0.154 ug/ml
Maximum Final concentration of tested samples: 20 ug/ml
Reported by: Chanthaket.R
Reported date (dd/mm/yy): 14/05/07
Total No. of tested sample: 1

Item	Screening code	Sample code	Activity	IC ₅₀ (ug/ml) ± SD
1	V 3900	P2	strongly active	4.96
	V 3900	P2	moderately active	6.39
	V 3900	P2	moderately active	6.82
				6.06±0.974

Remark:

Disclaimer: The results are limited to the test condition and further extrapolation is not inferred. BIOTEC will not take any responsibility for any consequences or damages, which may result from this information. Please note that BIOTEC is not a certification body.

Assayed by Rungrui Chanthaket

(Rungrui Chanthaket)
(14/05/07)

Approved by Kanlayanee Sriklung

(Kanlayanee Sriklung)
(14/05/07)

Interpretation

IC ₅₀ (ug/ml)	Activity
> 20	Inactive
10 - 20	Weakly active
5 - 10	Moderately active
< 5	Strongly active

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand, Telephone 02-5646700 ext. 3463, 3467 Fax 02-5646707

รหัสตัวอย่าง (Original code): C = สารสกัดใบชะมวง; K = สารสกัดใบแขวง;

P = สารสกัดใบแพรว; I = สารสกัดใบจีเหล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ผลการทดสอบการต้านมะเร็งปอด (Anti-NCI-H187)

Bioassay laboratory TEST REPORT**BIOTEC**
a member of NSTDA

Customer name : สุรีย์ นานาสสมบัติ

Customer Address : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Phone No. : 02-7373000 ต่อ 6264

Fax No. : 02-3264414

E-mail : knsuree@kmitl.ac.th

Test: Anti-NCI-H187 (Human, small cell lung cancer)

Method: Colorimetric Method ; 3-(4,5-dimethylthiazol 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Assay

Negative control: 0.5% DMSO

IC₅₀ of positive control: Ellipticine = - µg/ml, Doxorubicin = 0.025 µg/ml

Maximum final concentration of tested samples: 20 µg/ml

Reported by: Aunchaeroen P.

Reported date (dd/mm/yy): 22/03/07

Total No. of tested samples: 1

Item	Screening code	Sample code	Activity	IC ₅₀ (µg/ml)
1	V 3900	P2	Inactive	-

Remark:

Disclaimer: The results are limited to the test condition and further extrapolation is not inferred. BIOTEC will not take any responsibility for any consequences or damages, which may result from this information. Please note that BIOTEC is not a certification body.

Assayed by Patchanee Aunchaeroen(Patchanee Aunchaeroen)
(22/03/07)Approved by Somjit Komwijit(Somjit Komwijit)
(22/03/07)

Interpretation

IC ₅₀ (µg/ml)	Activity
> 20	Inactive
10 - 20	Weakly active
5 - 10	Moderately active
< 5	Strongly active

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA)

113 Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand, Telephone 02-5646700 ext. 3463, 3467 Fax 02-5646707

Page 1 of 1

รหัสตัวอย่าง (Original code): C = สารสกัดใบชะมวง; K = สารสกัดใบแขวง;

P = สารสกัดใบแพรว; I = สารสกัดใบจีเหล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Cytotoxicity test)

ตารางที่ ค.1 ผลทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero (Cytotoxicity against vero cells)

No	sample code	screening code	working concentration (mg/ml)	final concentration (µg/ml)	cytotoxicity (IC ₅₀ , µg/ml)
1	C	V3254	1.0	50.0	> 50
2	K	V3255	1.0	50.0	> 50
3	P	V3256	1.0	50.0	> 50
4	I	V3257	1.0	50.0	> 50

สรุปผลการทดสอบ

ตัวอย่างสารทดสอบที่ส่งมาทดสอบ ที่ความเข้มข้นสูงสุด 50 µg/ml ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ใช้ในการทดสอบ (vero cell line)

การแปลผลทดสอบ

1. ความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ปกติ (Cytotoxicity test against Vero cells)

- final concentration ของสารที่ใช้ทดสอบ เท่ากับ 50 ug/ml
- ในการแปลผลจะพิจารณาจากค่า % Cell viability ตามหลักเกณฑ์ ดังนี้
 - ถ้า % Cell viability \geq 50 % รายงานผล เป็นค่า IC₅₀ > 50 ug/ml
 - ถ้า % Cell viability < 50 % รายงานผล เป็นค่า IC₅₀ ที่หาได้จากการทำ 2-fold serial dilution

หมายเหตุ IC₅₀ = 50 % inhibitory concentration



Bioassay Laboratory TEST REPORT

Bioassay Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
National Science and Technology Development Agency Building
113 Pathayothin Road , Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand
Telephone 02-5646700 ext. 3465,3467 Fax 02-5646707

Date:	August 01, 2006
Customer name:	สุชัย นานาสมบัติ
Customer address:	ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ จสจ. กทม. 10520
Billing address:	ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ จสจ. กทม. 10520

ผลทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero (Cytotoxicity against vero cells)

No.	Screening code	Original code	Cytotoxicity (IC ₅₀ ; µg / ml)
1	V3254	C	> 50
2	V3255	K	> 50
3	V3256	P	> 50
4	V3257	I	> 50

For cytotoxicity test , clifticine is used as positive control ; IC₅₀ = 0.7 ± 0.2 µg / ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Assayed by
Approved by

01-08-2006

ภาคผนวก ง

การเตรียมตัวอย่าง การทำกราฟมาตรฐานและการคำนวณสำหรับการวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วย
เทคนิค HPLC

1. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดผักแพรวสำหรับการวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วยวิธี HPLC

1.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับหาปริมาณ Catechin (CA), Rutin(RU) และ Quercetin (QU)

นำตัวอย่าง (ตาราง ง.1) มาละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วยเอทานอล (HPLC grade) จากนั้นนำมาเจือจาง 10 เท่าด้วย Methanol-Acetonitrile-Water (40:15:45, v/v/v) กรองสารละลายที่ได้ผ่าน membrane ขนาด 0.45 μm ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ตารางที่ ง.1 รหัสตัวอย่างและปริมาณตัวอย่างสารสกัดผักแพรวสำหรับหาปริมาณ Catechin, Rutin และ Quercetin

รหัสตัวอย่าง	น้ำหนัก (กรัม)
P1	0.0112
P2	0.0109
P3	0.0107

1.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับหาปริมาณ Kaempferol (KA) และ Isorhamnetin (IS)

นำตัวอย่าง (ตาราง ง.2) มาละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตรด้วยเอทานอล (HPLC grade) กรองสารละลายที่ได้ผ่าน membrane ขนาด 0.45 μm ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ตารางที่ ง.2 รหัสตัวอย่างและปริมาณตัวอย่างสารสกัดผักแพรวสำหรับหาปริมาณ Kaempferol และ Isorhamnetin

รหัสตัวอย่าง	น้ำหนัก (กรัม)
P1	0.0504
P2	0.0510
P3	0.0507

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1000 ppm

ชั่งสารมาตรฐาน Catechin (CA), Rutin(RU), Quercetin (QU), Kaempferol (KA) และ Isorhamnetin (IS) 0.0100 กรัม ละลายด้วยเอทานอลและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ ๓.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ขวดที่	ความเข้มข้น เริ่มต้น (ppm)	ปริมาตรที่ บีบ (ml)	ปริมาตรที่ เตรียม (ml)	ความเข้มข้นของ สารละลาย (ppm)
1	1000.00	2.50	25.00	100.00
2	100.00	25.00	25.00	10.00
3	100.00	0.70	10.00	7.00
4	100.00	0.50	10.00	5.00
5	100.00	0.30	10.00	3.00
6	100.00	0.10	10.00	1.00
7	10.00	0.70	10.00	0.70
8	10.00	0.50	10.00	0.50
9	10.00	0.30	10.00	0.30
10	10.00	0.10	10.00	0.10
11	1.00	0.70	10.00	0.07
12	1.00	0.50	10.00	0.05
13	1.00	0.30	10.00	0.03
14	1.00	0.10	10.00	0.01

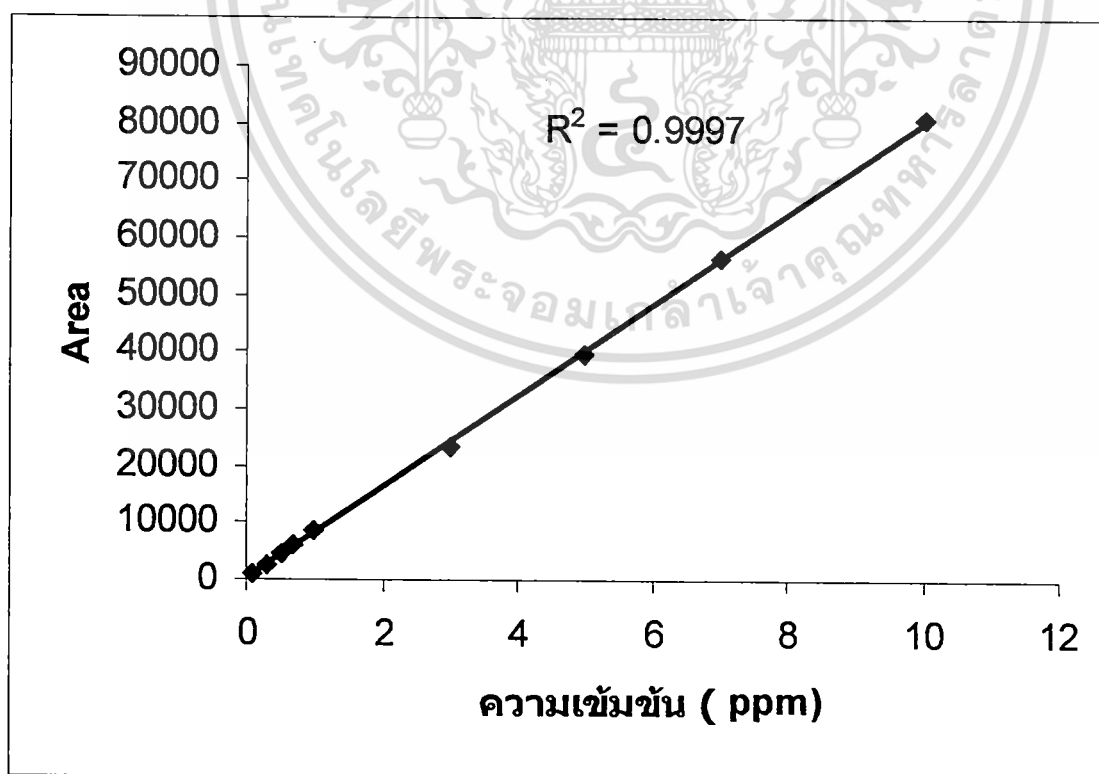
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน

2.3.1 กราฟมาตรฐานของ Catechin (CA)

ตารางที่ ง.4 การสร้างกราฟมาตรฐานของ Catechin

Retention time (นาที)	ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค
3.357	0.10	922
3.358	0.30	2756
3.346	0.50	4459
3.350	0.70	6269
3.358	1.00	8725
3.353	2.00	23463
3.356	5.00	39443
3.356	7.00	56249
3.369	10.00	80964



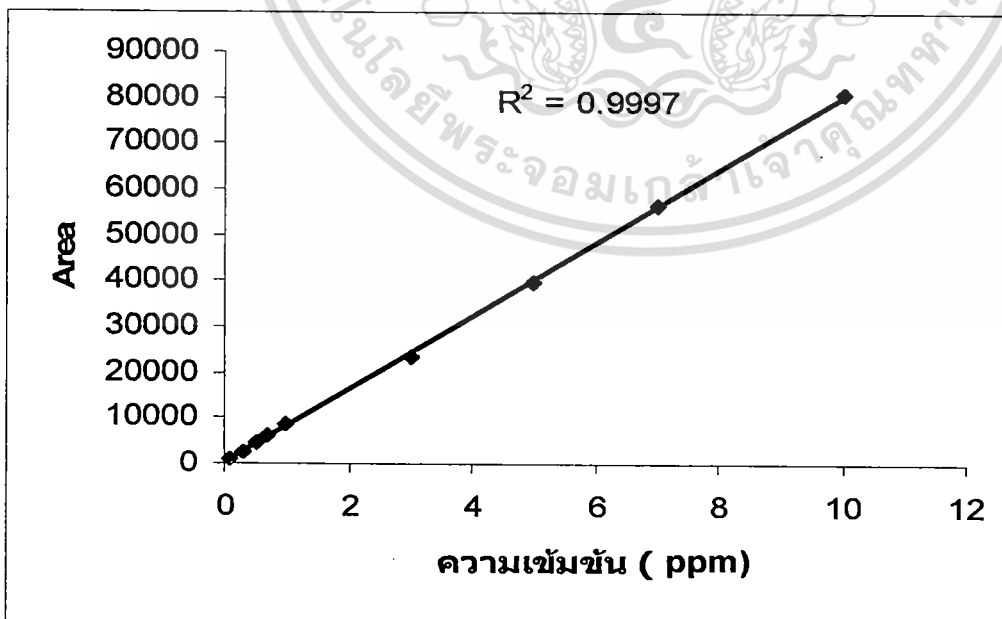
รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานของ catechin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 กราฟมาตรฐานของ Rutin(RU)

ตารางที่ ๓.5 การสร้างกราฟมาตรฐานของ Rutin

Retention time (นาที)	ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค
-	0.010	-
3.987	0.030	266
4.001	0.050	451
3.994	0.070	640
3.980	0.10	935
3.987	0.30	2748
3.983	0.50	4662
3.966	0.70	6709
3.994	1.00	9442
3.961	2.00	28751
3.955	5.00	48349
3.957	7.00	67385
3.942	10.00	97314



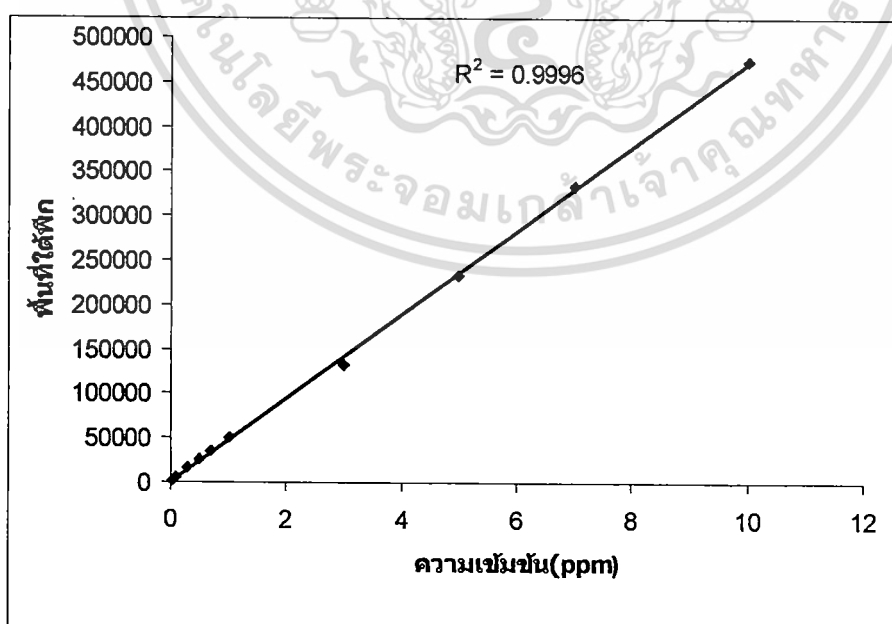
รูปที่ ๓.2 กราฟมาตรฐานของ Rutin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 กราฟมาตรฐานของ Quercetin (QU)

ตารางที่ ๓.6 การสร้างกราฟมาตรฐานของ Quercetin

Retention time (นาที)	ความเข้มข้น(ppm)	พื้นที่ใต้พีค
	0.010	-
7.198	0.030	1665
7.210	0.050	2930
7.226	0.070	3616
7.195	0.10	5800
7.235	0.30	16138
7.216	0.50	25746
7.188	0.70	35203
7.226	1.00	49872
7.167	2.00	133258
7.167	5.00	232814
7.182	7.00	334018
7.286	10.00	473690



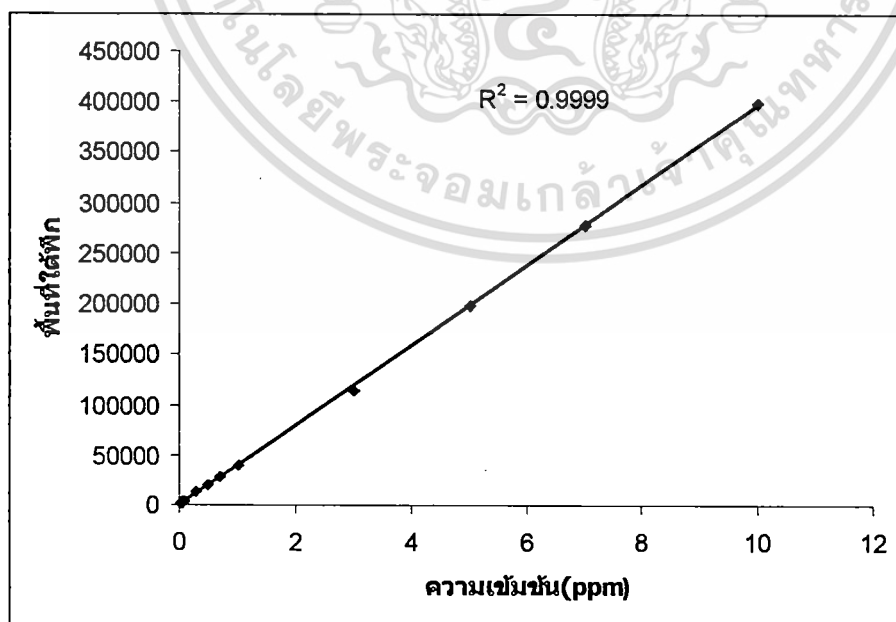
รูปที่ ๓.3 กราฟมาตรฐานของ Quercetin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 กราฟมาตรฐานของ Kaempferol (KA)

ตารางที่ ง.7 การสร้างกราฟมาตรฐานของ Kaempferol

Retention time (นาที)	ความเข้มข้น(ppm)	พื้นที่ใต้พีค
	0.010	-
10.520	0.030	1124
10.557	0.050	1966
10.580	0.070	2522
10.538	0.10	4023
10.613	0.30	12459
10.517	0.50	20155
10.542	0.70	28009
10.590	1.00	39129
10.505	3.00	114779
10.513	5.00	198238
10.540	7.00	278473
10.688	10.00	398092



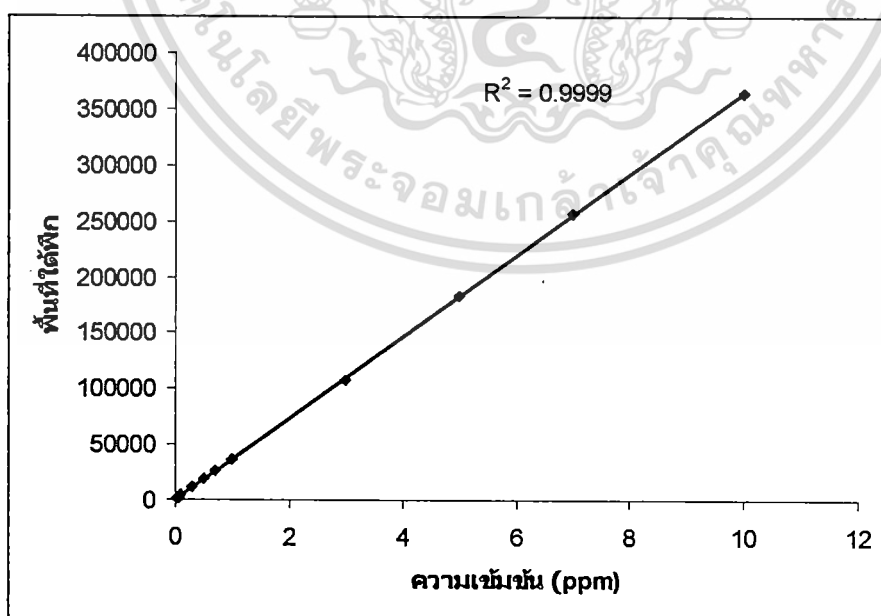
รูปที่ ง.4 กราฟมาตรฐานของ Kaempferol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.5 กราฟมาตรฐานของ Isorhamnetin (IS)

ตารางที่ ง.8 การสร้างกราฟมาตรฐานของ Isorhamnetin

Retention time (นาที)	ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้พีค
	0.010	-
11.354	0.030	1173
11.400	0.050	1878
11.419	0.070	2660
11.380	0.10	3792
11.446	0.30	11917
11.403	0.50	19697
11.374	0.70	26884
11.426	1.00	37606
11.336	3.00	107459
11.352	5.00	183004
11.373	7.00	257317
11.513	10.00	364497



รูปที่ ง.5 กราฟมาตรฐานของ Isorhamnetin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค HPLC

การศึกษานี้ใช้เครื่อง HPLC ของบริษัท Variance Postar ใช้ C-18 column ชนิด ZORBAX SB (250mmx4.6mm i.d.) ใช้สารละลายผสมระหว่าง methanol-acetonitrile-water ในอัตราส่วน 40:15:45 v/v/v ใน 1% acetic acid เป็น mobile phase ใช้ elution system เป็น isocratic ด้วย flow 0.8 ml/min ที่ injection volume 20 ul และ detector เป็น UV สำหรับ Catechin (CA), วัดการดูดกลืนแสงที่ 297 nm และ Rutin (RU), Quercetin (QU) Kaempferol (KA) และ Isorhamnetin (IS) วัดการดูดกลืนแสงที่ 368 nm

2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ Catechin (CA), Rutin (RU), Quercetin (QU), Kaempferol (KA) และ Isorhamnetin (IS) ในสารสกัดผักแพรว

2.5.1 การคำนวณหาปริมาณ Catechin (CA), Rutin (RU), Quercetin (QU), Kaempferol (KA) และ Isorhamnetin (IS) ในสารสกัดตัวอย่างชนิดต่างๆ

การหาปริมาณ Catechin (CA), Rutin (RU), Quercetin (QU), Kaempferol (KA) และ Isorhamnetin (IS) ทำได้โดยนำพื้นที่ที่ได้พิกมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Catechin (CA), Rutin (RU), Quercetin (QU), Kaempferol (KA) และ Isorhamnetin (IS)

เมื่อกำหนดสมการกราฟมาตรฐานเป็น $y = ax + b$

ตัวอย่าง : การคำนวณปริมาณสาร Catechin (CA) ในสารสกัดตัวอย่าง P1 โดยเทคนิค HPLC แทนค่าตัวอย่างตัวแปรต่างๆ จากกราฟมาตรฐานของสาร Catechin (CA)

Y คือ พื้นที่พิกของสารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์

a คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน

x คือ ปริมาณสารมาตรฐานในตัวอย่าง

b คือ จุดตัดแกน y

จากการทดลองกราฟมาตรฐานได้สมการ $y = 8.837852x$

แทนค่าพื้นที่ที่ได้พิก $3275 = 8.837852x$

$$X = 364.99$$

เมื่อแทนค่าเสร็จแล้วก็สามารถหาปริมาณสารมาตรฐาน คือ สาร Catechin (CA) ในสารสกัดตัวอย่างได้เท่ากับ 364.99 ไมโครกรัมต่อปริมาตรสารละลาย 1 ลิตร ซึ่งได้จากตัวอย่าง 0.0112 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรและทำการเจือจางลงไป 10 เท่า ดังนั้นในตัวอย่าง 1 กรัม จะมีสาร Catechin (CA) เท่ากับ

$$\frac{0.365 \text{ mg (CA)}}{1000 \text{ ml (sol)}} \times \frac{10 \text{ ml (sol)}}{1} \times 10 = 3.25 \text{ mg (CA) / 1g (sample)}$$

งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคิดเป็น % w/w ได้เท่ากับ

$$\frac{3.25 \text{ mg(CA)}}{1 \text{ g(sample)}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times 100 = 0.33 \% \text{w/w}$$

ในการคำนวณหาปริมาณสาร Rutin(RU), Quercetin(QU), Kaempferol(KA) และ Isorhamnetin(IS) ในสารสกัดตัวอย่างชนิดอื่นก็ทำเช่นเดียวกับข้างต้น

2.5.2 การคำนวณค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ในรูปแบบเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

ตัวอย่าง : การศึกษาความเที่ยงของเทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร Catechin(CA) ในสารสกัดตัวอย่าง P1 ในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%RSD)

จากสมการแสดงความสัมพันธ์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

$$\text{Standard Deviation(SD)} = \frac{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}{\sqrt{N-1}}$$

เมื่อ x_i คือ ข้อมูลตัวที่ i

\bar{x} คือ ค่าเฉลี่ยของข้อมูล

N คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

$$\text{แทนค่าในสมการ } \bar{x} = (0.33 + 0.34 + 0.36) / 3 = 0.34$$

$$\text{SD} = \frac{\sqrt{(0.33-0.34)^2 + (0.34-0.34)^2 + (0.36-0.34)^2}}{\sqrt{3-1}} = 0.015$$

$$\% \text{RSD} = \frac{0.015 \times 100}{0.34} = 4.40$$

2.5.3 การคำนวณค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในรูปแบบเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% recovery)

ตัวอย่าง : การศึกษาความถูกต้องของเทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร Catechin(CA) ในสารสกัดตัวอย่าง P1 ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% recovery)

จากสมการเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน = $\frac{\text{ปริมาณสาร Catechin(CA) ที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ปริมาณสาร Catechin(CA)ตามทฤษฎี}} \times 100$

เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนของสาร Catechin(CA)ในสารสกัดตัวอย่าง P1 คือ

$$\text{ครั้งที่ 1 : เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน} = \frac{996 \times 100}{1000} = 99.6 \%$$

$$\text{ครั้งที่ 2 : เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน} = \frac{1021 \times 100}{1000} = 102.1 \%$$

$$\text{ครั้งที่ 3 : เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน} = \frac{1067 \times 100}{1000} = 106.7 \%$$

$$\text{ดังนั้นเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนเฉลี่ย} = 103 \%$$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

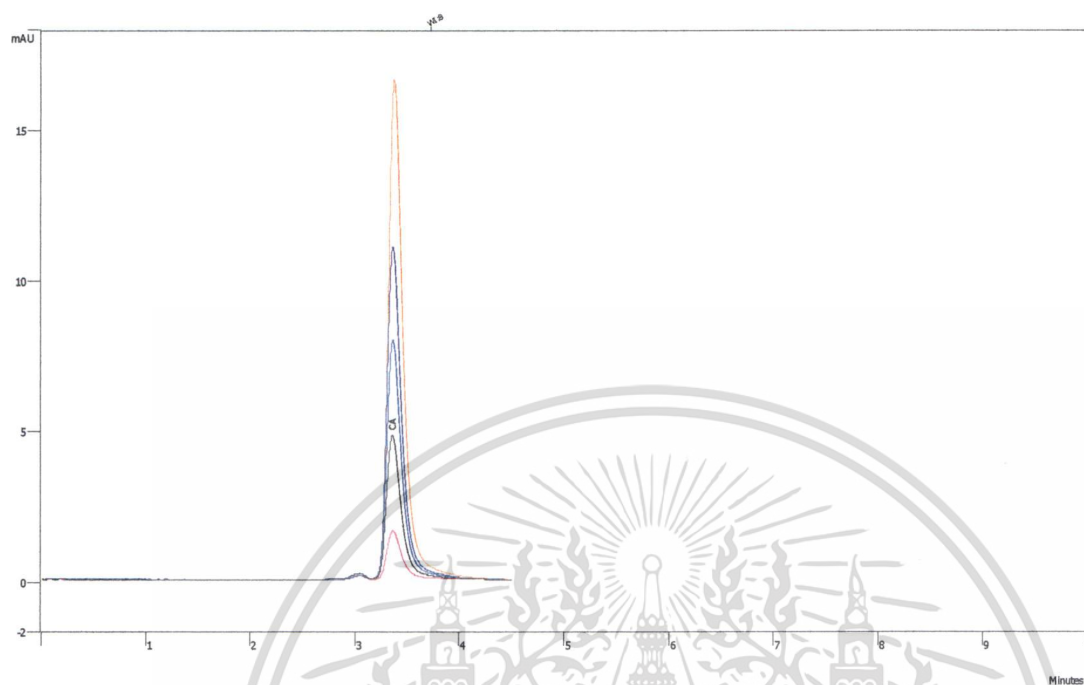
2.5.4 สรุปการหาปริมาณสารสำคัญในผักแพรว

ตารางที่ ๙.9 ปริมาณ catechin, rutin, quercetin, kaempferol และ isorhamnetin ในสารสกัดผักแพรว

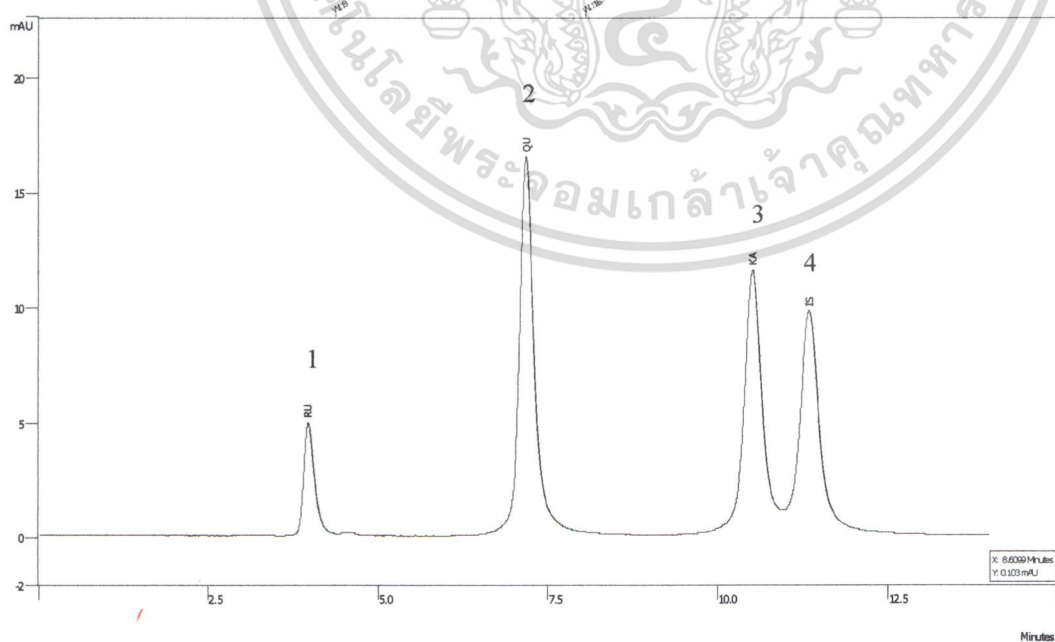
ชนิดของ สารสำคัญที่ ตรวจหา	รหัสตัวอย่าง	ปริมาณที่ตรวจพบ (% w/w) \pm R.S.D % (n = 3)	ปริมาณที่เติม เพิ่ม (Added, ppb)	ปริมาณที่ ตรวจพบ (ppb)	Recovery (%)
Catechin	P1	0.34 \pm 4.40	1000	1029	103
	P2	0.078 \pm 3.70	100	184.95	101
	P3	ND	-	-	-
Rutin	P1	3.80 \pm 0.47	1000	1933.0	93
	P2	1.91 \pm 0.58	1000	1923.0	92
	P3	3.77 \pm 0.27	1000	1973.0	97
Quercetin	P1	0.043 \pm 3.49	100	149.37	101
	P2	0.045 \pm 0.00	100	148.90	100
	P3	0.079 \pm 0.00	100	186.60	100
Kaempferol	P1	ND	-	-	-
	P2	0.015 \pm 3.33	500	820.33	101
	P3	0.9 x 10 ⁻² \pm 0.00	500	675.00	101
Isorhamnetin	P1	ND	-	-	-
	P2	ND	-	-	-
	P3	0.7 x 10 ⁻² \pm 0.00	500	644.00	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน



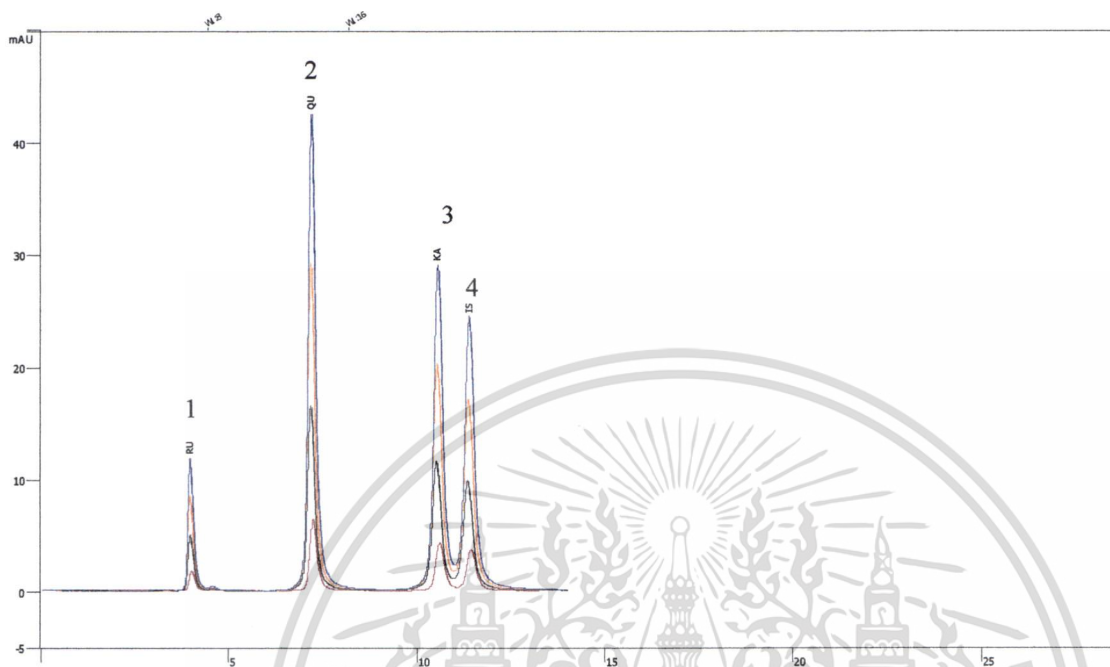
รูปที่ ง.6 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน catechin ในการทำกราฟมาตรฐาน



รูปที่ ง.7 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน (1) rutin (2) quercetin (3) kaemferol และ

(4) isorhamnetin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๘.๘ โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน (1) rutin (2) quercetin (3) kaemferol และ (4) isorhamnetin ในการทำกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้