

การแยกสารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มควันไม้โดยใช้คอลัมน์หมอนอลิติกร่วมกับ
เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบแรงดันต่ำ

SEPARATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN WOOD VINEGAR
USING MONOLITHIC COLUMN WITH LOW PRESSURE LIQUID
CHROMATOGRAPHY



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยทางเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่

สถาบันวิจัย

คณะวิทยาศาสตร์

ศูนย์เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2556

KMITL-2013-SC-M-012-026

การแยกสารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มควันไม้โดยใช้คอลัมน์มอโนลิติกร่วมกับ
เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบแรงดันต่ำ

SEPARATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN WOOD VINEGAR
USING MONOLITHIC COLUMN WITH LOW PRESSURE LIQUID
CHROMATOGRAPHY



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2556

KMITL-2013-SC-M-012-026

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**SEPARATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN WOOD VINEGAR
USING MONOLITHIC COLUMN WITH LOW PRESSURE LIQUID
CHROMATOGRAPHY**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2013
KMITL-2013-SC-M-012-026**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2013

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การแยกสารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มควันไม้โค่นใช้คอลัมน์มอนอลิติก
ร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบแรงดันต่ำ
Separation of Phenolic Compounds in Wood Vinegar Using
Monolithic Column with Low Pressure Liquid Chromatography

นักศึกษา

นายอาจณรงค์ เมธาวิสรเสรีญ

รหัสประจำตัว

53650904

ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา

เคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ดร.เสาวภาคย์	ธีราทรง	เสาวภาคย์
ผศ.ดร.สุวรรณี	จรรยาพูน	สุวรรณี
ดร.พัชรินทร์	ชัยสุวรรณ	พัชรินทร์
ดร.ณัฐวุฒิ	เชิงชั้น	ณัฐวุฒิ

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 21 พฤษภาคม พ.ศ. 2556 เวลา 09.30 - 12.00 น.
สถานที่สอบ ณ ห้อง 316 ชั้น 3 อาคารปฏิบัติการใหม่

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 29 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกสารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มควันไม้โดยใช้คอลัมน์มอนอลิติกร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบแรงดันต่ำ
นักศึกษา	นายอาจณรงค์ เมธาวิสรรเสริญ
รหัสประจำตัว	53650904
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมี
พ.ศ.	2556
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ณัฐวุฒิ เชิงชั้น

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ได้พัฒนาวิธีแยกและวิเคราะห์องค์ประกอบสารประกอบฟีนอลิก จำนวน 3 ชนิด ในน้ำส้มควันไม้ ได้แก่ กรดแกลลิก กรดวานิลลิก และ ไชรินจอล โดยใช้คอลัมน์ชนิดมอนอลิติก (Chromolith® flash RP-18e column) ร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบแรงดันต่ำ และการวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกคือ ใช้สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่เตรียมในสารละลาย อะซิเตทบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.0 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ใช้อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร เมื่อใช้สภาวะดังกล่าว พบว่า สารทั้งสามแยกออกจากกันได้ดี ภายใน 5 นาที ได้สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานดังนี้: พื้นที่ใต้กราฟ = $22730 [\text{กรดแกลลิก}] - 2724.9, r^2 = 1.0 / \text{พื้นที่ใต้กราฟ} = 25083 [\text{กรดวานิลลิก}] - 8701.2, r^2 = 0.9999$ และ $\text{พื้นที่ใต้กราฟ} = 1941.2 [\text{ไชรินจอล}] + 4209.5, r^2 = 0.9929$ เมื่อประยุกต์ใช้กับตัวอย่างน้ำส้มควันไม้จากไม้ยูคาลิปตัส พบว่า ให้ความแม่นยำและความเที่ยงสูง (ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับอยู่ในช่วง 82.4 - 98.2 และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า ร้อยละ 5) ผลการวิเคราะห์พบว่า ในตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ มีปริมาณ ไชรินจอลมากที่สุด รองลงมา คือ กรดแกลลิกและกรดวานิลลิก ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกัน

คำสำคัญ: น้ำส้มควันไม้, สารประกอบฟีนอลิก, โครมาโทกราฟีของเหลวแบบแรงดันต่ำ, คอลัมน์มอนอลิติก

Thesis Title	Separation of Phenolic Compounds in Wood Vinegar using Monolithic Column with Low Pressure Liquid Chromatography
Student	Arjnarong Mathaweensurn
Student ID	53650904
Degree	Master of Science
Program	Chemistry
Year	2013
Thesis Advisor	Dr. Nathawut Choengchan

Abstract

In this work, low pressure liquid chromatography (LPLC) with monolithic column (Chromolith® flash RP-18e) and UV detection was developed for separation and determination of phenolic compounds (*i.e.*, gallic acid, vanillic acid and syringol) in wood vinegar. The optimal conditions were listed as followings: Mobile phase; 10 % (v/v) methanol in 0.1 M acetate buffer pH 3.0, Flow rate; 2.0 ml min⁻¹ and Detection wavelength; 264 nm. Under these conditions, the phenolic compounds were completely separated within 5 min. Good linearity ranges were achieved (Peak area = 22730[Gallic acid] - 2724.9, r² = 1.0 / Peak area = 25083[Vanillic acid] - 8701.2, r² = 0.9999 and Peak area = 1941.2[Syringol] + 4209.5, r² = 0.9929). The method was applied to wood vinegar samples from eucalyptus tree. High precision and high accuracy were obtained (Analytical recovery = 82.4 - 98.2 and RSD < 5 %). It was found that the contents of syringol were higher than that of gallic and vanillic acid for all samples.

Key words: Wood vinegar, Phenolic compounds, Low pressure liquid chromatography, Monolithic column

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยได้รับความกรุณาจาก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น อาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในทุกๆ ขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์นี้ อย่างใกล้ชิด ซึ่งผู้เขียนต้องขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มอบทุนวิจัยบูรณาการเชิงพาณิชย์ ปีงบประมาณ 2554 เพื่อสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ และมอบทุนอุดหนุนการศึกษาให้แก่ผู้เขียน ตั้งแต่ปีการศึกษา 2553 ถึง 2554 รวมถึงขอขอบคุณ ทุนวิจัยจากสภาวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2555 ที่มอบทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์นี้เช่นเดียวกัน

ขอขอบคุณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ จากสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวรรณี จรรยาพูน ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ รวมถึงให้ข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ และ ดร.เสาวภาคย์ ชีราทรง ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ รวมถึงชี้แนะแนวทางในการจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและเรียบร้อย

ขอขอบคุณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์จากภายนอก คือ ดร.พัชรินทร์ ชัยสุวรรณ อาจารย์ประจำ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบแรงดันต่ำและคอลัมน์ชนิดมอนอลิติก เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ คุณกัญญา มงคลโกชนันท์ นักวิทยาศาสตร์ผู้ดูแลเครื่องมือโครมาโทกราฟีของเหลว ที่ได้สอนการใช้เครื่องมือและ โปรแกรมในการประมวลผลการทดลอง

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ บิดา มารดา และครอบครัว ที่สนับสนุนและให้กำลังใจผู้เขียน ด้วยดีเสมอมา

นายอาจณรงค์ เมธาวิสรเสริญ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	IV
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	XIV
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 สารอนุมูลอิสระ	5
2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ	5
2.3 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ	5
2.4 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ	6
2.5 แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ	8
2.6 น้ำส้มควันไม้	9
2.6.1 กระบวนการเกิดน้ำส้มควันไม้.....	10
2.6.2 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำส้มควันไม้.....	11
2.7 สารประกอบฟีนอลิก	14
2.7.1 ลักษณะทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิก.....	14
2.7.2 ชนิดของสารประกอบฟีนอลิก	15
2.7.3 สมบัติการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก	20
2.7.4 คุณสมบัติของกรดฟีนอลิกบางชนิด.....	22
2.8 เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง.....	23
2.8.1 หลักการแยกสาร โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว	23

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.8.2 ประสิทธิภาพในการแยกของโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง	25
2.9 คอลัมน์ชนิดรูปทรงแท่ง.....	29
2.10 เครื่องยิวี-วิสิเบิล สเปกโทรมิเตอร์.....	31
2.10.1 สเปกโทรมิเตอร์ และกฎของเบียร์.....	31
2.10.2 องค์ประกอบของเครื่องยิวี-วิสิเบิล สเปกโทรมิเตอร์	31
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	33
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	36
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์.....	36
3.1.1 สารเคมี.....	36
3.1.2 อุปกรณ์ เครื่องตรวจวัด	36
3.2 การเตรียมสารละลาย.....	37
3.2.1 สารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท.....	37
3.2.2 สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์.....	37
3.2.3 สารละลายอะซิโตนในไตรล์ เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร	37
3.2.4 สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก	37
3.2.5 สารละลายมาตรฐานกรดควานิลลิก.....	38
3.2.6 สารละลายมาตรฐานไซรินจอล.....	38
3.2.7 สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มก.ต่อลิตร	38
3.2.8 สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	38
3.3 วิธีดำเนินการทดลอง.....	38
3.3.1 ศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัด	38
3.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง.....	39
3.3.3 คุณลักษณะเด่นของวิธี	41
3.3.4 ศึกษาการแยกสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำส้มควันไม้	42
3.3.5 เปรียบเทียบคอลัมน์แบบบรรจุเม็ดคอนูภาคกับคอลัมน์แบบมอนอลิติก	42

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	43
4.1 ศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมใช้ในการตรวจวัด.....	43
4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง.....	44
4.2.1 ชนิดของสารละลายเฟสเคลื่อนที่.....	44
4.2.2 อัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่.....	45
4.2.3 ค่าพีเอชของสารละลายเฟสเคลื่อนที่.....	48
4.2.4 ความยาวคอลัมน์.....	54
4.2.5 อัตราการไหลของสารละลายเฟสเคลื่อนที่.....	55
4.2.6 ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีด.....	56
4.3 คุณลักษณะเด่นของวิธี.....	59
4.3.1 ความแม่นยำ.....	59
4.3.2 ความเที่ยง.....	60
4.3.3 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD).....	61
4.3.4 ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (Limit of Quantitation, LOQ).....	61
4.4 ศึกษาการแยกสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำส้มควันไม้.....	61
4.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพเมื่อใช้คอลัมน์แบบบรรจุเม็ดอนุภาคกับคอลัมน์แบบมอนอลิติก.....	63
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	66
5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	66
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	67
เอกสารอ้างอิง.....	68
ภาคผนวก ก.....	71
ภาคผนวก ข.....	90
ประวัติผู้เขียน.....	91

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 กระบวนการเกิดน้ำส้มควันไม้.....	11
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีโดยรวมของน้ำส้มควันไม้.....	12
ตารางที่ 2.3 สัดส่วนปริมาณองค์ประกอบทางเคมีต่างๆในน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่.....	13
ตารางที่ 2.4 กลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืช.....	19
ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพในการแยก (Resolution, R) ของสารประกอบฟีนอลิกในสารละลาย มาตรฐานผสมที่พีเอชต่างๆ.....	53
ตารางที่ 4.2 สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิก	57
ตารางที่ 4.3 ผลการคำนวณหาร้อยละค่าคืนกลับของสารประกอบฟีนอลิก.....	60
ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำส้มควันไม้.....	63
ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพในการแยก (Resolution, R) ของสารประกอบฟีนอลิกในสารละลาย มาตรฐานผสม เมื่อใช้คอลัมน์แบบบรรจุเม็ดอนุภาคและคอลัมน์มอนอลิติก.....	64
ตารางที่ ข.1 แสดงเวลาในการชะสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สัมพัทธ์ ($n=5$).....	90

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์.....	9
รูปที่ 2.2 โครงสร้างหลักของสารประกอบฟลาโวนอยด์.....	16
รูปที่ 2.3 โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์กลุ่มต่างๆ.....	17
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของควอซิทิน.....	18
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของกรดแกลลิก กรควานิลลิก และ ไซตินกอล.....	22
รูปที่ 2.6 การเคลื่อนที่ของสาร 2 ชนิดในเฟสหนึ่ง และออกจากเฟสหนึ่งในเวลาต่างกัน.....	24
รูปที่ 2.7 โครมาโทแกรมของสารตัวอย่างที่ประกอบด้วยสาร 2 ชนิด.....	25
รูปที่ 2.8 Van Deemter Plot แสดงเทอมที่มีบทบาทต่อค่า H.....	28
รูปที่ 2.9 การกระจายตัวของสารในคอลัมน์.....	28
รูปที่ 2.10 อิทธิพลของขนาดของอนุภาคที่มีผลต่อความสูงของเพลต(H).....	29
รูปที่ 2.11 ภาพถ่าย SEM ภายในคอลัมน์โมโนลิติก แสดงให้เห็นถึงช่องว่างภายในคอลัมน์.....	30
รูปที่ 2.12 แสดงการเปรียบเทียบวัสดุ และการไหลของสารภายในคอลัมน์ทั้งสองชนิด.....	30
รูปที่ 2.13 แสดง โมโน โครมาเตอร์.....	32
รูปที่ 4.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10-4 โมลาร์.....	43
รูปที่ 4.2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม กรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร.....	44
รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม กรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น สารละลายอะซิโตไนไตรล์เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร.....	45
รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร.....	46
รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 25 โดยปริมาตร.....	46

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร	47
รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 75 โดยปริมาตร	47
รูปที่ 4.8 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร	48
รูปที่ 4.9 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 5.0	49
รูปที่ 4.10 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.5	49
รูปที่ 4.11 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.0	50
รูปที่ 4.12 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.5	50

IX

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.13 โคโรนาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0	51
รูปที่ 4.14 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	52
รูปที่ 4.15 กราฟมาตรฐานของกรดวานิลลิกที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	52
รูปที่ 4.16 กราฟมาตรฐานของไซรินจอลที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	53
รูปที่ 4.17 โคโรนาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0.....	54
รูปที่ 4.18 กราฟแสดงผลของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่มีผลต่อเวลาในการแยกและ ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ต่อหนึ่งตัวอย่าง.....	55
รูปที่ 4.19 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	56
รูปที่ 4.20 กราฟมาตรฐานของกรดวานิลลิกที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	56
รูปที่ 4.21 กราฟมาตรฐานของไซรินจอลที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	57
รูปที่ 4.22 กราฟมาตรฐานของ ก. กรดแกลลิก ข. กรดวานิลลิก และ ค. ไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	58
รูปที่ 4.23 โคโรนาโทแกรมของตัวอย่างน้ำส้มคว้นไม้ที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐานผสมของ สารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิดลงไป	62
รูปที่ 4.24 โคโรนาโทแกรมของตัวอย่างน้ำส้มคว้นไม้ที่มีการเติมสารมาตรฐานผสมเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ของสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิดลงไป	62

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.25 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0. คอลัมน์แบบบรรจุเม็ดอนุภาค และ ข. คอลัมน์ม่อนอลิติ	64
รูปที่ ก.1 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.0.....	71
รูปที่ ก.2 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 10.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.0.....	72
รูปที่ ก.3 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 50.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.0.....	72
รูปที่ ก.4 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 100.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.0.....	73
รูปที่ ก.5 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.0.....	73
รูปที่ ก.6 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.5.....	74
รูปที่ ก.7 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 10.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.5.....	74
รูปที่ ก.8 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 50.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.5.....	75
รูปที่ ก.9 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 100.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.5.....	75
รูปที่ ก.10 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.5.....	76
รูปที่ ก.11 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 4.0.....	76

สารบัญญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ ก.12 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 10.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 4.0	77
รูปที่ ก.13 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 50.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 4.0	77
รูปที่ ก.14 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 100.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 4.0	78
รูปที่ ก.15 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 4.0	78
รูปที่ ก.16 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหล เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที.....	79
รูปที่ ก.17 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที.....	80
รูปที่ ก.18 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที.....	80
รูปที่ ก.19 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหล เท่ากับ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที.....	81
รูปที่ ก.20 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 10.0 ไมโครลิตร....	82
รูปที่ ก.21 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 10.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 10.0 ไมโครลิตร....	82
รูปที่ ก.22 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 50.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 10.0 ไมโครลิตร....	83
รูปที่ ก.23 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 100.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 10.0 ไมโครลิตร....	83
รูปที่ ก.24 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 10.0 ไมโครลิตร....	84
รูปที่ ก.25 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 15.0 ไมโครลิตร.....	84

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

- รูปที่ ก.26 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 10.0 ppm ค่าพีเอช 3.0
อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 15.0 ไมโครลิตร.... 85
- รูปที่ ก.27 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 50.0 ppm ค่าพีเอช 3.0
อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 15.0 ไมโครลิตร.... 85
- รูปที่ ก.28 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 100.0 ppm ค่าพีเอช 3.0
อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 15.0 ไมโครลิตร.... 86
- รูปที่ ก.29 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอช 3.0
อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 15.0 ไมโครลิตร.... 86
- รูปที่ ก.30 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าพีเอช 3.0
อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 20.0 ไมโครลิตร.... 87
- รูปที่ ก.31 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 10.0 ppm ค่าพีเอช 3.0
อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 20.0 ไมโครลิตร.... 87
- รูปที่ ก.32 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 50.0 ppm ค่าพีเอช 3.0
อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 20.0 ไมโครลิตร.... 88
- รูปที่ ก.33 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 100.0 ppm ค่าพีเอช 3.0
อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 20.0 ไมโครลิตร.... 88
- รูปที่ ก.34 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอช 3.0
อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 20.0 ไมโครลิตร.... 89

สัญลักษณ์และคำย่อ

ABTS	2,2-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid)
DPPH	1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
DAD	Photodiode array detector
SIA	Sequential Injection Analysis
SIC	Sequential Injection Chromatography
°C	องศาเซลเซียส
A	Absorbance



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

น้ำส้มควันไม้ (Wood vinegar หรือ Pyroligneous acid) เป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากการเผาถ่านไม้ในเตาเผาภายใต้ภาวะจำกัดอากาศ ซึ่งทำให้เกิดการระเหยของน้ำ น้ำมันดิน(tar) และการสลายตัวของเซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ออกจากเนื้อไม้ในรูปของควันไม้แล้วเกิดการควบแน่นเป็นน้ำส้มควันไม้

น้ำส้มควันไม้มีองค์ประกอบโดยปริมาตร คือ น้ำ ร้อยละ 85 กรดอินทรีย์ ร้อยละ 3 และสารอินทรีย์อื่นๆ ร้อยละ 12 สามารถแบ่งสารประกอบในน้ำส้มควันไม้เป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่

1. กลุ่ม Organic acids ได้แก่ formic acid, acetic acid, propionic acid
2. กลุ่ม Phenols ได้แก่ phenol, guaiacol, cresol, syringol, gallic acid, vanillic acid
3. กลุ่ม Carbonyl compounds ได้แก่ formaldehyde, acetone, acetaldehyde, furfural
4. กลุ่ม Alcohols ได้แก่ methanol, ethanol, propanol, isopropanol

จะเห็นได้ว่า ในน้ำส้มควันไม้ นอกจากจะประกอบด้วยกรดอะซิติกซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักแล้ว ยังมีสารประกอบจำพวกฟีนอลิก (Phenolic compounds) ด้วย ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกนี้เองที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง และรอยเหี่ยวย่น สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากธรรมชาติมีราคาต้นทุนค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับน้ำส้มควันไม้ ซึ่งมีการลงทุนในการผลิตที่ไม่สูงมากนักเพราะ วัตถุดิบหาได้ง่ายในท้องถิ่น เทคโนโลยีในการผลิตไม่ซับซ้อน สามารถผลิตได้ในระดับชุมชน

สำหรับในประเทศไทย น้ำส้มควันไม้จัดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดหนึ่งที่มีการผลิตอย่างแพร่หลาย เกษตรกรนิยมนำน้ำส้มควันไม้ (ที่ยังไม่ได้ผ่านการสกัด) ไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร เช่น นำไปใช้ฉีดพ่นใบ เพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช หรือ รดโคนต้นไม้เพื่อป้องกันและกำจัดจุลินทรีย์ที่อาจเป็นสาเหตุของโรครากและโคนเน่า นอกจากนี้ ยังมีการนำมาใช้ภายในครัวเรือน เช่น นำมารักษาแผลสด เป็นต้น ถึงแม้ว่าการนำไปใช้ประโยชน์ดังกล่าว จะช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีได้ แต่อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยยังไม่ค่อยมีการนำน้ำส้มควันไม้ไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นต่างจากในต่างประเทศ เช่น ประเทศญี่ปุ่น ที่มีรายงานการนำส่วนประกอบในน้ำส้มควันไม้ ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระไปเติมในเครื่องสำอาง เป็นต้น ทั้งนี้ การที่จะนำ

น้ำส้มควันไม้ไปเติมในเครื่องสำอานั้น จำเป็นต้องแยกส่วนที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระออกจากองค์ประกอบอื่นๆเสียก่อน แต่ในปัจจุบันยังไม่มีกรรมวิธี/ขั้นตอนในการแยก หากมีวิธีที่มีประสิทธิภาพที่สามารถแยกองค์ประกอบต่างๆออกจากกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก จะช่วยให้สามารถนำน้ำส้มควันไม้ไปใช้งานได้คุ้มค่าน่ามากขึ้น

เทคนิคในการแยกโดยทั่วไปที่ใช้เพื่อแยกสารประกอบจำพวกฟีนอลิกจะใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีประสิทธิภาพสูง ซึ่งจะใช้คอลัมน์ที่มีการบรรจุด้วยเม็ดอนุภาค จึงจำเป็นต้องใช้ปั๊มที่มีแรงดันสูงในการพาสารละลายเข้าสู่คอลัมน์ อีกทั้งยังใช้เวลาในการแยกนาน จึงนำมาสู่แนวทางในงานวิจัยนี้ โดยจะศึกษาการแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มควันไม้ โดยอาศัยหลักการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบความดันต่ำ เป็นเทคนิคที่ใช้ร่วมกับคอลัมน์ชนิดรูพรุนสูง (Monolithic column) การมีรูพรุนจำนวนมาก ทำให้สารละลายสามารถไหลผ่านคอลัมน์ได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้แรงดันสูงในการพาสารละลายเข้าสู่ระบบ อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการแยกที่ดี สามารถใช้ร่วมกับเทคนิคที่ใช้ความดันต่ำได้ อย่างไรก็ตาม เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบแรงดันต่ำที่ใช้อยู่นั้น ยังต้องอาศัยการฉีดแบบมือ ไม่เป็นอัตโนมัติ ในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเทคนิคซีเควนเชียลอินเจกชันโครมาโทกราฟี (Sequential injection chromatography, SIC) เพราะเทคนิค SIC สามารถฉีดสารละลายตัวอย่าง รวมถึง ขั้นตอนการวิเคราะห์ขั้นตอนอื่นๆ ให้เป็นอัตโนมัติได้ โดยใช้โปรแกรมควบคุมการทำงาน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อพัฒนาวิธีการแยกสารต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบความดันต่ำ
- 1.2.2 เพื่อตรวจสอบความน่าเชื่อถือของวิธีที่พัฒนาขึ้น
- 1.2.3 เพื่อนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างน้ำส้มควันไม้

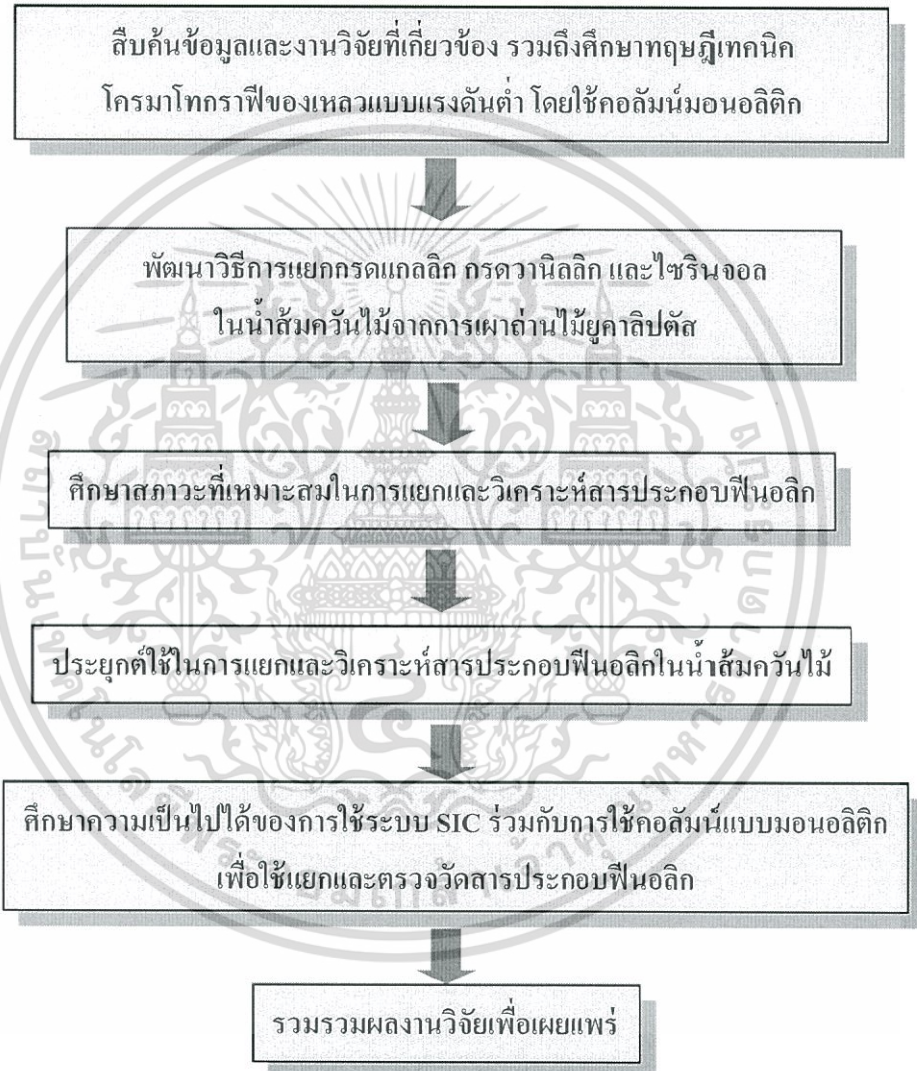
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ จะเริ่มจากการสืบค้นและศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ไปพร้อมๆกับศึกษาทฤษฎีของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบแรงดันต่ำ โดยใช้คอลัมน์ชนิดมอนอลิทิก ซึ่งมีความเป็นรูพรุนสูง

จากนั้นจะได้พัฒนาวิธีการแยกและหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ในตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่เกิดจากการเผาถ่านไม้

ยุคาลิปต์ส โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบแรงดันต่ำร่วมกับคอลัมน์แบบมอนอลิติก และตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ในส่วนของการพัฒนาวิธีการแยกนี้ จะเริ่มจากการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด เช่น ความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสง รวมถึง ศึกษาอิทธิพลของตัวแปรทางกายภาพและทางเคมีที่มีผลต่อประสิทธิภาพการแยก เช่น อัตราการไหล ปริมาตรที่ฉีด ชนิดและค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่ เป็นต้น

จากขอบเขตทั้งหมดสามารถสรุปเป็นแผนผังได้ดังนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1. ได้วิธีในการแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มควันไม้โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบแรงดันต่ำ โดยใช้คอลัมน์มอนอติกร่วมกับการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ

1.4.2. สามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มควันไม้ ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารอนุมูลอิสระ

สารอนุมูลอิสระ คือ โมเลกุลหรืออนุภาคที่อิเล็กตรอนวงนอกเป็นอิสระไม่ได้ใช้สร้างพันธะใดๆ เนื่องจากมีการรับ หรือขาดอิเล็กตรอนไปหนึ่งตัว ทำให้โมเลกุลหรืออนุภาคประเภทนี้ไม่เสถียรและมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาสูงมาก ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเสถียร โมเลกุลหรืออนุภาคนั้นจะต้องแย่งอิเล็กตรอนจาก โมเลกุลปกติมาหนึ่งตัว ซึ่งจะทำให้โมเลกุลนั้นขาดอิเล็กตรอนไปหนึ่งตัว กลายเป็นอนุมูลอิสระแทน การแย่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นๆนี้จะเกิดขึ้นเรื่อยๆเป็นลูกโซ่ อนุมูลอิสระเกิดได้จาก 2 แหล่ง คือ (1) ภายในร่างกาย เช่น เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของออกซิเจนภายในเซลล์ และ (2) ภายนอกร่างกาย จากสิ่งแวดล้อม เช่น รังสียูวี หรือจากมลพิษ เช่น คาร์บอนหรือ ไอเสียรถยนต์ โดยปกติร่างกายจะรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสมโดยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกาย แต่ถ้าเสียสมดุลโดยมีปริมาณของอนุมูลอิสระมากกว่าปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ จะก่อให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุล เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และดีเอ็นเอ ทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคผนังหลอดเลือดแข็งตัว โรคเบาหวาน แก่ก่อนวัย และโรคอื่นๆอีกมาก

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารต้านออกซิเดชัน คือโมเลกุลของสารที่สามารถสารจำพวกอนุมูลอิสระ แล้วยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้โดยตรง หรือทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงถือเป็นตัววิเศษ โดยอนุมูลอิสระจัดเป็นตัวออกซิไดส์

2.3 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ

1. สารต้านออกซิเดชันปฐมภูมิ (Primary anti-oxidant) สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้สามารถยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ โดยการให้ออกซิเจนหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ

แล้วทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดความคงตัว หรือไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นอนุมูลอิสระต่อไปอีก สารต้านออกซิเดชันที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ สารประกอบที่มีหมู่ฟีนอลในโครงสร้าง เช่น Butylated hydroxyl anisole (BHA), Butylated hydroxyl toluene (BHT) และ Polyhydroxylphenol เช่น แกลลิก เป็นต้น

2. สารต้านออกซิเดชันทุติยภูมิ (Secondary anti-oxidant) หรือสารต้านออกซิเดชันที่เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic anti-oxidant) สารต้านออกซิเดชันกลุ่มนี้จะไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระ แต่จะช่วยการทำงานของสารต้านออกซิเดชันปฐมภูมิในลักษณะต่างๆ ซึ่งจะเป็นตัวที่ทำหน้าที่ลดอัตราการเกิดออกซิเดชัน เช่น ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ช่วยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ว่องไวต่อปฏิกิริยา ช่วยดูดซับรังสียูวี เป็นต้น ตัวอย่างสารต้านออกซิเดชันกลุ่มนี้ได้แก่ กรดไทโอไดโพรพอยอนิก (thiodipropionic acid) และ ไคลอริล ไทรโอไดโพรพอยอนเนต เป็นต้น

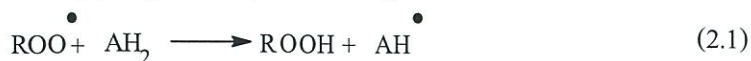
สารที่เสริมฤทธิ์กันมีกลไกการทำงานหลายอย่าง เช่น ให้ไฮโดรเจนกับอนุมูลฟีนอกซิล โดยเปลี่ยนรูปสารต้านออกซิเดชันปฐมภูมิ ซึ่งช่วยให้สารต้านออกซิเดชันปฐมภูมิจึงมีความคงตัวมากขึ้น ตัวอย่างสารต้านออกซิเดชันกลุ่มนี้ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก และอนุพันธ์ของกรดซิตริก และเอนไซม์ เป็นต้น

นอกจากนี้ ยังมีสารประกอบที่จัดเป็นสารต้านออกซิเดชันอื่นๆ ตัวอย่างเช่น ฟลาโวนอยด์ สารประกอบของฟลาโวนอยด์ และกรดอะมิโน มีหน้าที่เช่นเดียวกับสารต้านออกซิเดชันปฐมภูมิและสารต้านออกซิเดชันที่เสริมฤทธิ์กัน ส่วนใหญ่ใช้ในการถนอมรักษาเนื้อ โดยมีหน้าที่เปลี่ยนอิมโพรตีนให้อยู่ในรูปของไนตริกออกไซด์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยา และจับไอออนของโลหะ

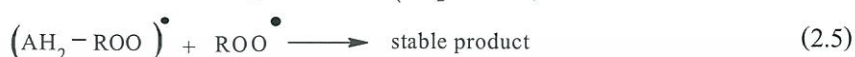
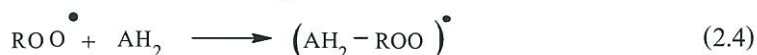
2.4 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ (Rajalakshmi *et.al.*, 1995)

1. กำจัดอนุมูลอิสระ (Radical scavenger) โดยการให้อะตอมไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งอัตราการเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระเร็วกว่าของสารตั้งต้นชนิดอื่น ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันไม่ดำเนินต่อไป

การให้ไฮโดรเจน (hydrogen donor) แสดงดังปฏิกิริยา 2.1 – 2.3



การให้อิเล็กตรอน แสดงดังปฏิกิริยา 2.4 และ 2.5



2. ยับยั้งการทำงานของ Singlet oxygen (Singlet oxygen quenching) เบต้าแคโรทีน และ แอลฟาโทโคฟีรอล สามารถยับยั้งการเกิด Singlet oxygen ได้ซึ่งเบต้าแคโรทีนนั้นสามารถยับยั้งการเกิดลิพิดออกซิเดชัน โดยเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้

3. การสลายสารเปอร์ออกไซด์ (Peroxide decomposer) สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น เอมีนไดไฮโอโพรพิโอนิก และกรดไฮโอโพรพิโอนิก ทำหน้าที่โดยการสลายลิพิดเปอร์ออกไซด์ ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีความคงตัว เช่น แอลกอฮอล์ คีโตน และแอลดีไฮด์

4. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (Enzyme inhibition) สารประกอบ ฟีนอลิกบางชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และ แกลเลต สามารถยับยั้ง Lipoxygenase โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ ยังผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว

5. การเสริมฤทธิ์กัน (synergism) สารชนิดนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น โดยมีการทำงานสองแบบ คือ

ก. การจับออกซิเจนและการรีดิวซ์ โดยสารกลุ่มนี้ทำหน้าที่ให้ไฮโดรเจนกับอนุมูลฟีนอกซิล โดยการเปลี่ยนรูปสารต้านออกซิเดชันปฐมภูมิหรือเข้าไปจับออกซิเจนอิสระ เช่นกรดแอสคอร์บิกและแอสคอร์บิลปาลมิเตท สามารถใช้เสริมฤทธิ์ร่วมกับสารต้านออกซิเดชันปฐมภูมิได้ โดยเฉพาะกับโทโคฟีรอล

ข. การจับโลหะอยู่ในรูปของคอมเพล็กซ์ที่คงตัว ทำหน้าที่จับกับโลหะโปรออกซิเดนท์ เช่น เหล็กและทองแดง ซึ่งให้ผลที่ดีเมื่อใช้ร่วมกับสารต้านออกซิเดชันปฐมภูมิและตัวจับออกซิเจน ทำให้อาหารมีความคงตัว

2.5 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ (Pratt *et.al.*, 1992)

สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนแปลง สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพ และความคงตัวสูงกว่าสารต้านออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติทั่วไป แต่มีข้อจำกัดของการใช้ เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์มีอยู่หลายชนิด แต่ที่นิยมใช้ ได้แก่

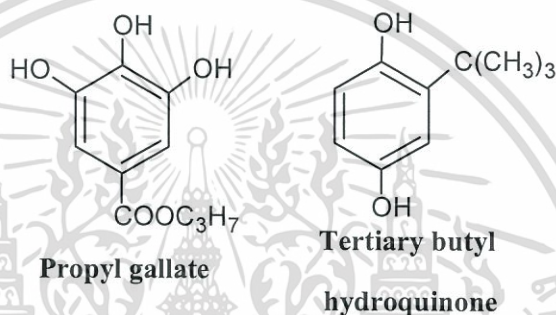
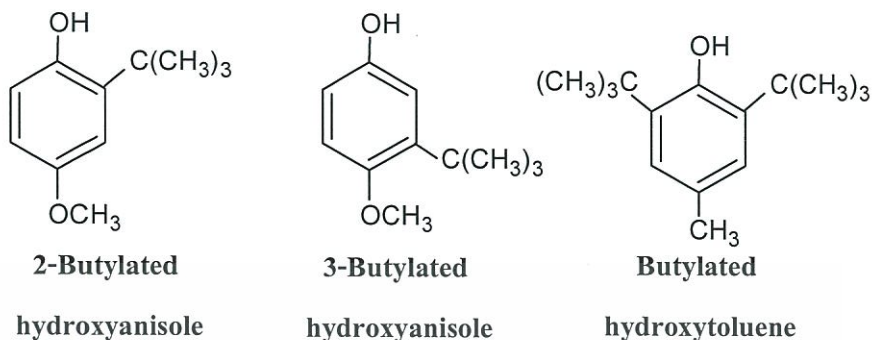
- Butylated hydroxyanisole (BHA) เป็นสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ที่นิยมใช้มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ มีลักษณะเป็นเกล็ดสีขาว เป็นงาละลายได้ดีในน้ำมัน และมักเสริมประสิทธิภาพโดยใช้ร่วมกับ แกลเลต หรือ BHT

- Butylated hydroxytoluene (BHT) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว คุณสมบัติทั่วไปใกล้เคียงกับ BHA และมีประสิทธิภาพดีกว่าเล็กน้อย และให้กลิ่นฟินอล

- Propyl gallate (PG) สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดแกลลิก และแอลกอฮอล์ เป็นสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพดีมาก ช่วยป้องกันการเกิดเปอร์ออกไซด์ได้ดี แต่มีข้อเสียคือ เมื่อใช้ในอาหารที่มีเหล็กปนเปื้อน จะทำให้เกิดสีม่วง มักใช้ร่วมกับกรดซิตริก เพื่อช่วยในการจับ ไอออนของเหล็ก

- Tertiary butylhydroquinone (TBHQ) มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวอมเหลืองแกมเทา ละลายได้ดีในน้ำมัน มีค่าคงตัวต่อความร้อนดีกว่า BHT และนิยมใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภททอด เพราะช่วยป้องกันการเปลี่ยนสีได้ดี

ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 2.1

รูปที่ 2.1 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ (Pratt *et al.*, 1992)

2. สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural anti-oxidant) สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการพัฒนาค้นคว้ากันอย่างมากในปัจจุบัน สารต้านออกซิเดชันเหล่านี้ พบได้ทั้งในจุลินทรีย์ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน อย่างเช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (Non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะ โพลีฟีนอล และอนุพันธ์ (Flavonoid and derivatives) เช่น เอสเทอร์ของกรดแกลลิก (ester of gallic acid) เป็นต้น

2.6 น้ำส้มควันไม้ (Wood vinegar)

น้ำส้มควันไม้ (Wood vinegar หรือ Pyroligneous acid) เป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากการเผาถ่านไม้ กล่าวคือ ในกรรมวิธีการผลิตถ่านไม้จะต้องเผาฟืน ในระหว่างเผาโดยมีอุณหภูมิของเตาเผาเท่ากับ 300 ถึง 400 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะจำกัดอากาศ จะได้ควันสีขาวปนเหลือง กลิ่นฉุนจัด หากต่อหน้าควันนี้แล้วทำให้เกิดการควบแน่น จะได้ของเหลวมีลักษณะสีน้ำตาล มีกลิ่นไหม้ รสเปรี้ยว โดยน้ำส้มควันไม้มี 2 ประเภท คือ น้ำส้มควันไม้ดิบ และ น้ำส้มควันไม้กลั่น น้ำส้มควันไม้

ดิบ จะได้จาก การนำของเหลวที่กลั่น ได้จากการเผาถ่านตั้งทิ้งไว้ 90 วันให้อนุภาคต่างๆที่แขวนลอย อยู่ ตกตะกอนแล้วนำไปกรอง ส่วนน้ำส้มควันไม้กลั่นจะนำน้ำส้มควันไม้ดิบมากลั่นต่อที่ 70 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ประโยชน์

2.6.1 กระบวนการเกิดน้ำส้มควันไม้

กระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการเผาไหม้ในการผลิตน้ำส้มควันไม้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. ช่วงอุณหภูมิไม่เกิน 200 องศาเซลเซียส สารบางชนิดจะถูกไล่ออกมาพร้อม ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เช่น กรดแอซิดิก กรดฟอร์มิก เป็นต้น เนื่องจากการสลายเฮมิเซลลูโลส แต่ยังมีสัดส่วนน้อยมาก

2. ช่วงอุณหภูมิ 200 - 280 องศาเซลเซียส ช่วงนี้เฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสจะ แตกตัวมากขึ้น รวมทั้งลิกนินเริ่มสลายตัว เมื่ออุณหภูมิใกล้เซลลูโลสแตกตัว จะได้ก๊าซต่างๆ เนื้อไม้ เริ่มกลายเป็นถ่านอย่างช้าๆ และเกิดปฏิกิริยาคูดความร้อน จึงต้องการความร้อนเพิ่มจากภายนอก

3. ช่วงอุณหภูมิ 280 - 500 องศาเซลเซียส องค์ประกอบไม้เกิดการสลายตัวอย่าง รวดเร็ว เกิดก๊าซต่างๆ หลายชนิดที่สามารถควบแน่นและเก็บเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ เช่น น้ำส้ม ควันไม้ ทาร์ เป็นต้น ไม้ที่เหลือถูกเปลี่ยนสภาพโดยการจับตัวใหม่ของคาร์บอนกลายเป็นถ่าน

4. ช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 500 องศาเซลเซียส ก่อนที่ไม้จะกลายเป็นถ่านหมด ไม้ ส่วนนอกที่กลายเป็นถ่านแล้ว อาจจะทำปฏิกิริยากับก๊าซที่ออกมาจากภายใน เกิดปฏิกิริยารวมตัวของก๊าซคาร์บอน ได้ก๊าซต่างๆเพิ่มขึ้นอีก ส่วนถ่านจะเกิดการสลายตัวไปบางส่วน ทำให้ผลผลิตถ่านลดลง

สามารถสรุปกระบวนการเกิดน้ำส้มควันไม้ได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 กระบวนการเกิดน้ำส้มควันไม้ (Loo *et al.*,2008)

อุณหภูมิ (°C)	การสลายองค์ประกอบในไม้	ผลผลิต
≤200	ความชื้นในไม้	คาร์บอนไดออกไซด์, กรดฟอร์มิก, กรดอะซิติก และ น้ำ
200 - 280	เฮมิเซลลูโลส	คาร์บอนไดออกไซด์, น้ำ, กรดอะซิติก, คาร์บอนมอนอกไซด์, บางส่วนของทาร์, สารประกอบคาร์บอนิล และ คาร์บอกซิลิก
280 - 500	เซลลูโลส ที่ 200 -320 °C ลิกนิน ที่ 320 - 500 °C	คาร์บอนไดออกไซด์, เมทานอล, กรดฟอร์มิก, กรดอะซิติก, ฟอรัลดีไฮด์, มีเทน, คาร์บอนิล, สารประกอบฟีนอลิก และถ่าน
> 500	ไม้ส่วนที่เหลือ	คาร์บอนไดออกไซด์, น้ำ, ถ่าน และ คาร์บอนมอนอกไซด์

2.6.2 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำส้มควันไม้

น้ำส้มควันไม้แตกต่างจากน้ำส้มสายชู หรือน้ำส้มอื่น ๆ ที่ได้จากการหมัก หรือการสังเคราะห์ กล่าวคือ มีสารประกอบหลากหลายชนิด โดยเกิดจากการสลายตัวของไม้ด้วยความร้อน เช่น กรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งได้จากการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส ส่วนฟีนอล (Phenol) ได้จากการสลายตัวของลิกนิน (Lignin) น้ำส้มควันไม้มีสารประกอบที่สำคัญได้แก่ น้ำประมาณร้อยละ 85 กรดอินทรีย์ ประมาณร้อยละ 3 และสารอินทรีย์อื่น ๆ อีกประมาณร้อยละ 12 มีค่าความเป็นกรด (pH) ประมาณ 2.5- 3 ความถ่วงจำเพาะประมาณ 1.012-1.014 ซึ่งปริมาณสารและคุณสมบัติต่างๆเหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดของไม้ อุณหภูมิที่เผา การดักเก็บน้ำส้มควันไม้ และระยะเวลาในการเก็บรักษา องค์ประกอบทางเคมีโดยรวมในน้ำส้มควันไม้ แสดงดังตารางที่ 2.2 และ 2.3

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีโดยรวมของน้ำส้มควันไม้ (ชมรมสวนป่า ผลิตภัณฑ์และพลังงาน จากไม้, 2546)

ชนิด	สารประกอบ
Organic acid	formic acid, acetic acid, propinoic acid, butyric acid, isobutyric acid, valeric acid, isovaleric acid, crotonic acic, isocaproic acic, tiglic acid, enanthic acid, levulinic acid, etc.
Phenol	phenol, o.m.p-cresol, 2.4-and 3.5-xyleneol, 4-ethyl-and 4-propylphenol, guaiaclo, cresol, 4-ethyl-and 4-propyl-guaiacol, pyrogallol, 5-methylpyrogallol, 5-ethyl pyrogllol-anv 5-propyol pyrogallol-1.3-dunethyl ether, catechol, 4-methyl, 4-ethyl, and 4-propyl catechol, etc.
Carbonyl compound	formaldehyde, acetaldehyde, propuonaldehyde, isobutylaldedyde, butylaldehyde, valeraldedyde, isovaleraldehyde, glyoxal, acrolein, crotonaldehyde, furfural, 5-hydroxymethylfural, acetone, methyl ethyl ketone, methyl propyl detone, methyl isopropyl ketone, methyl buthyl tulyl ketone, diacetyl, methylcyclo pentenone, methylcyclo pentenorone, etc.
Alcohol	methanol, ethanol , propanol, isopropanol, allylacohol, isobutylatcohol, isoamyl alcohol, etc.
Neutral ingredients	levoglucosan, acetol, maltor, roganic acic methyl ester, veratrole, 4-methyl, 4-ethyl, and 4-propyl veratrole, 3.4-benzopyrene, 1.2.5.6-dibenzanthracene, 20-methylcholinserne, -hydroxy-valerolactone, etc.
Basic ingredients	ammonia, methylamine, dimethylamine, pryidine, methlpyridine, dimethylpyridine, trimethylamine, etc.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 สัดส่วนปริมาณองค์ประกอบทางเคมีต่างๆในน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่

สารประกอบ	สัดส่วนปริมาณในน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ (%)
Acetic acid	40.04
Propanoic acid	1.51
Butanoic acid	0.33
3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenylacetic acid	0.54
Total (acidic components)	42.42
Phenol	4.1
2-Methyl-phenol	1.03
2-Methoxy-phenol (guaiacol)	5.02
2-Ethyl-phenol	0.15
2,5-Dimethyl-phenol	0.45
4-Ethyl-phenol	2.06
4-Methyl-2-methoxy-phenol	1.44
1,2-Benzenediol	0.77
3-Methoxy-1,2-benzenediol	1.08
4-Ethyl-2-methoxy-phenol	0.85
2,6-Dimethoxy-phenol (Syringol)	5.99
4-Propyl-2-methoxy-phenol	0.28
Total (phenolic components)	23.22
1-Hydroxy-2-butanone	0.24
Cyclopentanone	0.06
2-Cyclopenten-1-one	0.05
Furural	1.66
1-Hydroxy-3-methyl-2-butanone	0.1
Butyrolactone	0.05
2-Methyl-2-cyclopenten-1-one	0.76
3,4-Dimethyl-2-cyclopenten-1-one	0.03
2,3-Dimethyl-2-cyclopenten-1-one	0.02
5-Methyl-2-furancarboxaldehyde	0.57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3(ต่อ)

1,2,4-Trimethoxybenzene	1.08
5-Methyl-1,2,3-trimethoxybenzene	0.54
Total (neutral components)	5.16

จากตารางที่ 2.3 จะเห็นได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่ของน้ำส้มควันไม้คือกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ รองลงมาคือ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟีนอลิกนี้ มีส่วนสำคัญอย่างมากในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งจะกล่าวในส่วนถัดไป และสุดท้ายคือสารอินทรีย์อื่นๆ

2.7 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารเคมีที่พบได้ทั่วไปในพืชหลายชนิด ปัจจุบันได้รับความสนใจมาก เนื่องจากมีสมบัติการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ อีกทั้งยังมีผลต่อการชะลอความชรา อันมีสาเหตุมาจาก Oxidative stress ภายในร่างกาย นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้กับอาหาร เพื่อป้องกันการเสื่อมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันขององค์ประกอบไขมัน

2.7.1 ลักษณะทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันแบบ Primary anti-oxidant ที่พบในพืช มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของพืช รวมทั้งช่วยปกป้องพืชจากการติดเชื้อหรือถูกทำลายโดยแมลง จุลินทรีย์ หรือพาหะนำโรค (pathogens) และยังมีบทบาทเกี่ยวกับการเกิดสีกลิ่น และรส ในผักและผลไม้อีกด้วย โดยทั่วไป สารประกอบฟีนอลิกจะพบมากบริเวณผิวชั้นนอกของพืช เช่น เปลือก ทำหน้าที่ปกป้องสารต่างๆ ที่อยู่ภายใน ปัจจุบันพบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่ทราบโครงสร้างที่แน่นอนแล้วมีมากกว่า 8,000 ชนิด ตั้งแต่สารประกอบฟีนอลิกที่มีโมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acid) ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เช่น แทนนิน (tannin) เป็นต้น โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ตั้งแต่ 1 หมู่ ขึ้นไปเกาะอยู่ ในธรรมชาติสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระจะพบเพียงเล็กน้อย โดยส่วนใหญ่จะพบอยู่ในรูปที่รวมอยู่กับสารประกอบอื่นๆ ซึ่งละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ และอยู่ในรูปที่จับกับสารพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ โดยมักพบสารประกอบฟีนอลิกรวมอยู่กับโมเลกุลของน้ำตาล เช่น น้ำตาลกลูโคส (Glucose)

กาแลกโตส (Galactose) แรมโนส (Rhamnose) ไซโรส (Xylose) อะราบิโนส (Arabinose) และอนุพันธ์ของน้ำตาล เช่น กรดกลูโคโรนิก (Glucuronic acid) กรดกาแลกตูโรนิก (Galacturonic acid) ในรูปไกลโคไซด์ (Glycosides) นอกจากนี้ สารประกอบฟีนอลิกยังอาจรวมกับสารประกอบอื่นอีกหลายชนิด เช่น โพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) กรดอินทรีย์ (Organic acids) ไขมัน (Fats) และเอมีน (Amines)

2.7.2 ชนิดของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

2.7.2.1. แบ่งตามวงแหวนฟีนอล (Phenol rings) สามารถแบ่งย่อยเป็น

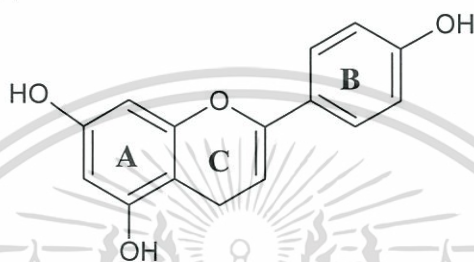
- โมโนไซคลิกฟีนอล (Monocyclic phenol) มีวงแหวนฟีนอลหนึ่งวง ที่พบทั่วไปในพืชได้แก่ ฟีนอล, คาทีคอล, ไฮโดรควิโนน และกรดไฮดรอกซีซินนามิก เป็นต้น
- ไดไซคลิกฟีนอล (Dicyclic phenols) มีวงแหวนฟีนอลสองวง ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ และ ลิกแนน เป็นต้น
- โพลีไซคลิกฟีนอล (Polycyclic phenols) หรือ โพลีฟีนอล (Polyphenol) ได้แก่ ลิกนิน, คาทีคอลเมลานิน และฟลาโวนแลน เป็นต้น

2.7.2.2. แบ่งตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในโครงสร้าง ที่พบในพืชส่วนใหญ่ได้แก่

1. กรดฟีนอลิก ประกอบด้วย กรดไฮดรอกซีซินนามิก (Hydroxycinnamic acid) และกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acid)
 - กรดไฮดรอกซีซินนามิก ที่พบทั่วไปในพืช ได้แก่ กรดคาเฟอิก (caffeic acid), กรดเฟอร์ริก (Ferulic acid), กรดพาราคูมาริก (p-Coumaric acid) และกรดซินแนปิก (Sinapic acid)
 - กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก ส่วนมากพบในรูปอนุพันธ์ และพบปริมาณน้อยในพืช ความหลากหลายของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกขึ้นอยู่กับการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิลและเมทอกซิลบนวงอะโรมาติก โดยมากจะเกิดพันธะไกลโคไซด์หรือพันธะเอสเทอร์กับกรดอินทรีย์ เช่น กรดมาลิก (Maleic acid) และกรดทาร์ทาริก (Taranic acid) หรือเกิดพันธะกับฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ตัวอย่างกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก เช่น กรดแกลลิก (Gallic acid), กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก (p-Hydroxybenzoic acid) และกรดวานิลลิก (Vanillic acid) โดยกรดแกลลิกสามารถพบได้ทั่วไป กรดแกลลิกสองโมเลกุล สามารถรวมตัวกันกลายเป็นกรดเอลลาจิก (ellagic acid) ซึ่งกรดเอลลาจิกนี้ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีคุณสมบัติในการต้านการเกิดมะเร็ง และต้านการเกิดออกซิเดชันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

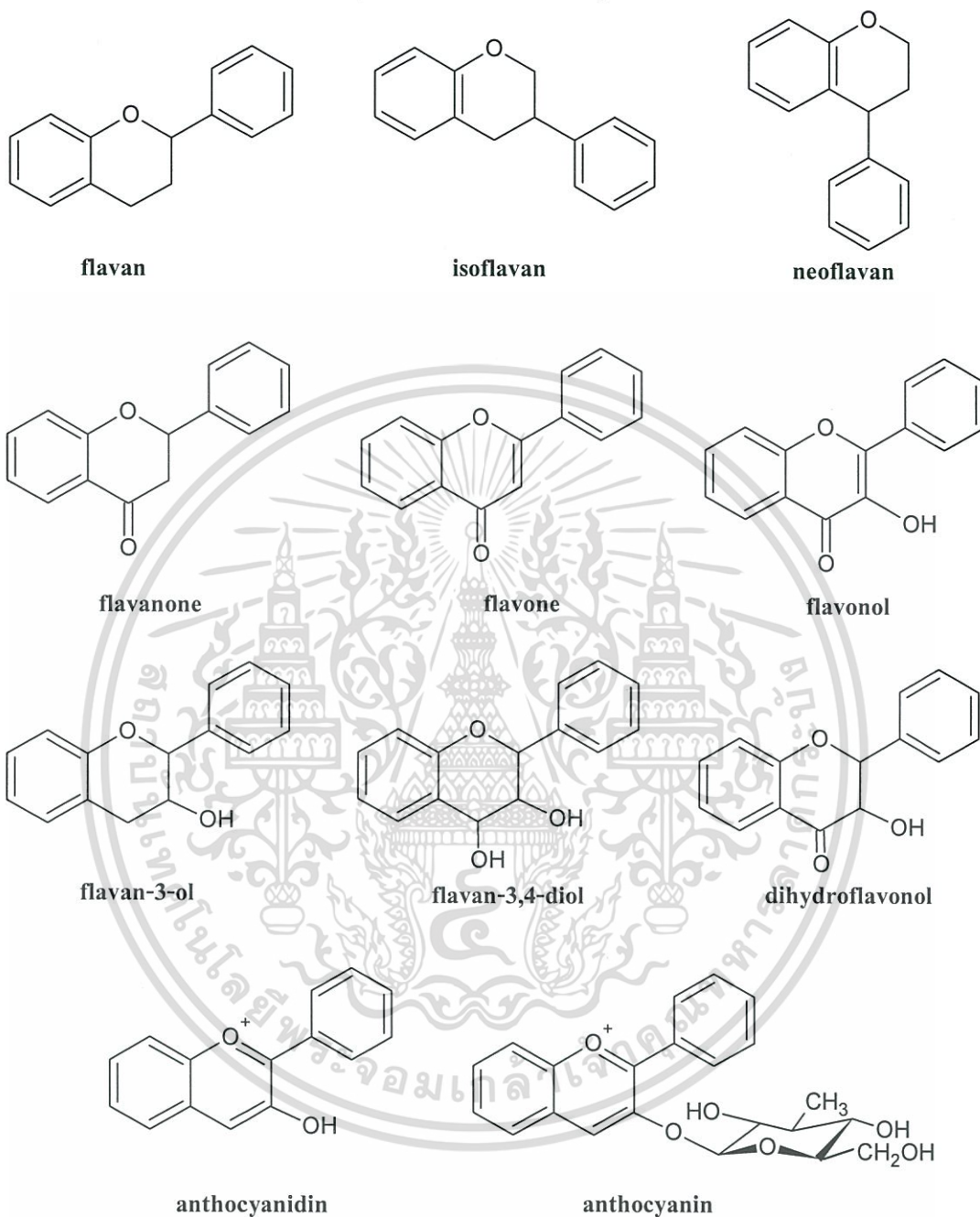
2. ฟลาโวนอยด์ จัดเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่ถูพบมากที่สุดชนิดในบรรดาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบทั่วไปในพืชสีเขียว และพบในทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็นใบ ราก เนื้อไม้ เปลือกต้น ดอก ผล หรือเมล็ด มีสูตรโครงสร้างหลักเป็น ฟลาเวน (flavan) หรือ 2-ฟีนิลเบนโซไพแรน (2-phenylbenzopyran) ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม เรียงกันเป็นระบบ $C_6-C_3-C_6$ โดยมีวงเบนซีนสองวง จับกันด้วยคาร์บอนสามอะตอม ซึ่งอาจจัดเรียงเกิดเป็นวงที่ 3 ทำให้โครงสร้างหลักที่ได้เหมือนโครงสร้างหลักของวิตามินอี ที่เป็นโครงสร้างแบบโครแมน (chroman) หรือเบนโซไพแรน (benzopyran)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างหลักของสารประกอบฟลาโวนอยด์

จากสูตร โครงสร้างหลักจะมีหมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่งต่างๆ โดยเฉพาะที่วง A และ B ส่วนใหญ่จะเป็นหมู่ไฮดรอกซิล เมทอกซิล และน้ำตาลต่างๆ สิ่งเหล่านี้ ทำให้เกิดเป็นฟลาโวนอยด์ในธรรมชาติที่แตกต่างกันเป็นจำนวนมาก ฟลาโวนอยด์มักพบในลักษณะของอนุพันธ์ของไกลโคไซด์

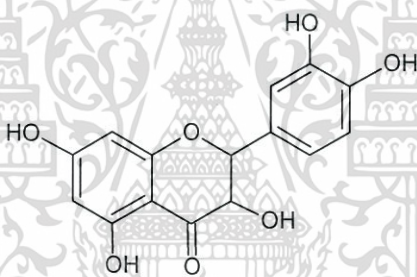
สารฟลาโวนอยด์กลุ่มต่างๆสามารถแสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์กลุ่มต่างๆ

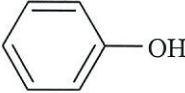

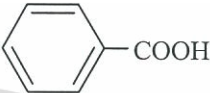
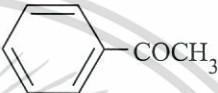
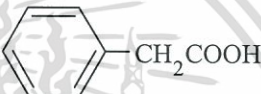
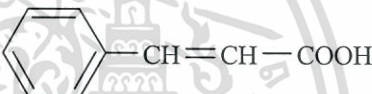
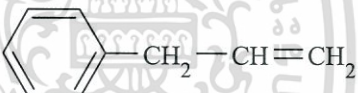
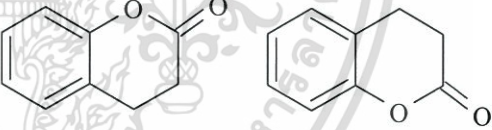
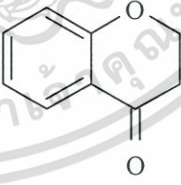
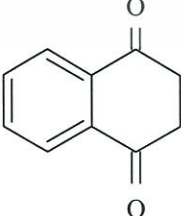
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชสร้างสารประกอบฟีนอลิกขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโต และใช้เป็นกลไกในการป้องกันอันตรายต่างๆ เช่น ฟลาโวนอยด์มีบทบาทในการกรองรังสีอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งเป็นรังสีที่สามารถทำลายเซลล์พืชได้ โดยเฉพาะฟลาโวนและฟลาโวนอลสามารถดูดกลืนแสงในช่วงของแสง UV-B ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่สามารถทำลายกรดนิวคลีอิกและ Metabolic enzymes ของพืช อีกทั้งสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น แคมป์เฟอรอล (Kaempferol) และควอซีทิน-3-กลูโคไซด์ (Quercetin-3-glucoside) สามารถยับยั้งเชื้อรา *Verticillium sp.* ที่เป็นสาเหตุทำให้ใบไม้ร่วงได้ โดยกลไกที่ยับยั้งจุลินทรีย์คือ สารประกอบฟีนอลิกจะเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของจุลินทรีย์และเข้าไปทำปฏิกิริยาเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีนภายนอกเซลล์เป็นสาเหตุให้ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์แตก อีกทั้งสารประกอบฟีนอลิกโดยเฉพาะอย่างยิ่ง แอนโทไซยานินยังมีบทบาทในการดึงดูดสัตว์ นก และแมลง เพื่อช่วยในการผสมพันธุ์ หรือผสมเกสร ขยายพันธุ์พืชแต่ละชนิด อีกทั้งยังมีความสำคัญต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัส (สี กลิ่น และรสชาติ) ของผัก ผลไม้สด ตัวอย่างสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืชแสดงในตารางที่ 2.4



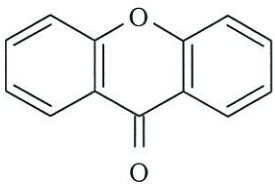
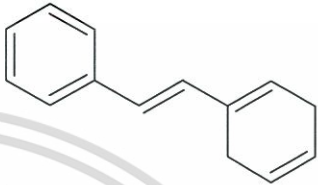
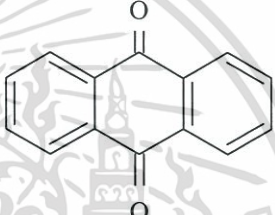
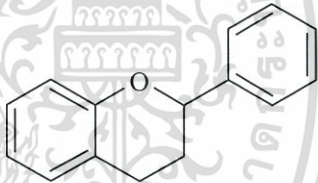
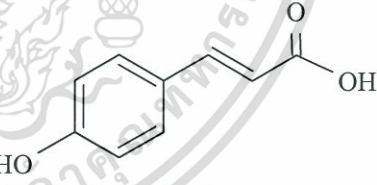
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของควอซีทิน

ตารางที่ 2.4 กลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืช

Class	Basic Skeleton	Basic Structure
Simple phenols	C_6	
Benzoquinones	C_6	
Phenolic acids	C_6-C_1	
Acetophenones	C_6-C_2	
Phenylacetic acids	C_6-C_2	
Hydroxycinnamic acids	C_6-C_3	
Phenylpropenes	C_6-C_3	
Coumarins, isocoumarins	C_6-C_3	
Chromones	C_6-C_3	
Naphthoquinones	C_6-C_4	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

Class	Basic Skeleton	Basic Structure
Xanthenes	$C_6-C_1-C_6$	
Stilbenes	$C_6-C_2-C_6$	
Anthraquinones	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonoids	$C_6-C_3-C_6$	
Lignin	$(C_6-C_3)_n$	

2.7.3 สมบัติการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก

คุณสมบัติที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากของสารประกอบฟีนอลิก คือ การเป็นสารต้านออกซิเดชัน และการเป็นสารต้านการกลายพันธุ์ (Anti-mutagens) สารประกอบฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแทนนิน เป็นต้น ตัวอย่างเช่น สารประกอบฟีนอลิกในผักและผลไม้สามารถป้องกันการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ ได้ เช่น โรคหัวใจ และโรคมะเร็ง เป็นต้น ด้านการอักเสบ ด้านการแพ้ และมีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือด และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถลดความดันโลหิตจากฤทธิ์ขยายหลอดเลือด เป็นต้น ความสามารถต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก มีกลไกการเกิดปฏิกิริยาอยู่ 3 กลไก ดังนี้

1. ความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ (scavenging free radical)

สารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว ดังปฏิกิริยา 2.1 - 2.2



(PPH คือ Polyphenolic compound)

เมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ จะเปลี่ยนเป็นอนุมูลฟีนอล ซึ่งมีสภาพค่อนข้างเสถียร เนื่องจากอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวจะเกิด resonance stabilized delocalization ภายในวงอะโรมาติก ดังนั้นอนุมูลฟีนอลจึงเกิดปฏิกิริยาต่อได้ยาก เป็นการชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้ อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้ ทำให้ลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า ดังปฏิกิริยา 2.8 - 2.9



2. ความสามารถในการจับกับโลหะ (chelating transition-metals)

สารประกอบฟีนอลิกสามารถจับกับโลหะ ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สามารถเกิดสารเชิงซ้อนกับเหล็ก และไอออนของทองแดงได้

3. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งให้เกิดอนุมูลอิสระ

สารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระได้ เช่น ไนตริกออกไซด์ ซินเทส (nitricoxide synthase) ไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinase) และแซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase)

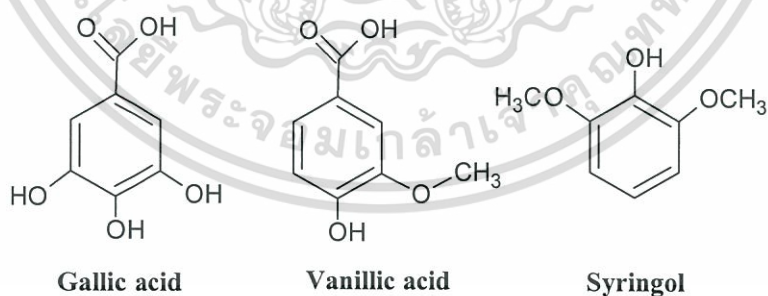
2.7.4 คุณสมบัติของกรดฟีนอลิกบางชนิด

จากที่กล่าวข้างต้น น้ำส้มควันไม้มีสารประกอบฟีนอลิกหลากหลายชนิด แต่ที่พบมาก และเป็นที่น่าสนใจถูกนำไปใช้ในด้านต่างๆ ได้แก่ ไชรินจอล กรดแกลลิก และกรดวานิลลิก ซึ่งสารทั้งสามชนิดนี้มีคุณสมบัติที่หลากหลาย ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะวิเคราะห์หาปริมาณสารทั้งสามชนิดนี้

1. กรดแกลลิก (Gallic acid) เกิดจากการสลายตัวของแทนนินประเภท Hydrolysable tannins กรดแกลลิกรวมกันสองโมเลกุลจะได้สารประกอบที่เรียกว่า Ellagic acid กรดแกลลิกมีคุณสมบัติสมานผิวและกำจัดสารอนุมูลอิสระ ยับยั้งเชื้อราและไวรัส และใช้ในการรักษาภาวะอะบูมินูเลียในคนเป็นโรคเบาหวาน และ สาร Ellagic acid ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอ็นไซม์ 5-α-รีดักเตส ทำให้ผิวขาวขึ้นและปรับสีผิวให้สม่ำเสมอ ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้ จึงได้มีการนำไปเติมในเครื่องสำอาง

2. กรดวานิลลิก (Vanillic acid) เป็นสารประกอบในรูปออกซิไดส์ของวานิลลิน วานิลลินสังเคราะห์ หรือเอทิลวานิลลิน (ethyl vanillin) จะมีราคาแพงกว่า วานิลลินที่ได้จากธรรมชาติ และวานิลลินสังเคราะห์ จะให้กลิ่นหอมรุนแรงกว่าอีกด้วย กรดวานิลลิก หรือวานิลลิน เป็นสารที่มักจะนำไปใช้ผสมกับสีน้ำตาล ของกิน ขนม ของหวาน หรือแม้แต่ยารักษาโรคหลากหลายชนิด โดยเป้าหมายการใช้งานหลักก็คือเพื่อเติมแต่งเพิ่มกลิ่นหอมวนวลให้กับตัวผลิตภัณฑ์

3. ไชรินจอล (Syringol) เป็นองค์ประกอบที่มีมากในควันไม้ ให้กลิ่นควันธรรมชาติ นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์รมควัน และสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ ทำให้ยืดอายุอาหารและเพิ่มคุณภาพของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการลดการอักเสบ ลดไข้ และแก้ปวด



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และ ไชรินจอล

2.8 เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid chromatography, HPLC) (แม้น และคณะ, 2553)

โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารที่ผสมกันอยู่หลายๆ สารให้ออกจากกันเป็นส่วนๆ และสามารถหาปริมาณของสารแต่ละชนิดที่แยกออกมาได้ด้วย หลักการของโครมาโทกราฟีเป็นหลักการที่ใช้วิธีการผ่านสารที่จะวิเคราะห์หรือแยกองค์ประกอบออกจากกันเข้าไประหว่าง 2 เฟสที่ไม่เข้ากัน เฟสหนึ่งเป็นเฟสที่เคลื่อนที่ (mobile phase) จะเคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) จากการเกิดอันตรกิริยาของสารในตัวอย่างกับเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ทำให้เกิดการแยกสารขึ้นหลังจากใช้เวลาพอสมควร

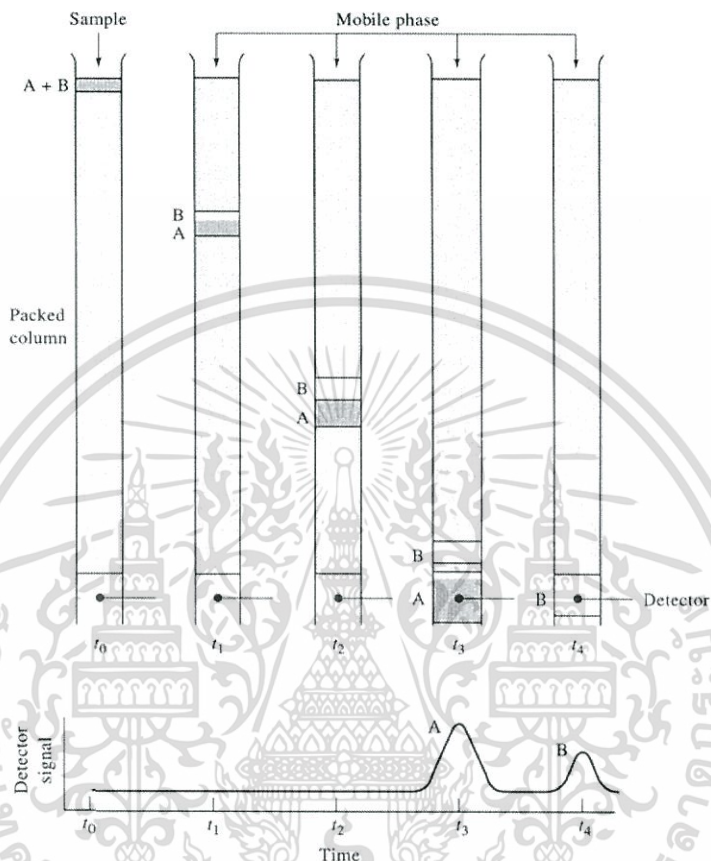
โครมาโทกราฟีของเหลวเป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดที่ผสมกันได้พร้อมกัน ในการวิเคราะห์ต้องสามารถแยกสารผสมออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ สารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่เข้าเครื่องตรวจวัดตามลำดับ สารแต่ละชนิดแยกจากกันได้หากมีความสามารถในการดูดซับระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ที่แตกต่างกัน โดยเฟสอยู่กับที่เป็นของแข็งหรือของเหลวเคลือบอยู่บนของแข็งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ จึงมักเรียกเฟสอยู่กับที่นี้ว่าคอลัมน์ ส่วนเฟสเคลื่อนที่ เป็นของเหลว เรียกว่า สารละลายตัวชะ (eluent) สารผสมเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่โดยการนำพาของเฟสเคลื่อนที่ด้วยเส้นทางที่แตกต่างกัน (differential migration) ซึ่งเป็นผลจากการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดที่อยู่ในตัวอย่าง บนเฟสอยู่กับที่ที่แตกต่างกันทำให้สารแต่ละชนิดแยกจากกันได้

การใช้เครื่อง HPLC สามารถวิเคราะห์สารได้ปริมาณต่ำระดับไมโครกรัมถึงนาโนกรัม สำหรับวิเคราะห์สารแต่ละชนิดต้องเลือกใช้คอลัมน์ สารละลายตัวชะ และเครื่องตรวจวัดที่เหมาะสม ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่องมีปริมาณต่ำระดับไมโครลิตร พร้อมทั้งสามารถประมวลผลข้อมูลโดยคอมพิวเตอร์ ทำให้ได้ข้อมูลครบถ้วน สำหรับหาปริมาณ การควบคุมคุณภาพ การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ และอาจรวมถึงการประเมินความเหมาะสมของวิธีทดสอบ

2.8.1 หลักการแยกสารโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว

เทคนิคนี้จะอาศัยการชะ (elution) ซึ่งเกิดขึ้นภายในคอลัมน์ สารตัวอย่างจะถูกใส่ลงในคอลัมน์ และให้เฟสเคลื่อนที่ชะไป (elute) จนสารที่ต้องการแยกออกจากปลายคอลัมน์เข้าเครื่องตรวจวัด(Detector) สารแต่ละชนิดที่ผสมรวมกันมีสมบัติแตกต่างกัน ทำให้เคลื่อนที่ในเฟสหนึ่ง

ด้วยเส้นทางที่ต่างกัน จึงใช้เวลาในเฟสหนึ่งแตกต่างกัน สารแต่ละชนิดจึงแยกจากกันได้ ดังแสดงในรูป 2.6



รูปที่ 2.6 การเคลื่อนที่ของสาร 2 ชนิดในเฟสหนึ่ง และออกจากเฟสหนึ่งในเวลาต่างกัน

เมื่อตัวอย่างถูกนำเข้าไปไว้ในคอลัมน์ องค์ประกอบต่างๆ ก็จะเกิดการกระจายระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสนิ่ง ถ้าเฟสเคลื่อนที่ซึ่งจัดว่าเป็นสาร eluent ไหลผ่านเข้าไปเรื่อยๆ สารประกอบในตัวอย่างที่ถูกหน่วงเหนี่ยว (retained) อยู่บนเฟสนิ่งได้ดี จะทำให้สารนั้นเคลื่อนที่ช้ากว่าสารอื่น จึงทำให้เกิดการแยกของสารขึ้นหลังจากใช้เวลาในการชะพอสสมควร สารแต่ละชนิดจะออกมาจากปลายคอลัมน์เข้าสู่เครื่องตรวจวัดต่อไป สัญญาณจากเครื่องตรวจวัดเป็นฟังก์ชันกับเวลาในการชะ ซึ่งจะถูกบันทึกออกมาเป็นโครมาโทแกรม (Chromatogram) ถ้าพิจารณาจากช่วง (zone) ของการแยกตามความยาวของคอลัมน์ จะพบว่ามีผลอยู่ 2 อย่าง (จากรูปที่ 2.6) คือ 1) ระยะห่างระหว่างสัญญาณของสารจะเพิ่มขึ้นในขณะที่เดียวกัน 2) สัญญาณก็จะกว้างขึ้น และทำให้การแยกไม่ประสบผลสำเร็จ โมเลกุลของสารชนิดเดียวกันจำนวนมากที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ จะเกิดการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระจายตัว ยิ่งเคลื่อนที่ในคอลัมน์นานมากจะกระจายตัวเป็นแถบสารที่กว้าง (band broadening) สังเกตได้จากสัญญาณของสารที่ออกจากคอลัมน์ก่อนจะมีลักษณะแหลมกว่าฟีกที่ออกมาทีหลัง

2.8.2 ประสิทธิภาพในการแยกของโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง

โครมาโทแกรมที่ดีจะพิจารณาจากสองปัจจัย คือ อัตราการเคลื่อนย้าย (migration rate) และความกว้างของสัญญาณ

1. อัตราการเคลื่อนย้าย (migration rate) ของอนุภาคไปตามคอลัมน์ สามารถบอกได้จากหลายค่า คือ

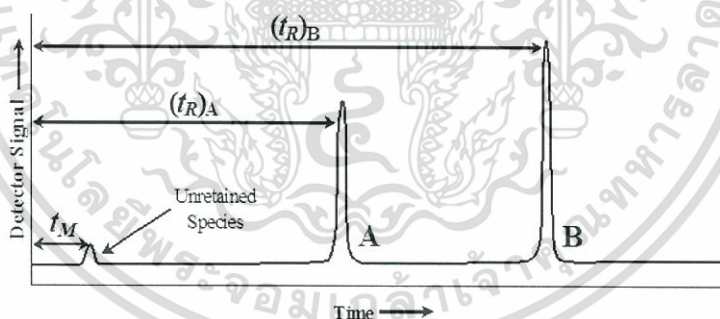
1.1 partition coefficient (K) สามารถหาได้จากสมการที่ 2.10

$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad \dots (2.10)$$

C_S คือ ความเข้มข้นของสารในเฟสนิ่ง

C_M คือ ความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่

ค่า K นี้ไม่สามารถหาได้โดยตรงจากโครมาโทแกรม ค่า K นี้เป็นค่าปริมาณทางเทอร์โมไดนามิกส์ซึ่งขึ้นกับอุณหภูมิ



รูปที่ 2.7 โครมาโทแกรมของสารตัวอย่างที่ประกอบด้วยสาร 2 ชนิด

1.2 retention time(t_R)

retention time(t_R) คือ เวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ นั่นคือจากต้นคอลัมน์จนถึงเครื่องตรวจวัด

t_M (Dead time or hold-up time) คือ เวลาที่เฟสเคลื่อนที่ใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ ซึ่งเป็นเวลาที่หมดตั้งแต่เริ่มต้นฉีดสารเข้าไป จนถึงเครื่องตรวจวัด โดยปกติจะหาจากค่า retention time ของสารที่ไม่จับกับเฟสคงที่ (unretained compound)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความต่างของ total retention time กับเวลาที่หยุดชะงัก (hold up time) เรียกว่า adjusted retention time ดังสมการ 2.11

$$t'_R = t_R - t_M \quad \dots (2.11)$$

1.3 Retention factor, k' เป็นการบอกถึงเวลาที่สาร (solute) ใช้อยู่กับเฟสคงที่ เทียบกับเวลาที่เฟสเคลื่อนที่ ใช้ โดยคำนวณได้จากสมการ 2.12

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad \dots (2.12)$$

1.4 ค่าความเลือกเฉพาะ (selectivity factor) หรืออาจเรียกว่าค่าการแยก (separation factor) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการแยกออกจากกันของสารสองชนิดในโครมาโทกราฟีแสดงด้วยสัญลักษณ์ α ในการคำนวณหาค่า selectivity factor ของสาร A และสาร B ได้โดยใช้ค่า partition coefficients ดังสมการ 2.13

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \quad \dots (2.13)$$

ค่าความเลือกเฉพาะนี้เป็นผลมาจากอันตรกิริยาระหว่างเฟสหนึ่งและเฟสเคลื่อนที่ เมื่อคอลัมน์ผ่านการใช้งานจะทำให้ค่านี้เปลี่ยนแปลงได้ เพราะพื้นผิวของเฟสหนึ่งดูดซับสารตัวอย่างไว้ไม่มีการปล่อยออกมา ความสามารถในการดูดซับลดลง สภาพของคอลัมน์ก็ลดลงด้วย

2. ความกว้างของพีค (peak broadening) ตามความยาวของคอลัมน์ ความกว้างของพีคเป็นปรากฏการณ์โดยตรงกับประสิทธิภาพการแยก หรือประสิทธิภาพของคอลัมน์ ความสัมพันธ์นี้เป็นผลมาจาก Classical Theory ของโครมาโทกราฟี ซึ่งเกี่ยวข้องกับจำนวนเพลตทางทฤษฎี (theoretical plates) และความสูงของเพลต (plate height) จากทฤษฎีนี้ทุกๆ theoretical plate จะทำให้การกระจายของสารเกิดขึ้นระหว่างเฟสหนึ่งและเฟสเคลื่อนที่ อยู่ในสมดุล ถ้าสารมีการเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์จะบ่งชี้ว่าเกิดการเคลื่อนที่ที่ละเอียดละน้อยจาก separation stage หนึ่งไปยัง stage หนึ่ง

จำนวน theoretical plates (N) เป็นผลมาจาก ความสูงของเพลต (H) และความยาวของคอลัมน์ (L) ดังสมการ 2.14

$$N = \frac{L}{H} \quad \dots (2.14)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในทางปฏิบัติจำนวน theoretical plate หาได้โดยตรงจากความกว้างของฐานพีค W ซึ่งหาได้จากสมการที่ 2.10

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad \dots (2.15)$$

ความกว้างของพีคที่แคบขนาน มาจาก Kinetic effect ซึ่งเกิดขึ้น เพราะอัตราการเกิดกระบวนการถ่ายเทมวล (mass transfer process) ระหว่างการเกิด migration ของสารตัวอย่างที่ผ่านไปนาคอลัมน์ ระดับของผลกระทบนี้ขึ้นอยู่กับความยาวของระยะทางระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสนิ่งที่เป็นทางผ่านและเป็นปฏิภาคโดยตรงกับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้มีผู้เสนอการคำนวณค่า H โดยได้พัฒนาสมการขึ้นมาชื่อ สมการเวนดีมเทอร์ (The Van Deemter equation) ดังแสดงในสมการที่ 2.11

$$H = A + \frac{B}{u} + C_s u \quad \dots (2.16)$$

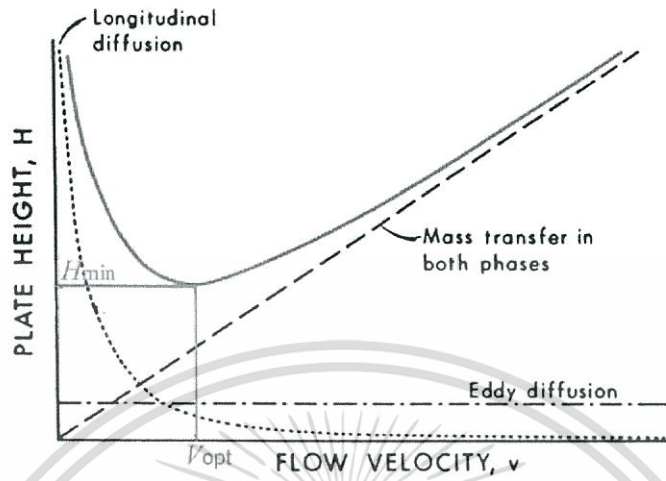
สมการนี้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสูงเพลตกับอัตราการไหลเชิงเส้นของเฟสเคลื่อนที่ เกี่ยวข้องกับค่าคงที่ A ซึ่งเป็นค่าเอ็ดดี ดิฟฟิวชัน (Eddy Diffusion) B เป็นค่าการแพร่ตามแนวความยาวคอลัมน์ (Longitudinal diffusion) และ C เป็นค่าการถ่ายโอนมวล (mass transfer) ระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสนิ่ง

- Eddy Diffusion เกิดจากช่องว่างระหว่างอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ที่มีขนาดไม่เท่ากัน โมเลกุลสารที่เคลื่อนที่ผ่านช่องเล็กจะเคลื่อนที่ที่ได้ช้ากว่าที่ผ่านเข้าไปในช่องกว้าง ดังนั้นหากช่องว่างระหว่างอนุภาคในคอลัมน์แตกต่างกันมากยิ่งทำให้แถบสารกระจายกว้างมาก ผลต่อค่า H จากการแพร่กระจายแบบ Eddy นี้ จะคงที่ ไม่แปรตามอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่

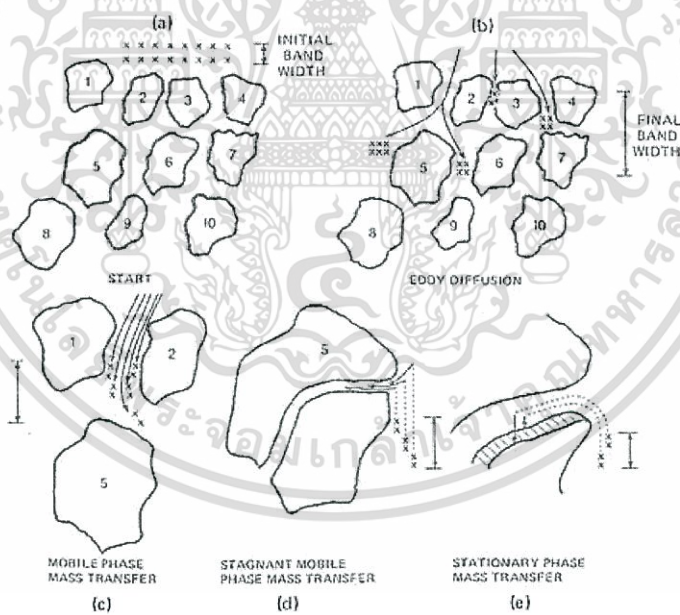
- Longitudinal diffusion เป็นกระบวนการที่สารเคลื่อนที่ไปหรือกระจายตัวจากความเข้มข้นสูง ไปยังที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าในทิศทางตามยาวของคอลัมน์ อัตราเร็วในการเคลื่อนที่จะเป็นสัดส่วนกับความแตกต่างของความเข้มข้นและค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่ของสารนั้นซึ่งเป็นค่าคงที่ของการเคลื่อนย้ายของสารแต่ละชนิดในตัวกลางหนึ่งๆ และมีผลต่อค่า H ซึ่งจะลดลงเมื่ออัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น

- Mass transfer เกิดจากการที่สารผ่านเข้าไปในช่องว่างของอนุภาคภายในคอลัมน์ได้ช้าไม่เท่ากัน จึงออกจากช่องได้ไม่พร้อมกัน ทำให้ใช้ระยะทางไม่เท่ากันจึงเกิดการกระจายตัวของสาร ถ้าอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่มาก จะทำให้เกิดการถ่ายโอนมวลได้ ส่งผลให้สารไม่เกิดการแยก ดังนั้นถ้าอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่มาก ก็จะทำให้ ค่า H เพิ่มขึ้นด้วย

จากกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในคอลัมน์ทั้งหมดที่กล่าวมา สามารถสรุปได้ดังรูป
ที่ 2.8 และ 2.9

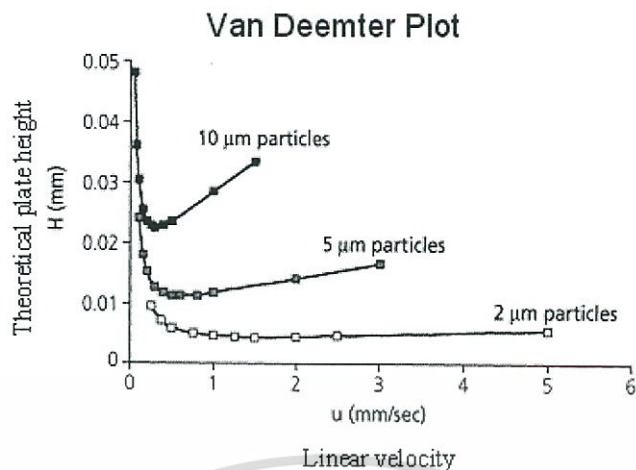


รูปที่ 2.8 Van Deemter Plot แสดงเทอมที่มีบทบาทต่อค่า H



รูปที่ 2.9 การกระจายตัวของสารในคอลัมน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

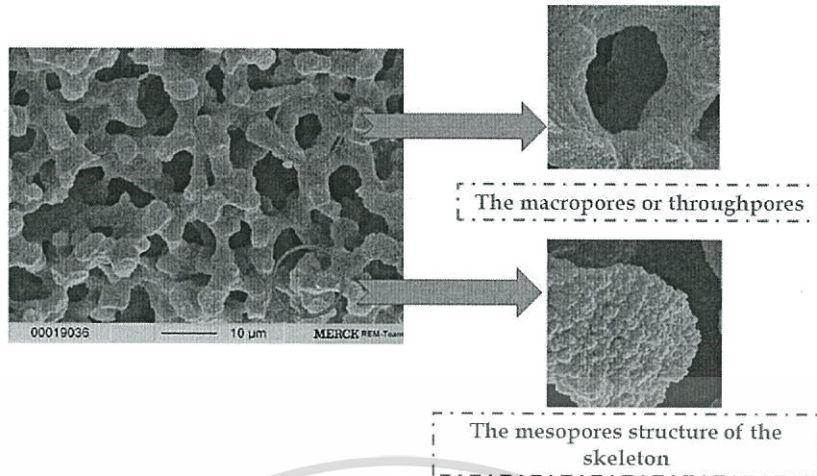


รูปที่ 2.10 อิทธิพลของขนาดของอนุภาคที่มีผลต่อความสูงของเพลต(H)

จากรูปที่ 2.10 จะเห็นว่ายิ่งอนุภาคมีขนาดเล็กความสูงของเพลตก็ยิ่งน้อย นั่นคือประสิทธิภาพการแยกยิ่งดีขึ้น ในหลักการของโครมาโทกราฟี สิ่งที่เราต้องการคือการแยกสารให้ได้ในเวลาสั้นๆ ดังนั้นตามทฤษฎีแล้วถ้าความสูงของเพลตต่ำจะทำให้ได้โครมาโทแกรมที่ดี แต่มีข้อจำกัดที่ว่ายิ่งขนาดอนุภาคเล็กเท่าลงเท่าไรค่าแรงดันต้านกลับก็ยิ่งสูงมากขึ้น ทำให้ต้องใช้ปั๊มที่มีประสิทธิภาพสูงในการพาเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์

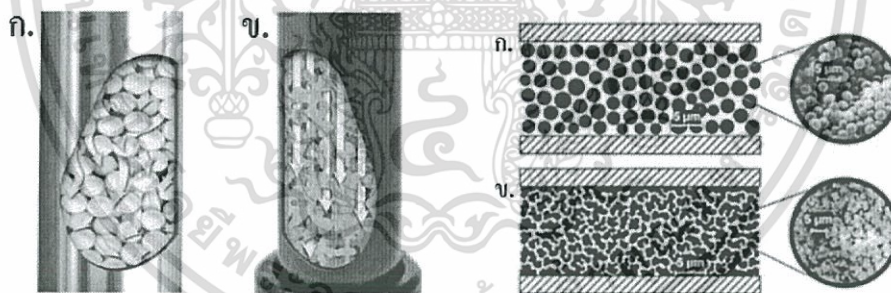
2.9 คอลัมน์ชนิดรูพรุนสูง (Monolithic column) (Guiochon, 2007)

คอลัมน์ชนิดรูพรุนสูง เป็นการสังเคราะห์พอลิเมอร์ให้เกิดขึ้นภายในคอลัมน์ มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ขึ้นเดียวตลอดคอลัมน์ แบ่งได้ 2 ประเภทคือ มอนอลิติกอนินทรีย์ เช่น ซิลิกา และอีกประเภทหนึ่งคือ โมโนลิติกอินทรีย์ เช่น พอลิเมอร์ คอลัมน์มอนอลิติกจะมีช่องว่างภายในคอลัมน์ 2 แบบ คือ ช่องว่างขนาดใหญ่ (Macropore) ซึ่งจะเป็นช่องที่ให้สารไหลผ่านคอลัมน์ และช่องว่างขนาดกลาง (Mesopore) เป็นช่องว่างบนตัวพอลิเมอร์ ดังแสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 ภาพถ่าย SEM ภายในคอลัมน์มโนลิติก แสดงให้เห็นถึงช่องว่างภายในคอลัมน์

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างคอลัมน์แบบโมโนลิติกกับคอลัมน์แบบบรรจุด้วยเม็ดอนุภาค พบว่า คอลัมน์โมโนลิติกมีความเป็นรูพรุนที่สูง สามารถทำให้ของเหลวไหลผ่านได้ง่ายกว่า อีกทั้งยังมีแรงดันต้านกลับที่ต่ำ ใช้ระยะเวลาในการแยกสารน้อย อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการแยกที่ดีกว่า และจากการที่มีความเป็นรูพรุนสูงนี้เอง จึงไม่จำเป็นต้องใช้ปั๊มที่มีแรงดันสูงในการพาสารเข้าสู่คอลัมน์



รูปที่ 2.12 แสดงการเปรียบเทียบวัสดุ และการไหลของสารภายในคอลัมน์ทั้งสองชนิด

ก. คือ คอลัมน์ที่บรรจุด้วยเม็ดอนุภาค, ข. คือ คอลัมน์มโนลิติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรมิเตอร์

2.10.1 สเปกโทรมิเตอร์และ กฎของเบียร์

แสงยูวี-วิสิเบิล จัดอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 200–800 นาโนเมตร โดยที่แสงหรือ Radiation เมื่อส่องผ่านสารที่สามารถดูดกลืนแสงได้ แสงจะถูกดูดกลืน เรียกว่า แอ็บซอร์เบ้นซ์ (A) โดยสัมพันธ์กับค่า ทรานสมิตเทนซ์ (T) ดังนี้

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad \dots (2.17)$$

I_0 = ความเข้มของแสงที่ตกกระทบ

I = ความเข้มของแสงที่เหลือ (Transmittance)

$$A = abc \text{ หรือ } A = \epsilon bc \quad \dots (2.18)$$

โดยที่ a = absorbtivity (หรือ ϵ = molar absorptivity)

b = ระยะทางที่แสงส่องผ่าน หรือความกว้างของ cell

c = ความเข้มข้นของตัวอย่าง

$$A = 2 - \log \%T = -\log T = \log \frac{1}{T}$$

นอกจากนี้

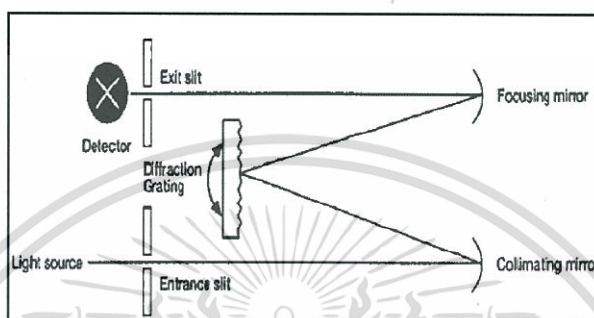
$$T = \frac{I_0}{I} \quad \dots (2.19)$$

2.10.2 องค์ประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เครื่อง ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทร โฟโตมิเตอร์ ทุกชนิดประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก ดังนี้คือ

1. แหล่งกำเนิดแสง แหล่งกำเนิดแสงที่ดีควรให้แสงที่มีความเข้มสม่ำเสมอและแสงนี้ตลอดช่วงความยาวคลื่นที่ใช้งาน นอกจากนี้ควรมีขนาดพอเหมาะ ทนทาน และราคาไม่แพง หากต้องการการตรวจวัดที่ครอบคลุมทุกความยาวคลื่น จะต้องมีหลอดอย่างน้อยสองชนิดคือ หลอดคิวทีเรียม และหลอดทั้งสแตน

2. โมโนโครมาเตอร์ ทำหน้าที่แยกแสงออกเป็นแต่ละความยาวคลื่น และแยกส่วนความยาวคลื่นที่ต้องการไปใช้วัดตัวอย่าง โมโนโครมาเตอร์โดยทั่วไป ประกอบไปด้วย สลิต ที่ใช้จำกัดให้แสงผ่านเข้าไปในกรอบการใช้งานที่ต้องการ จากนั้น กระจกจะนำแสงเข้าระบบไปสู่ส่วนเกรตติง ซึ่งจะแตกแสงออกเป็นความยาวคลื่นต่างๆ โดยที่ กระจกโฟกัส จะเล็งแสงที่แตกแล้วนี้ผ่านออกไปยัง สลิตและไปยังตัวอย่าง



รูปที่ 2.13 แสดงโมโนโครมาเตอร์

3. ช่องใส่ตัวอย่าง ปกติจะออกแบบให้มีฝาครอบ หรือเลื่อนปิดอย่างมิดชิด เพื่อไม่ให้แสงจากภายนอกตกไปยังตัวตรวจวัด ส่วนที่ใช้ใส่ตัวอย่างนี้จะปิดกันอย่างดี เพื่อป้องกันโมโนโครมาเตอร์และตัวตรวจวัด

4. ตัวตรวจวัด ทำหน้าที่ แปลงพลังงานแสงให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า ที่มีใช้กันในเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ มี 2 ชนิดคือ

- ซิลิคอน โฟโตไดโอด ใช้หลักการที่ว่าเมื่อแสงตกกระทบผิวตัวตรวจวัด ที่มีคุณสมบัติเป็น semi-conductive จะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าขึ้น

- หลอดโฟโตมัลติพลีเออร์ ประกอบไปด้วย หลอดโฟโต และ ตัวเพิ่มสัญญาณ ข้อดีของตัวตรวจวัดแบบนี้ คือสามารถปรับความไวในการตรวจวัดโดยการปรับกระแสไฟฟ้าที่ให้และใช้วัดได้ดีในช่วง 200 – 600 นาโนเมตรแต่ถ้าความยาวคลื่นเกิน 900 นาโนเมตร ความไวในการตรวจวัดจะลดลงมาก

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องสามารถสรุปได้เป็น 2 กลุ่มได้แก่

(1) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแยกประกอบในกลุ่มฟีนอลิกมีการประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

1. การใช้สารประกอบ ABTS [2,2-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid)] ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ในการวิเคราะห์ห้จะวัดค่าดูดกลืนแสงที่ลดลง เช่น

Verzelloni และคณะ (2007) ได้ศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของกรดฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในไวน์แดง และน้ำส้มบัลซามิก อาศัยการแยกองค์ประกอบในตัวอย่างด้วยเทคนิค HPLC และตรวจวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ ABTS ซึ่งสามารถแยกองค์ประกอบต่างๆในตัวอย่างได้ง่ายและรวดเร็ว แต่ ABTS ต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อน ถึงจะเกิดเป็นอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งทำให้การวิเคราะห์มีความยุ่งยาก

Mirosław Tarnawski และคณะ (2006) ได้พัฒนาเทคนิค HPLC ตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างถ่านหินร่วน ร่วมกับการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ ABTS วิธีพัฒนานี้มีความง่ายคือใช้เฟสเคลื่อนที่ชนิดเดียวในการชะ และสามารถแยกสารประกอบฟีนอลิกออกจากกันได้ดี

2. การใช้สารประกอบ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ซึ่ง DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้อีก เพื่อเปลี่ยนเป็น โมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ

Kelebek และคณะ (2009) ได้ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มและไวน์ส้ม ทำการแยกองค์ประกอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง

Salta และคณะ (2010) ได้เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสาเล่สายพันธุ์ต่างๆ และประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งตรวจวัดโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง ร่วมกับเครื่องตรวจวัดไดโอดอาร์เรย์ดีเทกเตอร์ (Diode array detector, DAD) การวิเคราะห์โดยใช้สารประกอบ DPPH จะคล้ายกับ $ABTS^{\bullet+}$ แต่อนุมูล DPPH ไม่ไวต่อปฏิกิริยา เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าความเป็นจริง

Loo และคณะ (2008) ศึกษาการใช้ GC-MS และระบุชนิดของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดในน้ำส้มคว้นไม้ และประเมินฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH ซึ่งพบว่าสารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มคว้นไม้ไม่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี

3. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) เป็นการวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe(III) -TPTZ (ferric tripyridyltriazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมของเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระ ได้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe(II)-TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงิน

A.Y. Loo และคณะ (2007) ได้ศึกษาการแยกโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ และ ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระขององค์ประกอบต่างๆในน้ำส้มควันไม้ พบว่าวิธี FRAP ให้ผลการประเมินเหมือนกับวิธี DPPH

(2) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแยกสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก แต่ไม่มีการประเมินฤทธิ์ ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม

2.1 งานวิจัยที่ไม่ได้ใช้คอลัมน์มอโนลิติก

พิสมัย และ สุวรรณ (2011) ได้ศึกษาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มควันไม้ที่ผลิตจากการเผาถ่านไม้ไผ่ ไม้ยูคาลิปตัส และ ไม้สัก โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี - แมสสเปกโตรมิเตอร์ พบว่าน้ำส้มควันไม้ที่ได้จาก ไม้ยูคาลิปตัสมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือ ไม้สัก และ ไม้ไผ่

อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีเป็นการวิเคราะห์ที่ทำลายตัวอย่าง ซึ่งไม่สามารถเอาองค์ประกอบต่างๆที่แยกได้ไปใช้ประโยชน์ต่อได้ จึงได้สนใจงานวิจัยเกี่ยวกับโครมาโทกราฟีของเหลว ซึ่งได้มีคณบดีนักวิจัยจำนวนมากได้พัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลว เพื่อวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก อาทิเช่น

Abad-Garcia และคณะ (2007) ได้สกัดสารประกอบฟีนอลิกจากน้ำผลไม้ โดยใช้ เมทานอล-น้ำ-กรดอะซิติก (30:69:1, %v) จากนั้นทำการแยกโดยใช้ Reversed-phase HPLC ร่วมกับการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดไดโอดอาร์เรย์ทีเทคเตอร์ ได้ %RSD น้อยกว่า 8 % ซัดจำกัดการตรวจวัดอยู่ระหว่าง 0.005 ถึง 0.03 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ได้ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับ 98-100 %

Garcia และคณะ (2004) เสนอการใช้เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง ตามด้วยการใช้ Reversed-phase C-18 HPLC ร่วมกับการตรวจวัดอัลตราไวโอเล็ต ในการแยกสารประกอบฟีนอลิก 10 ชนิด ซึ่งได้ค่า Repeatability ต่ำกว่า 10 % และ r^2 เท่ากับ 0.993

Shui และ Lai (2002) ได้พัฒนาเทคนิค HPLC ร่วมกับการตรวจวัดโฟโตไดโอดอาร์เรย์ ในการตรวจวัด กรดอินทรีย์และสารประกอบฟีนอลิกแบบพร้อมกัน ในน้ำผลไม้และเครื่องดื่ม ซึ่งประสบความสำเร็จโดยใช้เวลาในการแยกสารทั้งหมด 80 นาที มีค่า RSD ของเวลาในการแยกอยู่ระหว่าง 0.3 – 1.6 % และมีค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับอยู่ในช่วง 85 – 106 %

Rodriguez-Delgado และคณะ (2001) พัฒนาเทคนิค HPLC โดยใช้ร่วมกับเครื่องตรวจวัดยูวี-วิซิเบิล และใช้เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวัดคาเทชิน กรควานิลลิก กรดไซรินจิก อีพิกาทะชิน และ ทราน-เรสเวอราทอล ในตัวอย่างไวน์ พบว่าการวิเคราะห์ให้ผลที่ดี มีค่าความไวสูงขึ้น

Gomis และคณะ(2001) ได้เสนอการใช้ Packed-reversed Capillary liquid chromatography สำหรับใช้กับระบบ HPLC ในการตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำแอปเปิ้ล ได้ค่าร้อยละของการวิเคราะห์ที่คืนกลับอยู่ในช่วง 90 – 105% และ RSD น้อยกว่า 7%

Schieber และคณะ (2001) ทำการตรวจวัดกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในแอปเปิ้ล และสาเกโดยใช้ HPLC ร่วมกับ เครื่องตรวจวัดไดโอดอาร์เรย์และ แมสสเปกโตรมิเตอร์ โดยใช้คอลัมน์ Aqua C-18 column พบว่า สามารถแยกสารประกอบมาตรฐาน 26 ชนิด ได้ภายใน 1 ชั่วโมง และมีความสามารถในการแยกที่ดี

2.2 งานวิจัยที่ใช้คอลัมน์มอดอลิติก

ในงานวิจัยของ Maruska และ Kornysova (2006) ได้ศึกษาการใช้คอลัมน์มอดอลิติกในงานด้านต่างๆ ซึ่งมีการใช้งานอย่างกว้างขวาง อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการแยกที่สูง

Castellari และคณะ (2002) วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในไวน์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์โมโนลิติก ชนิด Reversed-phase C-18 ซึ่งพบว่าสามารถแยก และหาปริมาณได้โดยใช้เวลาน้อยกว่า 35 นาที

Du และ คณะ (2001) ได้ใช้เทคนิค HPLC และเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดอาร์เรย์ ร่วมกับ คอลัมน์มอดอลิติกแบบสั้น ในการตรวจวัดอัลคาลอยด์ในตัวอย่างซีรัมของคน พบว่าให้ความเป็นเส้นตรงที่ดีในช่วงความเข้มข้น 0.5-80 $\mu\text{g/mL}$ และเมื่อเปรียบเทียบกับคอลัมน์แบบบรรจุเม็ดอนุภาค พบว่า คอลัมน์แบบมอดอลิติกแยกได้เร็วกว่าแบบบรรจุเม็ดอนุภาค ประมาณ 10 นาที

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) – Sigma, USA
2. สารละลายมาตรฐานกรดวานิลลิก (Vanillic acid) – Fluka, Switzerland
3. สารละลายมาตรฐานไซริงจอล (Syringol) – Sigma, USA
4. สารละลายเมทานอล เกรด HPLC- Carlo Erba, Italy
5. สารละลายอะซิโตน ไตรคลอโรเอทิล เกรด HPLC – RCI Labscan, Thailand
6. กรดแกลเชียลอะซิดิก – Carlo Erba, Italy
7. โซเดียมอะซิเตท ไตรไฮเดรต – Univar, Australia

3.1.2 อุปกรณ์เครื่องตรวจวัด

1. ขวดวัดปริมาตร
2. บีกเกอร์
3. ปิเปต
4. หลอดหยด
5. เครื่องกรองสุญญากาศ
6. เครื่องให้คลื่นความถี่สูง (Sonicator)
7. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) - UV-Visible spectrophotometer (Water 486)
8. Syringe pump (HAMILTON, PSD4), Switzerland
9. 8-port Multi-selection valve (HAMILTON, Serial MVP), Switzerland
10. Revers phase C-18 Monolithic column (Merck, Chromolith® HPLC column)

3.2 การเตรียมสารละลาย

สารละลายทั้งหมดเตรียมจากน้ำกลั่นปราศจากไอออน และสารละลายที่ต้องฉีดเข้าเครื่อง HPLC จะกรองผ่านกระดาษกรองในลอนขนาด 0.45 ไมโครเมตร และไล่ฟองอากาศด้วย Sonicator ทุกครั้ง

3.2.1 สารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท

1. เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมอะซิเตทไตรไฮเดรต มา 13.6 กรัม ปรับปริมาตรน้ำกลั่นจนครบ 1,000.0 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยปิเปตกรดแกลเซียอะซิติกมา 5.8 มิลลิลิตรจนครบ 1,000.0 มิลลิลิตร
3. จากนั้นนำสารละลายโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ มาผสมกับสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ วัดพีเอชให้เท่ากับที่ต้องการ (3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0)

3.2.2 สารละลายเฟสเคลื่อนที่ เมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์

- ปิเปตสารละลายเมทานอลเข้มข้น 99.9% มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.3 สารละลายเฟสเคลื่อนที่ อะซิโตไนไทรล์เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร

- ปิเปตสารละลายอะซิโตไนไทรล์เข้มข้น 99.9% มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3.2.4 สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

- ละลายกรดแกลลิก 0.05 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50.0 มิลลิลิตร

3.2.5 สารละลายมาตรฐานกรดวานิลลิก เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

- ละลายกรดวานิลลิก 0.05 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50.0 มิลลิลิตร

3.2.6 สารละลายมาตรฐานไอซิริโนจอล เข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร

- ละลายไอซิริโนจอล 0.05 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50.0 มิลลิลิตร

3.2.7 สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

- สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก สารละลายมาตรฐานกรดวานิลลิก สารละลายมาตรฐานไอซิริโนจอล ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มาอย่างละ 5.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่จนครบ 25.0 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 10.0, 50.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1000.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งสามมา 0.25, 1.25 และ 2.50 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่จนครบ 25.0 มิลลิลิตร

3.2.8 สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

1. สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่จนครบ 25.0 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้นผสม 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่จนครบ 25.0 มิลลิลิตร

2. สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้นผสม 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่จนครบ 25.0 มิลลิลิตร

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 ศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัด

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (เพียงสารเดียว) ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เติสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ ลงในคิวเวท ทำการสแกนสเปกตรัม
3. นำสเปกตรัมที่ได้ หาความยาวคลื่นสูงสุดเพื่อใช้ติดตามประกอบพีโนลิกที่แยกได้
4. สำหรับสารละลายมาตรฐานวานิลลิก และ ไซรินจอล ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 – 3

3.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

3.3.2.1. ชนิดของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

1. เตรียมสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในน้ำกลั่น เพื่อเป็นเฟสเคลื่อนที่
2. บั่มสารละลายเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ บั่มจนกระทั่งคอลัมน์มีแต่สารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ โดยสังเกตจากสัญญาณ base line
3. กำหนดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้งค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร
4. นีดสารละลายมาตรฐานผสมเข้มข้น 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง HPLC บันทึกโครมาโทแกรม และนีสสารละลายเข้าเครื่องซ้ำจนครบสามครั้ง
5. ทำซ้ำข้อ 1 – 4 โดยปรับเปลี่ยนสารละลายเฟสเคลื่อนที่ใหม่เป็นอะซิโตไนไตรล์เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร

3.3.2.2. อัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

1. เตรียมสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10, 25, 50, 75 โดยปริมาตร ในน้ำกลั่น
2. ทำการทดลองเช่นเดียวกับในหัวข้อที่ 3.3.2.1
3. ทำซ้ำจนครบทุกอัตราส่วน

3.3.2.3. ค่าพีเอชของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

1. เตรียมสารละลายเฟสเคลื่อนที่ เมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร โดยเปิดสารละลายเมทานอลเข้มข้น 99.9% มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดเกลืออะซิติก 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เตรียมสารละลายเฟสเคลื่อนที่ เมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 พีเอช 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0
3. ทำการทดลองเช่นเดียวกับในหัวข้อที่ 3.3.2.1
4. ทำซ้ำจนครบทุกค่าพีเอช
5. ถ้าค่าพีเอชไหนเกิดการแยกของสารประกอบฟีนอลิก ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานผสมเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มจนครบทุกความเข้มข้น

3.3.2.4. ความยาวคอลัมน์

1. หลังจากได้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมแล้ว ชั้นแรกจะศึกษาความยาวคอลัมน์ที่ 25 มิลลิเมตร
2. ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมเข้มข้น 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง HPLC บันทึกโครมาโทแกรม และฉีดสารละลายเข้าเครื่องซ้ำจนครบสามครั้ง
3. ทำซ้ำโดยเปลี่ยนคอลัมน์เป็นความยาว 100 มิลลิเมตร

3.3.2.5. อัตราการไหลของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมเข้มข้น 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. กำหนดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้งค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร
3. ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง HPLC บันทึกโครมาโทแกรม และฉีดสารละลายเข้าเครื่องซ้ำจนครบสามครั้ง
4. ทำซ้ำโดยปรับเปลี่ยนอัตราการไหลเพิ่มขึ้นครั้งละ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการปรับเปลี่ยนอัตราการไหลในช่วง 1.0 – 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที

3.3.2.6. ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีด

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมเข้มข้น 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กำหนดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้งค่าจุดคืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร
3. ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง HPLC บันทึกโครมาโทแกรม และฉีดสารละลายเข้าเครื่องซ้ำจนครบสามครั้ง
4. ทำซ้ำโดยปรับเปลี่ยนปริมาตรสารที่ฉีดเพิ่มขึ้นครั้งละ 5 ไมโครลิตรต่อ นาที ทำการปรับเปลี่ยนปริมาตรสารที่ฉีดในช่วง 10 – 20 ไมโครลิตร

3.3.3 คุณลักษณะเด่นของวิธี

3.3.3.1 ความแม่นยำ

1. ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำส้มควั่น และตัวอย่างน้ำส้มควั่นไม่ที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิก ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไป โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละสามซ้ำ
2. คำนวณหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในตัวอย่างและตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน
3. คำนวณหาค่าร้อยละของการวิเคราะห์ค่าคืนกลับ

3.3.3.1 ความเที่ยง

1. ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมฟีนอลิก ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซ้ำๆเป็นจำนวน 5 ครั้ง
2. คำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของเวลาที่สารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดถูกชะออกมา

2.3.3.1 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)

1. สร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ
2. คำนวณหาค่า LOD จากสมการ

2.3.3.2 ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (Limit of quantitation, LOQ)

1. สร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ
2. คำนวณหาค่า LOQ จากสมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 ศึกษาการแยกสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำส้มควันไม้

1. เตรียมตัวอย่างโดยกรองตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ด้วยไซริงเมมเบรน ขนาด 0.22 ไมโครเมตร
2. ปิเปิดน้ำส้มควันไม้มา 0.25 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่จนครบปริมาตร
3. ใช้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่หาได้ ทำการฉีดตัวอย่างน้ำส้มควันไม้เข้าเครื่อง
4. ทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมดสามครั้ง
5. กำหนดหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มควันไม้

3.3.5 เปรียบเทียบคอลัมน์แบบบรรจุเม็ดอนุภาคกับคอลัมน์แบบมอนอลิติก

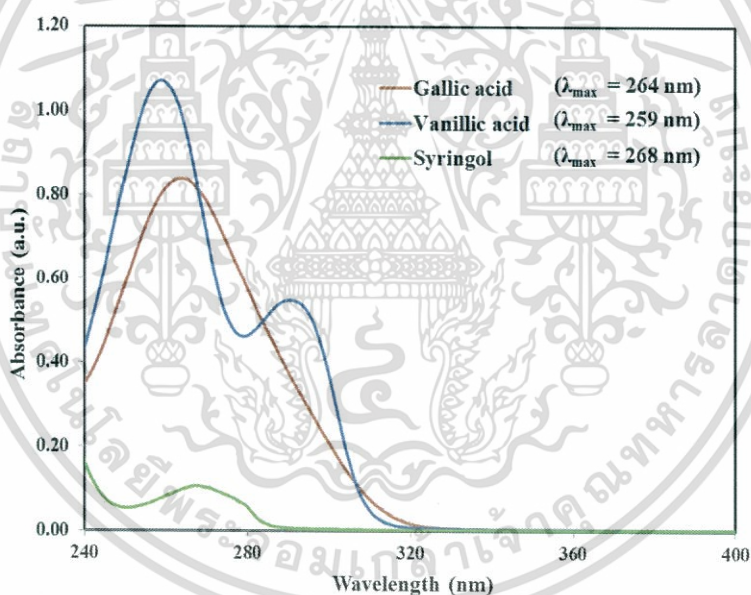
1. เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมเข้มข้น 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. กำหนดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้งค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร
3. ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง HPLC บันทึกโครมาโทแกรม ทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมดสามครั้ง
4. ทำซ้ำโดยเปลี่ยนคอลัมน์จากแบบบรรจุเม็ดอนุภาคเป็นแบบมอนอลิติก

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัด

เนื่องจากกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล มีค่าความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงที่ต่างกันดังแสดงในรูปที่ 4.1 และข้อจำกัดของเครื่องตรวจวัดที่ใช้ คือ เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ไม่สามารถตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงหลายความยาวคลื่นได้พร้อมกัน เนื่องจากไม่ได้ใช้แบบไดโอดอาร์เรย์ จึงจำเป็นต้องศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัดสารทั้งสามชนิดพร้อมกัน



รูปที่ 4.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-4} โมลาร์

จากรูปที่ 4.1 กรดแกลลิกมีค่าความยาวคลื่นสูงสุดเท่ากับ 264 นาโนเมตร กรควานิลลิก มีค่าความยาวคลื่นสูงสุดเท่ากับ 259 นาโนเมตร และไซรินจอล มีค่าความยาวคลื่นสูงสุดเท่ากับ 268 นาโนเมตร ดังนั้นจึงเลือกติดตามที่ 264 นาโนเมตร เพราะเป็นค่าความยาวคลื่นที่ใกล้เคียงกับความยาวคลื่นสูงสุดของสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิด อีกทั้งจากการศึกษาเบื้องต้นโดย พิสมัย และคณะ (2011) โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าในตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ (ซึ่งเป็นชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

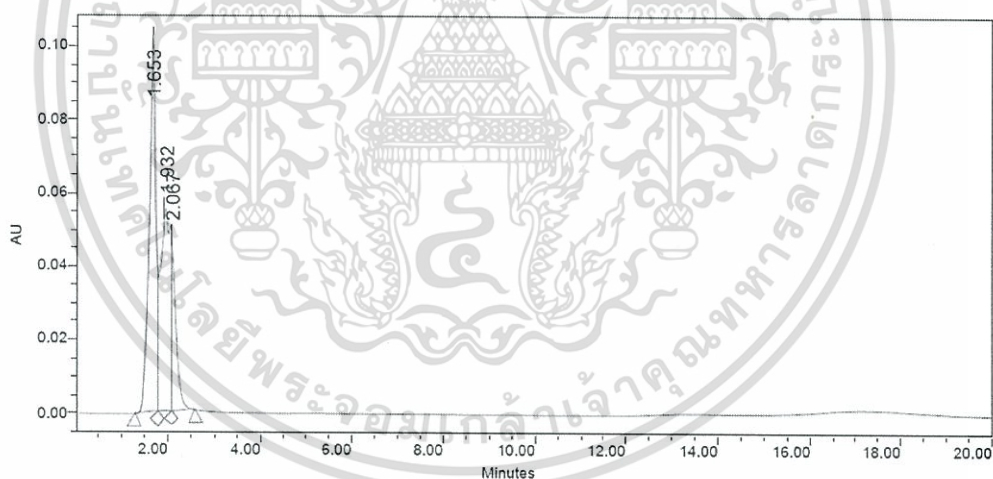
เดียวกันกับที่ศึกษาในงานวิจัยนี้) มีปริมาณกรดแกลลิกน้อยที่สุด การเลือกติดตามที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร จะช่วยให้หาปริมาณกรดแกลลิกได้

4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

ในส่วนนี้จะเป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิด ซึ่งเกณฑ์ในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมจะพิจารณาจากประสิทธิภาพการแยกเป็นหลัก อิทธิพลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการแยก มีดังหัวข้อต่อไปนี้

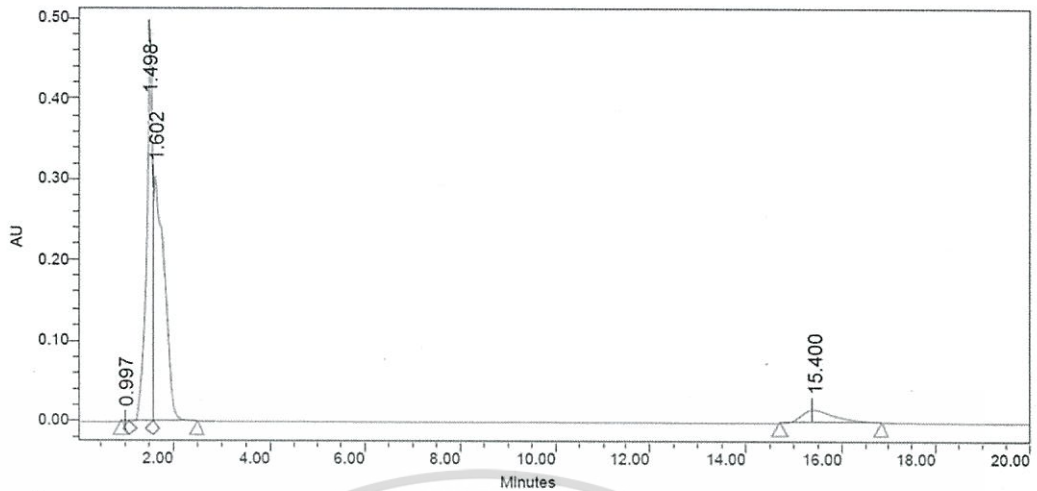
4.2.1 ชนิดของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

แยกสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิก โดยเฟสเคลื่อนที่ที่เลือกศึกษามีสองชนิด คือ สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร และสารละลายอะซิโตไนไตรล์เข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร แสดงผลดังรูปที่ 4.2 และ 4.3



รูปที่ 4.2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม กรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

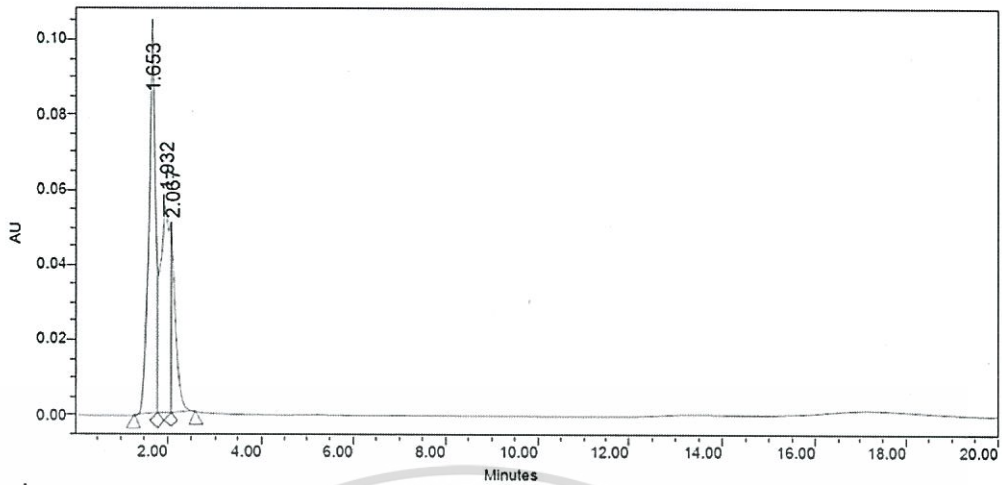


รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม กรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซิโตไนโตรล้เข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร

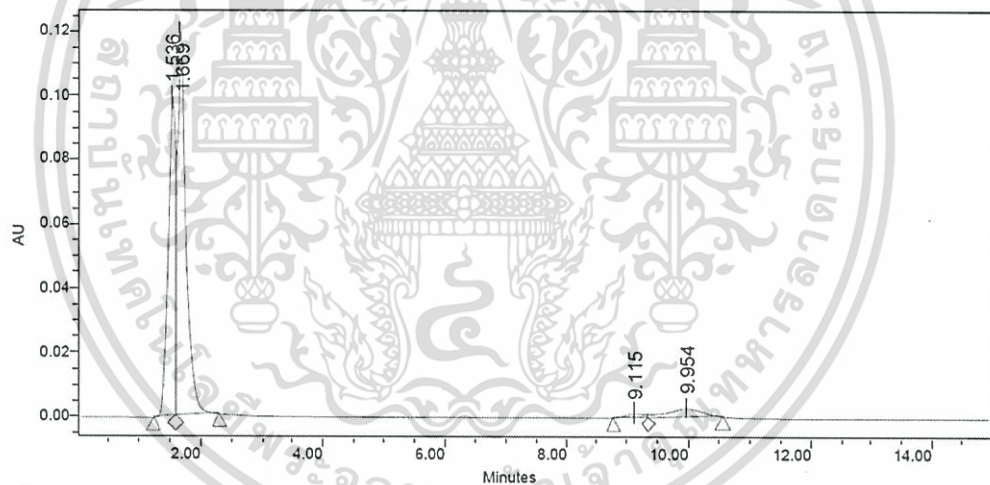
จากรูปที่ 4.2 และ 4.3 แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร และสารละลายอะซิโตไนโตรล้เข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ยังไม่สามารถแยกสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามในสารละลายมาตรฐานผสมออกจากกันได้ แต่อย่างไรก็ได้จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า งานวิจัยส่วนใหญ่เลือกใช้สารละลายเมทานอลในการศึกษา อีกทั้งสารละลายเมทานอลมีราคาถูกกว่า ดังนั้นในงานนี้จึงเลือกศึกษาเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลต่อไป เพื่อทำการศึกษาอัตราส่วนของสารละลายเมทานอล เพื่อให้สารประกอบฟีนอลิกทั้งสามแยกออกจากกัน

4.2.2 อัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

แยกสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิก โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10, 25, 50 และ 75 โดยปริมาตร และสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร ใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร แสดงผลดังรูปที่ 4.4 - 4.8

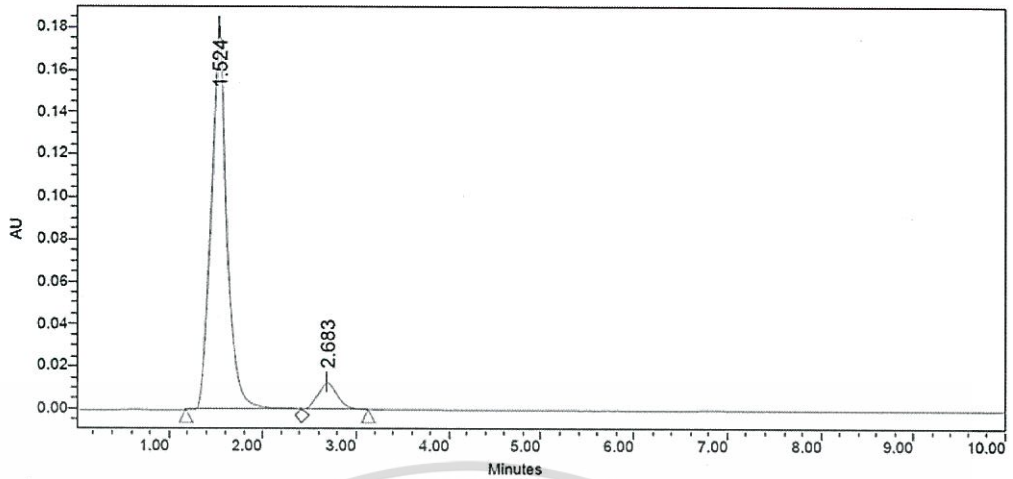


รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกดลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร

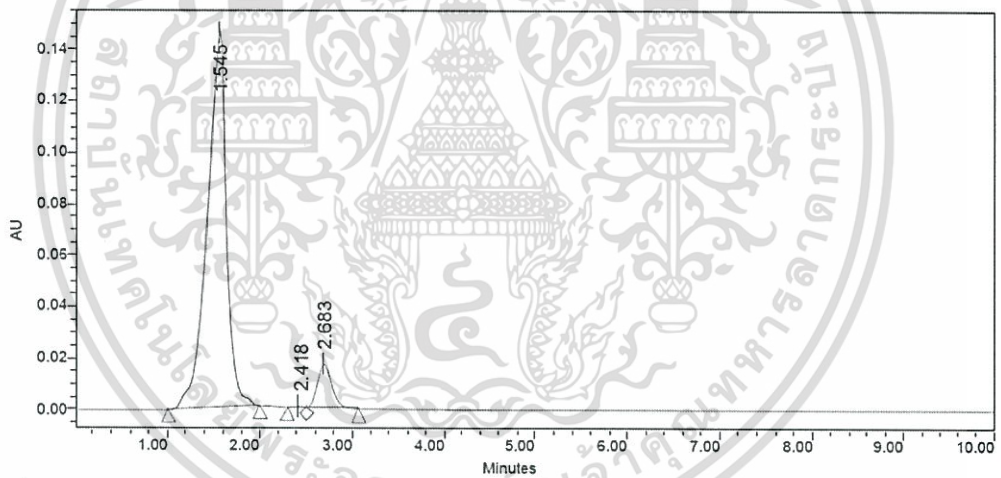


รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกดลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 25 โดยปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

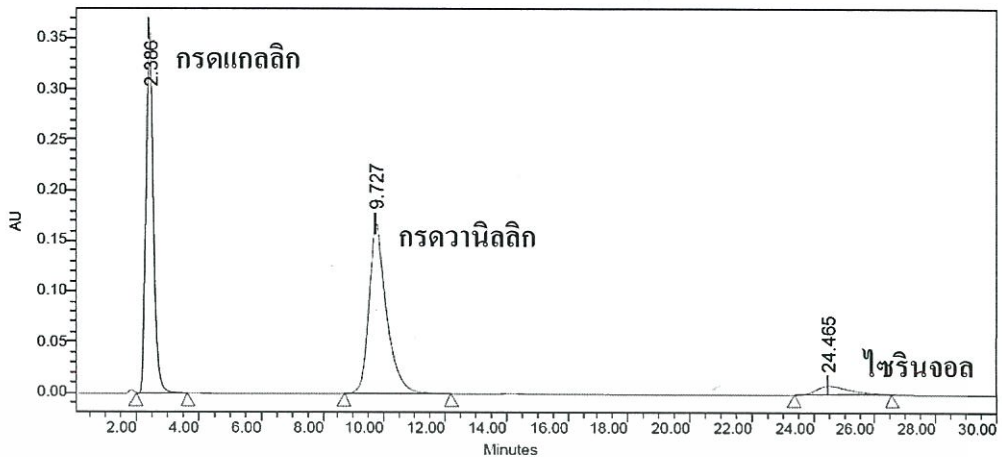


รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกดลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 50 โดยปริมาตร



รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกดลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 75 โดยปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

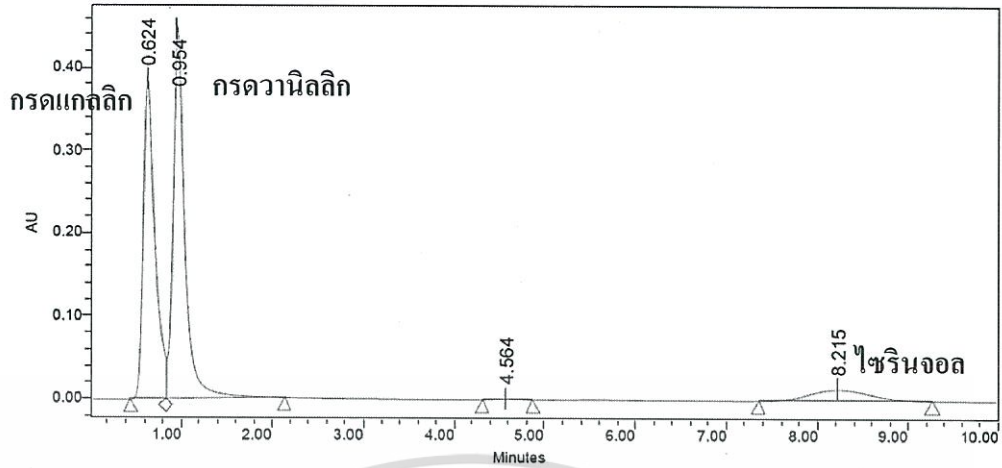


รูปที่ 4.8 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกดลิก กรดวานิลลิก และ ไชรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร

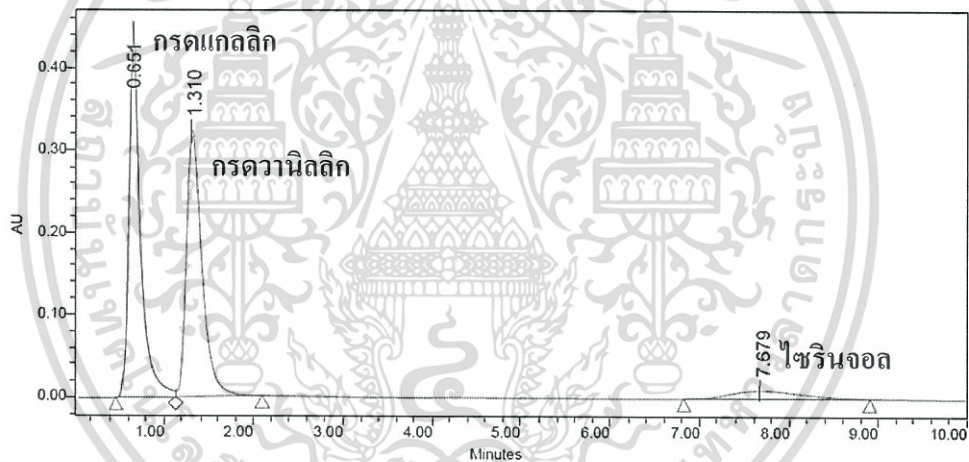
จากรูปที่ 4.4 – 4.7 พบว่า ไม่ว่าสารละลายเฟสเคลื่อนที่ มีความเข้มข้นของสารละลายเมทานอลเท่าใดก็ตาม ก็ยังไม่สามารถแยกสารประกอบฟีนอลิกออกจากกันได้ จึงเลือกใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เพื่อศึกษาอิทธิพลขององค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ โดยเปลี่ยนมาใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร พบว่าสามารถแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระได้ดี ดังรูปที่ 4.8 จากการผสมกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร ลงไป ทำให้ได้ค่าพีเอชของสารละลายเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2.6 ซึ่งมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับเมื่อใช้สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 เพียงอย่างเดียว (พีเอชเท่ากับ 6.4) จึงสรุปได้ว่า ค่าพีเอชน่าจะมีอิทธิพลต่อการแยกอยู่พอสมควร จึงได้ทำการศึกษาอิทธิพลของพีเอชโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์อะซิติกต่อไป

4.2.3 ค่าพีเอชของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

ในส่วนนี้เป็นการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิด โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เตรียมในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิติกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอช โดยทำการลดค่าพีเอชลงเป็นลำดับ ดังนี้ 5.0, 4.5, 3.0, 3.5 และ 3.0 ใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร ต่อนาที ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.9 – 4.13

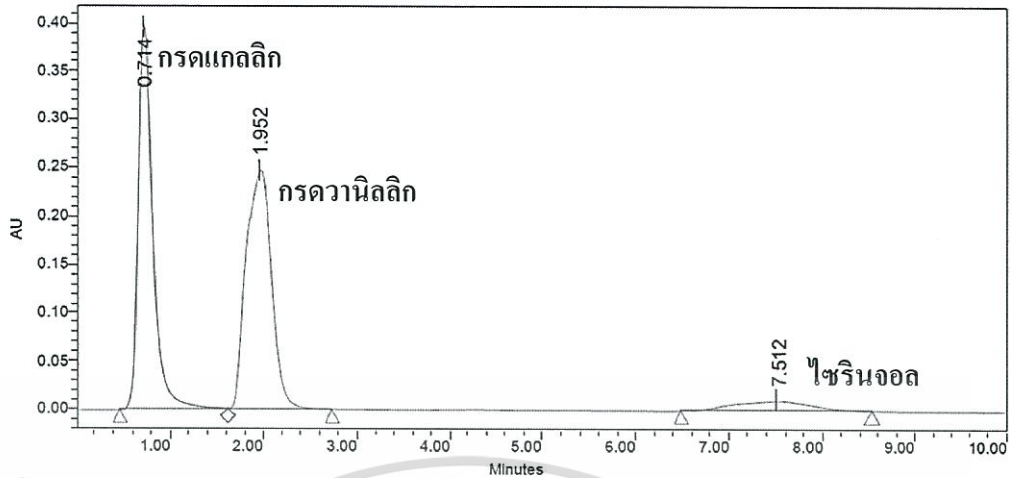


รูปที่ 4.9 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไชรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 5.0

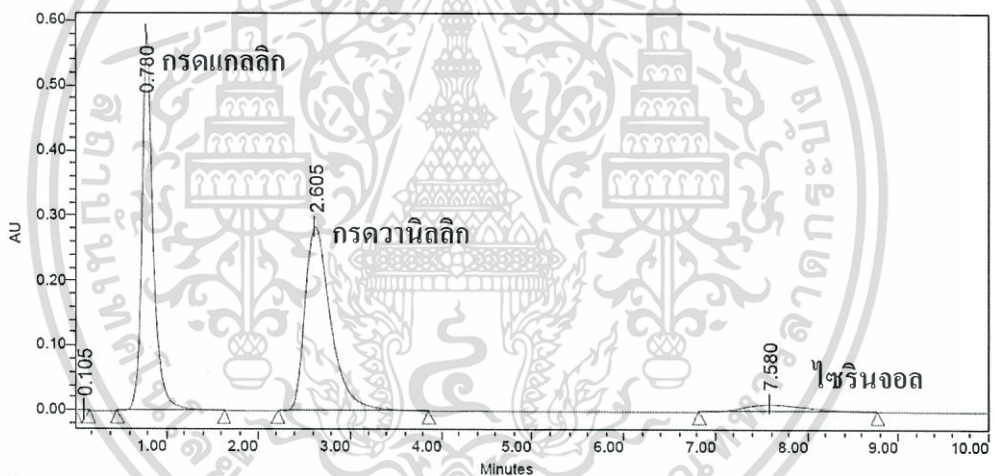


รูปที่ 4.10 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไชรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

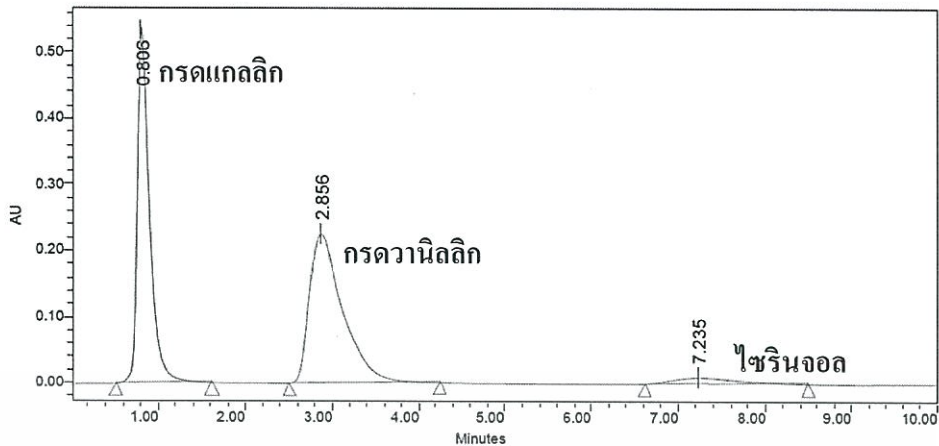


รูปที่ 4.11 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไชรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.0



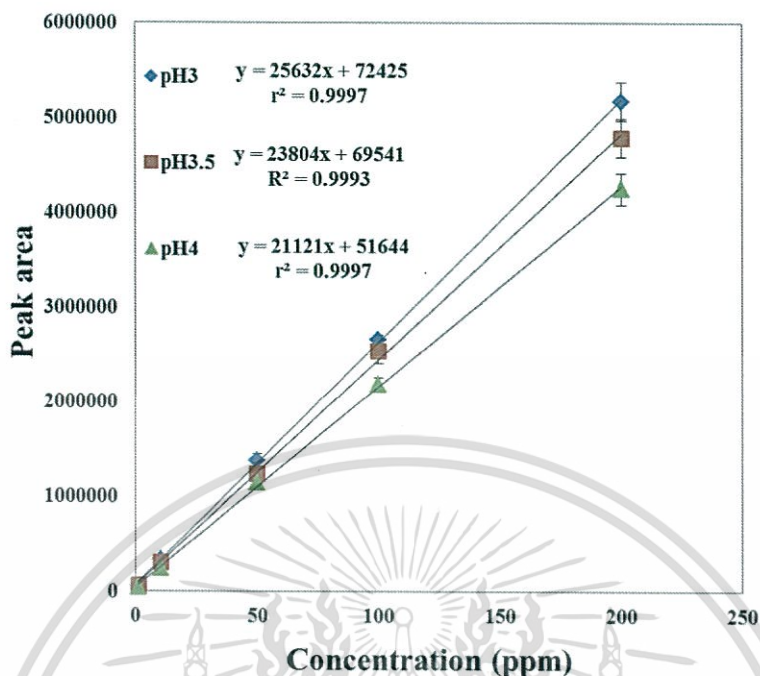
รูปที่ 4.12 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไชรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

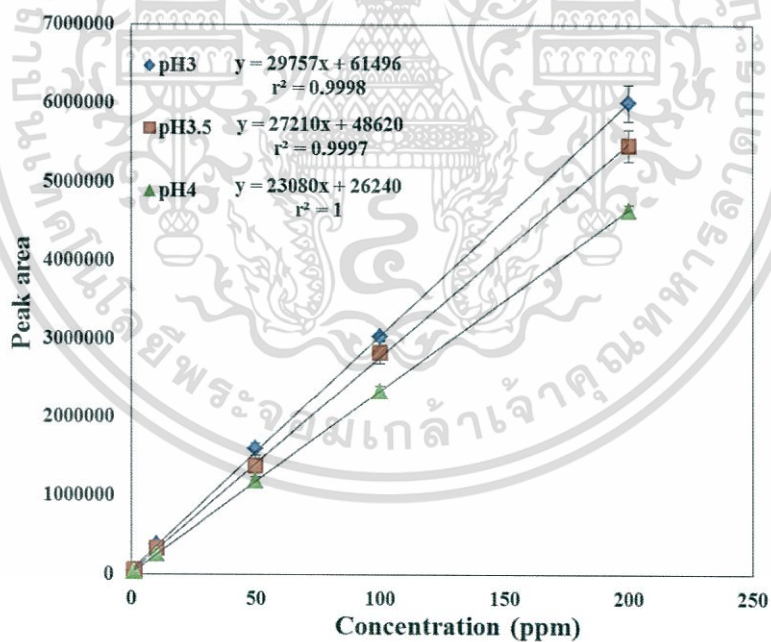


รูปที่ 4.13 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไชรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0

จากรูปที่ 4.9 – 4.13 แสดงให้เห็นว่า เมื่อค่าพีเอชต่ำลง สารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิดจะสามารถแยกออกจากกันได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Tarnawski (2006) เพราะ เมื่อเฟสเคลื่อนที่มีค่าพีเอชสูงกว่าค่าคงที่การแตกตัว (pK_a) ของกรดแกลลิก ($pK_a = 4.5$) และ กรดวานิลลิก ($pK_a = 4.5$) จะเกิดการแตกตัวทำให้มีสภาพขั้วที่มากขึ้น จึงถูกชะออกมาเร็ว ส่วน ไชรินจอลมีค่าการแตกตัวที่สูง ($pK_a = 9.98$) อีกทั้งจากโครงสร้างโมเลกุลของมันค่อนข้างมีขั้วต่ำ จึงถูกชะออกมาทีหลัง เมื่อลดค่าพีเอชลง กรดแกลลิกและกรดวานิลลิกจะแตกตัวได้มากขึ้น เมื่อพิจารณาร่วมกับโครงสร้างโมเลกุล กรดวานิลลิกจะมีสภาพความเป็นขั้วน้อยกว่ากรดแกลลิก ยิ่งเมื่อลดค่าพีเอช กรดวานิลลิกจะแตกตัวได้มากขึ้น ความเป็นขั้วจะยิ่งน้อยลง จึงใช้เวลาในการชะนานขึ้น อีกทั้งสารประกอบในกลุ่มกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดแกลลิก และกรดวานิลลิก) ลำดับการชะจะขึ้นกับหมู่ไฮดรอกซี และเมทอกซี ดังนั้นกรดแกลลิก ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซีมากกว่าจึงถูกชะออกมาก่อน (Swatsitang และคณะ, 2000) เมื่อพิจารณาเฉพาะพีเอช 3.0 – 4.0 พบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิดสามารถแยกออกจากกันได้ดี และใช้เวลาในการแยกใกล้เคียงกัน จึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติม โดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และ ไชรินจอล ที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีกและความเข้มข้น และหาสมการเส้นตรง พบว่า ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.14 - 4.16 (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก.1 – ก.15)

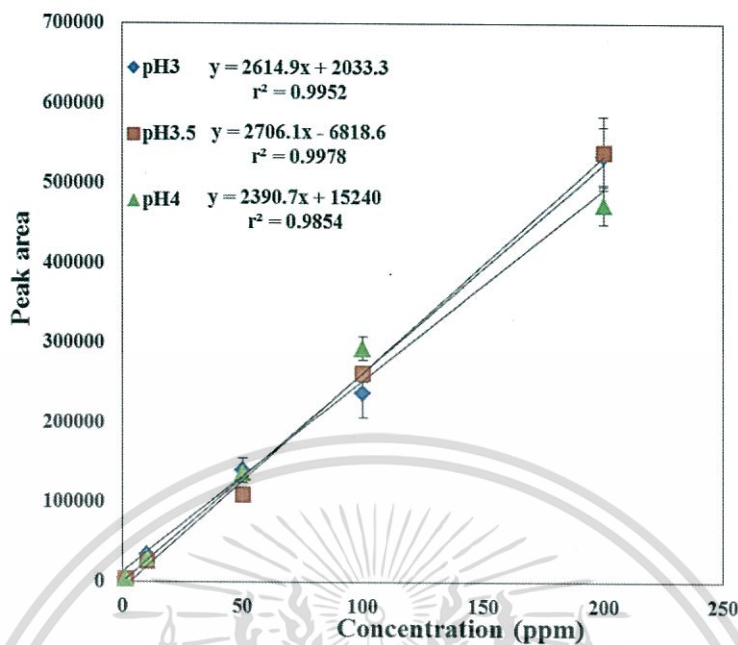


รูปที่ 4.14 กราฟมาตรฐานของกรดเกลือความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มก./ลิตร



รูปที่ 4.15 กราฟมาตรฐานของกรดวานิลลิกความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มก./ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 กราฟมาตรฐานของไซรินจอลที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มก./ลิตร

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพในการแยก (Resolution, R) ของสารประกอบฟีนอลิกในสารละลายมาตรฐานผสมที่พีเอชต่างๆ

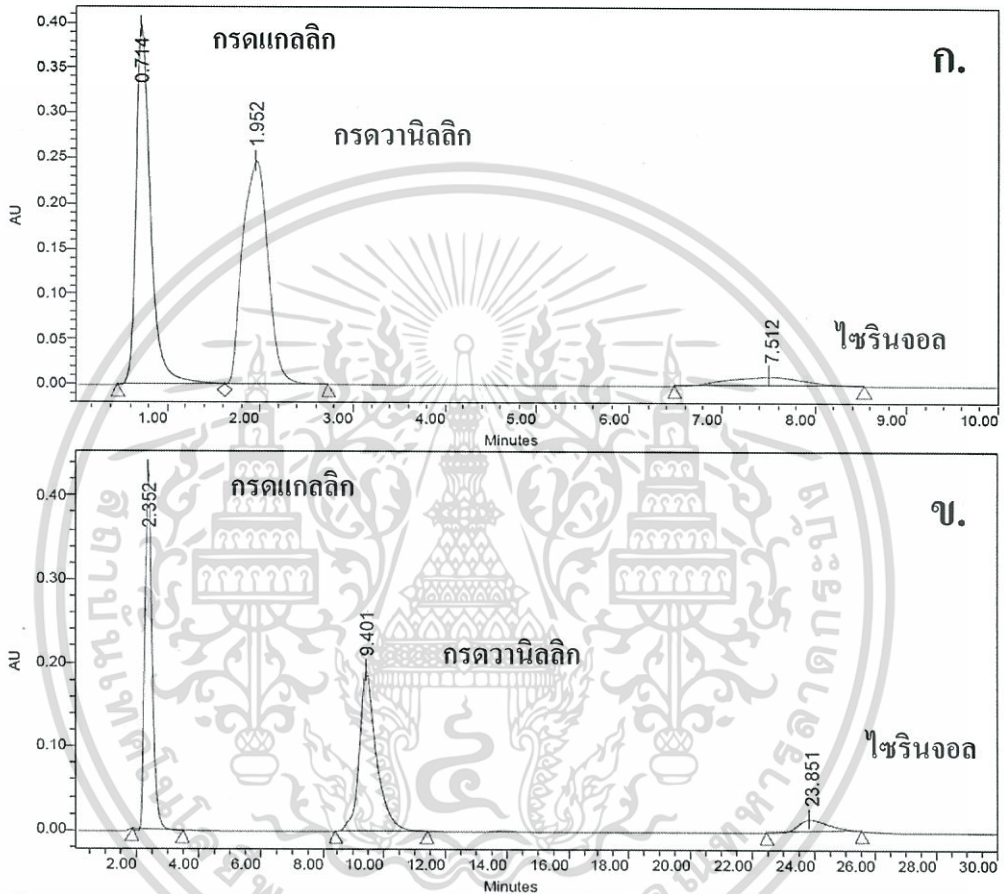
ค่าพีเอช	R _{Galic - Vanillic}	R _{Vanillic - Syringol}
pH 3.0	1.4	3.5
pH 3.5	1.3	2.7
pH 4.0	1.0	3.3

จากรูปที่ 4.14 – 4.16 แสดงกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ค่าพีเอชต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์ (ดูจากความชันของสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน) และค่าความเป็นเส้นตรง (ดูจากสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์, r^2) พบว่า ที่พีเอชเท่ากับ 3.0 มีความไวในการวิเคราะห์ และค่าความเป็นเส้นตรงดีที่สุด อีกทั้งเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการแยก (Resolution) ของสารประกอบทั้งสามชนิด พบว่า ที่พีเอชเท่ากับ 3.0 มีประสิทธิภาพในการแยกดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ดังนั้น จึงเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 3.0 ในการศึกษาต่อไป

ทั้งนี้ ไม่ได้ศึกษาที่พีเอชต่ำกว่า 3 เนื่องจากขีดจำกัดของคอลัมน์ ซึ่งมีขีดจำกัดความสามารถที่ทนต่อค่าพีเอชในช่วง 2 – 7 เพื่อเป็นการรักษาประสิทธิภาพของคอลัมน์จึงไม่ได้ศึกษาที่พีเอชต่ำ 3

4.2.4 ความยาวคอลัมน์

เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการแยกของสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิด โดยใช้คอลัมน์ที่มีขนาดความยาวต่างกัน คือ 25.0 และ 100.0 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก (4.6 มิลลิเมตร) เท่ากัน และมีขนาด Macropore (2.0 ไมโครเมตร) และ Mesopore (13.0 นาโนเมตร) เท่ากัน ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.17



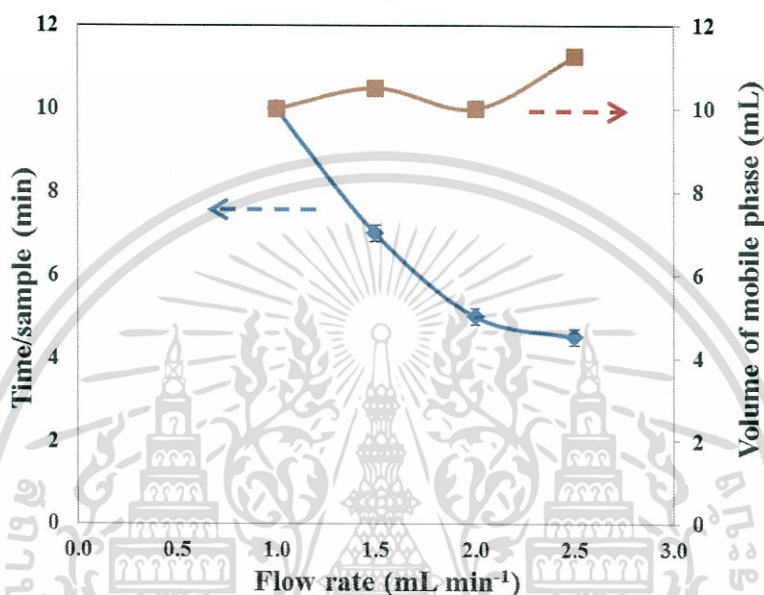
รูปที่ 4.17 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0

รูป ก. ความยาวคอลัมน์ 25 มิลลิเมตร และ ข. ความยาวคอลัมน์ 100 มิลลิเมตร

จากรูปที่ 4.17 แสดงให้เห็นว่า ทั้งสองความยาว ให้ผลการแยกที่ดี แต่เมื่อคอลัมน์ยาวขึ้น เวลาที่ใช้ในการแยกก็เพิ่มขึ้นด้วย อีกทั้งยังทำให้แรงดันเพิ่มสูงขึ้น โดยเปลี่ยนจากประมาณ 450 - 500 psi เป็น 750 - 800 psi ดังนั้นในงานนี้จึงเลือกใช้คอลัมน์ยาว 25 มิลลิเมตร

4.2.5 อัตราการไหลของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

ส่วนนี้เป็นการหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดการแยกของสารประกอบพีนอลิกที่ดี โดยเกณฑ์ในการเลือก จะพิจารณาจากเวลาในการแยก จนเสร็จสิ้น และ ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.18



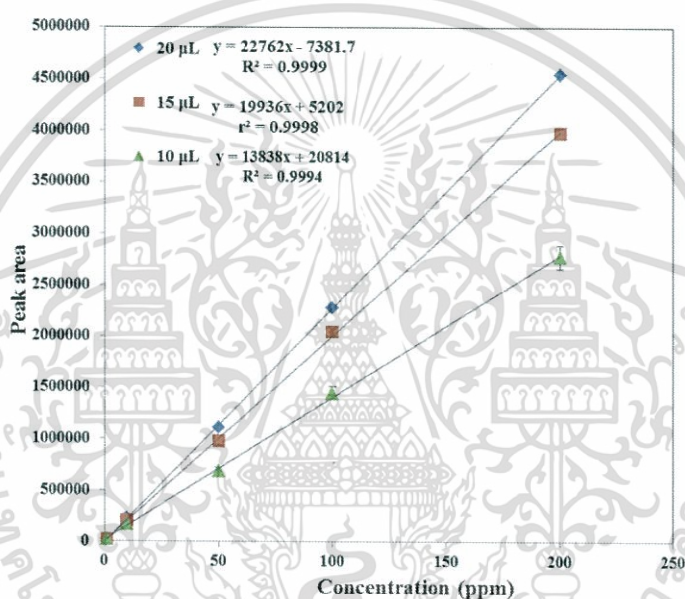
รูปที่ 4.18 กราฟแสดงผลของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่มีผลต่อเวลาในการแยกและปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ต่อหนึ่งตัวอย่าง

จากรูปที่ 4.18 จะเห็นว่า เมื่อใช้อัตราการไหลที่สูงขึ้นจาก 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จนถึง 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อเพิ่มอัตราการไหลจาก 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที เป็น 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที จะใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน จากนั้นจึงพิจารณาปริมาตรเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ พบว่าที่อัตราการไหล 1.0 - 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที จะใช้ปริมาตรเฟสเคลื่อนที่ใกล้เคียงกัน คือเท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อหนึ่งตัวอย่าง แต่ที่อัตราการไหล 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที จะใช้ปริมาตรเฟสเคลื่อนที่มากกว่า ดังนั้น เมื่อพิจารณาทั้งเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์และ ปริมาตรเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ในงานนี้จึงเลือกใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์ เสร็จสิ้นภายใน 5 นาที ต่อหนึ่งตัวอย่าง

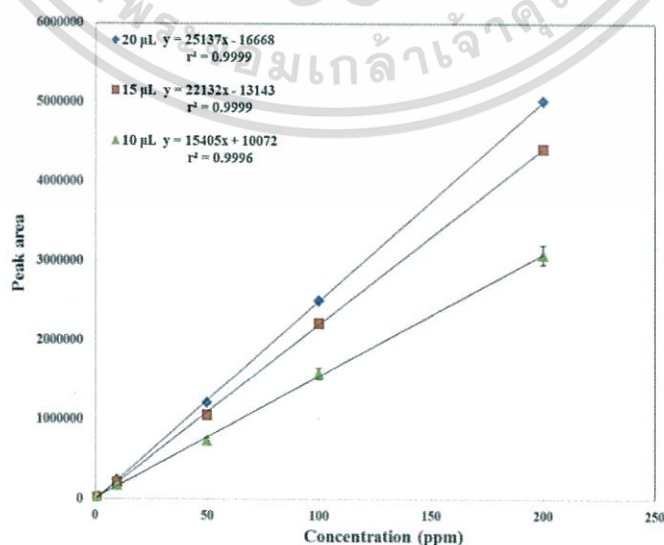
อนึ่ง ทุกๆอัตราการไหลที่ศึกษา สารประกอบพีนอลิกทั้งสามชนิดยังคงแยกออกจากกันได้ ดี (ดูรายละเอียดในภาคผนวกรูปที่ ก.16 – ก.19)

4.2.6 ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีด

เป็นการศึกษาปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดที่เหมาะสม ปริมาตรที่ศึกษาคือ 10, 15 และ 20 ไมโครลิตร โดยการทดลองได้วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0 และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2.0 มิลลิิตรต่อนาที จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้น แสดงผลดังรูปที่ 4.19 – 4.21

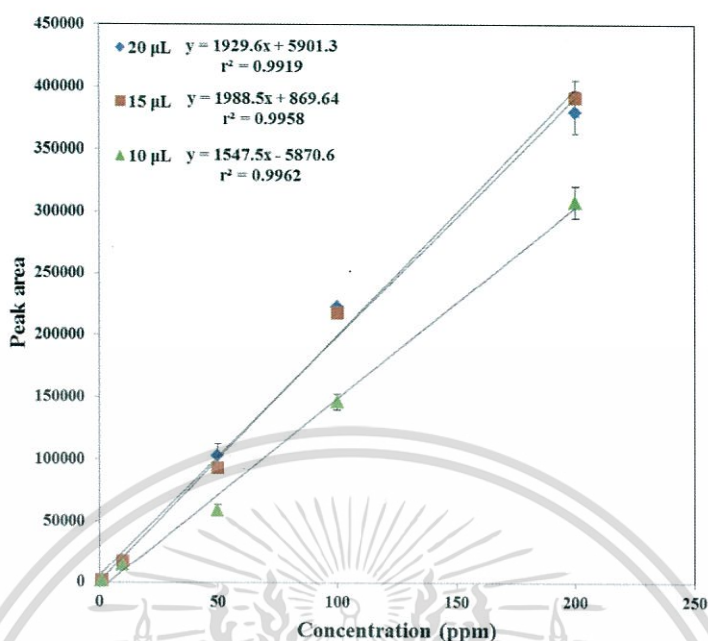


รูปที่ 4.19 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มก./ลิตร



รูปที่ 4.20 กราฟมาตรฐานของกรดวานิลลิกความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มก./ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 กราฟมาตรฐานของไคลอรีนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มก./ลิตร

จากรูปที่ 4.19 – 4.21 เมื่อปริมาตรเพิ่มขึ้น พบว่า ความไวในการวิเคราะห์ (ความชันของสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน) เพิ่มขึ้น ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2) ที่ดีมากสำหรับทุกๆ ปริมาตรที่ศึกษา แต่ที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มีความไวในการวิเคราะห์สูงที่สุด ดังนั้น จึงเลือกใช้ปริมาตรที่คิดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก.20 – ก.34)

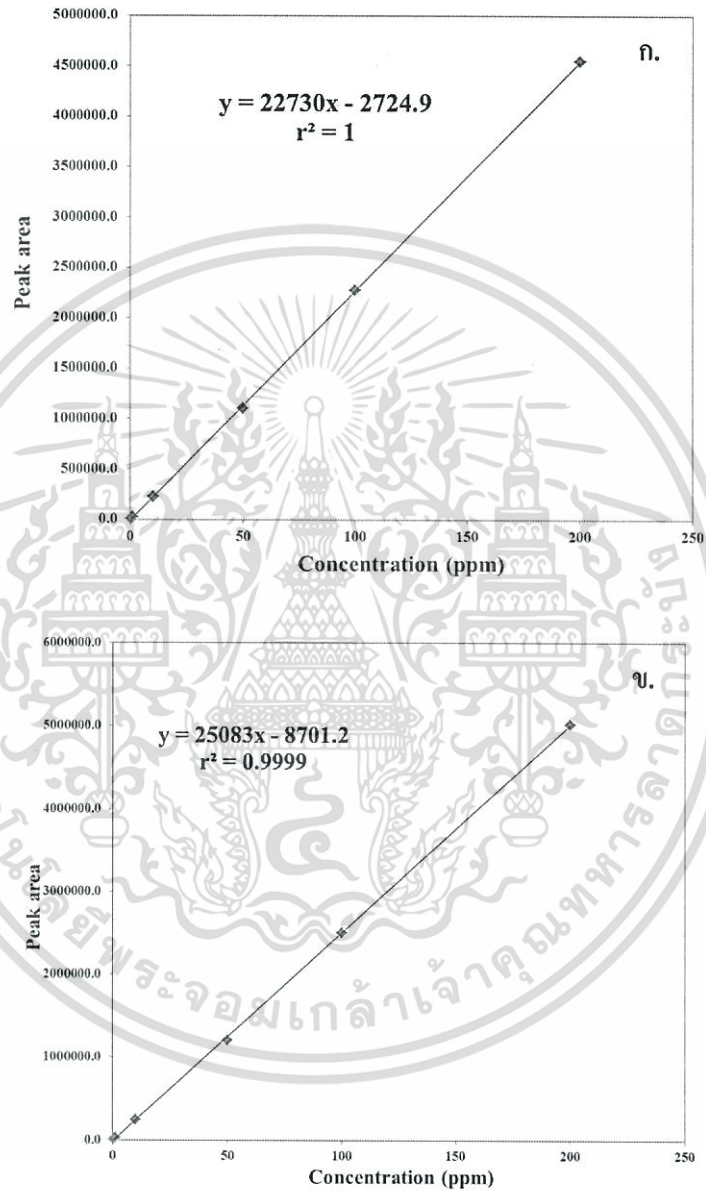
จากผลการทดลองตั้งแต่หัวข้อ 4.2.1 – 4.2.6 สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ได้ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิก

ตัวแปรที่ศึกษา	ค่าที่เหมาะสม
สารละลายเฟสเคลื่อนที่	สารละลายเมทานอลเข้มข้น 10% ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์
ค่าพีเอชของสารละลายเฟสเคลื่อนที่	3.0
ขนาดของมอนอลิติกคอลัมน์	4.6 มม. X 25.0 มม. Macropore 2.0 ไมโครเมตร และ Mesopore 13.0 นาโนเมตร
อัตราการไหล	2.0 มิลลิลิตร/นาที
ปริมาตรสารตัวอย่างที่ดีที่สุด	20 ไมโครลิตร

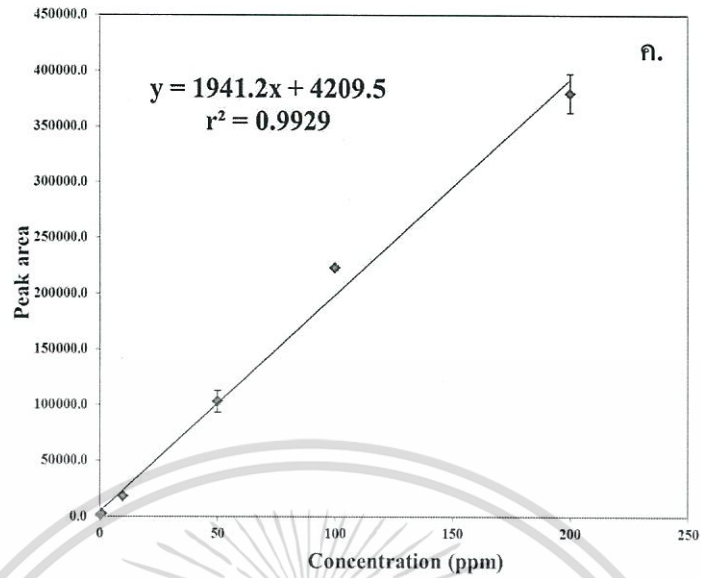
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นได้นำสภาวะการทดลองที่เหมาะสมนี้มาใช้ศึกษาเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิกในช่วยความเข้มข้น 0.1 – 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.22



รูปที่ 4.22 กราฟมาตรฐานของ ก. กรดแกลลิก ข. กรดวานิลลิก และ ค. ไซรินจอลที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.22 (ต่อ)

4.3 คุณลักษณะเด่นของวิธี

4.3.1 ความแม่นยำ

ในการหาความแม่นยำของวิธี จะพิจารณาโดยในการทดลองนี้จะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำส้มควั่น และตัวอย่างน้ำส้มควั่น ไม้ที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิก ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไป จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในตัวอย่างและตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน และคำนวณหาร้อยละของการคืนกลับ ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 ผลการคำนวณหาร้อยละค่าคืนกลับของสารประกอบฟีนอลิก

ตัวอย่าง	ร้อยละค่าคืนกลับ		
	กรดแกลลิก	กรดวานิลลิก	ไซรินจอล
1	85.2	93.2	92.2
2	92.2	98.2	92.1
3	95.7	97.1	82.4
4	94.5	106.7	74.0
5	96.3	98.1	86.1
6	95.5	96.6	94.6
7	97.0	98.8	98.2
8	96.5	97.3	90.3
9	95.7	97.2	86.8
10	94.8	97.7	92.4
11	96.4	100.0	97.4
12	95.7	98.7	93.2

จากตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิดในตัวอย่าง ส่วนใหญ่มีร้อยละค่าคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 85 - 100 จึงถือได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำสูง

4.3.2 ความเที่ยง

ในการหาความเที่ยงของวิธี จะพิจารณาจากค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดยในการทดลองนี้จะทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมฟีนอลิก ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซ้ำๆเป็นจำนวน 5 ครั้ง จากนั้นหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของเวลาที่สารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดถูกชะออกมา ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ ข.1 ในภาคผนวก

ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดในการวิเคราะห์ซ้ำมีค่าดังนี้ กรดแกลลิกเท่ากับร้อยละ 1.85 กรดวานิลลิกเท่ากับร้อยละ 4.56 และไซรินจอลเท่ากับร้อยละ 3.22 ซึ่งน้อยกว่าร้อยละ 5 ดังนั้น จึงถือได้ว่าวิธีนี้มีความเที่ยงที่สูง

4.3.3 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) (Miller and Miller, 1993)

ในส่วนนี้เป็นการหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดของวิธี ซึ่งคำนวณได้จากสูตรที่ (4.1)

$$\text{LOD} = \frac{3SD}{\text{slope}} \quad (4.1)$$

เมื่อแทนค่าที่วิเคราะห์ได้ลงในสมการ 4.1 ได้ค่า LOD ดังนี้ กรดแกแล็กเทอิกเท่ากับ 0.0022 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดวานิลลิกเท่ากับ 0.0047 มิลลิกรัมต่อลิตร และไซรินจอลเท่ากับ 0.23 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.3.4 ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (Limit of Quantitation, LOQ) (Miller and Miller, 1993)

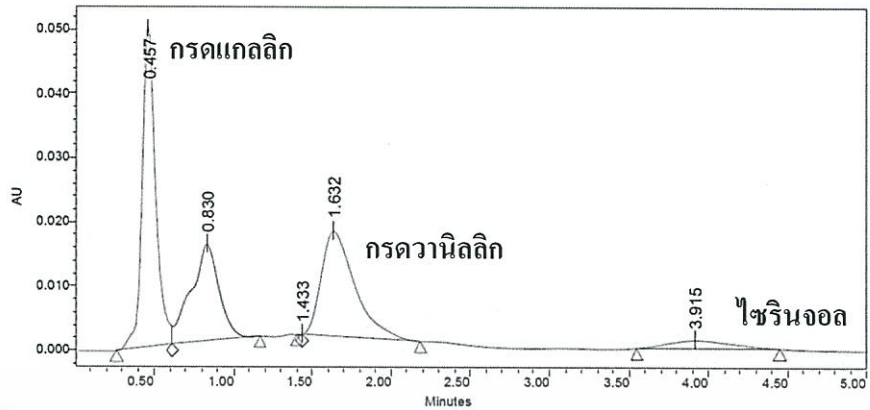
ในส่วนนี้เป็นการหาขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ของวิธี ซึ่งคำนวณได้จากสูตรที่ (4.2)

$$\text{LOQ} = \frac{10SD}{\text{slope}} \quad (4.2)$$

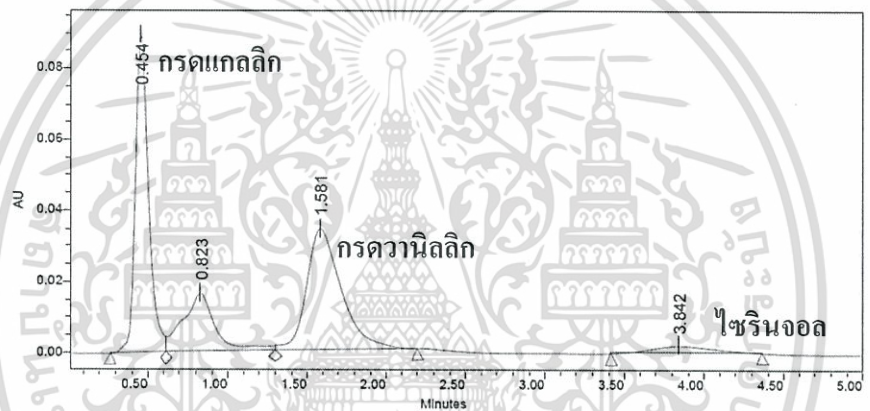
เมื่อแทนค่าที่วิเคราะห์ได้ลงในสมการ 4.2 ได้ค่า LOQ ดังนี้ กรดแกแล็กเทอิกเท่ากับ 0.0072 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดวานิลลิกเท่ากับ 0.017 มิลลิกรัมต่อลิตร และไซรินจอลเท่ากับ 0.77 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.4 ศึกษาการแยกสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำส้มควันไม้

ได้นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ โดยใช้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่สุด น้ำส้มควันไม้ที่ศึกษา เป็นน้ำส้มควันไม้ที่ได้จากการเผาไม้ยูคาลิปตัส และในงานวิจัยนี้ไม่ต้องเตรียมตัวอย่างเหมือนกับที่ พิสมัย และคณะ(2011) ได้เสนอไว้ เพียงนำน้ำส้มควันไม้มาเจือจาง แล้วกรองสุญญากาศเท่านั้น ในการทดลอง ได้ศึกษากับน้ำส้มควันไม้ทั้งที่ไม่เติมและเติมสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิกผสมลงไป เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าแต่ละพีคเป็นสารประกอบฟีนอลิกตัวใด ตัวอย่างผลโครมาโทแกรมที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.23 และ 4.24 ซึ่งลำดับการจะเป็นเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานผสม อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถระบุได้ว่าพีคที่ถัดจากพีคกรดคลินิกนั้นคืออะไร จากนั้นได้วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.23 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิดลงไป



รูปที่ 4.24 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่มีการเติมสารมาตรฐานผสมเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ของสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิดลงไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

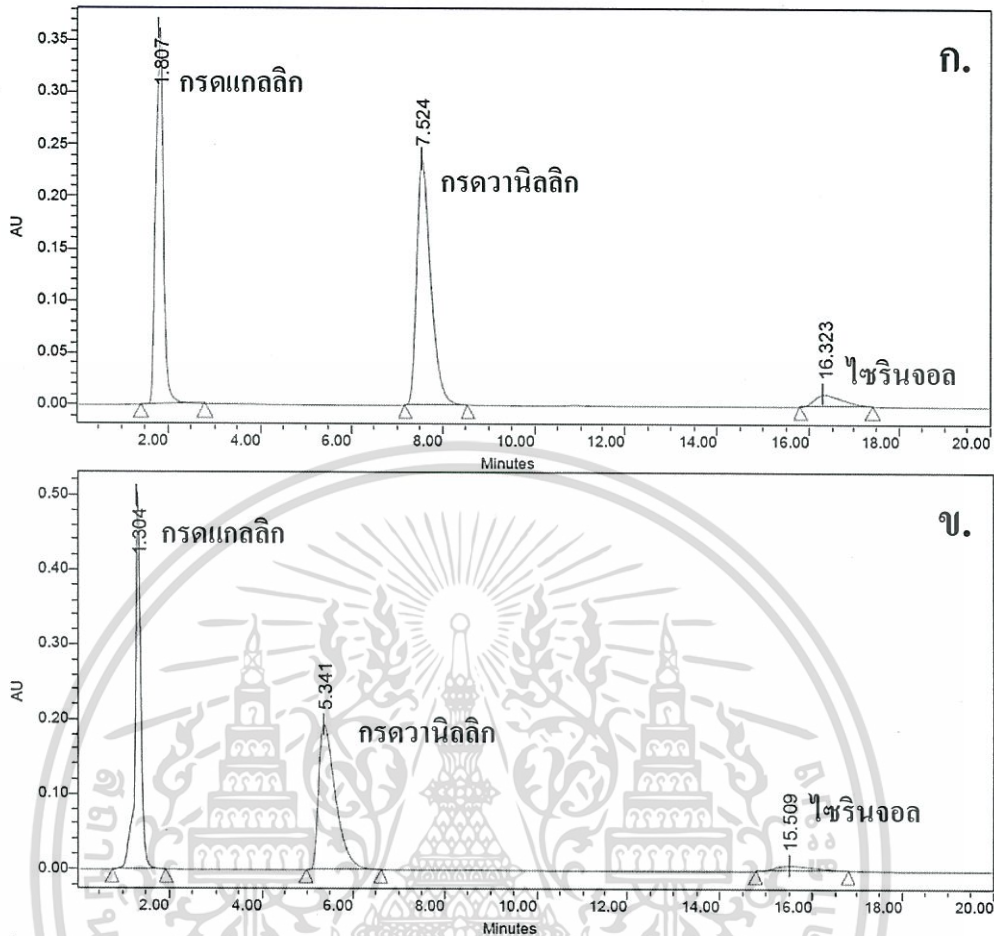
ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำส้มควั่นไม้ (n = 3)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	กรดแกลลิก	กรดวานิลลิก	ไซรินจอล
1	13.7 ± 1.1	11.8 ± 1.8	21.7 ± 1.7
2	13.0 ± 0.04	11.3 ± 0.1	21.7 ± 0.3
3	12.6 ± 0.1	11.4 ± 0.2	22.8 ± 1.5
4	12.7 ± 0.3	10.5 ± 1.1	23.8 ± 0.9
5	12.5 ± 0.1	11.3 ± 0.2	22.4 ± 0.9
6	12.6 ± 0.2	11.5 ± 0.05	21.4 ± 1.3
7	12.5 ± 0.2	11.2 ± 0.1	21.0 ± 0.3
8	12.5 ± 0.1	11.4 ± 0.1	21.9 ± 0.9
9	12.6 ± 0.1	11.4 ± 0.03	22.3 ± 0.5
10	12.7 ± 0.2	11.4 ± 0.2	21.6 ± 1.0
11	12.5 ± 0.2	11.1 ± 0.2	21.1 ± 0.2
12	12.6 ± 0.2	11.3 ± 0.2	21.6 ± 0.8

จากตาราง พบว่า น้ำส้มควั่นไม้ทุกตัวอย่างจะพบปริมาณไซรินจอลมากที่สุด และพบปริมาณกรดแกลลิก และกรดวานิลลิกรองลงมาในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

4.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพเมื่อใช้คอลัมน์แบบบรรจุเม็ดอนุภาคกับคอลัมน์มอนอลิติก

ในส่วนนี้จะเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการแยก เมื่อใช้คอลัมน์แบบบรรจุเม็ดอนุภาค และคอลัมน์มอนอลิติก โดยคอลัมน์ทั้งสองมีความยาวและเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกเท่ากัน (100 x 4.6 มิลลิเมตร) ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.25



รูปที่ 4.25 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซริงจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0 รูป ก. คอลัมน์แบบบรรจุเม็ดคอนูภาค และ ข. คอลัมน์มอนอลิติก

ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพในการแยก (Resolution, R) ของสารประกอบฟีนอลิกในสารละลายมาตรฐานผสม เมื่อใช้คอลัมน์แบบบรรจุเม็ดคอนูภาคและคอลัมน์มอนอลิติก

ชนิดคอลัมน์	$R_{\text{Gallic - Vanillic}}$	$R_{\text{Vanillic - Syringol}}$
คอลัมน์แบบบรรจุเม็ดคอนูภาค	6.33	7.33
คอลัมน์มอนอลิติก	4.00	7.29

จากรูปที่ 4.25 แสดงให้เห็นว่าไม่ว่าจะใช้คอลัมน์แบบบรรจุเม็ดคอนูภาคหรือคอลัมน์มอนอลิติก ให้ลักษณะโครมาโทแกรมในการแยกที่ไม่ต่างกัน แต่เมื่อใช้คอลัมน์มอนอลิติกพบว่าใช้เวลาในการแยกเร็วกว่าคอลัมน์แบบบรรจุเม็ดคอนูภาคเล็กน้อย แต่แรงดันเมื่อใช้คอลัมน์

มอนอลิติก (750 – 800 psi) ต่ำกว่าคอลัมน์แบบบรรจุเม็ดคอนกรีตมาก (1800 – 1900 psi) อีกทั้งเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของคอลัมน์ดังในตารางที่ 4.5 คอลัมน์แบบบรรจุเม็ดคอนกรีตจะมีประสิทธิภาพที่เหนือกว่าคอลัมน์มอนอลิติก อย่างไรก็ตาม ถ้าหากแรงดันที่ใช้สูง การจะดันสารละลายเข้าสู่คอลัมน์ จะต้องใช้ปั๊มแรงดันสูงในการขับเคลื่อน แต่ถ้าหากใช้แรงดันต่ำๆ สามารถใช้ปั๊มที่มีแรงดันไม่สูงมากนักในการขับเคลื่อนสารละลายได้ ซึ่งปั๊มแรงดันต่ำนี้ ราคาถูกกว่ามาก จึงลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ลงได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1.1 ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคในการแยกสารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มควันไม้ โดยอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแรงดันต่ำ ร่วมกับคอลัมน์แบบมอนอลิติก และตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงยูวี จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าเป็นดังนี้

(1) เฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายเมทานอล เข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ อะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0

(2) อัตราการไหลที่ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที

(3) ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร

(4) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร

5.1.2 ผลจากการประเมินคุณลักษณะเด่นของวิธี เป็นดังนี้

(1) สมการเชิงเส้นของสารประกอบฟีนอลิก

- กรดแกลลิกคือ (พื้นที่ใต้กราฟ = 22730 [กรดแกลลิก] - 2724.9) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 1.0

- กรควานิลลิก (พื้นที่ใต้กราฟ = 25083 [กรควานิลลิก] - 8701.2) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9999

- ไชรินจอล (พื้นที่ใต้กราฟ = 1941.2[ไชรินจอล] + 4209.5) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9929

(2) ค่าร้อยละของการวิเคราะห์ที่คืนกลับอยู่ในช่วง 82.4 - 98.2

(3) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า ร้อยละ 5

(4) ขีดจำกัดในการตรวจวัดสำหรับกรดแกลลิกเท่ากับ 0.0022 มิลลิกรัมต่อลิตร กรควานิลลิกเท่ากับ 0.0047 มิลลิกรัมต่อลิตร และไชรินจอลเท่ากับ 0.23 มิลลิกรัมต่อลิตร

(5) ขีดจำกัดในการวิเคราะห์สำหรับกรดแกลลิกเท่ากับ 0.0072 มิลลิกรัมต่อลิตร กรควานิลลิกเท่ากับ 0.017 มิลลิกรัมต่อลิตร และไชรินจอลเท่ากับ 0.77 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.1.3 เมื่อพัฒนาวิธีได้แล้ว จึงนำมาประยุกต์ใช้ในการแยกและวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มควันไม้ พบว่า สามารถแยกและวิเคราะห์ได้ดี โดยในตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่ศึกษาเป็น ไม้ยูคาลิปตัส และพบปริมาณ ไชรินจอลมากที่สุด รองลงมาคือกรดแกลลิก และกรควานิลลิก ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำส้มควินไม้ ควรมีการกรองตัวอย่างให้สะอาด เพื่อป้องกันการอุดตันของคอลัมน์

5.2.2 เมื่อวิเคราะห์แต่ละครั้งเสร็จแล้ว ควรล้างคอลัมน์ให้สะอาด เพื่อยืดอายุการใช้งาน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- ชมรมสวนป่า ผลิตภัณฑ์และพลังงานจากไม้. 2546. ถ่านไม้และน้ำส้มควันไม้ : [ม.ป.ท.]
- พิสมัย รุ่งเรือง และ สุวรรณิ จรรยาพูน. 2554. การศึกษาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้ม ควันไม้ที่ผลิตจากการเผาถ่านไม้ไฟ ไม้ยูคาลิปตัส และไม้สัก. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- แม่น อมรสิทธิ์ และคณะ. 2553. “หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ”. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : บริษัท ชวนพิมพ์ 50 จำกัด.
- Abad-Garcia, B., Berrueta, L.A., Lopez-Marquez, D.M. 2007. Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. **Journal of Chromatography A**. 1154: 87-96
- Castellari, M., Fabiani, A. Sartini, E. Arfelli, G., Amati, A. 2002. Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. **Journal of Chromatography A**. 973: 221-227
- Du, H., Ren, J. and Wang, S. 2011. Rapid determination of three alkaloids from Lotus Plumule in human serum using an HPLC-DAD method with a short monolithic column. **Food Chemistry**. 129: 1320-1324
- Fernandez, C., Larrechi, M. S., Forteza, R., Cerda, V. and Callao, M. P. 2010. Multisyringe chromatography (MSC) using a monolithic column for the determination of sulphonated azo dyes. **Talanta**. 82: 137-142
- Garcia, A. A., Grande, B. C. and Gandara, J. S. 2004. Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. **Journal of Chromatography A**. 1054: 175-180
- Georges Guiochon. 2007. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. 1168: 101-168
- Gomis, D. B., Palomini N. F. and Alonso, J. J. M. 2001. Capillary liquid chromatographic determination of neutral phenolic compounds in apple juices. **Analytica Chimica Acta**. 426: 111-117

- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A. and Cabaroglu, T. 2009. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. **Microchemical Journal**. 91: 187-192
- Ignat, I., Volf, I. and Popa, V. I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**. 126: 1821-1835
- Loo, A.Y., Jain, K. and Darah, I. 2008. Antioxidant activity of compounds isolated from the pyrolygneous acid, *Rhizophora apiculata*. **Food Chemistry**. 107: 1151-1160
- Loo, A.Y., Jain, K. and Darah, I. 2007. Antioxidant and radical scavenging activities of the pyrolygneous acid from a mangrove plant, *Rhizophora apiculata*. **Food Chemistry**. 104: 300-307
- Maruska, A. and Kornysova, O. 2006. Application of monolithic (continuous bed) chromatographic columns in phytochemical analysis. **Journal of Chromatography A**. 1112: 319-330
- Mathaweesansurn, A., Janyapoon, S. and Choengchan, N. 2013. Separation of phenolic Compounds in Wood vinegar using Sequential Injection Chromatography. **Proceeding in PACCON 2013, Chonburi**, P.57-60
- Miller, J. N. and Miller, J. C. 1993. **“Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry”**. fourth ed. Pearson Education, Essex.
- Naczki, M. and Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**. 1054: 95-111
- Pratt, D. E. 1992. Natural Antioxidants from Plant Material. **American Chemical Society**. 54-71
- Rajalakshmi, D. and Narasimhon. 1995. **“Food Antioxidants”**. Marcel Dekker, Inc. New York. 5-64
- Rodriguez-Delgado, M.A., Malovana, S., Perez, J.P., Borges, T. and Montelongo, F.J.G. 2001. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**. 912: 249-257
- Salta, J. Martins, A., Santos, R.G., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Justino, J. and Rauter, A.P. 2010. Phenolic composition and antioxidant activity of Rocha pear and other pear cultivars – A comparative study. **Journal of functional food**. 2: 153-157

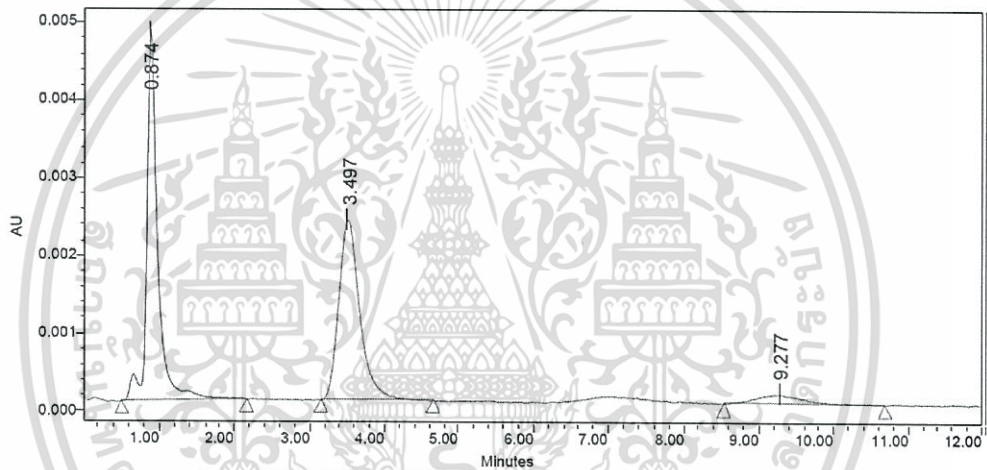
- Schieber, A., Keller, P. and Carle, R. 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A.** 910: 265-273
- Shui, G. and Leong, L.P. 2002. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A.** 977: 89-96
- Tarnawski, M., Depta, K., Grejciun, D. and Szelepin, B. 2006. HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract—a natural immunomodulator. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** 41: 182-188
- Verzelloni, E., Tagliacruzchi, D. and Conte, A. 2007. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. **Food Chemistry.** 105: 564-571
- [Online].Available1 : http://www.fisheries.go.th/cf-kung_krabaen/agricul1.htm
- [Online].Available2 : <http://www.vigowoodvinegar.com/index.php?mo=3&art=456004>

ภาคผนวก ก

โครมาโทแกรมและพื้นที่ใต้พีค

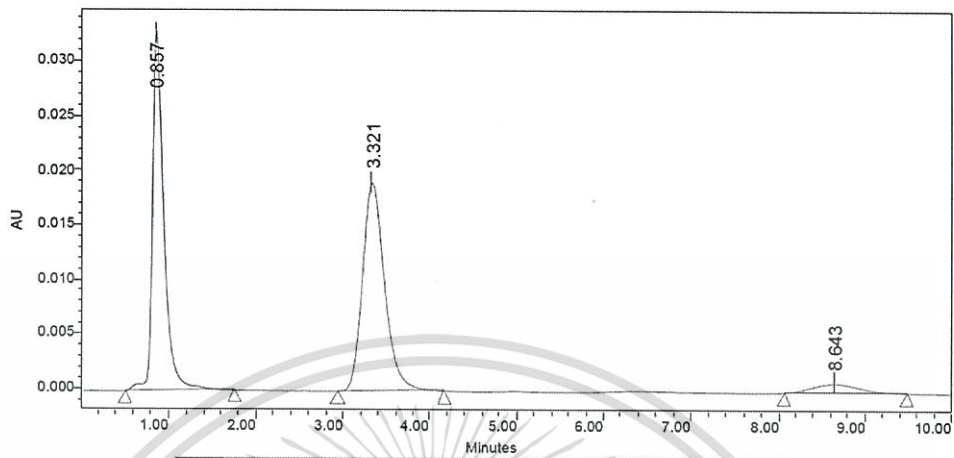
1. การศึกษาค่าพีเอชของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสมสารประกอบฟีนอลิก ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0 และ 200 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอชที่เลือกศึกษา คือ พีเอช 3.0, 3.5, และ 4.0 ใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร



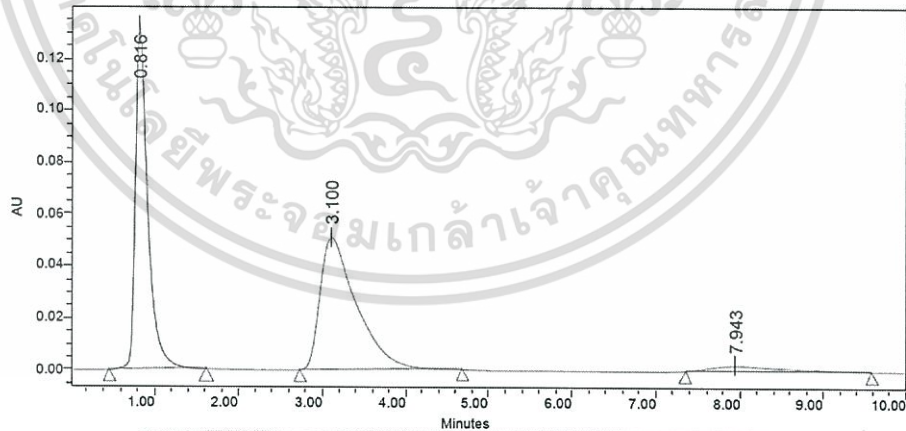
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.874	47693	4805		
2		3.497	45504	2321		
3		9.277	6203	124		

รูปที่ ก.1 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.0



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.857	300677	33402		
2		3.321	341556	19124		
3		8.643	31459	822		

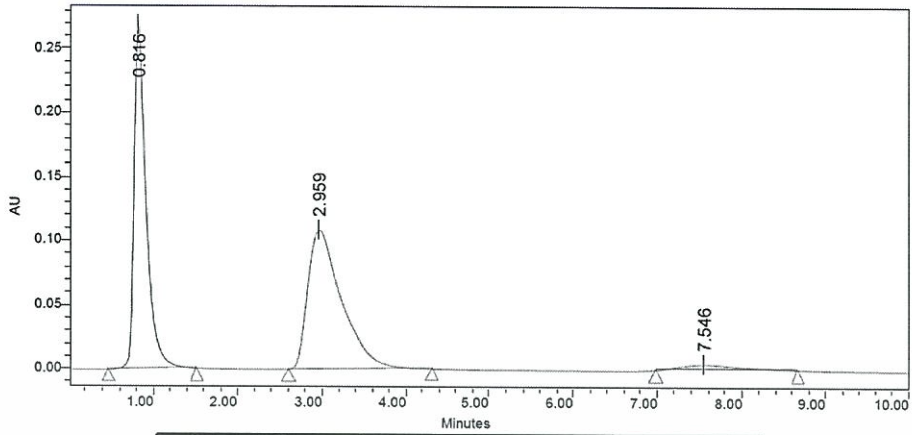
รูปที่ ก.2 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่มีความเข้มข้น 10.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.0



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.816	1360960	132631		
2		3.100	1554300	50952		
3		7.943	124681	1961		

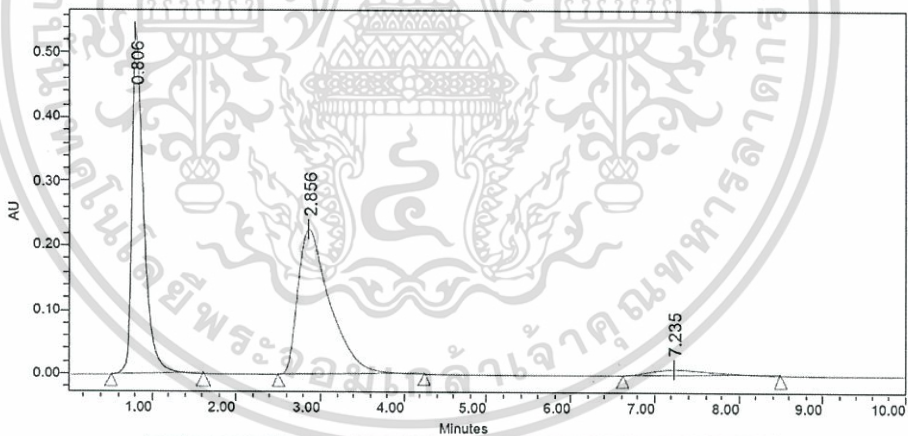
รูปที่ ก.3 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่มีความเข้มข้น 50.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.816	2684214	268887		
2		2.959	3041301	108243		
3		7.546	210297	4037		

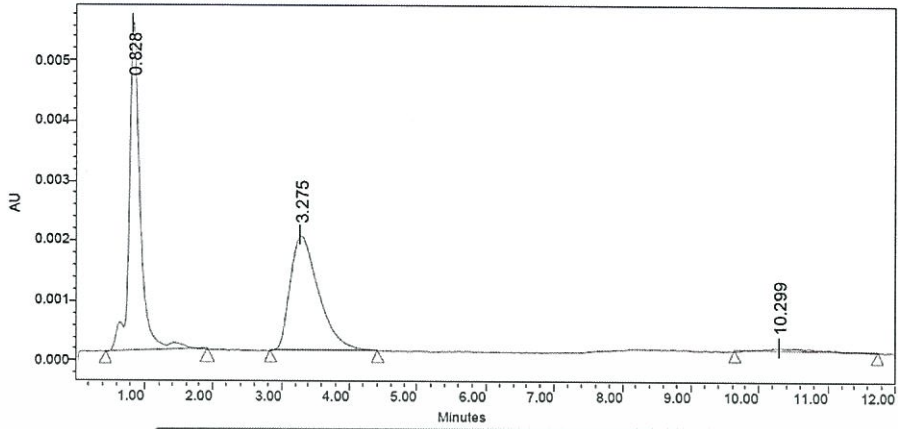
รูปที่ ก.4 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 100.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.0



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.806	5244313	540503		
2		2.856	6025451	226032		
3		7.235	504139	9319		

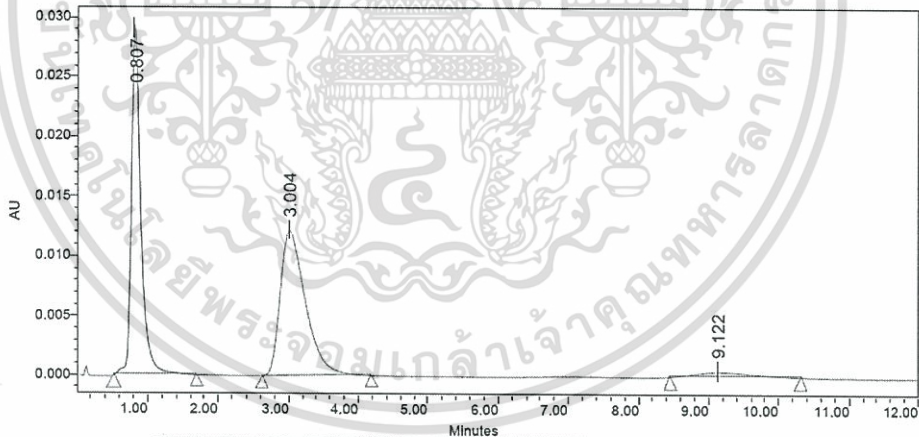
รูปที่ ก.5 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.828	61568	5484		
2		3.275	55638	1912		
3		10.299	3552	57		

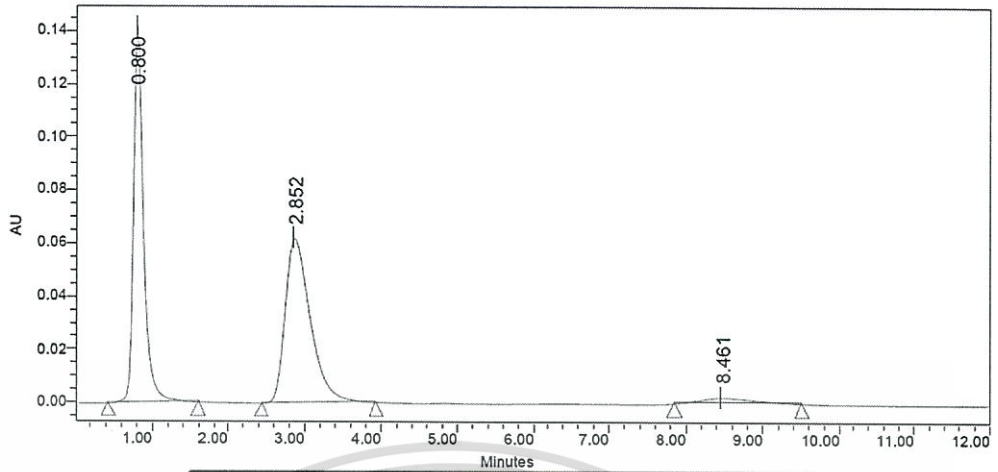
รูปที่ ก.6 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.5



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.807	279863	29450		
2		3.004	306606	12192		
3		9.122	24426	420		

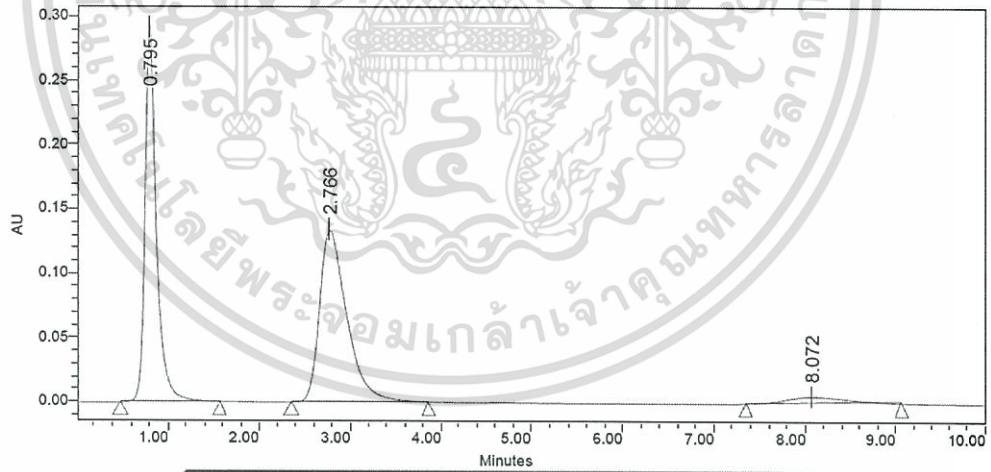
รูปที่ ก.7 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 10.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	0.800	1277169	141412		
2	2.852	1416032	61886		
3	8.461	112680	2179		

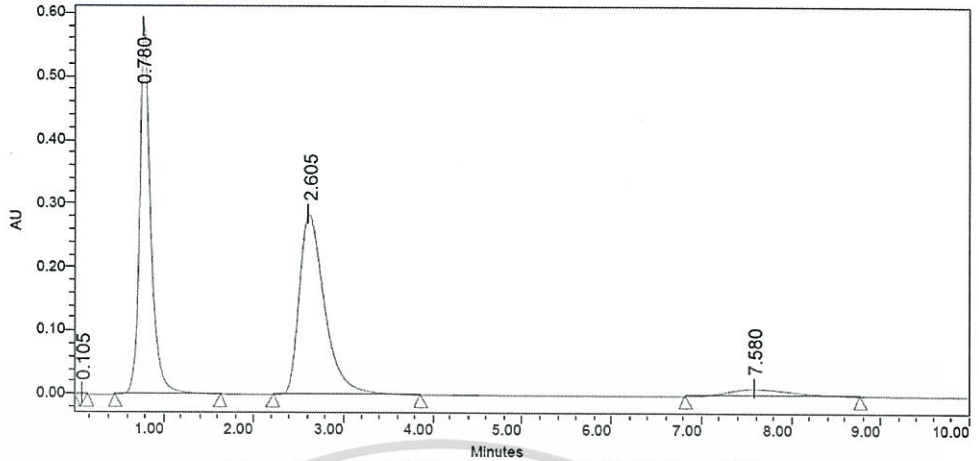
รูปที่ ก.8 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่มีความเข้มข้น 50.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.5



Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	0.795	2526024	292954		
2	2.766	2807608	134048		
3	8.072	251430	5173		

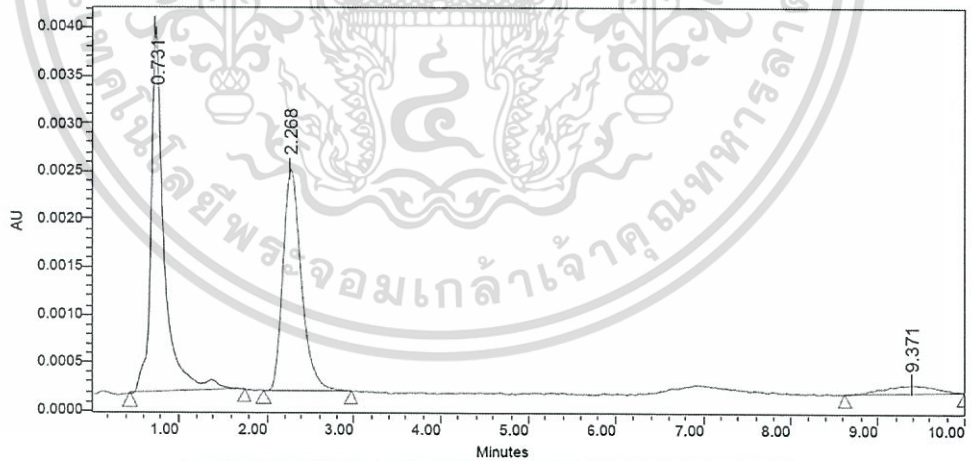
รูปที่ ก.9 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่มีความเข้มข้น 100.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.105	1906	675		
2		0.780	4885744	580204		
3		2.605	5581813	283792		
4		7.580	563272	11286		

รูปที่ ก.10 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 3.5



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.731	39654	3815		
2		2.268	33773	2313		
3		9.371	3896	88		

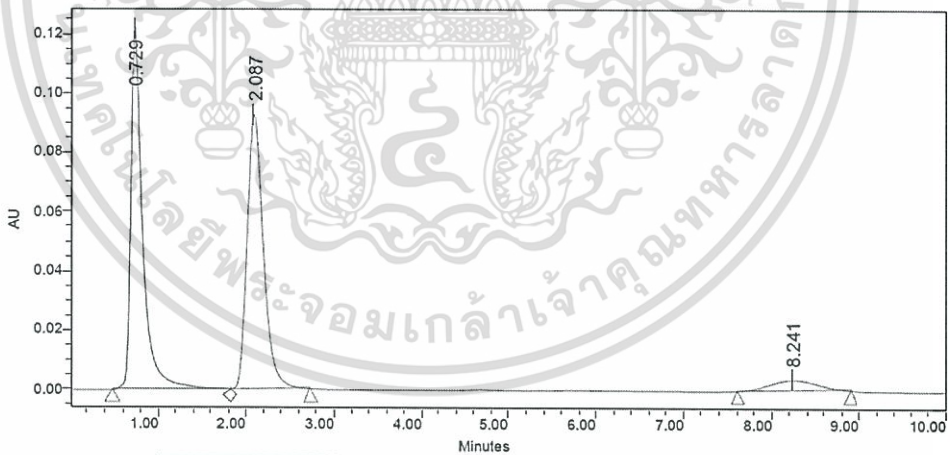
รูปที่ ก.11 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 4.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.734	254151	25529		
2		2.222	262939	18349		
3		8.986	30888	701		

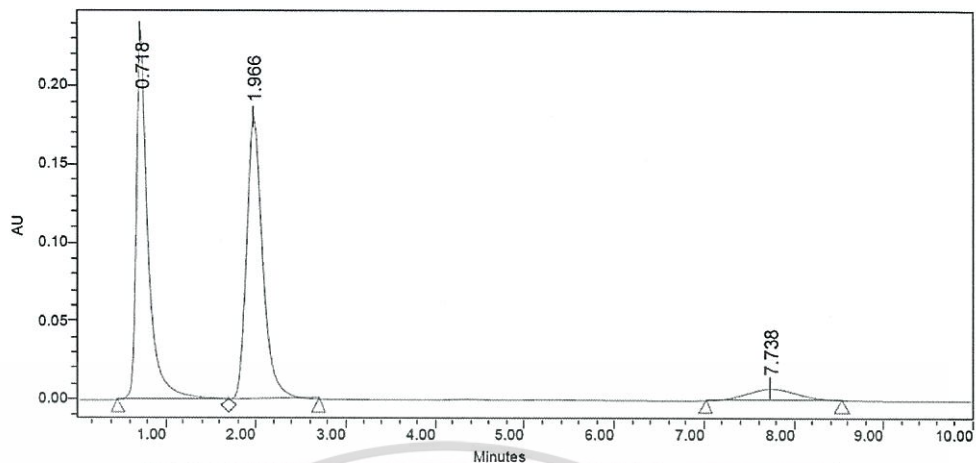
รูปที่ ก.12 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 10.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 4.0



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.729	1141796	121898		
2		2.087	1195084	92742		
3		8.241	135668	3579		

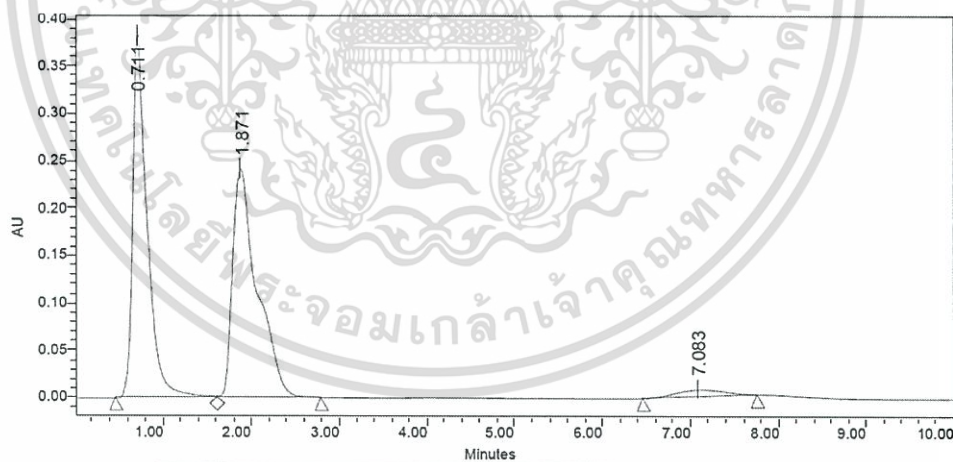
รูปที่ ก.13 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 50.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 4.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.718	2135819	235118		
2		1.966	2288604	179918		
3		7.738	288907	7369		

รูปที่ ก.14 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 100.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 4.0



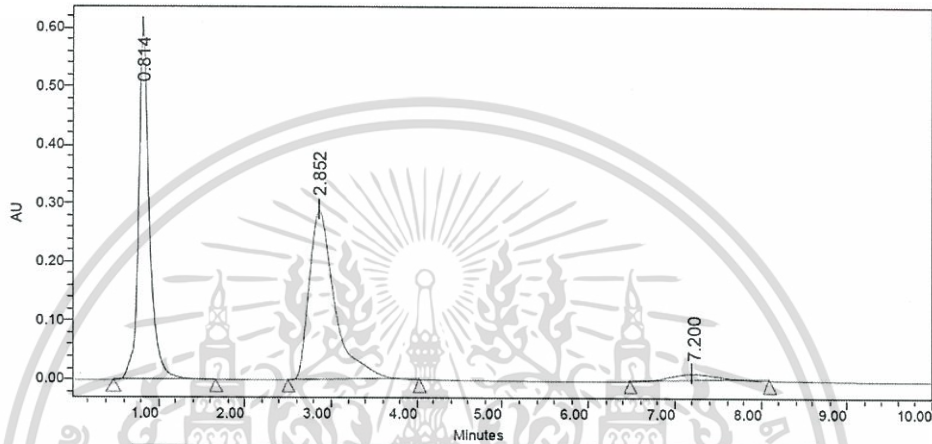
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.711	4338029	384149		
2		1.871	4686203	242203		
3		7.083	284149	7255		

รูปที่ ก.15 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 4.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

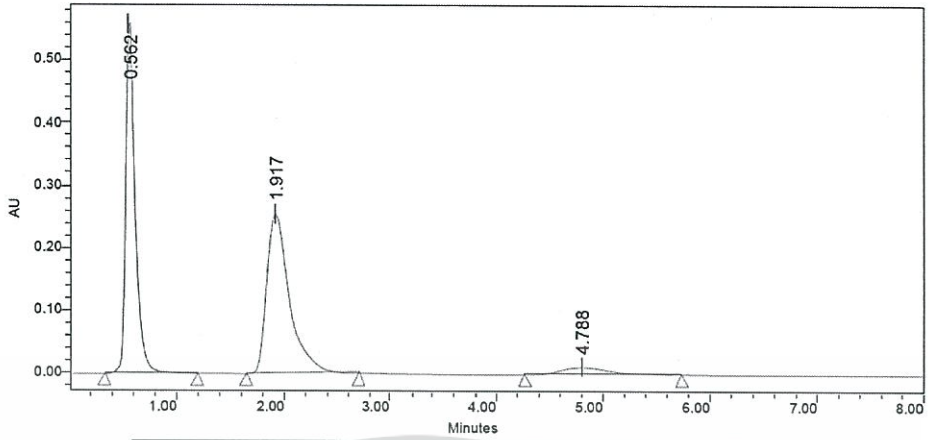
2. การศึกษาอัตราการไหลของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสมสารประกอบฟีนอลิก ความเข้มข้น 200 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลที่ศึกษาคือ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร



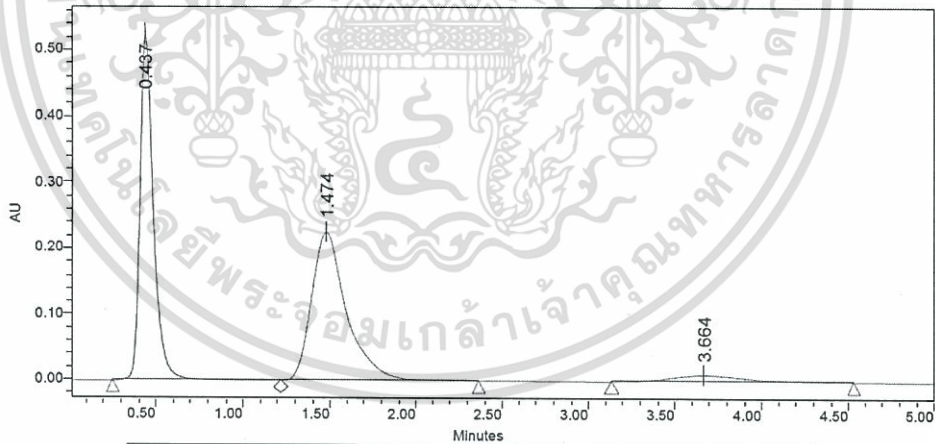
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.814	5321735	603030		
2		2.852	6056766	289511		
3		7.200	506541	12250		

รูปที่ ก.16 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่มีความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.562	3441719	558898		
2		1.917	3773647	254537		
3		4.788	377012	11286		

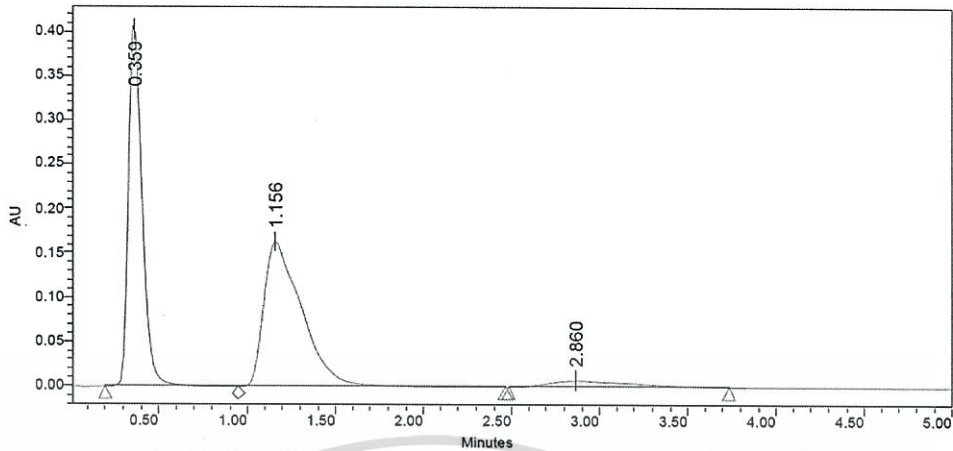
รูปที่ ก.17 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.437	2864183	529460		
2		1.474	3176416	226447		
3		3.664	316699	10110		

รูปที่ ก.18 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

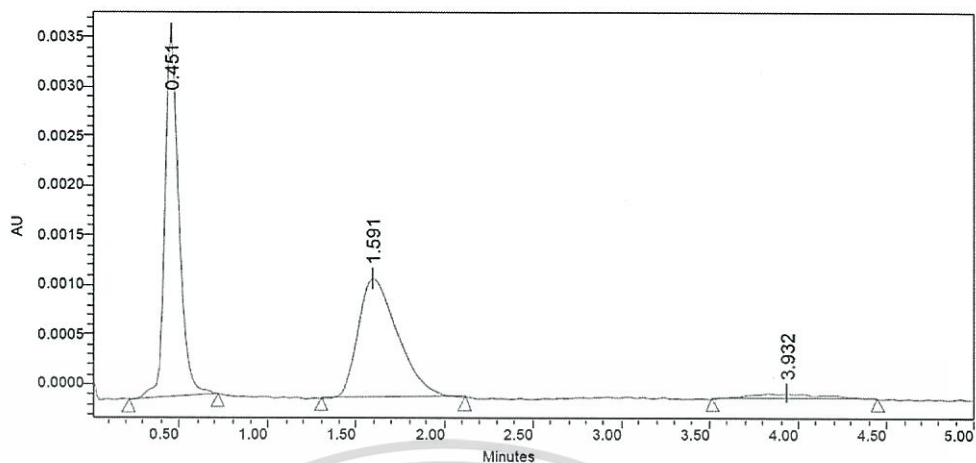


	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.359	2207774	411492		
2		1.156	2462625	164682		
3		2.860	238062	7106		

รูปที่ ก.19 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที

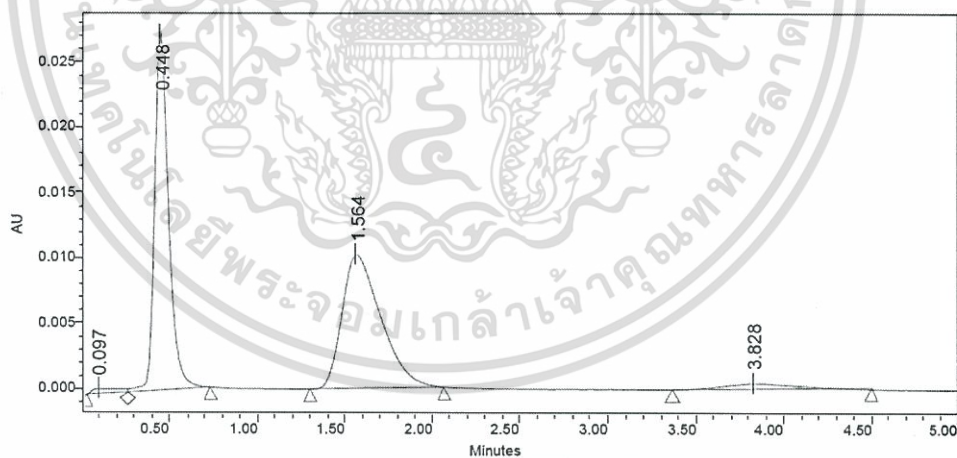
3. การศึกษาปริมาณสารตัวอย่างที่ดี

โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสมสารประกอบฟีนอลิก ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0 และ 200 ppm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0 ใช้อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 10.0, 15.0 และ 20.0 ไมโครลิตร



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.451	20426	3649		
2		1.591	19103	1206		
3		3.932	1732	54		

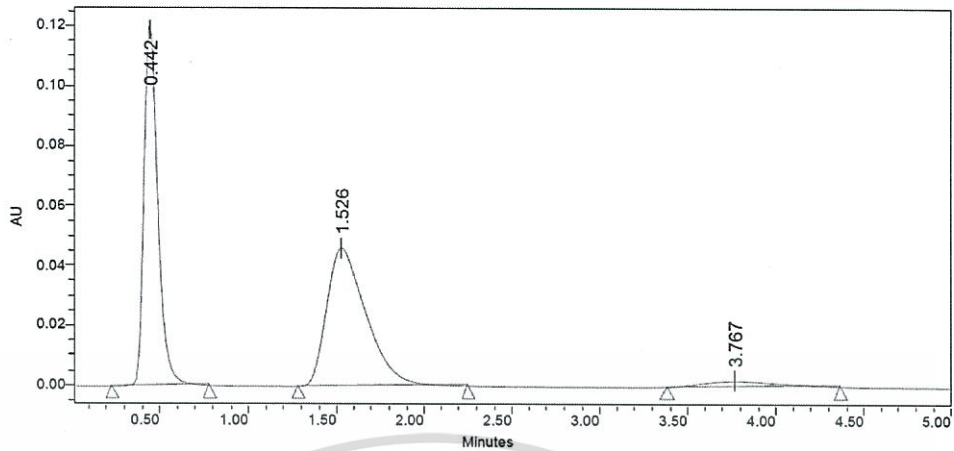
รูปที่ ก.20 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่มีความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 10.0 ไมโครลิตร



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.097	4565	431		
2		0.448	152010	27205		
3		1.564	157876	10213		
4		3.828	14001	435		

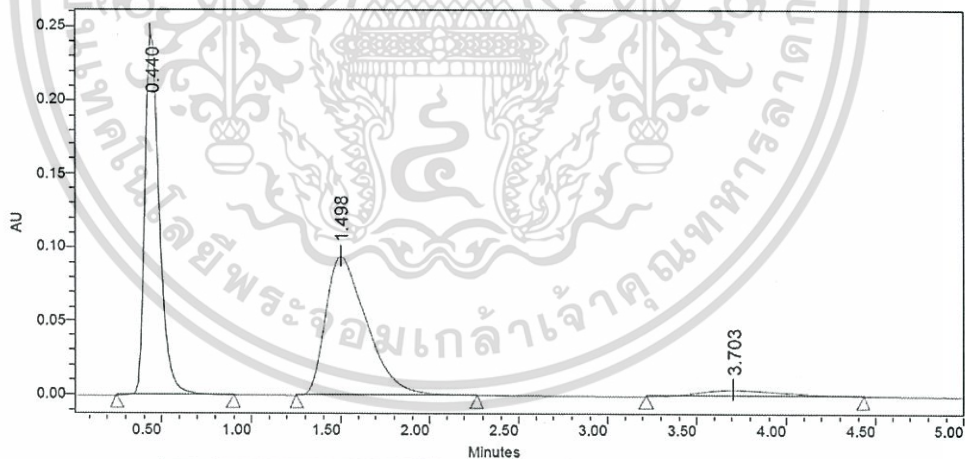
รูปที่ ก.21 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่มีความเข้มข้น 10.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 10.0 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.442	660007	120898		
2		1.526	722573	46244		
3		3.767	57410	1893		

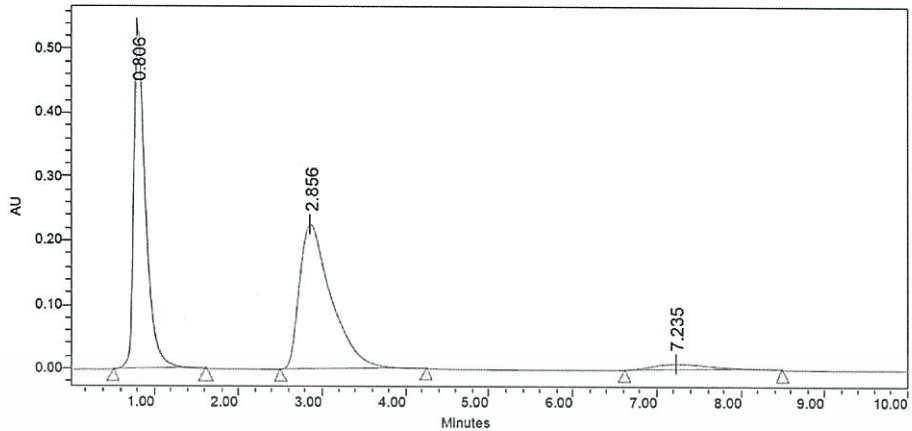
รูปที่ ก.22 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 50.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 10.0 ไมโครลิตร



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.440	1389392	249009		
2		1.498	1511528	94242		
3		3.703	143009	4223		

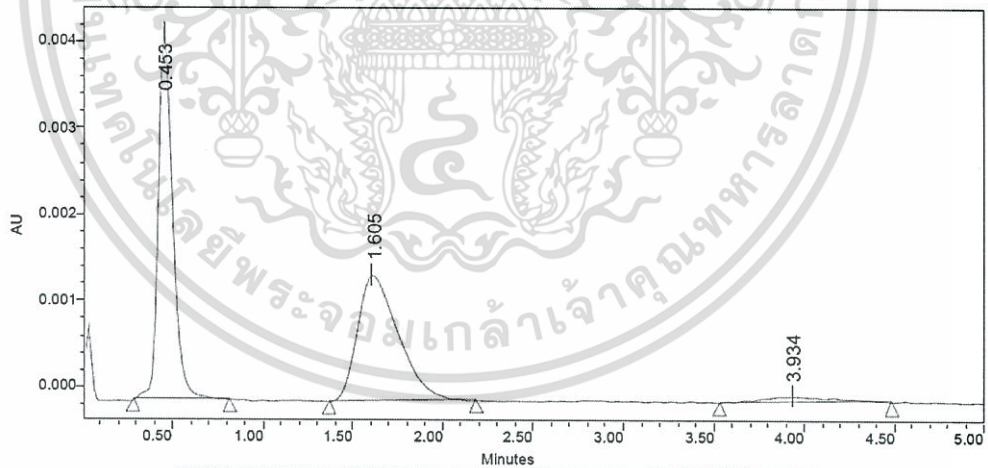
รูปที่ ก.23 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 100.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 10.0 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.451	20426	3649		
2		1.591	19103	1206		
3		3.932	1732	54		

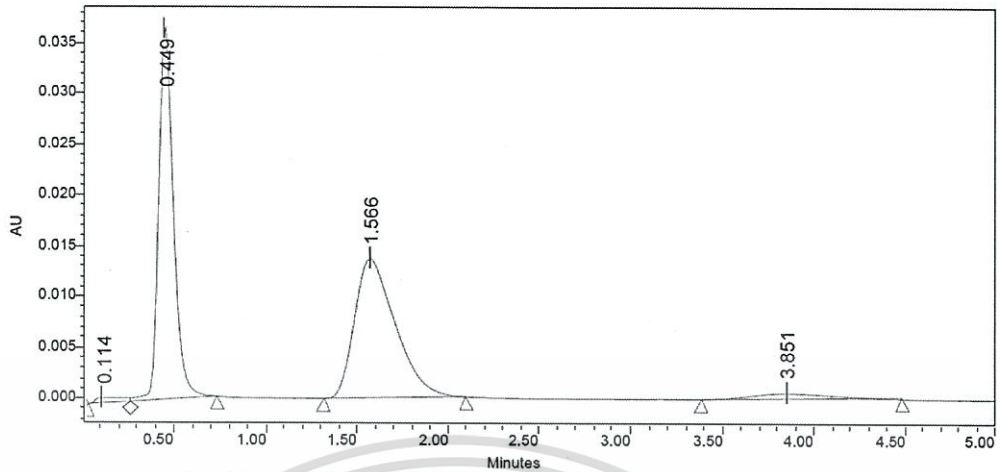
รูปที่ ก.24 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 10.0 ไมโครลิตร



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.453	23788	4263		
2		1.605	23138	1458		
3		3.934	1957	66		

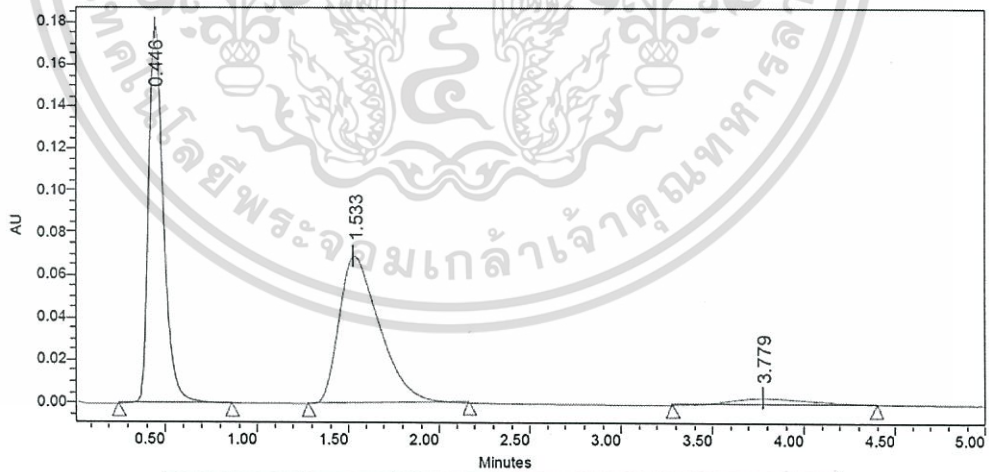
รูปที่ ก.25 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 15.0 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.114	5717	554		
2		0.449	203856	36415		
3		1.566	212818	13702		
4		3.851	18577	586		

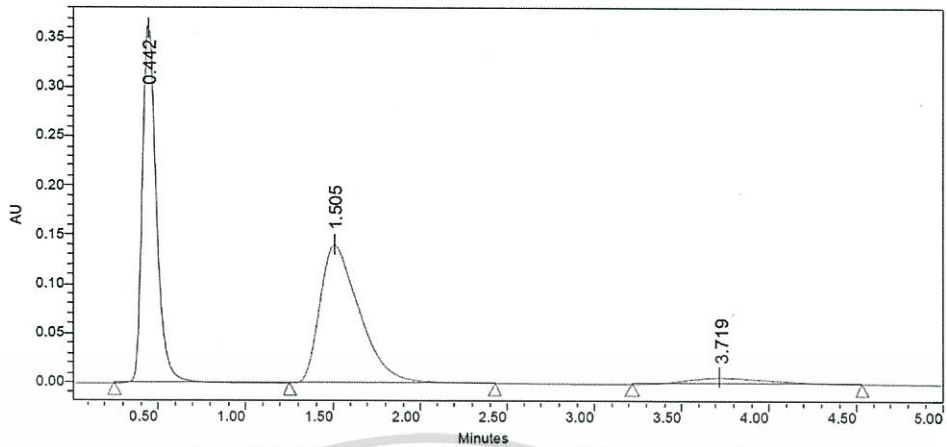
รูปที่ ก.26 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่มีความเข้มข้น 10.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 15.0 ไมโครลิตร



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.446	992850	177881		
2		1.533	1071669	69222		
3		3.779	93639	2972		

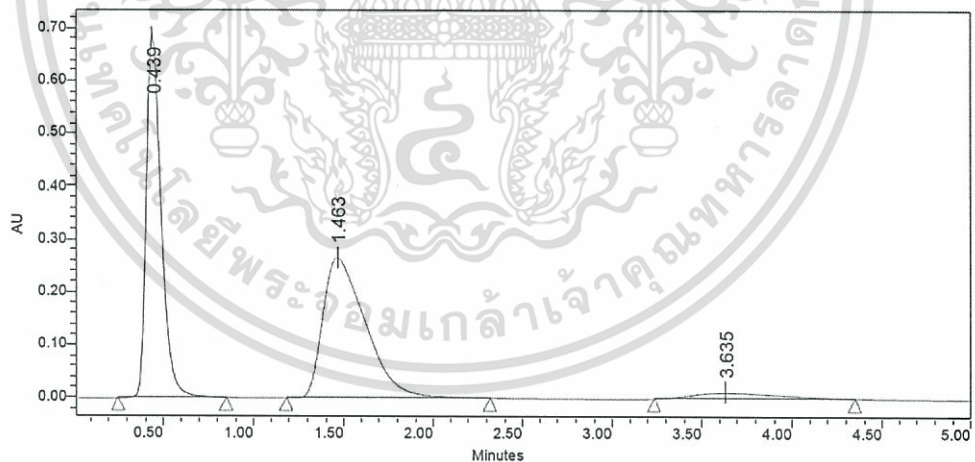
รูปที่ ก.27 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่มีความเข้มข้น 50.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 15.0 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.442	2046146	365672		
2		1.505	2232006	140929		
3		3.719	219270	6376		

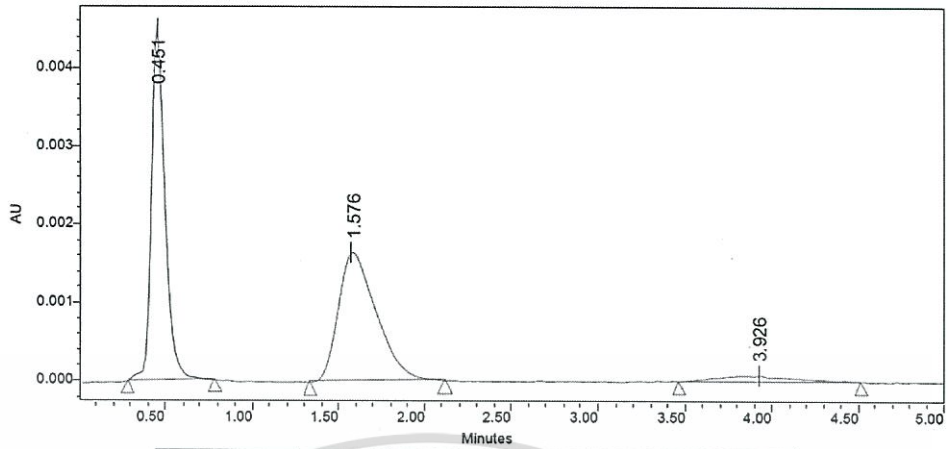
รูปที่ ก.28 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 100.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 15.0 ไมโครลิตร



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.439	3942370	696228		
2		1.463	4388348	265256		
3		3.635	382254	11152		

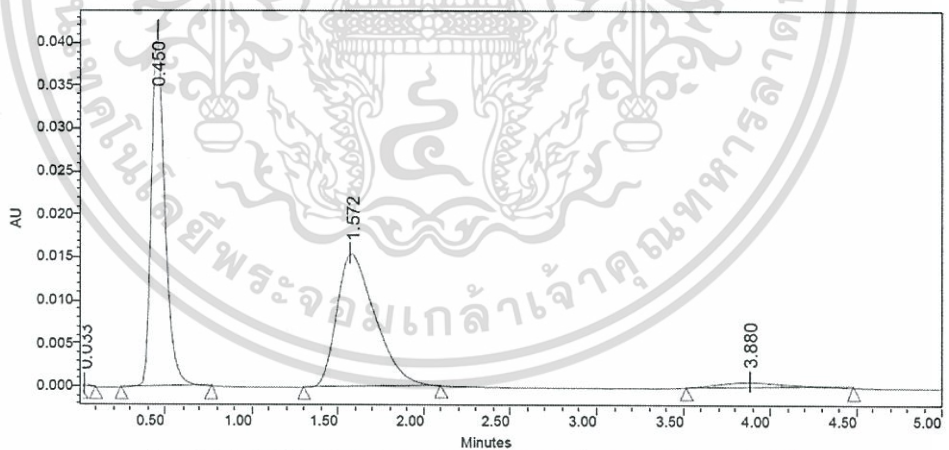
รูปที่ ก.29 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 15.0 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.451	24756	4496		
2		1.576	25581	1660		
3		3.926	2323	75		

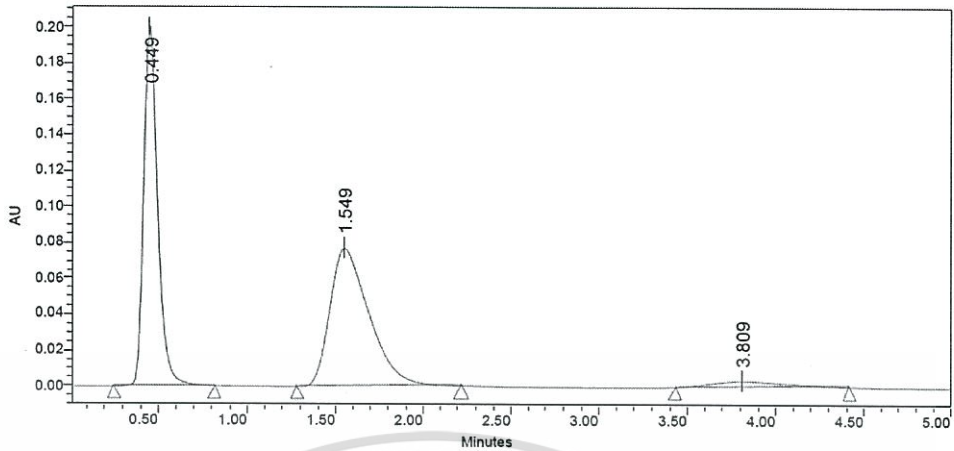
รูปที่ ก.30 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่มีความเข้มข้น 1.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 20.0 ไมโครลิตร



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.033	955	417		
2		0.450	225995	41149		
3		1.572	240876	15461		
4		3.880	17750	598		

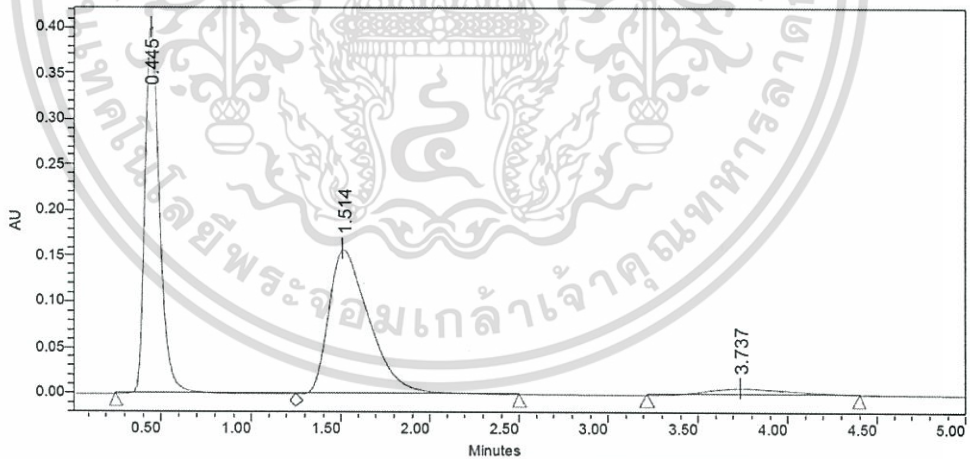
รูปที่ ก.31 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่มีความเข้มข้น 10.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 20.0 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.449	1097751	199184		
2		1.549	1193958	76850		
3		3.809	94703	3129		

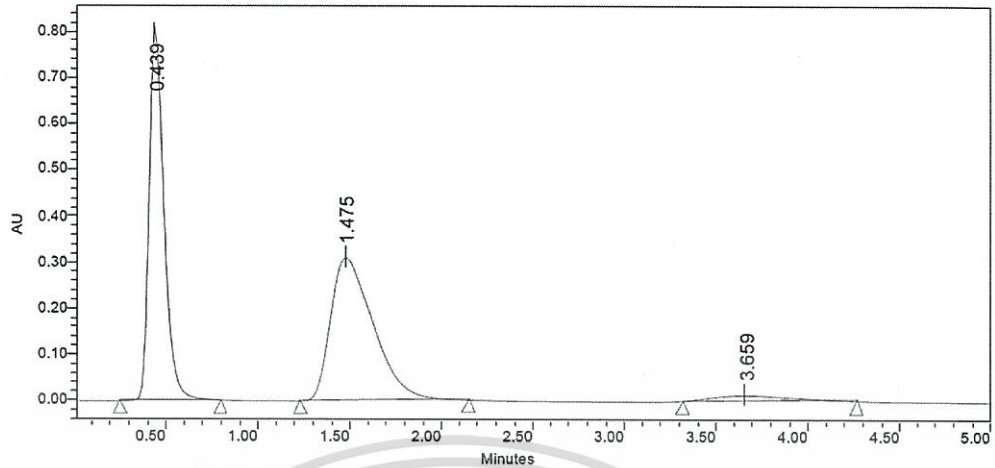
รูปที่ ก.32 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 50.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 20.0 ไมโครลิตร



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.445	2271168	401804		
2		1.514	2497754	157906		
3		3.737	224029	6951		

รูปที่ ก.33 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 100.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 20.0 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		0.439	4546636	811875		
2		1.475	5010956	311482		
3		3.659	365469	11870		

รูปที่ ก.34 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมที่ความเข้มข้น 200.0 ppm ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยปริมาตรที่ศึกษาคือ 20.0 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางและสูตรการคำนวณ

ตารางที่ 1 แสดงเวลาในการชะสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สัมพัทธ์ (n=5)

สารประกอบฟีนอลิก	1	2	3	4	5	ค่าเฉลี่ย	%RSD
กรดแกลลิก	0.44	0.44	0.44	0.45	0.45	0.45	1.85
กรดวานิลลิก	1.46	1.47	1.48	1.60	1.60	1.52	4.56
ไซรินจอล	3.64	3.65	3.66	3.86	3.88	3.73	3.22

สูตรการคำนวณหาร้อยละค่าคืนกลับ

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{spiked sample} - \text{sample}}{\text{standard}}$$

(1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายอาจณรงค์ เมธาวิสรเสรีญ
วัน เดือน ปีเกิด	7 มกราคม 2531
ที่อยู่	92/12 ถ.ชุมพล ต.หน้าเมือง อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา 24000 โทร 087-6069543
ประวัติการศึกษา	2552 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประสบการณ์การทำงานและผลงานวิจัย

พ.ศ.2554	นำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการ paccon 2011 ในหัวข้อ “Preparation, Characterization and Some Analytical Applications of a Planar Reference Electrode”
พ.ศ.2556	นำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการ paccon 2013 ในหัวข้อ “Separation of phenolic compounds in wood vinegar using low pressure liquid chromatography”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้