การพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์กรดแทนนิกในตัวอย่างพืชด้วยวิธีการสกัดระดับไมโครโดยอาศัยหลักการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่ใช้ตัวทำละลายสกัดเป็นชนิดความหนาแน่นต่ำ

DEVELOPMENT OF PREPARATION METHOD FOR ANALYSIS OF TANNIC ACID IN PLANT SAMPLES BY LOW-DENSITY SOLVENT BASED DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION (LDS-DLLME)

*สิริมา เดชะ** *พรพิมล ม่วงไทย*

Sirima Decha*, *Pornpimol Muangthai*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

****Corresponding author, E-mail:*** *Aom_normal691@hotmail.com*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดแทนนิกในตัวอย่างพืชด้วยวิธีการสกัดระดับไมโครโดยอาศัยหลักการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่ใช้ตัวทำละลายสกัดเป็นชนิดความหนาแน่นต่ำ ทั้งนี้ได้ศึกษาตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการสกัด ได้แก่ ชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัว และทดลองเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดทั่วไปตลอดจนได้ทดสอบความใช้ได้ของวิธีการ ก่อนที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการการตรวจสอบกับพืชตัวอย่าง ผลการหาสภาวะที่เหมะสมพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัด คือ 1-บิวทานอล ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เป็นตัวทำละลายในการสกัด และใช้สารผสมเอทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 20:80 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัว ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้กราฟมาตรฐานให้สัญญาณที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 3-15 mg/L โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9990 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ 0.51$\pm$0.04 mg/L และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ 1.71$\pm$0.27 mg/L ให้ค่าร้อยละการกลับคืน 99.89$\pm$3.59 และค่าความแม่น เท่ากับ 0.42$\pm$0.02 mg/L เมื่อเปรียบเทียบวิธีนี้กับวิธีการสกัดโดยทั่วไป พบว่าเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้การสกัดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัดกรดแทนนิก เมื่อนำวิธีที่พัฒนานี้ไปตรวจวัดปริมาณกรดแทนนิกในใบพืชทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ใบหูกวาง ใบฝรั่ง ใบกระท้อน และใบยอ พบปริมาณกรดแทนนิกมีอยู่ในตัวอย่างในช่วง 8.29$\pm$0.28 ถึง 16.161$\pm$0.88 mg/L. ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีที่พัฒนานี้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวกในการวิเคราะห์ มีประสิทธิภาพ และมีความต้องการในการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณที่น้อยกว่าวิธีการสกัดทั่วไป นอกจากนี้ยังสามารถนำงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้ชนิดอื่นๆ ได้

คำสำคัญ: กรดแทนนิก วิธีการสกัดเทคนิคการกระจายตัวระหว่างชั้นของของเหลว พืช

Abstract

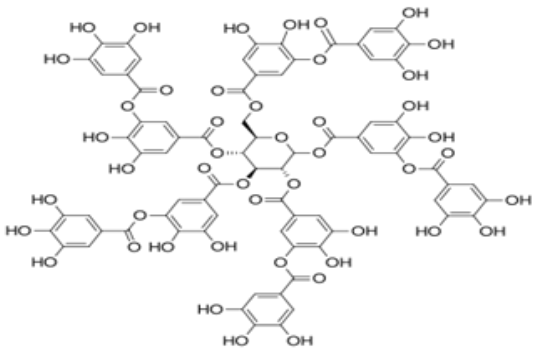
This objective of this research was to develop the preparation method for analysis of tannic acid in plant samples by low density solvent extraction based dispersive liquid-liquid microextraction (LDS-DLLME) technique. The parameters including the type and volume of dispersive solvent and extraction solvent. The method was compared with conventional extraction method and method validation was also tested before applying for tannic acid determination in plant samples. The optimization results showed that the optimum extraction conditions were 800 μL of 1-butanol as the extraction solvent and 800 μL of a mixture of ethanol and water in the ratio of 20:80 as the dispersive solvent. Under these optimum conditions, the standard curve show a linearity over a concentration range of 3 to 15 mg/L with a correlation coefficient (R^2) of 0.9990. The limit of detection and limit of quantitation of the analysis method were 0.51±0.04 mg/L and 1.71±0.27 mg/L respectively. The recoveries percentage was found to be 99.89±3.59% with RSD of 0.42±0.02 mg/L. The comparison test revealed that the propose method has the best efficiency for tannic extraction. The tannic acid quantity in the range of 8.29±0.28 to 16.16±0.88 mg/L for four types of leaves plant samples, including Indian almond leaves, guava leaves, Santol leaves and Indian mulberry leaves were observed using the proposed method. This method are easier, more comfortable, required fewer amounts of organic solvents. Inaddition, the proposed method could be applied for tannic acid analysis in plant and fruit samples.

Keywords: Tannic Acid, LDS-DLLME, Plant

บทนำ

พืชหลายชนิดมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยอีกทั้งยังเป็นที่นิยมบริโภคกันทั่วไปทั้งภายในและภายนอกประเทศ เนื่องจากผู้คนในปัจจุบันหันมาใส่ใจดูแลรักษาสุขภาพกันอย่างมากขึ้น ซึ่งนอกเหนือจากที่พืชส่วนใหญ่จะมีรสชาดที่อร่อยแล้วนั้นในพืชยังมีสารอาหารที่มีประโยชน์ เช่น กากใยที่ช่วยในเรื่องการขับถ่าย การฟื้นฟูร่างกายในการเจ็บป่วย และมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญซึ่งช่วยให้การทำงานของระบบต่างๆ ภายในร่างกายเป็นปกติ ช่วยในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น แคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และพอลิฟีนอล เป็นต้น [1-2] แต่เนื่องจากพืชบางชนิดนั้นไม่สามารถนำมารับประทานได้แต่นำมาใช้ประโยชน์ในทางด้านอื่น เช่น การใช้ใบพืชมาทำเป็นยารักษาโรค โดยการแยกสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบภายในใบพืชออกมาใช้ประโยชน์

กรดแทนนิก (Tannic Acid) เป็นกรดที่สำคัญชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้อย่างแพร่หลายในพืชและผลไม้ โดยกรดแทนนิกนั้นจัดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่มของสารประกอบฟีโนลิก (Phenolic Compound) มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ภายในโครงสร้างประกอบด้วยกรดแกลลิก 9 โมเลกุล และน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เป็นสารประกอบแทนนินชนิดสารไฮโดรไลซ์แทนนิน (Hydrolysable Tannins) [3] โดยมีสูตรโครงสร้างทางเคมี ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดแทนนิก

กรดแทนนิก สามารถพบได้ทั้งในส่วนของใบพืชและผลไม้หลายชนิด เช่น ใบชา ใบฝรั่ง ใบพลู ใบหูกวาง พบในผลไม้ดิบ เช่น องุ่น มะนาว ส้ม ฝรั่ง ลูกแพร์ และมังคุด เป็นต้น โดยปริมาณกรดแทนนิกจะลดลงเมื่อพืชและผลไม้เริ่มสุกเป็นผลเนื่องมาจากกรดแทกนิกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของน้ำตาล [4] ในทางการแพทย์ได้นำกรดแทนนิกมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรค เช่น โรคท้องร่วง โรคบิด และสมานแผลที่เกิดจากไฟไหม้ นอกจากนี้กรดแทนนิกยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราอีกด้วย [5] การวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกจึงจัดว่ามีความสำคัญมากในงานที่มีความเกี่ยวข้องกับกรดนี้ สำหรับในการตรวจสอบปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างนั้นโดยปกติแล้วจะนิยมนำสารตัวอย่างมาทำปฏิกิริยากับ Folin Ciocalteu Reagent โดยที่ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด แต่ทั้งนี้พบว่าวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวมีปริมาณสารรบกวนมากและมีความจำเพาะเจาะจงน้อยกว่าวิธีที่ผ่านการเตรียมสารตัวอย่างโดยผ่านขั้นตอนการสกัด ด้วยเหตุนี้การศึกษาหาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกจึงมีความจำเป็นและสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดแทนนิกโดยใช้วิธีการสกัด ซึ่งวิธีการสกัดอย่างง่ายที่นิยมนำมาใช้ในการเตรียมมีอยู่หลายวิธี ได้แก่ การสกัดด้วยวัฏภาคของเหลว (Liquid-Liquid Extraction, LLE) การสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง (Solid-Phase Extraction, SPE) เป็นต้น แต่ในปัจจุบันวิธีการสกัดสารที่สนใจจะตรวจสอบได้ถูกพัฒนาขึ้นมากโดยการนำเทคนิคใหม่ๆ เข้ามาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดให้ดีขึ้นกว่าการใช้วิธีแบบเดิมโดยวิธีการสกัดที่พัฒนาขึ้น ได้แก่ การสกัดระดับไมโคร เช่น การสกัดระดับไมโครด้วยวัฏภาคของเหลว (Liquid-Liquid Microextraction, LLME) การสกัดระดับไมโครด้วยวัฏภาคของแข็ง (Solid-Phase Microextraction, SPME) และการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลว (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME) [6] และการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดด้วยวัฏภาคของเหลวจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับ Folin Ciocalteu Reagent และทำการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี [7] ซึ่งในปัจจุบันวิธีการสกัดสารที่สนใจจะตรวจสอบได้ถูกพัฒนาขึ้นมากโดยการนำเทคนิคใหม่ๆ เข้ามาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดให้ดีขึ้นกว่าการใช้วิธีแบบเดิม โดยวิธีการสกัดที่พัฒนาขึ้นคือ วิธีการสกัดระดับไมโครโดยอาศัยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่ใช้ตัวทำละลายสกัดเป็นชนิดความหนาแน่นต่ำ (Low Density Solvent Based

Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, LDS-DLLME) [8]

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดแทนนิกด้วยวิธีการสกัดระดับไมโครโดยอาศัยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่ใช้ตัวทำละลายสกัดเป็นชนิดความหนาแน่นต่ำ (Low Density Solvent Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, LDS-DLLME) ในตัวอย่างพืช โดยหลักการในการสกัด คือ สกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นของเหลวและใช้ตัวทำลายอีกหนึ่งชนิดที่มีสมบัติช่วยให้เกิดการกระจายตัวเพื่อช่วยให้สารที่ไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่ชั้นตัวทำละลายอินทรีย์สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่ชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ได้ก่อนจะทำให้เกิดการแยกชั้นของสารอินทรีย์และชั้นของน้ำ แล้วนำสารละลายที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เหมาะสมต่อไป ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีการสกัดสารที่สนใจตรวจวิเคราะห์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร และใช้ตัวทำละลายสกัดปริมาณน้อย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กรดแทนนิกด้วยวิธีการสกัดระดับไมโครโดยอาศัยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่ใช้ตัวทำละลายสกัดเป็นชนิดความหนาแน่นต่ำ (Low Density Solvent Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, LDS-DLLME) ในตัวอย่างพืช

2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิก

3. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืช

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

- สารมาตรฐานกรดแทนนิก จากบริษัท Sigma Aldrich
- อะซิโทไนไตรล์ (Acetonitrile, HPLC grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate, AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform, AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- 1-บิวทานอล (1-Butanol, AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- เพนทานอล (Pentanol, AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, AR grade) จากบริษัท RCL Lab San
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide , AR grade) จากบริษัท RCL Lab San
- เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทโฟโทรมิเตอร์ รุ่น UV-2401 PC จากบริษัท Shimadzu
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออนรุ่น LaboStar จากบริษัท Siemens
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Zentrifugen EBA 8S จากบริษัท Hettich
- ไมโครปิเปตขนาด 100 และ 1000 ไมโครลิตร จากบริษัท Socorex

สารตัวอย่าง

สารตัวอย่างที่นำมาทดลอง มีดังนี้ คือ ใบหูกวาง ใบฝรั่ง ใบกระท้อน และใบยอ ซึ่งได้จัดหาตัวอย่างชนิดต่างๆ ดังกล่าวจากโรงเรียนและตลาดสดในเขตจังหวัดอ่างทอง โดยการบรรจุใบไม้ตัวอย่างในถุงพลาสติกที่มีซิปปิดสนิทและเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

วิธีดำเนินการ

ตอนที่ 1 การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกด้วยวิธีการสกัดระดับไมโครด้วยอาศัยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่มีตัวทำละลายสกัดชนิดความหนาแน่นต่ำ

1.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

นำใบพืชตัวอย่างที่ล้างสะอาด และผึ่งให้แห้ง ชั่งประมาณ 5.xxxx กรัม และแช่ด้วยน้ำปราศจากไอออนนาน 24 ชั่วโมง แล้วกรองเอากากออก ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก 1000 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด โดยชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่นำมาใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม 1-บิวทานอล และเพนทานอล จากนั้นเติมตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัว ลงไปในหลอดทดลองอย่างรวดเร็ว ทำการปรับสภาวะของสารละลายตัวอย่างให้เป็นกลางด้วย 0.1M NaOH นำไปทำให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (Vortex) เป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลายเกลืออิ่มตัวลงไปในสารละลายตัวอย่าง นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร และนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เก็บสารละลายที่อยู่ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ (ชั้นบน) ลงในบีกเกอร์ที่สะอาด ทำการสกัดสารเช่นนี้อีกหนึ่งชุดแต่ไม่ต้องเติมสารสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกลงไปในตัวอย่าง

1.2 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก 1000 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด โดยทำการศึกษาหาปริมาตรของตัวทำละลายที่เหมาะสม ที่ปริมาตร 300 400 500 600 700 800 900 และ 1000 ไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นเติมตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัวลงไปในหลอดทดลองอย่างรวดเร็ว ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1

1.3 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัว

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก 1000 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดจากนั้นเติมตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัวลงไปในหลอดทดลองอย่างรวดเร็ว โดยทำการศึกษาหาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัวที่นำมาใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอลต่อน้ำ อะซิโทไนไตรล์ต่อน้ำ และอะซิโตนต่อน้ำ ในอัตราส่วน 20:80 ทำการปรับสภาวะของสารละลายตัวอย่างให้เป็นกลางด้วย 0.1M NaOH นำไปทำให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 1 นาที ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.2

1.4 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัว

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก 1000 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด จากนั้นเติมตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัวลงไปในหลอดทดลองอย่างรวดเร็ว โดยทำการศึกษาหาปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัวที่เหมาะสมที่ปริมาตร 300 400 500 600 700 800 900 และ 1000 ไมโครลิตร ตามลำดับ ทำการปรับสภาวะของสารละลายตัวอย่างให้เป็นกลางด้วย 0.1M NaOH นำไปทำให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 1 นาที ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.3

จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากข้อ 1.2 1.3 1.4 และ 1.5 ซึ่งเป็นสารละลายที่ผ่านกระบวนการสกัดมาทำการระเหยแห้งที่อุณหภูมิห้องละลายสารที่เหลือด้วยน้ำและนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-Ciocalteu Phenol Reagent เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตแอนไฮดรัส

ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร นำไปเขย่า และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี

ตอนที่ 2 การศึกษาหาประสิทธิภาพของวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกที่ความเข้มข้น 3 – 1000 mg/L และทำการวิเคราะห์ปริมาณโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงเพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง คำนวณหาค่า LOD และ LOQ โดยใช้การคำนวณ S/N = 3 และ S/N = 10 ตามลำดับ

ตอนที่ 3 การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัด

ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดระดับไมโครโดยอาศัยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่ใช้ตัวทำละลายสกัดเป็นชนิดความหนาแน่นต่ำ (Low Density Solvent Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, LDS-DLLME) กับวิธีการสกัดโดยทั่วไปกับวิธีการสกัดโดยทั่วไป คือ การสกัดระดับไมโครด้วยวัฏภาคของเหลว (Liquid-Liquid Microextraction, LLME) และการสกัดระดับไมโครด้วยวัฏภาคของแข็ง (Solid-Phase Microextraction, SPME) โดยเลือกสภาวะการสกัดที่ดีที่สุดที่ทำการศึกษาข้างต้นในตอนที่ 1 และตอนที่ 2 มาทดสอบ

ตอนที่ 4 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้

นำตัวอย่างพืช ได้แก่ ใบหูกวาง ใบฝรั่ง ใบกระท้อน และใบยอ ที่เก็บไว้มาบดให้ละเอียด นำไปชั่งประมาณ 5.xxxx กรัม และแช่ด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงนำมากรองเอากากที่เหลือทิ้งไป เก็บสารละลายตัวอย่างพืชแต่ละในขวดสีชา และนำไปเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณของกรดแทนนิกตามวิธีที่พัฒนาขึ้นต่อไป ทำการทดลองสกัดโดยเลือกสภาวะการสกัดที่ดีที่สุดที่ทำการศึกษาข้างต้นในตอนที่ 1 และตอนที่ 2 มาทดสอบกับตัวอย่างพืช

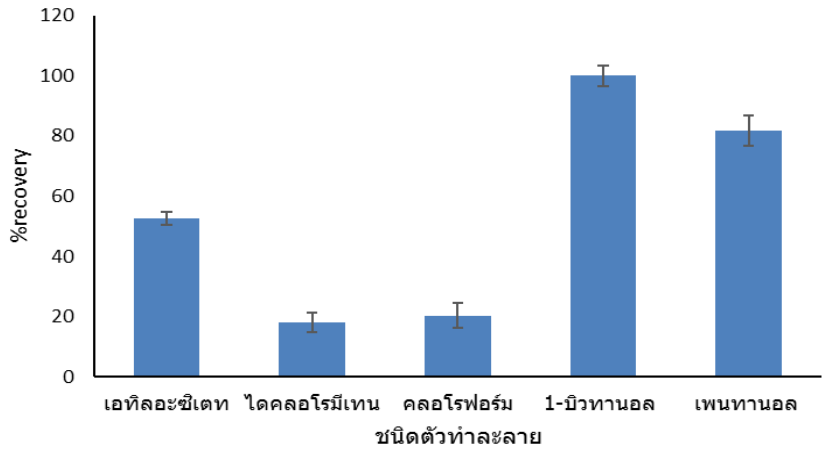
ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกด้วยวิธี Low Density Solvent Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (LDS-DLLME)

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์กรดแทนนิกและทำการแยกกรดแทนนิกจากสารรบกวนชนิดอื่นๆ โดยได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดดังต่อไปนี้

1.1 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

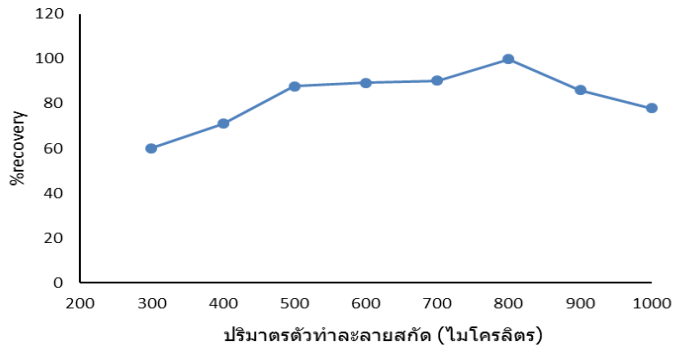
จากการศึกษาผลของชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม 1-บิวทานอล และเพนทานอล (โดยใช้ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดชนิดต่างๆ ที่ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และเอทานอลต่อน้ำ อัตราส่วน 20:80 เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัว) จากผลการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง พบว่า 1-บิวทานอล คือตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่ให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่ดีกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นๆ เนื่องจากให้ค่าร้อยละการได้กลับคืนสูงที่สุด ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ผลการศึกษาชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่เหมาะสม

1.2 ผลการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

จากการศึกษาผลของปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด โดยทำการศึกษาหาปริมาตรของตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ปริมาตร 300 400 500 600 700 800 900 และ 1000 ไมโครลิตร ตามลำดับ (โดยใช้ 1-บิวทานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และเอทานอลต่อน้ำ อัตราส่วน 20:80 เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัว) จากผลการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง พบว่าที่ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นั้นให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงที่สุด เนื่องจากให้ค่าร้อยละการได้กลับคืนสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาตรอื่นๆ ดังภาพที่ 3

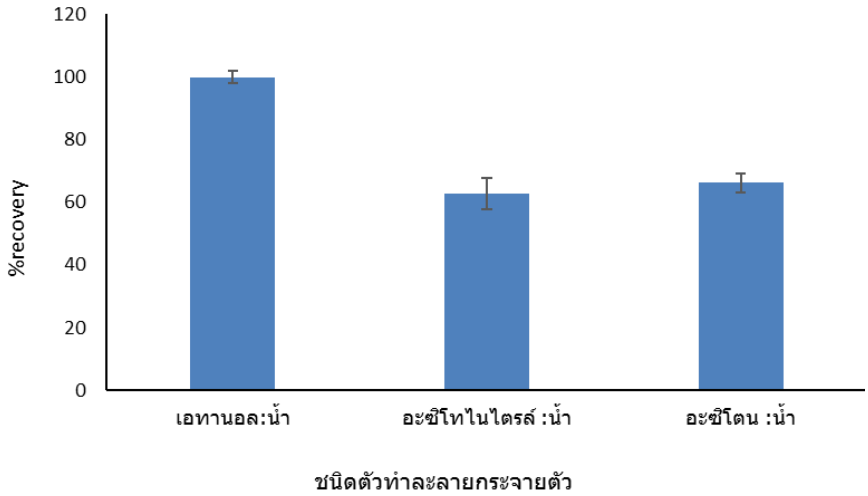


ภาพที่ 3 ผลการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่เหมาะสม

1.3 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัว

จากการศึกษาผลของชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในกระจายตัวทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอลต่อน้ำ อะซิโทไนไตรล์ต่อน้ำ และอะซิโทไนไตรล์ต่อน้ำในอัตราส่วน 20:80 (โดยใช้ 1-บิวทานอลปริมาตร 800 ไมโครลิตร เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัวแต่ละชนิด ปริมาตร 800 ไมโครลิตร) จากผลการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง พบว่า

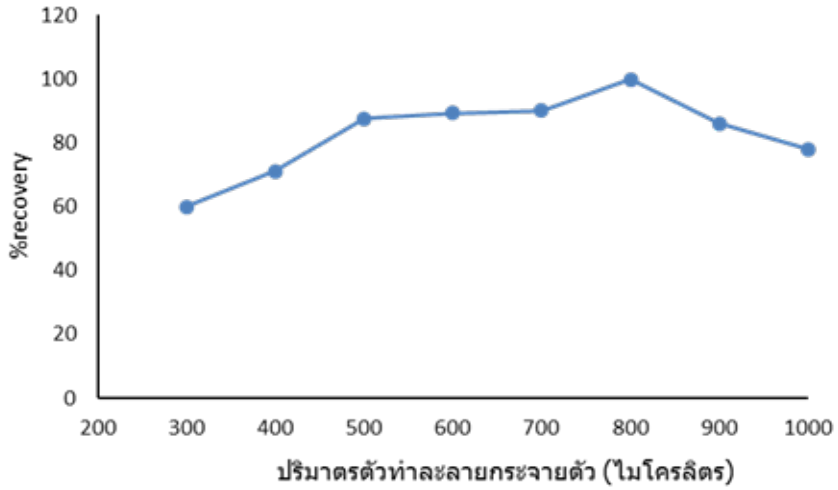
เอทานอลต่อน้ำ DI อัตราส่วน 20:80 คือตัวทำละลายที่ใช้ในกระจายตัวที่ให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่ดีกว่าตัวทำละลายที่ใช้ในกระจายตัวชนิดอื่นๆ เนื่องจากให้ค่าร้อยละการได้กลับคืนสูงสุด ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัวที่เหมาะสม

1.4 ผลการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัว

จากการศึกษาผลของปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัว ที่ปริมาตร 300 400 500 600 700 800 900 และ 1000 ไมโครลิตร ตามลำดับ (โดยใช้ 1-บิวทานอล ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและเอทานอลต่อน้ำ อัตราส่วน 20:80 เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัว) จากผลการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง พบว่าที่ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นั้นให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงสุด เนื่องจากให้ค่าร้อยละการได้กลับคืนสูงสุดเช่นกันเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาตรอื่นๆ ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ผลการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัวที่เหมาะสม

ตอนที่ 2 ผลการศึกษาหาประสิทธิภาพของวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

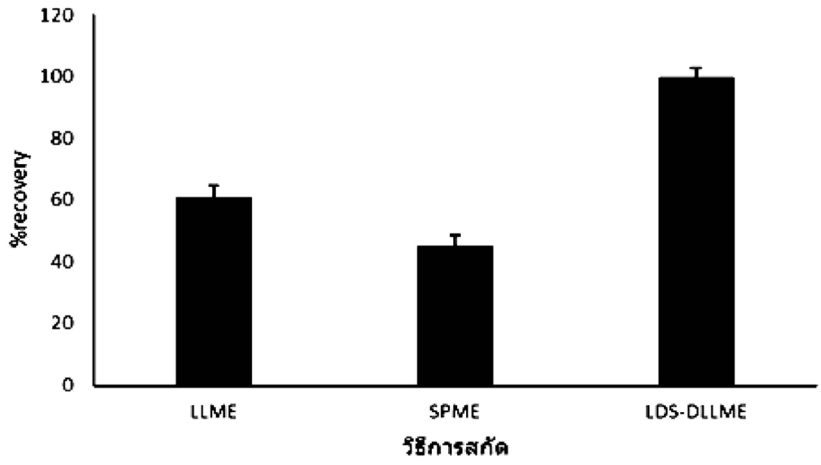
จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมการในการเตรียมตัวอย่างโดยใช้วิธีการสกัดระดับไมโครโดยอาศัยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่ใช้ตัวทำละลายสกัดเป็นชนิดความหนาแน่นต่ำ และการวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้ด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี จากการศึกษาหาค่าความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์กรดแทนนิก โดยการสแกนหาค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร พบว่าที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร คือค่าความยาวคลื่นที่สารสามารถดูดกลืนแสงสูงสุด (λmax) ดังนั้นจึงเลือกวิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิกที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร จากผลการศึกษาสามารถสร้างกราฟมาตรฐานของกรดแทนนิกในช่วงความเข้มข้นเท่า 3 mg/L ถึง 15 mg/L พบว่าให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9990 ให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 0.51$\pm$0.04 mg/L และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 1.70$\pm$0.27 mg/L ให้ค่าร้อยละการกลับคืน เท่ากับ 99.89$\pm$3.59 และในงานวิจัยนี้แสดงค่าความเที่ยงโดยจะแสดงอยู่รูป %RSD เท่ากับ 0.42$\pm$0.02 mg/L ผลการทดลองในแต่ละพารามิเตอร์ทดลองซ้ำ 10 ครั้ง แสดงค่าดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณลักษณะในการวิเคราะห์โดยวิธีที่พัฒนาขึ้น

พารามิเตอร์	ผลที่ได้
สมการเส้นตรง (linearity)	y = 0.0883x – 0.0169
ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)	0.9990
ร้อยละการกลับคืน (%recovery)	99.89$\pm$3.59
ค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)	0.42$\pm$0.02 mg/L
ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD)	0.51$\pm$0.04 mg/L
ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ)	1.71$\pm$0.27 mg/L

ตอนที่ 3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัด

ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดระดับไมโครโดยอาศัยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่ใช้ตัวทำละลายสกัดเป็นชนิดความหนาแน่นต่ำกับวิธีการสกัดโดยทั่วไปคือ การสกัดระดับไมโครด้วยวัฏภาคของเหลว (Liquid-Liquid Microextraction, LLME) และการสกัดระดับไมโครด้วยวัฏภาคของแข็ง (Solid-Phase Microextraction, SPME) ให้ค่าร้อยละการกลับคืน เท่ากับ 99.89$\pm$3.59 60.89$\pm$3.54 และ 45.12$\pm$3.09 ตามลำดับ โดยวิธีการสกัดระดับไมโครด้วยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวโดยใช้ตัวทำละลายสกัดที่หนาแน่นต่ำเป็นวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพดี เนื่องจากให้ค่าร้อยละการกลับคืนสูงสุด ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ผลของการศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสม

จากภาพที่ 6 แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดระดับไมโครโดยอาศัยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่ใช้ตัวทำละลายสกัดเป็นชนิดความหนาแน่นต่ำ นั้นมีประสิทธิภาพดีกว่าเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดโดยทั่วไปคือ การสกัดระดับไมโครด้วยวัฏภาคของเหลว (Liquid-Liquid Microextraction, LLME) และการสกัดระดับไมโครด้วยวัฏภาคของแข็ง (Solid-Phase Microextraction, SPME) ทั้งนี้เพราะวิธี LDS-DLLME มีตัวทำละลายที่ช่วยในการกระจายตัวทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์เคลื่อนที่เข้าสู่ชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ได้เป็นอย่างดี ต่างจากวิธีการสกัดแบบ LLME และ SPME ที่ไม่มีตัวทำละลายที่ช่วยในการกระจายตัวทำให้เกิดกระบวนการส่งผ่านสารเข้าสู่ชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ได้น้อย ดังนั้นวิธี LDS-DLLME จึงเป็นวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพดีที่เหมาะสมแก่การนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืช

ตอนที่ 4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืช

จากการศึกษาทำการวิเคราะห์โดยเลือกสภาวะการสกัดที่ดีที่สุดที่ทำการศึกษาข้างต้นในตอนที่ 1 และตอนที่ 2 มาทดสอบกับตัวอย่างพืชพบปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่าง ดังแสดงตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณของกรดแทนนิกในตัวอย่างพืช

ตัวอย่าง	ปริมาณกรดแทนนิก(mg/L) (n=5)
ใบหูกวาง	8.29±0.28
ใบฝรั่ง	13.00±3.22
ใบกระท้อน	16.21±1.53
ใบยอ	16.16±0.88

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาการพัฒนาวิธีการสกัดระดับไมโครโดยอาศัยการกระจายตัวระหว่างชั้นของเหลวที่ใช้ตัวทำละลายสกัดเป็นชนิดความหนาแน่นต่ำในตัวอย่างพืช พบว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่ดีที่สุด คือ 1-บิวทานอล และตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัวคือเอทานอลต่อน้ำ (20:80) โดยใช้ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการกระจายตัวชนิดละ 800 ไมโครลิตร การทดสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) พบว่าให้ค่าที่ดี โดยกราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 3-15 ppm ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9990 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 0.51$\pm$0.04 mg/L และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 1.71$\pm$0.07 mg/L ผลการทดลองตรวจปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชและผลไม้ที่สภาวะข้างต้น พบว่าสามารถตรวจพบปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืชเท่ากับ 8.29$\pm$0.28 mg/L. ให้ค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 99.89$\pm$3.59 และค่าความแม่น (%RSD) เท่ากับ 0.42$\pm$0.01 mg/L. ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าวิธีดังกล่าวนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิกในตัวอย่างพืช

เอกสารอ้างอิง

[1] นิดดา หงส์วิวัฒน์. (2550). *ผลไม้ 111 ชนิด*. กรุงเทพฯ: แสงแดด.

[2] อรัญญา จุติวิบูลย์สุข. (2556, กรกฎาคม-ธันวาคม). การใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติในการป้องกันผิวหนังจากการถูกทำลายโดยรังสีอัลตราไวโอเลต. *วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี).* 5(10): 110-127.

[3] พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงษ์. (2555). *กรดแทนนิก*. สืบค้นเมื่อ 25 มีนาคม 2558, จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/แทนนิน

[4] นิธิยา รัตนาปนนท์. (2549*).* การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลและกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสของผลมะเขือ 16 สายพันธุ์หลังการเก็บเกี่ยว. *วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร.* 37: 15-18.

[5] กัลยาณี วัฒนธีรางกูร. (2551). *ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากกากเมล็ดสบู่ดำ.* ปริญญาวิทยาศาสตร์ วท.ม. (เคมีสำหรับครู). ขอนแก่น: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

[6] Kermasha; et al. (1995). Analyses of phenolic and furfural compound in concentrated and non-concentrated apple juices. *Food Research International.* 28: 245-252.

[7] Jittawan K.; and Sirithon S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (Momordica charantia L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Journal of Food Chemistry.* 110: 881–890.

[8] Liang G.; et al. (2013). Vortex-assisted micro-solid-phase- extraction followed by low-density solvent based dispersive liquid-liquid microextraction for the fast and efficient determination of phthalate ester in river water sample. *Journal of chromagraphy A.* 1300: 24-30.