การประเมินปริมาณกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดเฟอร์รูลิก และกรดพาราคูมาริก ในเครื่องดื่มน้ำสมุนไพร

EVALUATION ON CHLOROGENIC ACID CAFFEIC ACID FERULIC ACID AND p-COUMARIC ACID IN HERBAL DRINKS

วชิราพรรณ บวรชาติ* *พรพิมล ม่วงไทย*

Wachiraphun Bovornchart, Pornpimol Muangthai*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

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

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดเฟอร์รูริก และกรดพาราคูมาริก ซึ่งจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของกรดไฮดรอกซีซินนามิกแบบพร้อมกันในตัวอย่างน้ำสมุนไพรจากพืช 7 ชนิด ได้แก่ ฝาง ใบหม่อน หญ้าหวาน ปอกระบิด ตะไคร้ ราก สามสิบ และกระเจี๊ยบ โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอร์เรย์ ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง พบว่า สภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ การใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ของกรดแอซีติกความเข้มข้น 5% ผสมกับอะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 85.5:14.5 โดยปริมาตร ควบคุมอัตราการไหลของสารละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 324 นาโนเมตร ผลการประเมินความใช้ได้ของวิธีการทดลอง พบว่า เป็นวิธีการที่ให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) ของกรดไฮดรอกซีซินนามิก 4 ตัวที่ทำการวิเคราะห์อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.08-0.15 และ 0.20-0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 2-100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง (R^2 ≈ 0.9993 – 0.9997) เมื่อนำวิธีการวิเคราะห์ไปใช้ตรวจวัดกรดไฮดรอกซีซินนามิกในน้ำสมุนไพรตัวอย่างนั้น พบว่า น้ำสมุนไพรตรวจพบ กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก และกรดพาราคูมาริก ในช่วง 16.56 – 947.37, 9.04 – 128.73 และ 13.97 – 22.17 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ข้อน่าสังเกตคือ น้ำสมุนไพรตัวอย่างไม่สามารถตรวจพบกรดเฟอร์รูลิก แสดงว่า พืชทั้ง 7 ชนิด อาจไม่ใช่แหล่งสำคัญของกรดเฟอร์รูลิก อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ ทำให้เห็นว่า การดื่มเครื่องดื่มน้ำสมุนไพร จะได้รับสารสำคัญจากกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก

คำสำคัญ: กรดคาเฟอิก กรดคลอโรจีนิก กรดพาราคูมาริก กรดไฮดรอกซีซินนามิก น้ำสมุนไพร

Abstract

The objective of this research was to simultaneously analysis of chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid and *p*-coumaric acid contents in seven types of herbal drinks (*Caesalpinia sappan* Linn., *Morus alba* Linn., *Stevia rebaudiana* Bertoni , *Helicteres isora* L., *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Asparagus racemosus* Willd., and *Hibiscus sabdariffa* L.) by high performance liquid chromatography coupled to diode array detector. The optimization of experimental conditions for the analysis were also studied. The best mobile phase system was 5% acetic acid : acetonitrile with ratio of 85.5:14.5 v/v, controlled flow rate as 1 ml/min and detection wavelength at 324 nm. Regarding the validation of the proposed method, it was found that the limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) for the four acids determined in the range of 0.08-0.15 and 0.20-0.50 mg/L were respectively obtained. The linearity for the four acids determined was in the range of 2-100 mg/L with high correlation coefficient ($R^2 \approx 0.9993 – 0.9997$).This method was applied to analyse the hydroxycinnamic acid in herbal drink samples and revealed that herbal drink contained chlorogenic acid, caffeic acid and *p*-coumaric acid in the range of 16.56-947.37, 9.04-128.73 and 13.97-22.17 mg/L, respectively. It was noticed that, ferulic acid could not be detected in all herbal drinks. This means that all samples may not be the source of ferulic acid. However, this work showed that by drinking of herbal drink will result in obtaining active substances of hydroxycinnamic acid.

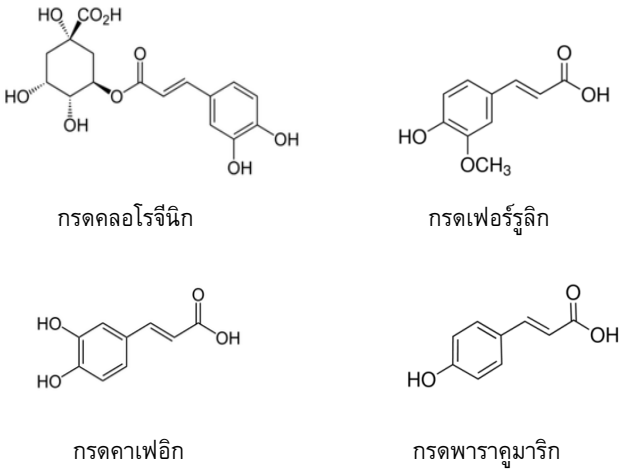
Keywords: Caffeic Acid, Chlorogenic Acid, *p*-coumaric acid, Hydroxycinnamic Acid, Herbal Drinks

บทนำ

ปัจจุบันประชาชนทั่วไปให้ความสำคัญกับการดูแลสุขภาพมากขึ้น พืชสมุนไพรจัดเป็นพืชสำคัญที่คนไทยนำมาใช้ประโยชน์ เช่น รักษาโรค ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร และใช้ในการผลิตเครื่องสำอาง เป็นต้น และนอกจากนี้ยังนำพืชสมุนไพรมาทำเป็นเครื่องดื่ม พืชสมุนไพรแต่ละชนิดนั้นต่างมีประโยชน์และสรรพคุณที่แตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่นำมาใช้ในการบำรุงร่างกายและรักษาโรค เช่น ฝาง (*Caesalpinia sappan* Linn.) ใช้ส่วนเนื้อไม้ แก่นและเปลือก นำมาต้มเป็นยาบำรุงโลหิต แก้ไอ แก้ไข้ แก้หอบ ต้านไวรัส ต้านแบคทีเรีย และใช้เป็นยารักษาแผล ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) ใช้ส่วนใบและลำต้น มีสรรพคุณแก้ไข้ แก้ไอ บำรุงไต บำรุงหัวใจ แก้กษัย ลดความดันโลหิต ป้องกันมะเร็ง ต้านไวรัส และมีฤทธิ์ในทางการลดการอักเสบ หญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni) มีสารให้ความหวาน ใช้แทนความหวานของน้ำตาล ไม่ทำให้อ้วน จึงนิยมนำมาผสมในอาหารสำหรับกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานและผู้ที่ต้องการลดความอ้วน และสามารถป้องกันมะเร็งและต้านแบคทีเรียได้ รากสามสิบ (*Asparagus racemosus* Willd.) ใช้ส่วนรากและใบทำเป็นยา มีสรรพคุณเป็นยาบำรุงกำลัง ลดไขมันในเลือด แก้อาการท้องเสีย ป้องกันโรคมะเร็ง ต้านแบคทีเรีย และใช้เป็นยาระบาย ใบหม่อน (*Morus alba* Linn.) มีสรรพคุณลดปริมานน้ำตาลในเลือดลดความดันโลหิต แก้อาการปวดศรีษะ แก้ไข้ แก้ไอ ป้องกันมะเร็ง ต้านแบคทีเรีย และมีฤทธิ์ป้องกันทางด้านเซลล์สมอง ปอกระบิด (*Helicteres isora* L.) ใช้ส่วนราก เปลือกลำต้นและผล นำมาต้มช่วยแก้อาการท้องร่วง ท้องอืด ป้องกันโรคเบาหวาน โรคความดันโลหิต และต้านไวรัส กระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* L.) ใช้ส่วน

ผลนำมาต้มมีสรรพคุณบำรุงเลือดลดความดันโลหิต ลดอาการแก้ไอ ช่วยขับปัสสาวะ เป็นยาระบาย ลดไขมันในเส้นเลือด และป้องกันมะเร็ง เป็นต้น [1-9]

จากที่กล่าวมาข้างต้นพืชสมุนไพรมีประโยชน์มาก เนื่องจากอุดมไปด้วยเกลือแร่ วิตามิน และที่สำคัญเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds) หลายชนิด สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ตามธรรมชาติ พบในอาหารและเครื่องดื่มที่ได้จากพืช เช่น ผัก ผลไม้ สมุนไพร ธัญพืชต่างๆ ไวน์ เบียร์ ชา และกาแฟ เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกนั้นมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [10-11] ซึ่งมีบทบาทในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ [12] ไม่ให้ทำลายองค์ประกอบเซลล์ต่างๆ ทำให้ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคต่างๆ ทั้งนี้ในสมุนไพรจะพบสารสำคัญโดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มกรดฟีนอลิกที่สำคัญหลายชนิด แต่ที่น่าสนใจคือ กรดฟีนอลิกในกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก ได้แก่ กรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic Acid) กรดเฟอร์รูลิก (Ferulic Acid) กรดคาเฟอิก (Caffeic Acid) และกรดพาราคูมาลิก (*p*-coumaric Acid) เนื่องจากเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ยับยั้งการเกิดมะเร็ง ลดความเสี่ยงการเป็นเบาหวาน มีฤทธิ์ต้านไวรัสและแบคทีเรีย เป็นต้น โครงสร้างของกรดไฮดรอกซีซินามิกบางชนิด แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของกรดไฮดรอกซีซินนามิก

อย่างไรก็ตามคนไทยในปัจจุบันมีวิธีการดูแลรักษาสุขภาพโดยการบริโภคพืชสมุนไพร ซึ่งพืชสมุนไพรแต่ละชนิดนั้นมีกลิ่น รสเป็นเอกลักษณ์ ซึ่งอาจจะยากต่อการบริโภค จึงนิยมนำพืชสมุนไพรมาต้มเป็นน้ำสมุนไพรและปรุงรสจำหน่าย นอกจากนี้ผู้บริโภคอาจจัดหาพืชสมุนไพรอบแห้งมาแปรรูปเป็นน้ำสมุนไพรเอง ทั้งนี้พบว่าพืชสมุนไพรที่ได้รับความนิยมบริโภคในรูปน้ำสมุนไพร ได้แก่ น้ำกระเจี๊ยบ น้ำตะไคร้ น้ำหญ้าหวาน น้ำฝางน้ำใบหม่อนน้ำปอกระบิดและน้ำรากสามสิบ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างน้ำสมุนไพร ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลสำคัญแก่ผู้บริโภคน้ำสมุนไพร และทราบถึงคุณประโยชน์ที่สำคัญของพืชสมุนไพร อีกทั้งเป็นการช่วยกระตุ้นให้มีความสนใจเกี่ยวกับพืชสมุนไพร เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ ด้านสุขอนามัย ด้านเศรษฐกิจ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของวิธีการในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างน้ำสมุนไพร

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอร์เรย์ จากบริษัท Hewlett- Packard รุ่น HP 1100
- คอลัมน์ C18 (pHendure 5 ไมโครเมตร ขนาด 250×4.60 มิลลิเมตร) จากบริษัท VertiSep
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออนรุ่น LaboStar จากบริษัท Siemens
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น AB104-S) จากบริษัท Mettler Toledo
- เครื่องให้ความร้อน (hotplate)
- ชุดกรองวัฏภาคเคลื่อนที่ขนาด 1000 มิลลิลิตร จากบริษัท Altech
- ไซรินจ์ฟิลเตอร์ (Syringe Filters) ชนิดไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน จากบริษัท Vertical
- กระดาษกรอง
- สารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดเฟอร์รูลิก กรดคาเฟอิก และกรดพาราคูมาริก จากบริษัท Sigma-Aldrich
- กรดอะซิติก (Acetic acid, AR grade) จากบริษัท Merck
- เมทานอล (Methanol, HPLC grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- เมทานอล (Methanol, AR grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents
- อะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile, HPLC grade) จากบริษัท Carlo Erba Reagents

ตัวอย่างพืชสมุนไพร

ฝาง (เนื้อไม้) ใบหม่อน (ใบ) หญ้าหวาน (ใบ) ปอกระบิด (ผล) ตะไคร้ (ใบและลำต้น) รากสามสิบ (ราก) และกระเจี๊ยบ (ผล) พืชทั้งหมดนี้เป็นพืชสมุนไพรโอท๊อปที่จำหน่ายโดยศูนย์จำหน่ายผลิตภัณฑ์โอท๊อปเลียบทางด่วนรามอินทรา เขตบางเขน แขวงอนุสาวรีย์ กรุงเทพมหานคร

ตอนที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของวิธีการในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดเฟอร์รูลิก กรดคาเฟอิก และกรดพาราคูมาริกความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานอย่างละ 0.0250 กรัม นำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนมีปริมาตรครบ 25 มิลลิลิตร สารละลายมาตรฐานนี้ใช้สำหรับการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อไป

1.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ทำการศึกษาโดยใช้สารละลายมาตรฐานผสมกรดคลอโรจีนิก กรดเฟอร์รูลิก กรดคาเฟอิก และกรดพาราคูมาริกที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และกำหนดสภาวะต่างๆ ดังนี้ คอลัมน์ C18 (pHendure 5 ไมโครเมตร ขนาด 250×4.60 มิลลิเมตร) ตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอร์เรย์ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 324 นาโนเมตร

1.2.1 ศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ทดลอง คือ กรดแอซีติกความเข้มข้น 5% และอะซีโตไนไตรล์ กำหนดอัตราการไหลคงที่ที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ทั้งนี้ได้ศึกษาผลการแปรผันอัตราส่วนของวัฏภาค

เคลื่อนที่คือ 90:10 86:14 85:15 85.5:14.5 และ 80:20 โดยปริมาตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และบันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์

1.2.2 ศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

ผลการศึกษาในข้อ 1.2.1 จะเลือกอัตราส่วนวัฏภาคที่เหมาะสม และนำมาศึกษาผลการแปรผันอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ 0.4 0.5 0.7 0.8 0.9 1.0 1.2 และ 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และบันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์

1.3 ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

1.3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity Range)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดเฟอร์รูลิก กรดพาราคูมาลิก และกรดพาราคูมาริกในช่วงความเข้มข้น 2 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วฉีดสารละลายมาตรฐานปริมาตร 20 ไมโครลิตรที่ผ่านการกรองด้วยไซรินจ์ฟิลเตอร์เมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน เข้าสู่คอลัมน์ C18 ของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ และสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดเฟอร์รูลิก กรดคาเฟอิก และกรดพาราคูมาริก

1.3.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of Detection, LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of Quantitation, LOQ)

ทำการเจือจางสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก กรดเฟอร์รูลิก กรดคาเฟอิก และกรดพาราคูมาริก และฉีดที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม ทำการวิเคราะห์จนได้ความเข้มข้นที่มีสัดส่วนของสัญญาณของสารที่วัดได้เป็น 3 และ 10 เท่าของสัญญาณรบกวน (Noise) ซึ่งเป็นค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ตามลำดับ

ตอนที่ 2 วิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างน้ำสมุนไพร

2.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำสมุนไพร

ชั่งตัวอย่างสมุนไพร 5 กรัม เติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการต้ม โดยศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการต้มที่แตกต่างกัน 3 สภาวะ ดังนี้

สภาวะที่ 1 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ทำการต้มเป็นเวลา 30 นาที

สภาวะที่ 2 อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ทำการต้มเป็นเวลา 15 นาที

สภาวะที่ 3 อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ทำการต้มเป็นเวลา 5 นาที

แล้วทำการกรองด้วยกระดาษกรองเก็บตัวอย่างเพื่อไว้ทดลองต่อไป

2.2 วิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างน้ำสมุนไพร

นำตัวอย่างจากข้อ 2.1 กรองด้วยไซรินจ์ฟิลเตอร์เมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองตอนที่ 1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกโครมาโทแกรมและคำนวณหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก (กรดคลอโรจีนิก กรดเฟอร์รูลิก กรดคาเฟอิก และกรดพาราคูมาริก) ในตัวอย่างน้ำสมุนไพร

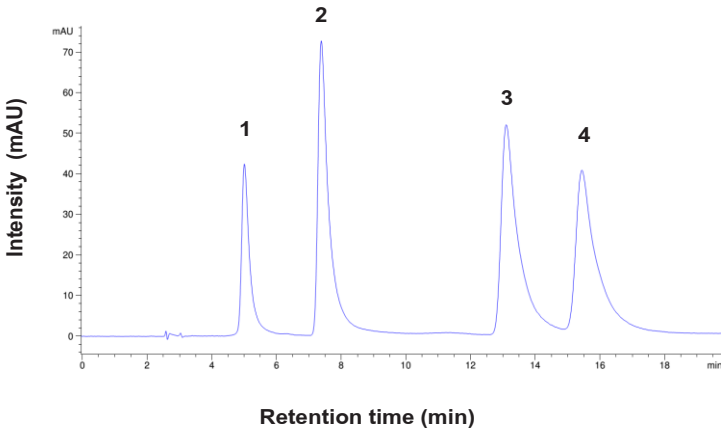
ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของวิธีในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

1.1 องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

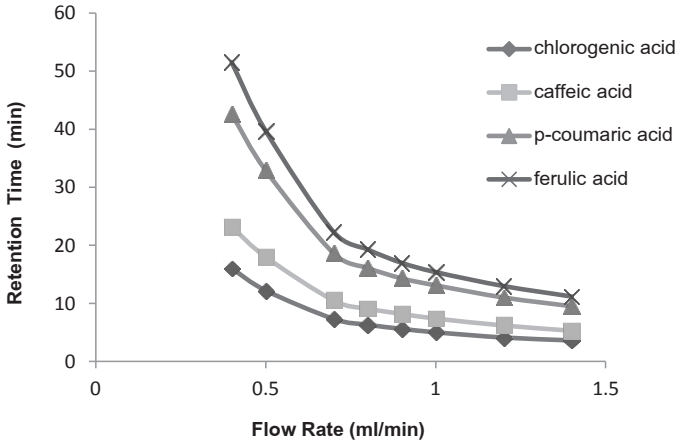
องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนั้นเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ ซึ่งจะส่งผลถึงความสามารถในการแยกและลักษณะของพีกจากการศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ของสารละลายผสมระหว่างกรดแอซีติกความเข้มข้น 5% และอะซีโตไนไตรล์ที่อัตราส่วน 90:10 86:14 85:15 85.5:14.5 และ 80:20 โดยปริมาตร พบว่าสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้น 5% และอะซีโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 85.5:14.5 โดยปริมาตร นั้นสามารถแยกสารทั้ง 4 ชนิดได้ดีที่สุด และลักษณะของพีคที่ได้มีความสมมาตรกัน แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมที่ได้จากการแยกกรดไฮดรอกซีซินนามิก
1 แทน กรดคลอโรจีนิก
2 แทน กรดคาเฟอิก
3 แทน กรดพาราคูมาริก
4 แทน กรดเฟอร์รูลิก

1.2 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

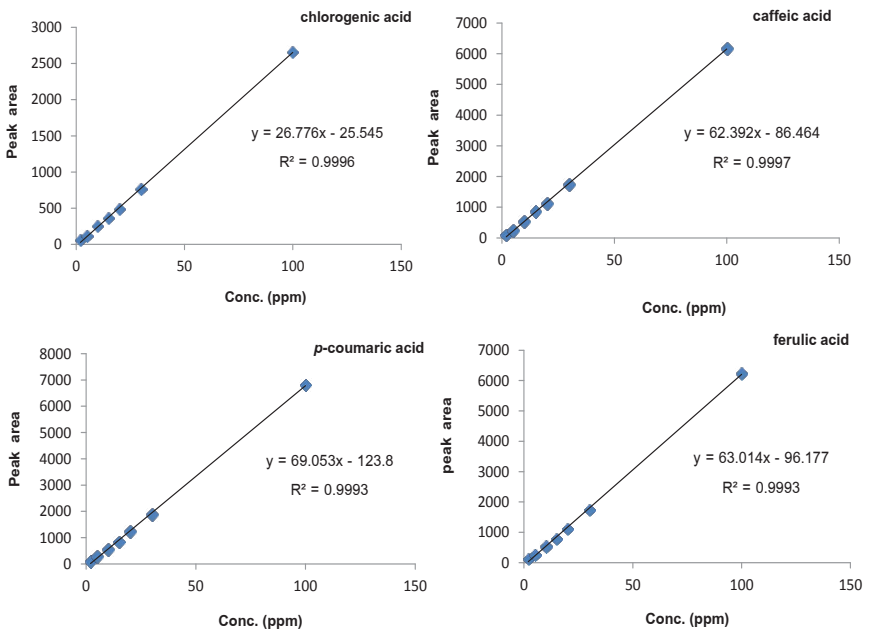
การศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ทำการศึกษาอัตราการไหลที่ 0.4 0.5 0.7 0.8 0.9 1.0 1.2 และ 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที และมีองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ กรดแอซีติกความเข้มข้น 5% และอะซีโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 85.5:14.5 โดยปริมาตร ดังแสดงดังภาพที่3พบว่าการเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่จะทำให้ชะสารออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยลง แต่การใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่สูงจะทำให้อนุภาคของสารเกิดการถ่ายโอนมวลสารระหว่างวัฏภาคนิ่งกับวัฏภาคเคลื่อนที่ลดลง ทำให้สมดุลของอันตรกิริยาการกระจายตัว (Partition Coefficient , K) ระหว่างโมเลกุลของสารกับวัฏภาคนิ่งและวัฏภาคเคลื่อนที่ลดลงส่งผลทำให้ค่าการแยก (Resolution) ลดต่ำลงด้วย [13] และจากการศึกษาพบว่าอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม คือ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพที่ 3 ผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

2. ประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง โดยทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 2 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า กราฟมาตรฐานที่ได้มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง ($R^2 \approx 0.9993 - 0.9997$) ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานของกรดไฮดรอกซีซินนามิก

สำหรับค่าขีดจำกัดที่สามารถตรวจวัดได้และค่าขีดจำกัดที่สามารถวิเคราะห์ได้ผลแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าขีดจำกัดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ)

กรดไฮดรอกซีซินนามิก	ค่าขีดจำกัดที่สามารถตรวจวัดได้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าขีดจำกัดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
กรดคลอโรจีนิก	0.08	0.26
กรดคาเฟอิก	0.06	0.20
กรดพาราคูมาริก	0.10	0.33
กรดเฟอร์รูลิก	0.15	0.50

ตอนที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างน้ำสมุนไพร

ในการทดลองนี้ได้ทำการเตรียมตัวอย่างน้ำสมุนไพรโดยการต้มที่อุณหภูมิและระยะเวลาในการต้มที่แตกต่างกัน ผลการศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิและระยะเวลาในการต้ม พบว่า การเตรียมตัวอย่างน้ำสมุนไพรในอุณหภูมิที่สูงและใช้ระยะเวลาในการต้มสั้นนั้นเหมาะสมที่สุด (สภาวะที่ 3 อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส / เวลา 5 นาที) เนื่องจากสามารถตรวจพบปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกได้มากที่สุด ซึ่งผลที่เป็นเช่นนี้เป็นผลมาจากการที่ใช้ระยะเวลาในการต้มเป็นเวลานานเกินไป อาจทำให้สารถูกทำลาย

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในน้ำสมุนไพรทุกชนิด พบว่า ในน้ำสมุนไพรตรวจพบกรดไฮดรอกซีซินนามิก 3 ชนิด ได้แก่ กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก และกรดพาราคูมาริก ส่วนกรดเฟอร์รูลิกไม่สามารถตรวจพบในน้ำสมุนไพรทุกชนิด ผลแสดงตารางที่ 2 และภาพที่ 5 แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมของการตรวจวัดกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างน้ำสมุนไพรหญ้าหวานที่เตรียมโดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในการต้มเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส และ 5 นาที

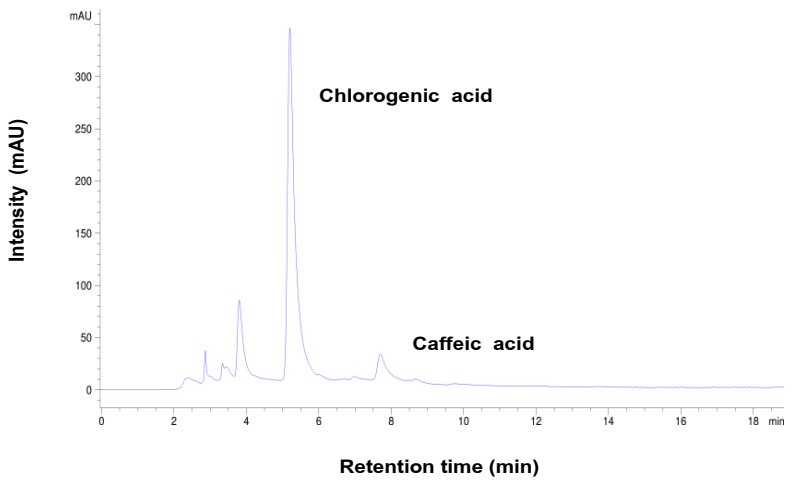
ตารางที่ 2 ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร

ตัวอย่าง	สภาวะการทดลอง	กรดไฮดรอกซีซินนามิก (mg/l±SD)			
		กรดคลอโรจีนิก	กรดคาเฟอิก	กรดพาราคูมาริก	กรดเฟอร์รูลิก
ฝาง	1	16.56±0.49	nd	nd	nd
	2	17.36±0.59	nd	nd	nd
	3	18.21±0.62	nd	nd	nd
ใบหม่อน	1	241.96±0.92	nd	nd	nd
	2	466.67±0.57	nd	nd	nd
	3	602.21±0.56	nd	nd	nd
หญ้าหวาน	1	745.60±0.61	43.04±0.52	nd	nd
	2	824.80±0.40	47.86±0.58	nd	nd
	3	947.37±0.53	128.73±0.67	nd	nd

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างพืชสมุนไพร (ต่อ)

ตัวอย่าง	สภาวะการทดลอง	กรดไฮดรอกซีซินนามิก (mg/l±SD)			
		กรดคลอโรจีนิก	กรดคาเฟอิก	กรดพาราคูมาริก	กรดเฟอร์รูลิก
ตะไคร้	1	23.24±0.51	nd	13.97±0.47	nd
	2	25.64±0.45	nd	14.31±0.21	nd
	3	30.57±0.48	nd	22.17±0.27	nd
รากสามสิบ	1	nd	13.77±0.51	nd	nd
	2	nd	15.01±0.45	nd	nd
	3	nd	33.92±0.56	nd	nd
กระเจี๊ยบ	1	216.36±0.54	9.04±0.73	nd	nd
	2	258.07±0.43	21.13±0.67	nd	nd
	3	279.36±0.48	18.64±0.64	nd	nd

หมายเหตุ nd หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบสารด้วยวิธีที่ทำการทดลองในงานวิจัย



ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำหญ้าหวาน

สรุปและอภิปรายผล

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างน้ำสมุนไพร จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิก พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ กรดแอซีติกเข้มข้น 5% และอะซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 85.5:14.5 โดยปริมาตร และใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์พบว่า กราฟมาตรฐานของกรดไฮดรอกซีซินนามิกที่ทำการวิเคราะห์ 4 ตัวมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 2-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง (R^2 ≈ 0.9993 – 0.9997) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) อยู่ในช่วง 0.06 - 0.15 และ 0.20 – 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการ

วิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซินนามิกในตัวอย่างน้ำสมุนไพร พบว่า ในน้ำสมุนไพรมีกรดไฮดรอกซีซินนามิก 3 ชนิด คือ กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก และกรดพาราคูมาริก ส่วนกรดเฟอร์รูลิกไม่สามารถตรวจพบได้ ซึ่งน้ำสมุนไพรหญ้าหวานนั้นมีกรดคลอโรจีนิก และกรดคาเฟอิกมากที่สุด ส่วนกรดพาราคูมาริกนั้นพบในน้ำตะไคร้

เอกสารอ้างอิง

[1] Badami, S.; Moorkoth, S; & Suresh, B. (2004). *Caesalpinia sappan* a medicinal and dye yielding plant. *Natural Product Radiance*. 3(2): 75-82.

[2] Ekpenyong, C.E.; Akpan, E.E.; & Daniel, N.E. (2014). Phytochemical Constituents, Therapeutic Applications and Toxicological Profile of *Cymbopogon citratus* Stapf (DC) Leaf Extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 3(1): 133-141.

[3] Ghosh, S.; Subudhi, E; & Nayak, S. (2008). Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens. *International Journal of Integrative Biology*. 2(1): 27-31.

[4] Singh, S.; Garg, V.; Yadav, D.; Beg, M.N.; & Sharma, N. (2012). *In-vitro* antioxidative and antibacterial activities of various parts of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 4(3): 468-473.

[5] Sankar, N.S.; & Mirinal, B. (2011). Effect of extracts from *Asparagus racemosus* willd root against pathogenic bacteria. *International journal of applied biology and pharmaceutical technology*. 2(3): 312-314.

[6] Zafar, M.S.; Muhammad, F.; Javed, I.; Akhtar, M.; Khaliq, T.; Aslam, B.; Waheed, A.; Yasmin, R.; & Zafar, H. (2013). *White mulberry* (Morus alba): A brief phytochemical and pharmacological evaluations account. *International Journal of Agriculture & Biology*. 15: 612-620.

[7] Devi, B.; Sharma, N.; Kumar, D.; & Jeet, K. (2013). *Morus alba* Linn : A phytopharmacological review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 5(2): 14-18.

[8] Basniwal, P.K.; Suthar, M.; Rathore, G.S.; Gupta, R.; Kumar, V.; Pareek, A.; & Jain, D. (2009). In-vitro antioxidant activity of hot aqueous extract of *Helicteres isora* Linn. fruits. *Natural Product Radiance.* 8(5): 483-487.

[9] Mahadevan, N.; Kamboj, S.; & Kamboj, P. (2009). *Hibiscus sabdariffa* Linn.-An overview. *Natural Product Radiance*. 8(1): 77-83.

[10] เจนจิรา จิรัมย์; และ ประสงค์ สีหานาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์*. 1(1): 59-70. สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม 2558, จาก http://www.kpi.msu.ac.th/upload/ag_tor_ref_ bymst/ag_9_in_2.1.2.1_6_377().pdf

[11] บุหรัน พันธุ์สวรรค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารมหาวิทยาลัยพะเยา*. 21(3): 275-286. สืบค้นเมื่อ 9 ตุลาคม 2558, จาก http://www.tci- thaijo.org/index.php/tstj/article/view/12696

[12] สมบัติ คงวิทยา. (2554). เพอร์ออกซิเดสและสารต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*. 2(1): 69-74.

[13] แม้น อมรสิทธิ์; และคณะ. (2553). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์. 50.