บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. การเตรียมตัวอย่างเปลือกผลทับทิม

ตัวอย่างเปลือกผลทับทิมไทย ทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นบดให้ละเอียดได้ง่าย ผงเปลือกทับทิมที่จากผงเปลือกทับทิมทั้ง 3 ช่วงอายุมีสีเหลือง – เหลืองปนน้ำตาลอ่อนต่างกันเล็กน้อย

2. การสกัดเปลือกทับทิมและการทำ acid hydrolysis

2.1 การสกัดและการทำ acid hydrolysis **ของเปลือกทับทิมในช่วงอายุต่าง ๆกัน**

เมื่อเปรียบเทียบผลการสกัดที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆกัน คือ 40 % เอธานอล, 60% เอธานอล , 80% เอธานอล และ น้ำ:เอธานอล: กรดอะซิติก (10:10:1) ในการสกัดเปลือกทับทิมไทยพบว่าได้ yield จากกการสกัดด้วย น้ำ:เอธานอล: กรดอะซิติก (10:10:1) สูงที่สุด (1.08, 3.88, 1.87 และ 4.80 จากการใช้ตัวทำละลายเป็น 40 % เอธานอล, 60% เอธานอล , 80% เอธานอล และ น้ำ:เอธานอล: กรดอะซิติก (10:10:1) ตามลำดับ) นั่นคือการใช้ตัวทำลายละลายเพียงน้ำและเอธานอลใน % yield ที่น้อยกว่าซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จาก Lu และ Yuan [19] ซึ่งได้รายงานถึงผลการสกัดเปลือกทับทิมจีนด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน พบว่าการกวนเปลือกทับทิมด้วยตัวทำละลายที่มีกรดอะซิติกผสมด้วยในอัตราส่วน น้ำ:เอธานอล: กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 10:10:1 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ได้ผลสารสกัด ellagitannins ออกจากเปลือกทับทิมได้มากที่สุด แต่มีข้อสังเกตว่า ในผลการสกัดเปลือกทับทิมจีนด้วยตัวทำละลายเป็น 40 % เอธานอล, 60% เอธานอล , 80% เอธานอล เพื่อเปรียบเทียบนั้นปริมาณตะกอนที่ได้ พบว่าตะกอนที่ได้จาก 40 % เอธานอล มีปริมาณสูงกว่าจาก 60% เอธานอล และ 80% เอธานอล ตามลำดับ (4.34, 3.62, 2.28) ซึ่งพบว่าในขณะกรองนั้นการใช้ตัวทำละลายเป็น 40% เอธานอลในการสกัดเปลือกทับทิมไทย จะได้สารลักษณะเหนียว ไม่แยกชั้นหลังปั่น และทำให้กรองได้ ถึงแม้จะทำการปั่นเหวี่ยง 2 รอบ จึงส่งผลให้น้ำหนักตะกอนที่ได้น้อยมาก ผลที่ได้จึงแตกต่างจากการสกัดทับทิมจีนซึ่งได้ % yield สูงถึง 4.34 % ผลการสกัดที่ได้ในทับทิมจีนนี้แตกต่างจากที่มีการรายงานโดย Panichayuakaranant ค่อนข้างมาก ซึ่งอาจมาจากความแตกต่างของแหล่งผลิตทับทิมที่นำมาทำการทดลองด้วย ในการศึกษาเปรียบเทียบผลของอายุต่อน้ำหนัก yield ที่ได้จึงเลือกตัว น้ำ:เอธานอล:กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 10:10:1 เป็นตัวทำละลายในการศึกษาต่อ หลักจาการ stir

ละลายชนิดต่างๆในความร้อน สารสกัดที่ได้มีความเหนียว ไม่สามารถกรองออกได้ ต้องทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที หลังจากนั้นจึงทำการไฮโดรไลซิสโดยใช้กรดซัลฟุริกเข้มข้น 5% เป็นตัวเร่ง ทุกตัวอย่างได้ตะกอนลักษณะคล้ายกันคือเป็นตะกอนสีน้ำตาลเข้ม – ดำ น้ำหนักตะกอนที่ได้อยู่ในช่วง 4.8 -5.6 กรัม แต่อย่างไรก็ตามปริมาณกรดเอลลาจิกที่พบมีปริมาณมากกว่าที่พบในผลเบอร์รีชนิดต่างๆรวมถึงในเปลือกเมล็ดลำไยด้วย [18]

3. การวิเคราะห์สาร

3.1 การตรวจสอบเบื้องต้นด้วย TLC

จากการตรวจสอบเบื้องต้นโดยวิธี TLC ได้ Rf ของสารสกัดหลังทำการ hydrolysis เท่ากับมาตรฐานกรดเอลลาจิก ซึ่ง Rf ที่ได้ (Rf = 0.31) สูงกว่าก่อนทำ hydrolysis แสดง (Rf = 0.14) เนื่องจากมีการ cyclization เกิดเป็นกรดเอลลลาจิก

3.2. การวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลวโดย Differential Scanning Calorimeter (DSC)

เมื่อนำตะกอนหลังจากการทำ hydrolysis และตกตะกอนครั้งแรกใน methanol ไปวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่อง DSC แล้วนำไปสร้าง thermogram พบว่าให้ peak ของจุดหลอมเหลวในลักษณะเดียวกันทั้งหมดนั่นคือ สารส่วนใหญ่จะให้ peak ในช่วงประมาณ 168-175 °C และ peak ที่ 2 ปรากฏในอุณหภูมิสูงกว่า 350°C อยู่ แต่ไม่สามารถบอกจุดหลอมเหลวที่แน่นอนได้ เพราะข้อจำกัดของเครื่อง DSC ที่ใช้อยู่คือสามารถวัดจุดหลอมเหลวได้สูงสุดเพียง 500°C เท่านั้น และนอกจากนี้การที่ thermogram มีเส้นกราฟที่พุ่งสูงขึ้นไม่เป็น peak เนื่องมาจากผลึกของกรดเอลลาจิกเกิดการสลายตัวทันที จึงไม่สามารถบอกจุดหลอมเหลวที่แน่นอนได้ ซึ่งจากผลที่ได้สามารถแปลความได้ว่า สารที่ได้มีจุดหลอมเหลวประมาณ 2 ช่วง ซึ่งเมื่อพิจารณา themogram ของสารมาตรฐานกรดเอลลาจิกพบ peak แรก ที่ 168.103 °C และ peak ที่สองพบที่อุณหภูมิสูงกว่า 350°C Themogram ของสารมาตรฐานนี้ปรากฏ peak เล็กๆบริเวณ 168.100 °C ซึ่งคาดว่าเป็นของ impurity ที่มีปนในสารมาตรฐานที่ใช้ซึ่งในใบ certification ระบุว่ามีความบริสุทธิ์ 96.0%

ตะกอนที่ได้จากการสกัดเปลือกทับทิมไทยช่วงอายุต่างๆกัน พบว่า มี peak ที่หนึ่งเกิดขึ้นบริเวณ 176.044, 175.961 และ 172.109 °C ของเปลือกทับทิมอายุ 0-25 วัน, 26-50 วัน และ 51-75 วันตามลำดับ โดยจากตัวอย่าง 26-50 วัน และ 51-75 วัน พบว่ามี peak ขนาดเล็กอีก themogram ละ 2 peak บริเวณ 155-160 °C ผลที่ได้สามารถชี้ให้เห็นว่าตะกอนจากตัวอย่าง 26-50 วัน และ 51-75 วัน มีสารปนเปื้อนอยู่ด้วย

เมื่อพิจารณา thermogram ของเปลือกทับทิมจีนที่สกัดได้และนำไปทำการตกตะกอนซ้ำหลายครั้งใน methanol พบ thermogram ในลักษณะเดียวกัน แต่ลักษณะ peak ขนาดเล็กที่ตำแหน่งอุณหภูมิ 173.557 °C มีขนาดเล็กลงในตะกอนที่ตกผลึกซ้ำครั้งที่ 2 และหายไปในตะกอนที่ตกผลึกซ้ำครั้งที่ 3 แสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่าสารมีความบริสุทธิ์มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถบอกถึง %purity จากวิธีนี้ได้ จากการศึกษาของ Nara[19] ซึ่งมีการใช้ DSC ในการวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลวของกรดเอลลาจิกพบว่า หากทำการตกผลึกใหม่จำนวนมากครั้ง ก็จะได้กรดเอลลาจิกที่บริสุทธิ์มากขึ้น โดยสังเกตจุดหลอมเหลวที่เริ่มหลอม จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่สูงมากขึ้น ซึ่งเป็นไปตาม colligative properties ของสาร คือถ้าสารไม่บริสุทธิ์จุดหลอมเหลวจะลดต่ำลง

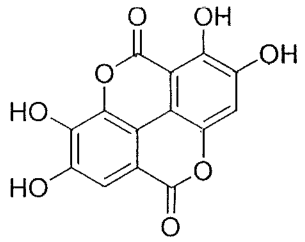
3. **การวิเคราะห์หาความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) โดย** UV-Visible Spectrophotometer

เมื่อพิจารณาลักษณะการดูดกลืนแสงของตะกอนที่ได้จากการสกัดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดเอลลาจิก พบว่าตะกอนที่ได้ให้ peak ของการดูดกลืนแสงในลักษณะเดียวกัน โดยทุกตัวจะมี λ_{max} 2 ค่าคือ ช่วง 366.0 – 366.5 และ 286.0 – 288.5 nm มีเพียงผลึกจากเปลือกทับทิมจีนที่ได้จากการสกัดโดย 60% methanol ที่ให้ค่า shift ไปเล็กน้อยที่ 291.5 nm แต่ก็จัดว่าอยู่ในช่วงจากการศึกษาของ Nara[20], Lu and Yuan[19] และ monograph ของกรดเอลลาจิก ให้ข้อมูลว่ากรดเอลลาจิกจะดูดกลืนแสงที่ λ_{max}= 254 nm พบว่ามีค่าแตกต่างไปเล็กน้อย แต่ค่าที่ได้นี้ตรงกับสารมาตรฐานกรดเอลลาจิกซึ่งมีขายใน % purity 96.0 ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าตะกอนที่ได้เป็นกรดเอลลาจิกเช่นเดียวกัน

4. **การวิเคราะห์หา** Finger print **จาก** IR Spectrum **โดย** FT-IR Spectrometer

การยืนยันโครงสร้างสามารถทำได้โดยการใช้ IR spectrophotometry ในส่วนของ finger print region เทียบระหว่างสารมาตรฐานกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบลักษณะของ IR spectrum ที่ได้ ในช่วงความยาวคลื่น 500 cm^{-1}- 1500 cm^{-1} พบว่าได้สารที่มีลักษณะ IR spectrum เหมือนกัน ทั้งสารมาตรฐาน และสารสกัดที่ได้จาก ตัวอย่างทับทิมทั้ง 3 ช่วงอายุ ดังแสดงในตารางที่ 7 จึงสามารถยืนยันได้ว่าผลึกที่ได้ควรเป็นกรดเอลลาจิก

เมื่อพิจารณาในส่วนของ functional group region ของ IR spectrum ที่ได้พบว่าสารทุกตัวมี broad, strong peak ที่ความยาวคลื่นประมาณ 3100 – 3150 cm^{-1} ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่เกิดจาก O-H stretching ของหมู่ phenols ช่วง 1700 – 1708 cm^{-1} ซึ่งมีลักษณะเป็น strong peak เป็นช่วงคลื่นที่เกิดจาก C=O stretching ของหมู่



ellagic acid

ดังนั้นจากลักษณะ TLC, UV spectrum และ IR spectrum ที่ได้ จึงสามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างที่สกัดได้เป็นกรดเอลลาจิก

สรุปผลการวิจัย

ถึงแม้ว่าผลไทยทิมสายพันธุ์พื้นเมืองไทยจะให้ปริมาณกรดเอลลาจิกน้อยกว่าเปลือกทับทิมจากจีน แต่จัดได้ว่าเป็นแหล่งให้กรดเอลลาจิกในปริมาณสูงแหล่งหนึ่ง โดยควรใช้ผลแก่จะให้กรดเอลลาจิกในปริมาณที่สูงกว่าผลอ่อน วิธีการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ทำได้ไม่ยาก และสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการ การติดตามความบริสุทธิ์เบื้องต้นอาจทำได้โดยการติดตามผลการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DSC ซึ่งทำให้การวิเคราะห์ทำได้รวดเร็ว จากผลวิจัยนำทำให้ได้กรดเอลลาจิกซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางด้านยา อาหารเสริม หรือเครื่องสำอางต่อไปได้