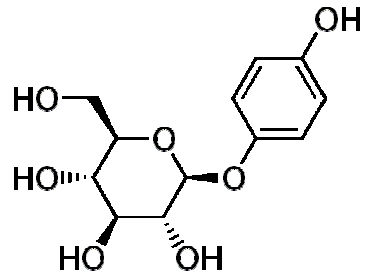
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1.1อาร์บูติน(Arbutin)(คณิต ลูกรักษ์: 2540 หน้า 10-16)

อาร์บูตินเป็นอนุพันธ์ของไฮโดรควิโนนชนิดหนึ่ง มีชื่อเรียกทางเคมีว่า 4-ไฮดรอกซีฟีนิล-บีตา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (4-hydroxyphenyl-beta-D-glucopyranoside)เป็นสารจำพวกไกลโคไซด์ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose)ยึดติดกับโมเลกุลของไฮโดรควิโนนมีทางสูตรเคมีคือ $C_{12}H_{16}O_7$น้ำหนักโมเลกุล 272.25 กรัมต่อโมลและมี สูตรโครงสร้างดังนี้



Hydroquinone-β-D-glucopyranoside

รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างอาร์บูติน

2.1.2 อาร์บูตินสามารถสกัดได้จากพืชและสามารถสังเคราะห์ได้จากกระบวนการทางเคมี คือ

(1) สังเคราะห์จากอะซิโตบลอมกลูโคส(acetobromglucose)และไฮโดรควิโนน (Hydroquinone)

(2) สังเคราะห์จากบีตา-ดี-กลูโคสเพนตะอะซิเตต (β-D-glucose pentaacetate) กับไฮโดรควิโนนโมโนเบนซิลอีเทอร์ (hydroquinone Monobenzyl Ether) ใน ฟอสฟอรัสออกซีคลอไรด์ (phosphorousoxychloride; $POCl_3$)

2.1.3 คุณสมบัติทางกายภาพของอาร์บูติน

เป็นผลึกสีขาวมีขนาดเล็กละเอียดไม่มีกลิ่นมีรสขมดูดความชื้นได้ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ272.25 กรัมต่อโมลจุดหลอมเหลวเท่ากับ 190-212 องศาเซลเซียสและความเป็นกรดเป็นด่าง pH 6.0-7.0 (ที่ความเข้มข้นของสารละลายอาร์บูตินร้อยละ 1)

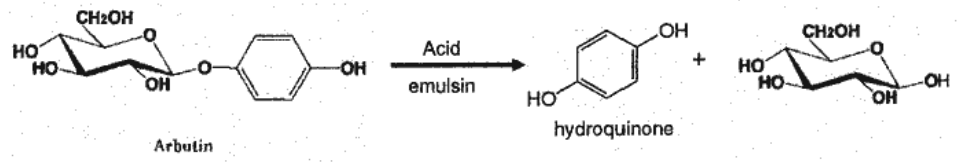
2.1.3.1 สมบัติทางเคมีของอาร์บูติน

(1) คุณสมบัติในการละลาย เนื่องจากอาร์บูตินมีโครงสร้างของน้ำตาลเป็นส่วนประกอบในโมเลกุล จึงสามารถละลายได้ดีในน้ำร้อนและแอลกอฮอล์

(2) ปริมาณอาร์บูตินที่ใช้ในเครื่องสำอางอาร์บูติน ความเข้มข้นประมาณ 3 – 7เปอร์เซ็นต์ผสมในเครื่องสำอางเพื่อทำให้ผิวขาวขึ้น โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสทำให้การสร้างเม็ดสีเมลานินลดลง

2.1.4 ไฮโดรไลซีสของอาร์บูติน

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างและปฏิกิริยาทางเคมีแล้วก็จะทำให้เห็นว่าอาร์บูติน คือสารประกอบประเภทไกลโคไซด์ที่ประกอบไปด้วยโมเลกุลของไฮโดรควิโนนยึดติดกับโมเลกุลของกลูโคส อาร์บูตินสามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายด้วยกรดเจือจางหรือเอนไซม์อิมัลซัน เนื่องจากกลูโคสที่เป็นส่วนของน้ำตาลในไกลโคไซด์ของอาร์บูตินนั้นมีการจัดเรียงตัวแบบบีตา-สเตอริโอไอโซเมอร์(β-Stereoisomers จึงทำให้อาร์บูตินสามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ด้วยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่อิมัลซันเท่านั้น ส่วนเอนไซม์มอลเทส (enzyme maltase)จะสามารถไฮโดรไลซ์ได้แต่เฉพาะแอลฟา-ไกลโคไซด์(α-glycoside)



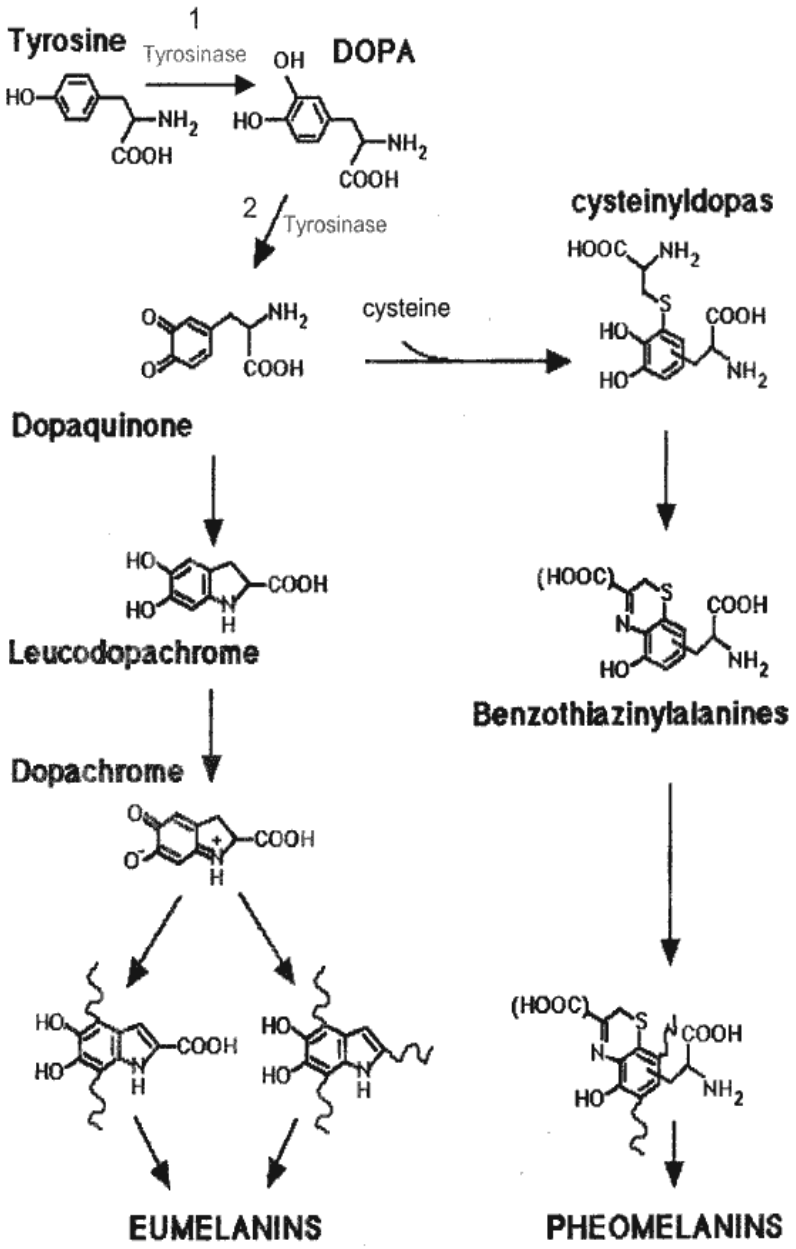
รูปที่ 2.2 แสดงกระบวนการไฮโดรไลซีสของสารอาร์บูติน
(ที่มา : สุภัทรา บุญเสริม,2547 หน้า 9)

2.1.5 ฤทธิ์ต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีของผิวหนัง

อาร์บูตินออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีโดยขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitor) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญ (Keyenzyme) ในกระบวนการสร้างเม็ดสีของผิวหนัง (Skinpigmentation) โดยการยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีนั้นจะประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอน ที่ต้องใช้เอนไซม์ไทโรซิเนส คือ

(1) การเปลี่ยนไทโรซิเนส (Tyrosinase)เป็น3,4ไดไฮโดรซี ฟีนิลอะลานีน(3,4 Dihydroxyphenylalanine ;Dopa)

(2) การเปลี่ยน 3,4ไดไฮโดรซี ฟีนิลอะลานีน (3,4 Dihydroxy phenylalanine ; dopa)ไปเป็น 3,4ไดไฮโดรซี ฟีนิลอะลานีน-ควิโนน (Dopa-quinone)



รูปที่ 2.3 แสดงกลไกการยับยั้งการเกิดเม็ดสีของอาร์บูติน

(ที่มา : สุภัทรา บุญเสริม,2547 หน้า 11)

2.2 เม่าหลวง

รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะของใบเม่าหลวง

ชื่อสมุนไพรเม่าหลวง

ชื่อวิทยาศาสตร์*AntidesmathwaitesianumMuell. Arg.*

ชื่อวงศ์ Euphorbiaceae

2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ยืนต้น หรือไม้พุ่มขนาดเล็ก สูงได้ถึง 20 เมตร เปลือกต้นสีน้ำตาลเทา แตกเป็นสะเก็ดเล็กๆ กิ่งอ่อนและยอดอ่อน มีขนสั้นนุ่มสีน้ำตาล ใบเดี่ยวเรียงสลับในระนาบเดียวกัน แผ่นใบกว้างรูปไข่ถึงรูปวงรีมีขนเล็กน้อยตามเส้นใบและด้านหลังใบแผ่นใบบางคล้ายกระดาษถึงกึ่งหนาคล้ายแผ่นหนัง มีขนสั้นนุ่มถึงเกลี้ยงทั้งสองด้านเส้นแขนงใบข้างละ 5-8 เส้น เส้นใบย่อยแบบร่างแหชัดเจนดอกออกเป็นช่อแบบช่อเชิงลด ตามซอกใบใกล้ยอดและปลายกิ่ง ดอกมีขนาดเล็กมากผิวด้านนอกมีขนสั้นนุ่ม ด้านในเกลี้ยง รังไข่อยู่เหนือวงกลีบ รูปไข่หรือกลม มีขนสั้นนุ่ม มี 1 ช่อง มีออวุล2 เม็ด ผลเป็นช่อ ช่อผลยาว 4-7 เซนติเมตร ค่อนข้างกลมหรือรี ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ผิวมีขน ผนังชั้นในแข็ง ผลอ่อนสีขาว ผลสุกมีสีแดงคล้ำถึงดำ เมล็ดขนาดเล็ก 1-2 เมล็ด พบตามป่าเต็งรัง ที่โล่งลุ่มต่ำ ป่าละเมาะ เรือกสวนทั่วไป และป่าพรุออกดอกราวเดือนกันยายนถึงธันวาคม ใบอ่อนและผลดิบใช้ปรุงอาหารให้มีรสเปรี้ยว ผลสุกมีรสเปรี้ยวรับประทานได้เม่ามีอยู่หลายสายพันธุ์ในประเทศไทยพบ18ชนิด (Species) 9 สายพันธุ์ เป็นผลไม้ท้องถิ่นสามารถขึ้นได้ทุกภาคพบมากเป็นพิเศษในแถบเทือกเขาภูพาน จังหวัดสกลนคร และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง

2.2.2 ประโยชน์ของเม่า

คุณค่าทางโภชนาการเม่าเป็นผลไม้ที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหารแร่ธาตุเช่น โปรตีน เส้นใย คาร์โบไฮเดรต แคลเซียม เหล็ก วิตามิน บี1 บี 2 วิตามินซีและเป็นผลไม้ที่มีวิตามินที่สูงและยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายอีกมากมายเม่านั้นสามารถรับประทานได้ทั้งผลสุกโดยรับประทานเป็นผลไม้ผลดิบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนนำมาประกอบอาหารคล้ายส้มตำปัจจุบันเป็นไม้ผลเศรษฐกิจ เพาะปลูกขายต้นพันธุ์ ผล นำมาทำน้ำผลไม้และไวน์แดงให้สีสันและรสชาติดีเป็นการเพิ่มมูลค่าอย่างมาก

2.2.3 คุณค่าทางโภชนาการของเม่าหลวง

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการเม่า โดยกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ (2539) พบว่าผลเม่าสุกมีคุณค่าของสารอาหารที่จำเป็นต่อความต้องการของมนุษย์อยู่มากมายหลายชนิด เช่น แคลเซียม เหล็ก สังกะสี และวิตามิน B_1 B_2 และ E และที่สำคัญมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย (essential amino acid) จำนวน 20 ชนิดนั้นเม่ามีกรดอะมิโนดังกล่าวถึง 18 ชนิด ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ต้องได้รับการบริโภคเข้าไปเท่านั้นดังตารางที่ 2.1 และ 2.2

ตารางที่2.1คุณค่าทางอาหารของเม่าเทียบกับองุ่นและแอปเปิ้ล

Nutritive values	เม่า	องุ่น	แอปเปิ้ล
ความชื้น(%)	79.60	81.10	85.30
โปรตีน(%)	0.63	0.68	0.34
ไขมัน(%)	0.15	0.25	0.40
เส้นใย(%)	0.79	1.62	2.30
คาร์โบไฮเดรต(%)	17.96	16.20	11.90
แคลเซียม(%)	0.01	NI	NI
ฟอสฟอรัส (%)	NI	NI	NI
วิตามิน B (μg/100 g)	6.46	NI	NI
วิตามิน B1 (μg/100 g)	96.9	46.00	35.00
วิตามิน B2 (μg/100 g)	0.03	0.25	0.32
วิตามิน E (μg /100 g)	0.48	NI	NI
วิตามิน C (μg /100 g)	8.97	4.20	12.00

หมายเหตุ : (NI= ไม่มีข้อมูลตรวจพบ)

ที่มา : อร่าม คุ้มกลาง และวินัยแสงแก้ว, 2540

ตารางที่ 2.2 ปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ที่พบในเม่า

กรดอะมิโน	มิลลิกรัม/100 กรัม	กรดอะมิโน	มิลลิกรัม/100 กรัม
กรดแอสปาติก	559.43	เมไทโอนีน	22.87
ไทโอนีน	227.47	ไอโซ-ลิวซีน	226.78
ซีรีน	285.75	ลิวซีน	392.53
กรดกลูตามิก	618.62	ไทโรซีน	175.17
โปลีน	234.94	ฟีนิลลาลานีน	317.70
ไกลซีน	250.23	ฮีสติดีน	129.43
อะลานีน	255.17	ไลซีน	389.08
วาลีน	57	อาร์จีนีน	213.33
เคซีน	36	ทริปโตเฟน	189.54

ที่มา : อร่าม คุ้มกลาง และวินัย แสงแก้ว, 2540

2.2.4 วิธีการนำมาใช้ประโยชน์

2.2.4.1 การบริโภคผลดิบสีเขียวอ่อนและผลสุกสีแดงที่มีรสเปรี้ยว จะนำมาทำเป็นส้มตำเม่าส่วนผลสุกสีดำม่วงจะมีรสหวานอมเปรี้ยวโดยทั่วไปจะนำมารับประทานในลักษณะผลสดเลยก็ได้

2.2.4.2 สรรพคุณทางสมุนไพรพบว่าถ้าหากรับประทานผลเม่าหลวงในปริมาณเหมาะสมจะมีสรรพคุณเป็นยาระบายและบำรุงสายตานอกจากนั้นยังสามารถใช้ใบสดนำมาอังไฟเพื่อใช้ประคบแก้อาการฟกช้ำดำเขียว

2.2.4.3 สามารถนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลายหลายชนิดได้แก่

(1) น้ำผลไม้ เช่น น้ำเม่า แท้ (pure juice) น้ำเม่าเข้มข้น (squash) น้ำเม่าพร้อมดื่ม เป็นต้น

(2) สุราแช่ ได้แก่ไวน์เม่าและ อื่นๆ เช่น แยมเม่า เม่ากวน Topping เม่า (ลักษณะคล้ายคาราเมลใช้ราดไอศกรีม)เป็นต้น

2.2.4.4 สีสกัดจากเม่าน้ำคั้นที่ได้จากผลเม่าหลวงสุกจะให้สีม่วงเข้มซึ่งเกิดจากเม็ดสีในกลุ่มสาร xanthophyllsจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสีที่ได้จะมีคุณสมบัติคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดีโดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูง ไม่ว่าจะเป็นการต้มหรือนึ่งจึงเหมาะที่จะนำมาทำสีผสมอาหารซึ่งเป็นสีที่ได้จากธรรมชาติและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

2.2.4.5 ประโยชน์อื่นๆจากต้นเม่า เช่น ปลูกเป็นไม้ให้ร่มเงา ไม้ประดับและหากต้นเม่ามีอายุมากกว่าสิบปีสามารถนำเนื้อไม้มาใช้ทำที่อยู่อาศัยและเฟอร์นิเจอร์ได้อีกด้วย

2.2.4.6 น้ำเม่าสกัดเข้มข้น 100% เป็นอาหารบำรุงสุขภาพในลักษณะเดียวกับน้ำ-พรุนสกัดเข้มข้นซึ่งเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปเนื่องจาก เม่า ซึ่งเป็น ผลไม้ในตระกูลเดียวกันกับพรุน คือ ตระกูล เบอร์รี่ ซึ่งต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เม่า มีสารอาหาร และ วิตามินหลายชนิด ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกายรวมทั้งมี สารต้านอนุมูลอิสระ ใช้เป็นยาพื้นบ้านในหลายพื้นที่ เช่น เปลือกต้นเม่าเป็นส่วนประกอบของลูกประคบสำหรับการนวดประคบเพื่อผ่อนคลายและรักษาอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ

ปัจจุบันเม่าหลวงจัดเป็นเศรษฐกิจที่สำคัญของจังหวัดสกลนคร โดยก่อให้เกิดรายได้ เช่น การจำหน่ายต้นพันธุ์ กิ่งพันธุ์ดี ผลผลิตเม่าสุกเกิดอาชีพใหม่ๆ เช่น กลุ่มเกษตรกรประกอบการโรงงานอุตสาหกรรมชุมชน และผู้ประกอบการโรงงานอุตสาหกรรม ตลอดจนผลิตภัณฑ์จากเม่า คือ น้ำเม่า (pure juice) ไวน์ขาว (white table wine) ไวน์แดง (red table wine) น้ำผลไม้พร้อมดื่ม (read to drink juice) น้ำผลไม้ชนิด Squash (mao Squash) เป็นต้น

2.3 เทคนิคการแยก

2.3.1 การสกัด (Extraction)

ในเอกสารประกอบการสอนรายวิชาเคมีของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ได้อธิบายหลักการของการสกัดโดย (อนุรัตน์ สายทอง, 2546 : 5)

การสกัด คือ การแยกสารเคมีที่ต้องการออกจากของผสมหรือวัตถุดิบ เช่น การแยกองค์ประกอบทางเคมีในพืช พืชที่ถูกนำมาสกัดอาจเป็นพืชสดหรือพืชแห้ง ก็ได้ ถ้าเป็นพืชสดจะนำมาหั่นหรือบดให้ละเอียดก่อนสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่อสกัดเสร็จต้องนำมาแยกน้ำออกด้วยกรวยแยก แต่โดยทั่วไปนิยมสกัดพืชแห้งมากกว่า เพื่อตัดขั้นตอนการแยกน้ำและสะดวกกว่าตรงที่ใช้เวลาช่วงเก็บรักษาพืชได้หลายวัน การทำพืชแห้งควรตากในที่ร่ม อากาศถ่ายเทได้สะดวกหรืออบที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันการสลายตัวของสารองค์ประกอบในพืชอันเนื่องมาจากแสงแดดและความร้อน เมื่อพืชแห้งดีแล้วจึงนำมาบดให้ละเอียดก่อนที่จะนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย ในการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์นิยมสกัดที่อุณหภูมิห้องเพื่อหลีกเลี่ยงการสลายตัวของสารองค์ประกอบ การเลือกตัวทำละลายใช้หลักการที่ว่าตัวทำละลายมีขั้วจะละลายสารที่มีขั้ว และตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจะละลายสารที่ไม่มีขั้ว ลำดับความมีขั้วของสารดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงลำดับความมีขั้วของสาร

ความมีขั้ว	ชนิดของตัวทำละลาย
ต่ำ	เฮกเซน
↓	คาร์บอนเตตระคลอไรด์
↓	เบนซีน
↓	คลอโรฟอร์ม
↓	อีเทอร์
↓	อะซีโตน
↓	อะซีโตไนไตรท์
↓	อีเทอร์อะซีเตรต
↓	เอทานอล
↓	เมทานอล
↓	น้ำ
สูง	กรด + เบส

ที่มา: อนุรัตน์ สายทอง, 2546

2.3.2 วิธีการสกัด

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2543 : 23 ได้สรุปวิธีการสกัดไว้ 5 วิธีดังนี้คือ

2.3.2.1 การแช่เพื่อแยกหรือย่อยเนื้อเยื่อ เป็นวิธีการแช่พืชตัวอย่างในตัวทำละลายบรรจุในภาชนะปิดฝา เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่หรือโถ เป็นต้น แช่ไว้ประมาณ 7 วัน เขย่าหรือคนบ่อย ๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อย ๆ รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกากให้มากที่สุดแล้วนำสารสกัดไปกรอง ถ้าจะสกัดให้หมดจดจะต้องสกัดซ้ำหลาย ๆ ครั้ง ข้อดีคือสารไม่ถูกความร้อน แต่สิ้นเปลืองตัวทำละลายและสกัดได้ช้า

2.3.2.2 การแช่สกัดต่อเนื่อง เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Percolation แช่พืชในตัวทำละลายให้ท่วมปิดฝาไว้ 1 คืน ไขเอาสารสกัดออก เติมตัวทำละลายใหม่ แช่ต่อ 1 คืน ไขเอาสารสกัดออก เติมตัวทำละลายใหม่ ทำซ้ำจนกว่าสารสกัดจะใส

2.3.2.3 การสกัดโดยซ็อกเล็ต (Soxhlet extraction) เป็นวิธีการสกัดสารอินทรีย์ออกจากของแข็ง ซึ่งเป็นแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ ด้วยความร้อนทำให้ตัวทำละลายในขวดรูปชมพู่ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบิลซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน Extracting chamber สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในขวดรูปชมพู่สารละลายนี้จะได้รับความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไป ทิ้งสารสกัดไว้ใน

ขวดรูปชมพู่ไอน้ำจะลอยขึ้นไปกระทบกับคอนเดนเซอร์จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งสกัดสารสมบูรณ์ วิธีการสกัดนี้ใช้ความร้อนจึงอาจทำให้สารบางชนิดสลายตัวได้

2.3.2.4 การสกัดของเหลว-ของเหลว (Liquid-Liquidextraction) วิธีนี้อาศัยตัวทำละลาย 2 ชนิดที่ไม่ผสมกัน แยกชั้นกันอยู่ ตัวทำละลายอาจเบาหรือหนักกว่าสารละลายก็ได้ วิธีนี้แยกสารที่มีขั้วต่างกันมาก ๆ ออกจากกันได้

2.3.2.5 การสกัดน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยมีกลิ่นหอมระเหยง่าย การสกัดจึงต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ ซึ่งมีวิธีสกัด 5 วิธีดังนี้

(1) กลั่นโดยใช้น้ำ เป็นการต้มพืชในน้ำ และกลั่นไอน้ำพร้อมน้ำมันหอมระเหยผลที่ได้จะมีน้ำมันหอมระเหยแยกชั้นกับน้ำ ซึ่งแยกได้ไม่ยาก

(2) กลั่นด้วยไอน้ำ

(3) สกัดโดยใช้ตัวทำละลาย

(4) การบีบ ใช้กรณีที่พืชนั้นมีน้ำมันหอมมาก

(5) การดูดซับ ใช้น้ำหรือไขมันเป็นตัวดูดซับน้ำมันหอม เช่น ดูดซับน้ำหอมของกุหลาบ

เมื่อสกัดได้แล้วต้องแยกตัวทำละลายออกให้เหลือแต่สารสกัด ซึ่งวิธีการแยกตัวทำละลายทำได้ 2 แบบ คือ กลั่นลดความดันโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) เมื่อได้สารสกัดเข้มข้นแล้วถ่ายสารลงในขวดบรรจุสารที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว และควรเก็บไว้ในเครื่องทำความเย็น เช่น ตู้เย็นหรือห้องเย็นเพื่อป้องกันเชื้อราและการทำให้แห้งโดยการแช่แข็งใช้เครื่องไลโอฟิไลเซอร์ ดูดเฉพาะส่วนน้ำออกเหลือสารสกัดที่แห้งซึ่งมีคุณสมบัติดูดความชื้นสูง เมื่อถ่ายลงในภาชนะต้องปิดให้สนิทเพื่อป้องกันความชื้นในอากาศ

2.3.3 โครมาโทกราฟี

โครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบออกจากสารผสม โดยอาศัยหลักการของการเลือกกระจายของสารองค์ประกอบนั้น ๆ ระหว่าง 2 เฟส ที่แตกต่างกัน ซึ่งไม่ละลายกันหรือละลายกันได้น้อยเมื่ออยู่ในสมดุล เฟสทั้งสอง ได้แก่ เฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ การแยกของผสมนี้จะแยกจากกันได้เมื่อค่าสมดุลคงที่ของการกระจายของสารนั้น ๆ ในระหว่างเฟสทั้งสองต่างกัน สารที่ยึดเกาะกับตัวดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ช้า ส่วนสารที่ยึดเกาะกับตัวดูดซับได้ไม่ดีจะเคลื่อนที่ไปกับตัวพาได้ดี ทำให้มีการแยกของสารเหล่านั้นออกมาเป็นแถบ ถ้าสารนั้นมีสีจะเห็นได้ชัดเจน

เทคนิคทางโครมาโทกราฟี มีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดและลักษณะของเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ เช่น

2.3.3.1 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจสอบหรือบ่งชี้สารที่วิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและใช้สารปริมาณเพียงเล็กน้อย(วันดี กฤษณพันธ์, 2536)

นอกจากนั้นในหลักการเดียวกันยังสามารถประยุกต์ใช้ในการแยกและเก็บรวมสารได้ในรูปของ Preparative plate

วิธีการแยกแบบของทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีเป็นโครมาโทกราฟีดูดซับ ดังนั้นเฟสคงที่จึงเป็นของแข็ง หรือเรียกว่าตัวดูดซับ ซึ่งในทางเคมีอินทรีย์นิยมใช้สารพวกอะลูมินาหรือซิลิกาเจล ตัวดูดซับเหล่านี้เป็นผงละเอียด จึงนำมาฉาบบนวัสดุแผ่นเรียบซึ่งเป็นแผ่นกระจก (แก้ว) แผ่นอะลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติก ตัวดูดซับพวกอะลูมินา หรือ ซิลิกาเจล เป็นสารมีขั้ว จะดูดซับสารมีขั้วได้ดีกว่าสารไม่มีขั้ว ส่วนเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่าง ๆ กัน แล้วแต่ความเหมาะสมในการแยกสารแต่ละชนิด วิธีการแยกเหมือนกับโครมาโทกราฟีคอลัมน์ แต่ต่างกันที่ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีพาสารขึ้นไป ส่วนโครมาโทกราฟีคอลัมน์พาสารลงมา สารจะกระจายตัวอยู่ในสมดุลระหว่างเฟสคงที่กับเฟสเคลื่อนที่ แต่ถ้าสมดุลถูกเลื่อนไป โดยสารกระจายตัวอยู่ในเฟสเคลื่อนที่มากเกินไป สารจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ตัวดูดซับจะทำงานได้น้อยลงและประสิทธิภาพการแยกจะลดลงด้วย สาเหตุนี้จะเกิดขึ้นเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงเกินไปเมื่อเทียบกับสารที่จะแยก จึงทำให้ตัวดูดซับดูดซับตัวทำละลายได้มากกว่า จึงไล่สารลงไปในเฟสเคลื่อนที่มากขึ้นด้วย ในทางตรงข้ามถ้าสมดุลเลื่อนไปทางเฟสคงที่ สารก็จะถูกยึดโดยตัวดูดซับมากเกินไป สารจะเคลื่อนที่ได้ช้าประสิทธิภาพการแยกจะลดลงเช่นกัน การที่เป็นเช่นนี้เพราะใช้ตัวทำละลายที่มีความมีขั้วต่ำเกินไปเมื่อเทียบกับสารตัวดูดซับก็จะดูดซับสารได้มากกว่าตัวทำละลาย การแยกด้วยทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ทำได้ดังนี้

(1) วิธีการจุดสารลงบนแผ่นโครมาโทเพลต นำแผ่นโครมาโทเพลตมาวัดระยะจากปลายล่าง 2 เซนติเมตร หรือสูงกว่าระดับตัวทำละลายในแทงค์และปลายบน 0.5-1.0 เซนติเมตร แล้วทำเครื่องหมายเบา ๆ ไว้ทั้ง 2 แห่ง นำสารที่ต้องการแยกมาละลายในตัวทำละลาย ที่ระเหยง่ายให้มีความเข้มข้นที่พอเหมาะ ใช้หลอดคาปิลลารีที่มีปลายเรียวเล็กจุ่มลงในสารละลาย สารละลายจะเข้าไปในหลอดเนื่องจากมีแรงตึงผิวเกิดขึ้นแล้วแตะลงบนตำแหน่ง ที่ทำไว้แล้วข้างต้น หยดสารนี้ซ้ำที่เดิม 2-3 ครั้ง หลังจากนั้นปล่อยให้หยดของสารนั้นแห้ง ที่อุณหภูมิห้องหรือใช้เครื่องเป่าสารที่หยดลงไปต้องระวังอย่าให้มีจุดใหญ่จนเกินไปคือ เส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 2 มิลลิเมตร เพราะถ้าหากจุดสารขนาดใหญ่เกินไปจะทำให้เกิดการซ้อนทับกับจุดที่อยู่ใกล้เคียงเมื่อเคลื่อนที่สูงเกินไป

(2) การจุ่มโครมาโทเพลตลงในแทงค์สำหรับทินเลเยอร์โครมาโท-กราฟีตัวทำละลายที่ใส่ลงในแทงค์อาจใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวหรือตัวทำละลายผสมก็ได้ โดยทั่วไปตัวทำละลายที่มีขั้วใช้แยกสารที่มีขั้ว ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วใช้แยกสารที่ไม่มีขั้ว ในทางปฏิบัติการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมจะต้องเอาสารที่ต้องการแยกมาละลายในตัวทำละลาย ที่ระเหยง่ายก่อน แล้วใช้หลอดคาปิลลารีหยดสารลงบนโครมาโทเพลตหลาย ๆ เพลต จากนั้นจุ่มแต่ละเพลตลงในแทงค์

สำหรับทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีที่มีตัวทำละลายที่มีขั้วต่าง ๆ กัน แทงค์สำหรับทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีนั้นควรใช้กระดาษกรองวางไว้รอบข้างแทงค์ให้กระดาษกรองชุ่มไปด้วยตัวทำละลายซึ่งจะทำให้ภาชนะอิ่มตัวไปด้วยไอของตัวทำละลายเป็นผลให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้เร็วและสม่ำเสมอ ระดับของตัวทำละลายในแทงค์จะต้องต่ำกว่าจุดของสารบนโครมาโทเพลต จากนั้นจึงวางโครมาโทเพลตลงในแทงค์แล้วปิดฝา เมื่อตัวทำละลายพาสารเคลื่อนที่ไปจนถึงระดับด้านบนของโครมาโทเพลตซึ่งเรียกระดับนี้ว่า Solvent front นำเพลตออกจากแทงค์ทำให้แห้งในตู้ควัน ถ้าระเหยได้ยากอาจทำให้แห้งโดยการเป่าด้วยความร้อน หรือการอบ นำมาพิจารณาว่าตัวทำละลายใดเหมาะสมที่จะทำให้สารแยกออกจากกันได้ดีที่สุดเมื่อได้ตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วจึงใช้วิธีเดียวกันนี้วิเคราะห์สารผสมตัวอย่างต่อไป

(3) การหาตำแหน่งของสาร โดยดูสีของจุดสารที่ปรากฏด้วยตาถ้าสารที่นำมาแยกนั้นมีสี กรณีที่สารไม่มีสีสามารถมองหาตำแหน่งของสารได้หลายวิธีคือ

(ก) ไอโอดีน บรรจุสารไอโอดีนลงในแทงค์ที่มีฝาปิดจนแทงค์อิ่มตัวไปด้วยไอของไอโอดีน จุดของสารต่าง ๆ จะกลายเป็นสีน้ำตาลหรือสีม่วงปรากฏอยู่บนเพลตชั่วคราวทำเครื่องหมายไว้ สารไอโอดีนสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนได้กับสารอินทรีย์เกือบทุกชนิดยกเว้นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวและสารประกอบเอไมด์

(ข) รังสีอัลตราไวโอเลต เมื่อนำมาส่องด้วยแสงอัตราไวโอเลตจะมองเห็นจุดเป็นสีม่วง ทำเครื่องหมายไว้

(ค) ใช้สารที่ทำให้เกิดสี โดยการฉีดพ่นสารที่เกิดปฏิกิริยากับจุดของสารแล้วเกิดสีให้ทั่วเพลต ถ้าสีปรากฏขึ้นมาให้ทำเครื่องหมายโดยวงรอบสีที่เห็นตำแหน่งของจุดสาร โดยสารนำมาหาค่า R_f ต่อไป ตัวอย่างของสารที่ฉีดพ่นแล้วให้สี ได้แก่ กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ซึ่งสามารถเปลี่ยนสีของจุดสารให้เป็นสีน้ำตาลได้ สาร 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราโซน หรือสารละลาย เฟอริกคลอไรด์ สามารถทำให้จุดของสารฟีนอลเกิดสีได้ สารบรอมคลีซอลกรีนใช้บ่งชี้พวกกรดคาร์บอกซิลิก สาร p-ไดเมทิลลามิโนเบนซอลดีไฮด์ สามารถฉีดพ่นเพื่อบ่งชี้สาร เอมีนหรือ นินไฮดริน สามารถฉีดพ่นเพื่อบ่งชี้กรดอะมิโนเป็นต้น

(4) การหาค่า R_f(Rateofflow) ซึ่งหาได้จากอัตราส่วนระหว่างระยะทางที่สารเคลื่อนที่กับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ จากสมการที่ 2.2

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}} \qquad 2.2$$

2.3.3.2 โครมาโทกราฟฟีแบบเคลือบชนิดหนา (preparative thin layer chromatography : PTLC) เทคนิคแบบ PTLC ใช้หลักการเดียวกับแผ่นเคลือบชนิด TLC แต่ใช้เฟสเคลื่อนที่คงที่ (Stationaryphase) หนากว่า ซึ่งความหนาประมาณ 1.0-2.0 มิลลิเมตร ซึ่งจะทำให้แยกสารได้ในปริมาณที่มากขึ้น (บำรุง รินทา,2550)สารเฟสเคลื่อนที่คงที่ใช้แผ่นเคลือบกว้าง x ยาวประมาณ 20 x 25 เซนติเมตร สารที่ใช้เคลือบคืออะลูมินาหรือซิลิกาเจลที่ผสมด้วยสารเรืองแสงอัลตราไวโอเลต หลักในการแยกสารทำได้โดยการใส่สารที่ต้องการแยกที่ทำเป็นสารละลายเข้มข้นลากเป็นแถบยาวเหนือจากปลายทางด้านล่างของแผ่นเคลือบ PTLC ประมาณ 2 เซนติเมตร รอให้แห้งแล้วนำไปใส่ในแทงค์แก้วที่ใส่เฟสเคลื่อนที่ หรือตัวทำละลายที่เหมาะสมเช่นเดียวกับการทำแผ่นเคลือบ TLC สารที่ต้องการแยกจะถูกนำพาขึ้นข้างบนของแผ่นเคลือบเป็นแถบยาว นำออกจากแทงค์ รอให้แห้ง (อาจตรวจสอบสารด้วยเทคนิคคล้าย TLC) ใช้ช้อนโลหะเล็ก ๆ ขูดแถบสารออกจากแผ่นเคลือบ นำมาบดให้ละเอียด แล้วละลายสารออกมาด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม กรอง แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกจะได้สารที่ต้องการแยกที่เป็นสารบริสุทธิ์นำไปทดลองหรือวิเคราะห์เอกลักษณ์ของสารที่แยกต่อไป

รูปที่ 2.5 แสดงแผ่น PTLC ที่มีการเทสารตัวอย่างลงบนเส้นเริ่มต้น

2.3.4 การสกัดด้วยเฟสของแข็ง

การสกัดด้วยระบบเฟสของแข็ง (ธงจุฑา สุวรรณประเสริฐ,2554 : 179-191) เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้เพื่อการสกัดที่มีปริมาณน้อยๆ แทนที่การสกัดด้วยเฟสของเหลว 2 ชนิด โดยจะขึ้นกับสมดุลของการกระจายตัวของตัวถูกละลายระหว่างเฟส 2 เฟสที่ไม่รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกันระบบการสกัดด้วยระบบนี้แตกต่างจากการสกัดสารด้วยเฟสของเหลวตรงที่ตัวกลางที่ใช้

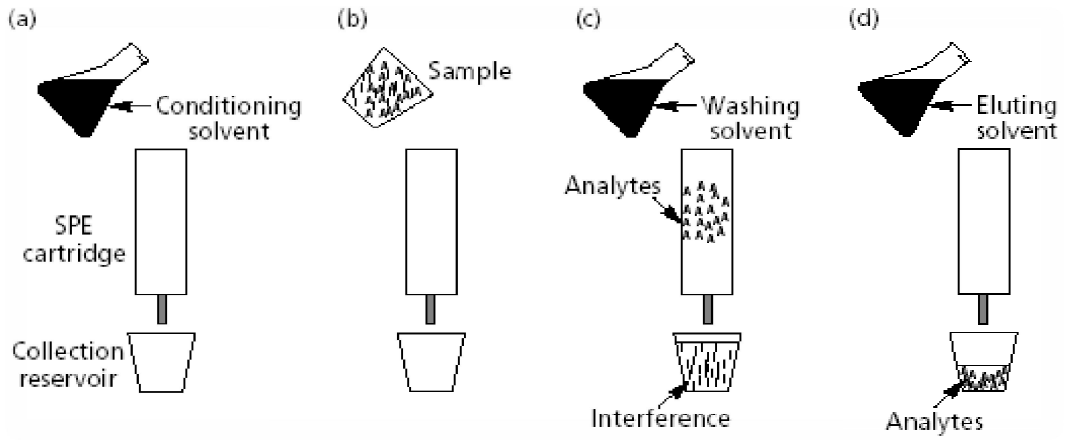
เป็นของแข็งโดยวัตถุประสงค์หลักแล้วเพื่อเป็นการเตรียมสารตัวอย่างก่อนฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อทำการกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่อาจจะทำลายคอลัมน์ในระบบโครมาโทกราฟฟีซึ่งถ้ามีสิ่งปนเปื้อนเข้าไปก็จะทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์นั้นลดลงและทำให้คอลัมน์เสียหายได้ดังนั้นก็มีวิธีการรักษาอายุของคอลัมน์ไว้คือ การเตรียมสารตัวอย่างนั้นเองและประสิทธิภาพของการสกัดด้วยวิธีนี้จะดีกว่าการสกัดด้วยเฟสของเหลวเพราะสกัดด้วยเฟสของเหลวจะเสียเวลาและปริมาณของตัวทำละลายจะมากกว่าการสกัดสารด้วยเฟสของแข็ง โดยวิธีนี้จะใช้หลักการดูดซับของสารตัวอย่างที่ผิวของเฟสคงที่ตรงส่วนที่มีของเหลวเคลือบอยู่ เฟสคงที่ที่เป็นของแข็งนั้น เรียกว่า ตัวดูดซับ การสกัดด้วยวิธีนี้เป็นการจับสารที่ต้องการโดยให้สารเกิดอันตรกิริยาจับอยู่บนเฟสของแข็งโดยไม่ใช้การกรองที่คัดแยกสารที่มีขนาดใหญ่ไม่ให้ผ่านตัวกรองออกมาและเนื่องจากเฟสของแข็งมีการเรียงตัวที่ชิดกัน ทำให้หน้าที่กรองอนุภาคของแข็งที่ปนอยู่ในสารละลายที่นำมาสกัดการที่มีอนุภาคของแข็งถูกกรองติดอยู่ที่เฟสของแข็งจะลดประสิทธิภาพของการสกัดได้ เพราะอาจทำให้เกิดการอุดตันและบางครั้งสารที่สนใจอาจเกิดการจับหรือเกิดสารเชิงซ้อนอยู่ที่อนุภาคเหล่านี้ไม่ถูกชะออกมาในภายหลังการเกิดอันตรกิริยาของเฟสคงที่กับสารตัวอย่างจะเกิดจากแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสิตจากแรงดึงดูดระหว่างประจุของสารกับประจุบนผิวของตัวดูดซับและจากการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างสารกับไอออนบนผิวของตัวดูดซับ

2.3.4.1 เฟสของแข็งที่ใช้ในการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

(1) ของแข็งที่มีรูพรุน (porous sorbent)จะมีรูพรุนที่ผิวของแข็งมีสมบัติสามารถซับดูดซับสารที่ผิว (adsorption) โดยความพรุนของของแข็งที่ใช้จะมีขนาดจากใหญ่ไปเล็ก คือ แมคโครพอร์ (macropores) เมโซพอร์ (mesopores) และไมโครพอร์ (micropoures) ซึ่งประสิทธิภาพของการสกัดจะขึ้นอยู่กับอนุภาค (particlesize) เส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุน (pore diameter) ความจุของรูพรุน (pore volum) พื้นที่ผิว (surfacearea) และความม่ำเสมอของอนุภาค (particle size distribution)

(3) ของแข็งที่เคลือบด้วยเฟสของเหลว (solid supported liquid sorbent)การสกัดสารจะใช้ลักษณะการดูดกลืน (Absorption) จัดว่าเฟสที่ใช้สกัดเป็นของแข็ง แต่การสกัดสารจริงๆ เป็นของเหลวที่เคลือบอยู่และใช้หลักการสกัดเหมือนการสกัดด้วยเฟสของเหลวของเหลวที่เคลือบแบบบอนด์เฟส (Bonded phase) จะมีกระบวนการจับสารทั้งการดูดซับภายในและการดูดซับที่ผิว

2.3.4.2 ลักษณะของเฟสของแข็ง ลักษณะทั่วไปจะทำการบรรจุเฟสของแข็งซึ่งเป็นลักษณะอนุภาคเหมือนกับคอลัมน์ในโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (ODS) แต่มีขนาดของอนุภาคใหญ่กว่าประมาณ 10 เท่า อนุภาคของเฟสของแข็งเหล่านี้จะบรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกและมีตัวกั้นเพื่อป้องกันการหลุดรั่วของเฟสของแข็งจากหลอดพลาสติกอาจเรียกเฟสของแข็งว่า Sep-Pak หรือ Cartridge



รูปที่ 2.6แสดงลำดับการแยกในเฟสของแข็ง
ที่มา : พุทธรักษา วรานุศุภากุล, 2557

2.3.4.3 รูปแบบ SPEที่ใช้ในปัจจุบันมีหลายรูปแบบเพื่อความเหมาะสมของการใช้งานซึ่งแต่ละรูปแบบจะมีความจุของเฟสของแข็งที่ต่างกัน

รูปที่ 2.7 แสดงชนิดเฟสของแข็งมีทั้งชนิดของเข็มฉีดยาและเป็นแผ่น

ที่มา : พุทธรักษา วรานุศุภากุล, 2557

2.4โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performamce Liquid Chromatography ;HPLC)

หลักการพื้นฐานลิควิดโครมาโทกราฟี คือ การแยกสารละลายผสมกัน ในคอลัมน์ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็กซึ่งมีรูพรุนเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 150 ไมครอน ในหลอดยาวเล็กๆ เรียกว่าคอลัมน์ สารละลายตัวอย่างถูกฉีดเข้าไปในส่วนบนของคอลัมน์เฟสเคลื่อนที่จะทำหน้าที่พาสารผ่านไปยังคอลัมน์ผลที่ตามมาคือ สารประกอบจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้าลงและอัตราเร็วของการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาค (Affinity) ของสารอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารประกอบ X มีการกระจายอยู่ระหว่างเฟสที่อยู่กับที่ (Stationnary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ดังนี้

$X_m X_s$.....(1)

X_mในเฟสเคลื่อนที่ X_sในเฟสอยู่กับที่

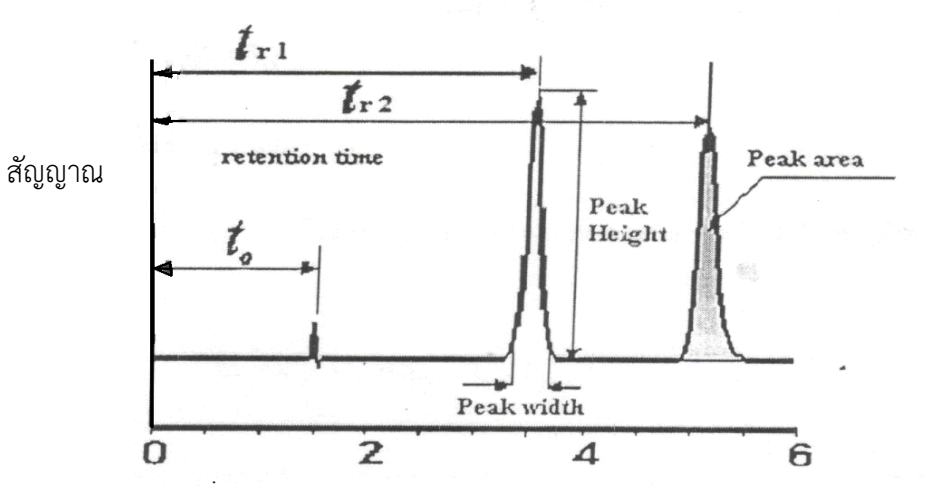
ค่า distribution coefficient สำหรับมาประกอบที่สอดคล้องกับสมการข้างบนคือ

$K_x = [X]_s / [x]_m$.....(2)

ถ้า K_x มีค่ามาก แสดงว่าสารประกอบชอบที่ละลายในเฟสที่อยู่กับที่มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้า ถ้า K_xมีค่าน้อยสารประกอบก็จะละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าเฟสอยู่กับที่ จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็ว ความแตกต่างของสารประกอบจะมีผลทำให้เกิดการแยกสารประกอบในคอลัมน์สารประกอบที่ถูกแยกนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์ การวัดสารประกอบที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ และนำมาพล็อตกราฟกับปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่เรียกว่า โครมาโทแกรม

2.4.1 ทฤษฎีโครมาโทกราฟี

ลักษณะผลลัพธ์ของการแยกจากวิธีโครมาโทกราฟี เรียกว่า โครมาโทแกรมจะเป็นการพล็อตระหว่างสัญญาณไฟฟ้ากับเวลา หน่วยทางแกน y จะเป็นสัญญาณไฟฟ้าซึ่งอาจมีหน่วยเป็นมิลลิแอมป์(mA) หรือมิลลิโวลต์ (mV) ส่วนแกน x จะเป็นเวลาซึ่งเรียกว่า รีเทนชันไทม์ (retention time; t_r) สัญญาณที่เห็นก่อนเริ่มแรกคือ พีกของสารประกอบตัวแรกที่แยกออกมาก่อนจะมีค่ารีเทนชันไทม์ที่น้อยที่สุด จะพบค่าของรีเทนชันไทม์ที่มากขึ้นตามลำดับของสารประกอบที่แยกออกมาทีหลัง การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบแต่ละตัวมักระบุโดยใช้ค่าของรีเทนชันไทม์ ซึ่งการแยกสารผสมหลายชนิดที่สภาวะทางโครมาโทกราฟีเดียวกัน จะได้ค่ารีเทนชันไทม์ของสารประกอบที่คงที่ ดังนั้นจึงสามารถใช้วิธีทางโครมาโทกราฟีในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพได้ ส่วนการวิเคราะห์เชิงปริมาณสามารถทำได้โดยวัดความสูงของพีก(peak height) หรือวัดพื้นที่ใต้พีก(peak area)โดยปริมาณของสารจะแปรผันตามความสูงของพื้นที่ใต้พีก



รูปที่ 2.8 แสดงภาพตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารผสม 2 ชนิด

2.5 แมสสเปกโทรเมตรี (Mass Spectrometry)

หลักการของแมสสเปกโตรเมทรี คือ เมื่อทำให้โมเลกุลของสารเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน โมเลกุลนั้นจะกลายเป็นไอออนและมีประจุบวก (molecular ion, M^+) โมเลกุลที่มีประจุบวกนี้ ถ้ามีพลังงานมากพออาจเกิดการแตกตัวออกเป็นส่วนย่อยๆซึ่งส่วนย่อยๆ เหล่านี้อาจเป็นอนุภาคที่เป็นกลาง (neutral) หรืออาจเป็นไอออนย่อย (fragment ion) นั่นคือเป็นแคตไอออนแรดิเคิล ($A^{+\bullet}$) หรือเป็นแคตไอออน (A^+) หรือเป็นอนุภาคที่เป็นกลาง (N) เช่น

$$M + e^- \longrightarrow M^+ + 2e^-$$

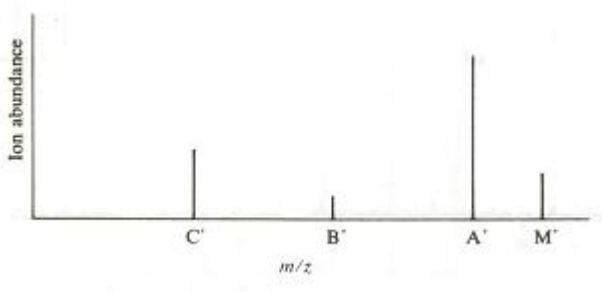
$$M^+ \rightarrow A^+ + N^\bullet$$
$$M^+ \rightarrow A^+ + N$$

รูปที่ 2.9 แสดงการแตกตัวของไอออนด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี

แมสสเปกโทรมิเตอร์ (mass spectrometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้แยกและวัดมวลของไอออนด้วยการที่ใช้อัตราส่วนของมวลต่อประจุ (m/Z) โดยทั่วไปแล้วไอออนมักมีประจุ +1 (Z = 1)ดั้งนั้นค่า m/Z จึงมีค่าเท่ากับมวลของไอออนโดยตรง

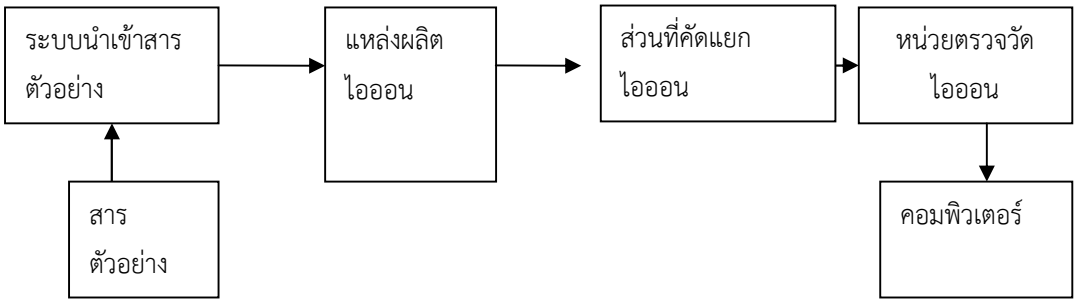
ในช่วงเวลาใด ๆ โมเลกุลที่เป็นไอออนจะเกิดขึ้นด้วยระดับพลังงานที่ต่างกัน โมเลกุลที่เป็นไอออนแต่ละตัวก็จะเกิดการแตกตัวด้วยอัตราเร็วที่ขึ้นกับพลังงานภายใน การชนกันระหว่างไอออนกับไอออนหรือไอออนกับโมเลกุล เกิดขึ้นน้อยมากในสภาวะที่เป็นสุญญากาศสูงในเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ ดังนั้นการถ่ายเทพลังงานเพื่อให้สภาวะเข้าสู่สมดุลจึงไม่เกิดขึ้น โมเลกุลที่เป็นไอออนบางชนิดมีพลังงานไม่พอจะไม่เกิดการแตกตัว แต่บางชนิดอาจมีพลังงานมากจึงสามารถแตกตัวออกตามวิถีทางของมัน ดังนั้น ในเวลาสั้น ๆ หลังจากเกิดไอออไนเซชัน จะเห็นไอออนต่าง ๆ คือ $M^{+\bullet}$, A^+ , B^+, C^+เป็นต้น เกิดขึ้น ไอออนแต่ละตัวที่มีอยู่ในปริมาณที่ขึ้นกับอัตราเร็วของการเกิดและอัตราการสลายตัวของแต่ละไอออน ถ้าทราบชนิดและปริมาณของไอออน เหล่านั้น จะสามารถหาความสัมพันธ์ของมันได้ โดยให้แกน X แสดงค่า $\frac{m}{Z}$ และให้

แกน Y แสดงปริมาณสัมพันธ์ (relative abundance) ก็จะได้แมสสเปกตรัม ดังแสดงในรูปที่ 4.1ซึ่งอาจบันทึกไว้บนจอของหลอดภาพ กระดาษบันทึก แผ่นฟิล์ม หรือในคอมพิวเตอร์



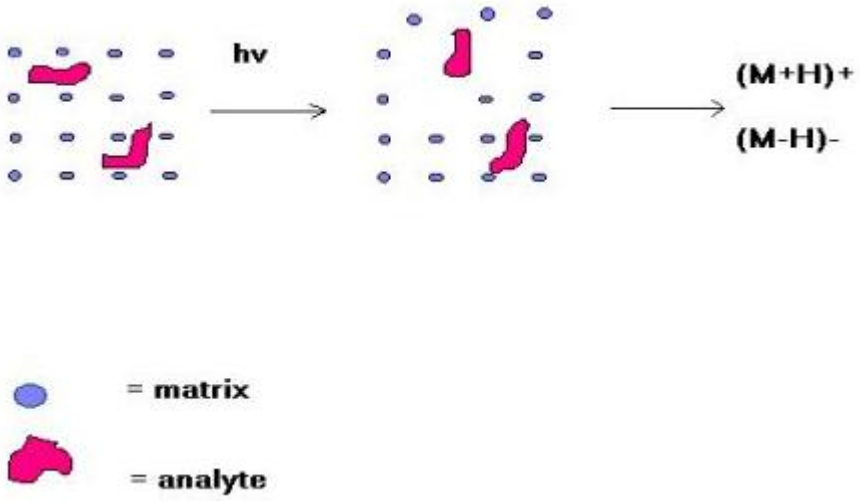
รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะของแมสเปกตรัม

เครื่องมือแมสสเปกโทรมิเตอร์แสดงในรูปที่ 2.11 ซึ่งแหล่งกำเนิดของแมสสเปกโทรมิเตอร์ทำหน้าที่เปลี่ยนองค์ประกอบสารตัวอย่างเป็นอนุภาคที่มีประจุ ระหว่างเกิดอนุภาคที่มีประจุโมเลกุลที่วิเคราะห์มักเกิดแตกตัวเป็นไอออนย่อยๆให้อนุภาคที่มีประจุ และมีอัตราส่วนมวลต่อประจุต่างไป ระหว่างเกิดกระบวนการแยกตัวเป็นไอออนจะมีทั้งอนุภาคที่เป็นประจุบวกและลบ อนุภาคที่มีประจุลบถูกกำจัดออก และแยกเฉพาะอนุภาคที่มีประจุบวก และจะสามารถถูกตรวจวัดเครื่องตรวจหา ไอออน กระบวนการให้สัญญาณ และระบบอ่านสัญญาณ เครื่องแมสสเปกโทรต้องมีความดันต่ำ (10^{-4} หรือ 10^{-8}ทอร์) ระบบสุญญากาศจึงเป็นส่วนสำคัญของเครื่องนี้



รูปที่ 2.11 แผนภูมิแสดงองค์ประกอบของแมสสเปกโทรมิเตอร์

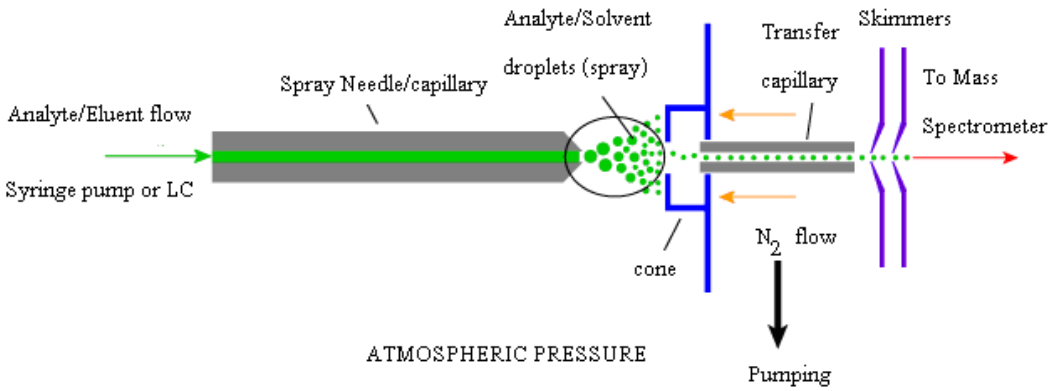
เมทริกซ์แอสซิทเลเซอร์ดีซอร์บชันไอออไนเซชัน ***(Matrix – Assisted Laser Desorption Ionisation : MALDI)***ซึ่งเป็นการทำให้สารกลายเป็นไอออนได้โดยการชนอนุภาคด้วยแสงเลเซอร์ โดยสารตัวอย่างจะต้องทำการผสมกับสารที่ดูดกลืนแสงได้ดี ซึ่งเรียกว่าเป็นเมทริกซ์ (matrix) เมื่อมีการผ่านแสงเลเซอร์ไปยังสารตัวอย่างที่ผสมกับสารที่เป็นเมทริกซ์ ในเมทริกซ์จะช่วยเปลี่ยนพลังงานจากแสงเลเซอร์ส่งผ่านให้สารตัวอย่างมีการเคลื่อนระดับพลังงานไปอยู่ชั้นกระตุ้นเพื่อกลายเป็นไอออนที่ผิวของสารผสมนั้นๆ ซึ่งการใช้เมทริกซ์จะเป็นการช่วยการส่งผ่านของพลังงานสู่สารตัวอย่างที่เพียงพอต่อการเกิดเป็นไอออนของสารตัวอย่าง เมื่อเทียบกับการใช้แสงเลเซอร์เพื่อการกลายเป็นไอออนแบบเดิม ดังแสดงในรูปที่ 2.12 วิธี MALDI นี้เหมาะสำหรับการตรวจวัดสารที่ระเหยยาก เช่นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงอย่างโปรตีนและเพปไทด์ MALDI ที่นิยมใช้จะเป็นแสงเลเซอร์จากไนโตรเจน ที่ความยาวคลื่น 337 nm และตัวอย่างสารที่ใช้เป็นเมทริกซ์ที่นิยมใช้ เช่น ซินาพินิกเอซิด (sinapinic acid) สำหรับการตรวจวัดโปรตีน และ อัลฟา– ไซยาโน – 4 - ไฮดรอกซีซินนามิกเอซิด (alpha – cyano – 4 – hydroxycinnamic acid) สำหรับการตรวจวัดเพปไทด์



รูปที่ 2.12 แสดงตัวอย่างการเกิดเป็นไอออนด้วยวิธี MALDI

ที่มา (An Introduction to Mass Spectrometry. 2508. [online)

การแตกตัวเป็นไอออนด้วยวิธีอิเล็กโทรสเปรย์ (Electrospray Ionisation : ESI) เป็นการทำให้สารเกิดเป็นไอออนด้วยการเปลี่ยนสถานะเป็นแก๊สก่อนการเกิดเป็นไอออน ซึ่งได้กำเนิดมาเพื่อใช้เป็นกระบวนการเกิดเป็นไอออนของสารที่ระเหยได้ที่มาจาก เครื่องมือ HPLC ก่อนเข้าสู่ดีเทคเตอร์มวลต่อไป โดยมีชื่อเรียกเครื่องมือนี้ว่า LC-MS (Liquid Chromatography – Mass Spectrometer) โดยในส่วนของ ESI นี้เครื่องมือจะประกอบด้วยท่อขนาดเล็กประมาณคาปิลลารีด้วยอัตราการไหลประมาณ 1-20 ไมโครลิตรต่อนาที ที่มีค่าศักย์ไฟฟ้าประมาณ 2.5 - 4 kV และเมื่อผ่านสารละลายเข้าไป เมื่อเจอศักย์ไฟฟ้าจากท่าคาปิลลารี จะถูกพ่นเป็นละอองขนาดเล็กและมีประจุเกาะอยู่บนผิวของสารละลาย สารละลายที่มีประจุนี้จะถูกผลักไปยังกรวยรองรับ โดยตัวทำละลายจะระเหยออกไปเหลือแต่อนุภาคของสารที่มีโปรตอนด้วยการผ่านแก๊สไนโตรเจนที่แห้ง เพื่อเข้าสู่ดีเทคเตอร์ไอออนต่อไป ประจุที่เกิดขึ้นอาจเจือปนทำให้เกิดเป็นประจุของตัวทำละลายที่เป็นอิเล็กโตรไลต์ได้ เช่น ไอออนของแอมโมเนียม ไอออนโซเดียม ไอออนโปแตสเซียม หรือโปรตอน เช่น $[M + Na]^+$ เป็นต้น ในรูปที่ 2.13 แสดงการแตกตัวแบบ ESI นี้ ถือว่าเป็นการแตกตัวแบบไม่รุนแรง (soft ionization) ซึ่งจะทำให้โมเลกุลของสารไม่เกิดการแตกตัวเป็นส่วนย่อยๆมากนัก เมื่อเทียบกับวิธีอิเล็กตรอนอิมแพ็ค(EI) จึงทำให้สามารถเป็นสเปกตรัมของโครงสร้างหลักของสารได้ในปริมาณที่มากขึ้น



รูปที่ 2.13 แสดงองค์ประกอบของระบบการแตกตัวเป็นไอออนแบบ

อิเล็กโทรสเปรย์ (Electrospray Ionisation (ESI))

ที่มา (University of Bristol. 2008. [online])

ไทม์-ออฟ-ไฟลท์แมสสเปกโทรมิเตอร์ (Time-of-Flight MassSpectrometer: TOF)เป็นเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ที่วัดเวลาที่ไอออนใช้ในการเดินทางจากแหล่งไอออนไปยังเครื่องดีเทคเตอร์ ซึ่งไอออนจะถูกเร่งด้วยความต่างศักย์ ทำให้เคลื่อนที่ และไอออนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะเคลื่อนที่ได้ช้า ส่วนไอออนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า เครื่องมือชนิดนี้ไม่มีแม่เหล็ก และการแยกไอออนแยกตามความแตกต่างของมวลโดยใช้ความแตกต่างของเวลาที่จะไปถึงดีเทคเตอร์ ถ้าใช้ศักย์ V ในการเร่งไอออน

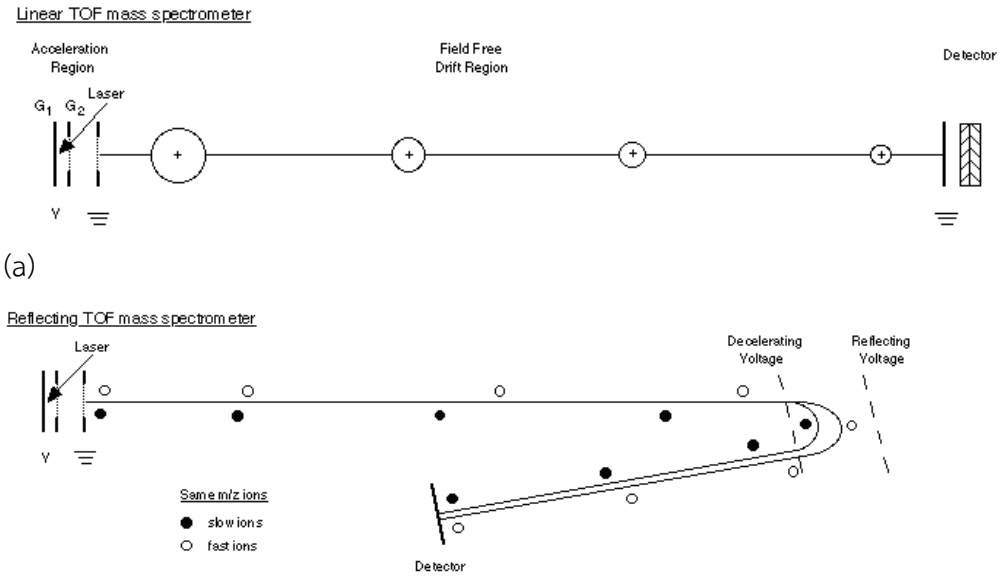
ดังนั้น $ZV = \frac{1}{2}mv^2$

$V = (2ZV/m)^{1/2}$

ดังนั้น ความเร็ว (v) ของไอออนจึงขึ้นอยู่กับค่ามวล (m) ถ้ากลุ่มของไอออน (m_1, m_2, m_3, m_n) ถูกเร่งแล้วปล่อยให้ผ่านบริเวณที่ปราศจากอิทธิพลใด ๆ ทั้งสิ้น (field-free region) ไอออนแต่ละตัวจะไปถึงดีเทคเตอร์ในเวลาต่าง ๆ กัน ขึ้นอยู่กับความเร็วของมัน (v_1, v_2, v_3, v_n) เวลาที่ใช้ต่างกันนี้มีค่าน้อยมาก (เช่น มวล 800 จะใช้เวลาเพียง 10 sec) จึงจำเป็นต้องแสดงแมสสเปกตรัมบนหลอดแคโทด แม้โดยทั่วไปค่าประสิทธิภาพในการแยกของเครื่องมือจะต่ำ แต่ก็มีประโยชน์เนื่องจากสามารถสแกนได้เร็วมาก ไม่มีขีดจำกัดของช่วงมวลที่ตรวจได้ มักใช้ในการศึกษาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว

แมสสเปกโทรมิเตอร์ชนิดนี้นิยมใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีมวลสูง ๆ และมีประสิทธิภาพในการแยกมากกว่า 10,000 สำหรับเครื่องที่ออกแบบเป็นพิเศษ แต่โดยทั่ว ๆ ไป เครื่องชนิดนี้จะมีประสิทธิภาพในการแยกประมาณ 500

ปัจจุบันได้มีการออกแบบเครื่องมือ TOF นอกเหนือจากแบบเดิมคือวิ่งเป็นเส้นตรงทางเดียว (linear TOF) คือแบบ TOF สะท้อนกลับ (Reflection TOF) เพื่อลดความแปรปรวนของพลังงานจลน์ ทำให้พีกมีความกว้างลดลง โดยการเพิ่มกระจกสะท้อนให้ไอออนเพิ่มระยะทางในการวิ่ง ดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 แสดงแผนภาพการทำงานของดีเทคเตอร์ไอออนชนิดไทม์-ออฟ- ไฟลท์ (Time-of-Flight (TOF)) ทั้งแบบ (a) แบบเส้นตรง (linear TOF) และ (b) แบบสะท้อนกลับ (reflection TOF)

ที่มา (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. 2007. [online])

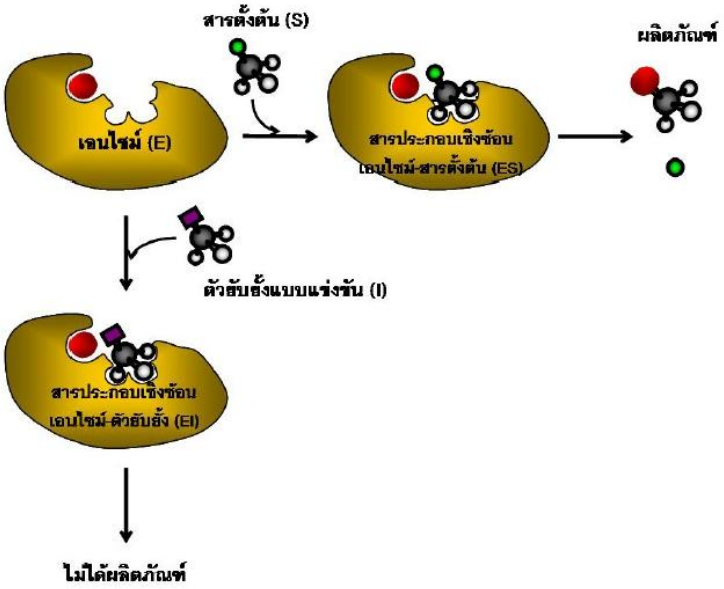
2.6 เอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซนม์ไทโรซิเนส เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เอนไซม์โพลีฟีนอล ออกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดสีบนผิวหนัง สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงมีผลยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน เนื่องจากมีความสามารถเป็น Chelating agent ซึ่งเป็นสารกลุ่ม Phenolic acid จะเข้าจับกับทองแดงในโมเลกุลของเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไทโรซีนที่เป็นเอมีนในผิวหนังมนุษย์ไปเป็นโดปาและต่อไปเป็น โดปาควิโนน จากนั้นจึงเกิดเป็นปฏิกิริยาพอลิเมอร์-ไรเซชัน จนเป็นเม็ดสีเมลานิน ทำให้ผิวหนังมีสีเข้มขึ้นดังรูปที่ 2.3

2.6.1 การยับยั้งเอนไซม์

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส สามารถแบ่งได้ตามตำแหน่งในการจับของสารตัวยับยั้ง แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ การยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition) และการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Noncompetitive and Uncompetitive inhibition)

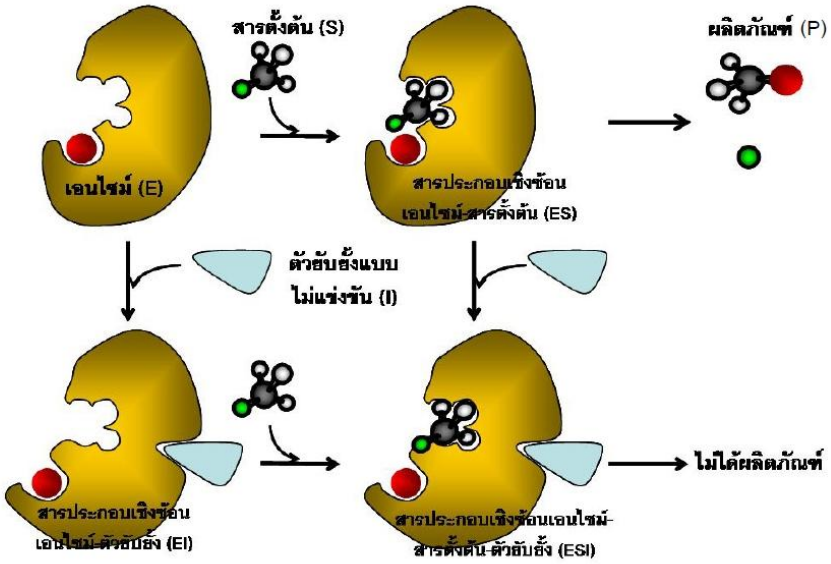
2.6.1.1 การยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition) ตัวยับยั้ง (inhibitor) จะมีลักษณะโครงสร้างที่เหมือน หรือคล้ายกับ สารตั้งต้น จึงสามารถเข้าจับกับบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับสารตั้งต้น



รูปที่ 2.15 แสดงการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition)
(ศักดา ดาดวง, 2553)

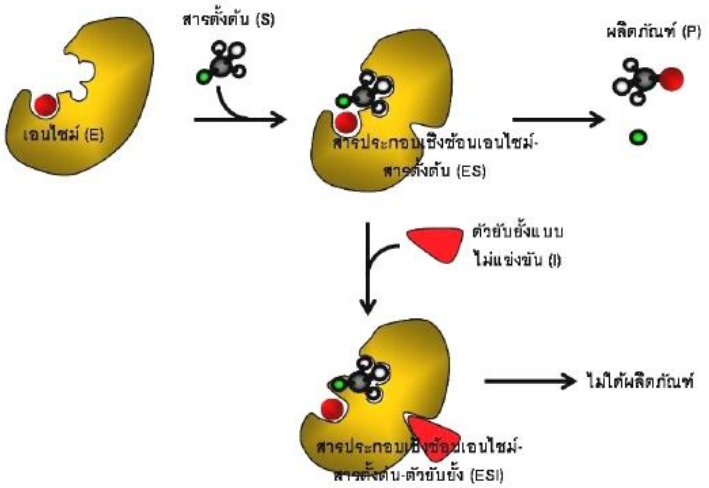
2.6.1.2 การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Noncompetitive and Uncompetitive inhibition)จะไม่เกิดการจับกันของเอนไซม์กับตัวยับยั้งที่บริเวณเร่ง แต่จะเกิดการยับยั้งโดยการรบกวนการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น การยับยั้งแบบไม่แข่งขันนี้แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ ดังนี้

(1) การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ 1 (Noncompetitive inhibition) เป็นการยับยั้งโดยตัวยับยั้งจะไม่จับที่บริเวณเร่ง แต่จะเข้าจับได้ทั้งสารเชิงซ้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น และเอนไซม์อิสระ ตัวยับยั้งแบบนี้ไม่รบกวนการจับของสารตั้งต้นที่บริเวณเร่ง แต่จะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ทำให้หมู่คะตะไลติกไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ



รูปที่ 2.16 แสดงการยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ 1 (Noncompetitive inhibition)
(ศักดา ดาดวง, 2553)

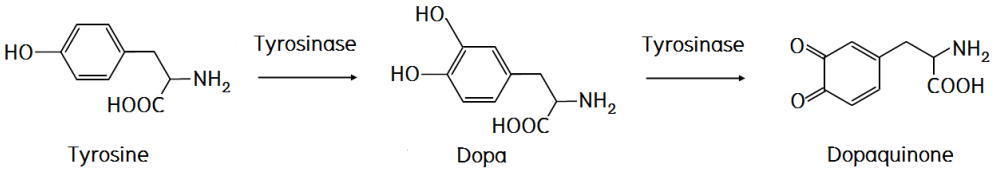
(2) การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ 2 (Uncompetitive inhibition) เป็นการยับยั้งโดยตัวยับยั้งเข้าจับเฉพาะกับสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น แต่ไม่จับกับเอนไซม์อิสระ ผลของการจับของตัวยับยั้งทำให้เอนไซม์เสียโครงรูปไป ทำให้ความสามารถในการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ลดลง หรือหมดไป



รูปที่ 2.17 แสดงการยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ 2 (Uncompetitive inhibition)
(ศักดา ดาดวง, 2553)

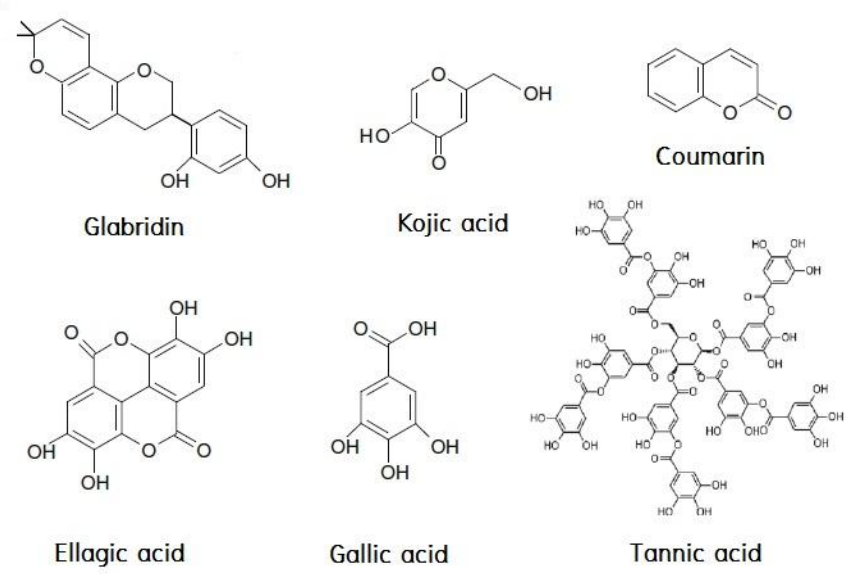
2.6.2 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งด้วยวิธีDopachrome method

เอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ประเภทพอลิฟีนอลออกซิเดส จะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารประกอบประเภทพอลิฟีนอล ในกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน เอนไซม์ไทโรซิเนสจะทำหน้าที่ในการเปลี่ยน tyrosine ไปเป็น 3,4-dihydroxy phenylalanine หรือ dopaและเปลี่ยนdopaไปเป็น dopaquinoneดังรูปที่ 2.18



รูปที่ 2.18 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสในกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน

การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในปฏิกิริยานี้จึงเกิดจากการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารกลุ่มยับยั้ง ซึ่งสารกลุ่มนี้ได้แก่ อาร์บูติน กรดโคจิก กลาบิดิน กรดโคจิก กรดเอลาจิก กรดแกลลิก กรดแทนนิก คูมาริน เป็นต้น

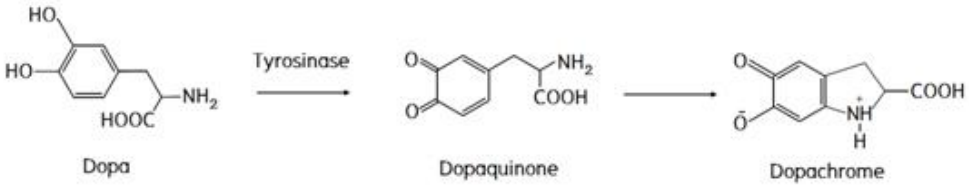


รูปที่2.19 แสดงตัวอย่างสารกลุ่มยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส
(Pitchaonmaisuthisakul and Michael H. Gordon, 2009)

สารกลุ่มยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีลักษณะโครงสร้างเป็นสารกลุ่มพอลิฟีนอล เช่นเดียวกับสารตั้งต้นในปฏิกิริยาการสร้างเม็ดสีเมลานิน สารกลุ่มนี้จะเข้าทำการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบแข่งขัน โดยที่ตัวยับยั้งจะจับกับเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าจับกับสารตั้งต้นได้จึงไม่ทำให้เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยา

2.6.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method

จากกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินซึ่งมี tyrosine และ dopa เป็นสารตั้งต้นนั้น ในการทดลองด้วยวิธี Dopachrome method ได้นำขั้นตอนการเปลี่ยน dopaโดยเอนไซม์ไทโรซิเนสไปเป็นdopaquinoneและ dopaquinone จะเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางในการเกิดเม็ดสีเมลานินที่ชื่อว่า dopachromeในการวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสนั้นจะวัดค่าการดูดกลืนแสงของ dopachromeที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร เมื่อมีการเติมสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแล้วทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงนั้นหมายถึง dopaเปลี่ยนไปเป็น dopachromeได้น้อยลง แสดงว่าเอนไซม์ไทโรซิเนสเกิดการยับยั้ง และมีการทำงานที่น้อยลง



สีส้มน้ำตาล

รูปที่ 2.20 แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method

2.7งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พิชญา ตระการรุ่งโรจน์. (2547:บทคัดย่อ). การสกัดแยกและหาโครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่าง ๆ ของมะเม่าได้สำรวจและตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่สามารถแยกได้จากส่วนสกัดหยาบของมะเม่าหลวง (AntidesmathwaitesianumMell.Arg.) โดยจำกัดขอบเขตการศึกษา ไปที่ส่วนเปลือก ใบ ผล เมล็ด และรากซึ่งได้จัดหามาเพื่อใช้ในการเตรียมส่วนสกัดหยาบ โดยสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ทั้งนี้โดยอาศัยหลักการของ Bioassay-Guided Approach เฉพาะส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเท่านั้นที่จะถูกนำไปแยกโดยใช้เทคนิคทางโครมาโตรกราฟี ซึ่งสารประกอบที่แยกได้จะนำมาศึกษาหาโครงสร้างหลักทางเคมี โดยใช้เทคนิค NMR แล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ทาง

ชีวภาพอีกครั้งหนึ่งเพื่อระบุสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในส่วนต่าง ๆ ของพืชผลจากการศึกษาพบว่ารากและผลของมะเม่านั้น จะมีสารประกอบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยส่วนรากนั้นทั้งส่วนสกัดหยาบเฮกเซนและส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตทได้แสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) โดยมีค่า IC_{50}เป็น 30.49 และ 14.59 g/mL ตามลำดับ หลังจากแยกส่วนสกัดหยาบทั้งสองนี้แล้ว ได้พบสารประกอบStigmasterolและสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ อีกอย่างน้อย 1 ชนิดซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งได้ระบุว่าสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ที่พบนี้เป็นสารออกฤทธิ์ในส่วนรากสำหรับการศึกษาส่วนผลนั้นสามารถแยกได้สารประกอบประเภทแอนโทรไซยานิน ซึ่งเป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลายว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สำหรับผลการศึกษาส่วนอื่น ๆ ของมะเม่าพบว่าถึงแม้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของส่วนเปลือกจะแสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) บ้าง แต่สารประกอบที่สามารถแยกมาได้นั้นมีปริมาณน้อยมากซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดในการนำส่วนเปลือกนี้มาใช้ประโยชน์ตามวัตถุประสงค์ส่วนการศึกษาส่วนใบและเมล็ดนั้น ไม่พบว่าส่วนสกัดหยาบต่าง ๆแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญต่อโครงการนี้ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นต้องนำมาแยกเพื่อหาสารประกอบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ

สำรี มั่นเขตต์กรน์. (2543 : บทคัดย่อ). การแยกบริสุทธิ์สารในกลุ่ม Polyphenols จากมะเม่าและศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นและการต้านมะเร็งสารสกัดในกลุ่ม polyphenol จากเนื้อไม้มะเม่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งเม็ดเลือด K562 และมะเร็งปอด GLC4 ทั้งในชนิดที่ดื้อยาและไวต่อยา และสามารถกำจัด ROS ที่มากเกินไปในไมโตคอนเดรียได้โดย ทำให้ความต่างศักย์เมมเบรน ของไมโตคอนเดรียเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ตายที่ลดลง เซลล์มะเร็ง K562 และ GLC4 มีความไวต่อภาวะ oxidative stress ไม่เท่ากัน เซลล์มะเร็ง K562 ทนต่อภาวะ oxidative stress ได้ดีกว่า เซลล์มะเร็ง GLC4 และโมเลกุล apigeninสามารถกำจัด ROS ในเซลล์มะเร็ง GLC4 ได้ดีกว่า เซลล์มะเร็ง K562 นอกจากนี้พบว่า โมเลกุล polyphenol ที่ศึกษาศักยภาพในการเพิ่มพิษของยารักษามะเร็งโมเลกุลที่สกัดได้จากเนื้อไม้มะเม่ามีศักยภาพสูงมากที่ควรจะได้รับการพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้เป็นยาต้านมะเร็งหรือในอุตสาหกรรมอาหาร

PYKA et al. (2550 : บทคัดย่อ). ได้ทำการตรวจหาปริมาณของสารอาร์บูตินในใบของ COWBERRY ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากรัฐSuwalszczyznaในประเทศโปแลนด์ซึ่งตัวอย่างจะเก็บจากปี พ.ศ.2548 และ พ.ศ.2549 นำมาสกัดด้วยเมทานอล แล้วนำไปแยกสารผสมด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี มีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ แล้วนำไปสแกนความยาวคลื่นด้วยเครื่อง UV Visible spectrophotometer แยกอาร์บูตินออก แล้วนำไปวิเคราะห์หา

ปริมาณด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าปีพ.ศ.2548 ความยาวคลื่น 285 นาโนเมตร ปริมาณสารอาร์บูติน35 มิลลิกรัมใน 1 กรัมของใบ COWBERRY ส่วนปี พ.ศ. 2549 ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร ปริมาณสารอาร์บูติน47 มิลลิกรัมใน 1 กรัมของใบ COWBERRY

Parejo I et al. (2544 : บทคัดย่อ). การสกัดอาร์บูตินจากใบแบเบอร์รี่ (bearberry) เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้ทำการเก็บตัวอย่างคือ ใบแบเบอร์รี่ (bearberry) มาจากพื้นที่ที่มีการเจริญเติบโตแตกต่างกันถึง 4 พื้นที่ และเก็บจากฤดูที่แตกต่างกัน 2 ฤดู คือ ฤดูใบไม้ร่วงและฤดูใบไม้ผลิ จากนั้นก็นำมาทำการสกัดและวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าแตกต่างกัน 6.30 -9.16 % บนน้ำหนักแห้งซึ่งฤดูใบไม้ร่วงจะให้อาร์บูตินได้มากกว่าฤดูใบไม้ผลิ

P.Denevaและคณะ (2553) การสกัดสารแอนโธไซยานินในผลเบอร์รี่ด้วยเฟสของแข็งและการตรวจหาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระผลเบอร์รี่สกัดสารแอนโธไซยานินโดยใช้เฟสของแข็ง C_{18} cartridge ทำให้อิ่มตัวด้วยและชะสารปนเปื้อนด้วย Bidistilleted waterและชะสารที่ต้องการด้วย CH_3CH_2OH 96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะสกัดสารแอนโธไซยานินจากผลเบอร์รี่ 5 ชนิดด้วยกันคือ โชกี้เบอร์รี่ แอลเดอร์เบอร์รี่ แบล็คเคอร์แรนท์แบล็คเบอร์รี่และ บลูเบอร์รี่ในระหว่างที่ใช้ SPE สกัดสารจากสารสกัดหยาบนั้นพบว่า SPE สามารถแยกน้ำตาลได้มากกว่า 94.4 เปอร์เซ็นต์และสามารถแยกสารพวกกรดได้มากกว่า 88.5 เปอร์เซ็นต์ในการใช้ SPE สกัดสารแอนโธไซยานินนั้นพบว่า SPE สามารถสกัดสารแอนโธไซยานินได้มากถึง 90-95.6เปอร์เซ็นต์จากการทดลองการตรวจหาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารแอนโธไซยานินนั้นสามารถตรวจหาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้หลากหลายวิธีได้แก่ วิธี Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC) วิธี Hydroxyl Oxygen Radical Averting Capacity (HORAC) วิธี TotalPeroxylRadicalTrappingAntioxidantParameter(TRAP) วิ ธี ScavengingofNitrogen Oxide จากการตรวจหาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลแอลเดอร์เบอร์รี่โดยวิธี ORACพบว่ามีค่าในการต้านอนุมูลอิสระสูงถึง 5,783 ไมโครโมลTE/กรัม สารสกัดจากผลโชกี้เบอร์รี่ส่วนใหญ่จะสามารถยับยั้งการเกิด Lipid Peroxidation ได้ และจากการตรวจหาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลโชกี้เบอร์รี่โดยวิธี TRAP พบว่ามีค่าในการต้านอนุมูลอิสระสูงถึง 4,051 ไมโครโมลTE/กรัมจากการตรวจหาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลบลูเบอร์รี่โดยวิธี HORACพบว่าผลในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลบลูเบอร์รี่มีค่า 1,293 ไมโครโมล GAE/กรัมและส่วนใหญ่สารสกัดจากผลบลูเบอร์รี่จะมี Scavengerของ

NO ที่สูงมาก สารต้านอนุมูลอิสระที่มีค่าในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงนั้นพบว่าขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ และรวมไปถึงวิธีที่เหมาะสมที่ใช้ในการเตรียมสารที่จะวิเคราะห์

Brigitte Lukas (2009) อาร์บูตินในมาเจอร์แรมและออริกาโน สกัดด้วยวิธีทิเลเยอร์โครมาโทกราฟี(TLC) โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดเป็นเมทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วน 50:50 อาร์บูตินเป็นอนุพันธุ์ hydroquinone เป็นพืชที่พบมากอยู่ในสายพันธุ์ตระกูล origanumการก่อตัวของอาร์บูตินเป็นแบบ Polymorphic ในปัจจุบันอาร์บูตินมีปริมาณมากคือ (O.dubium 20.8 ±15.3 มิลลิกรัม/กรัม;O.majorranaที่อยู่ในป่า 51.3 ±15.4 มิลลิกรัม/กรัม ,Omajoranaที่เพาะปลูก 40.6 ±11.2 มิลลิกรัม/กรัม) และพบในปริมาณน้อยใน (O.microphyllum 0.1 ±1.0 มิลลิกรัม/กรัม .onitesที่ปลูกอยู่ในป่า 0.3 ±0.1 มิลลิกรัม/กรัม onitesที่เพาะปลูก 0.1 ±0.1 มิลลิกรัม/กรัม, O,saccatum 0.1 ±0.1 มิลลิกรัม/กรัม ,O.solymicumo0.4 ±1.0 มิลลิกรัม/กรัม)

วิภพ และคณะ (2549: บทคัดย่อ). ศึกษาการแยกบริสุทธิ์สารโพลีฟีนอลในไวน์แดงสยามมัวส์และศึกษาประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและการชักนำการตายแบบอาปอบโตซีสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดและมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กโดยการวิเคราะห์ แยกบริสุทธิ์สารโพลีฟีนอลในไวน์แดงสยามมัวส์และศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กที่ไวและดื้อต่อยา พบว่าผงไวน์แดงของสยามมัวส์ประกอบด้วยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ กรดฟินอลิก และโปรแอนโธไซยานิดิน โดยคิดเป็นมวลรวม 45% ของน้ำหนักแห้ง โดยส่วนประกอบหลัก ได้แก่ เดอร์ซิติน (IC50;K562=10+ 0.8 1M and GLC4 = 22 + 1.6 1M), เคอรซิติน ไกลโคไซด์ (IC50;K562=6+ 1M and GLC4 = 8 + 1 1M) และแคมป์เฟอรอล(IC50;K562=13.2+ 0.8 1M and GLC4 = 20.6 + 1.6 1M) โมเลกุลดังกล่าวสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาได้ดีกว่าเซลล์ที่ไวต่อยา 2 เท่าและการผสมสารสกัดจากไม้มะเม่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีกว่าไวน์แดงสยามมัวส์อย่างเดียวและยังพบอีกว่าผงไวน์แดงสยามมัวส์สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอาปอปโตซีสซึ่งมีโมเลกุลฟลาโวนอยด์เป็นสารออกฤทธิ์หลักและมีตำแหน่งการออกฤทธิ์ที่ไมโตรคอนเดรียของเซลล์

A.Schieberและคณะ (2544) การตรวจหากรดฟีนอลิกและสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ในผลแอปเปิ้ล และผลลูกแพร์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยสกัดแยกสารด้วยเฟสของแข็ง C_{18} cartridge โดยทำให้เฟสของแข็งอิ่มตัวด้วยเมทานอลและกรดไฮโดรคลอริกความ

เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ชะสารปนเปื้อนด้วยเอธิลอะซิเตตและชะสารที่ต้องการด้วยเมทานอล ในการตรวจวิเคราะห์โดยใช้สภาวะคอลัมน์ Aqua C_{18} 250×4.6 มิลลิเมตร; 5 ไมโครเมตร อุณหภูมิที่ใช้ 25 องศาเซลเซียสกรดฟีนอลิก และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยมี Diode array และ Mass spectrometric เป็นตัวตรวจวัด สารมาตรฐานทั้ง 26 ชนิด ใช้เวลาในการแยกภายใน 1 ชั่วโมง เฟสคงที่ที่ใช้ในการแยกสารนั้นสามารถแยกสารที่เราต้องการวิเคราะห์ได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ ระบบของการวิเคราะห์จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในกากผลแอปเปิ้ล และน้ำแอปเปิ้ล และใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารสกัดจากผลลูกแพร์ ในการทดลองพบว่ากากผลแอปเปิ้ลเป็นแหล่งที่พบสารกลุ่มฟีนอลิกมากที่สุด อย่างไรก็ตามสภาวะที่แห้งของกากผลแอปเปิ้ลนี้ก็จะมีผลต่อผลิตผลเช่นกัน นอกจากนี้ระบบของการวิเคราะห์ยังสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์สาร Quercitinและสาร Isorhamnetin glycoside และสาร Dihydrochalconesในน้ำแอปเปิ้ล และน้ำผลลูกแพร์ได้อีกตามลำดับ ในผลลูกแพร์จากการตรวจวิเคราะห์พบว่าจะมีสาร Isorhamnetin-3-glycosideอยู่ในผลลูกแพร์ จากการที่มีสาร Isorhamnetin-3-glycoside อยู่ในผลลูกแพร์นี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์หาสารอาร์บูติน ซึ่งเป็นสารที่อาจจะมีอยู่ในผลลูกแพร์

วิษณุธงไชย.(2553: บทคัดย่อ).การพัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับวิเคราะห์ปริมาณอาร์บูตินในครีมและสารสกัดจากพืชสมุนไพร ได้ทำกาพัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินโดยทำการแยกด้วยคอลัมน์ ODS Hypersil ® C_{18} ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นส่วนผสมของน้ำต่อเมทานอล ต่อ 0.1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริคในอัตราส่วน 89:10:1ที่พีเอช4.0 โดยปริมาตรได้ทำการตรวจวัดสารที่แยกได้ด้วยเครื่องยูวีที่ความยาวคลื่น 222 นาโนเมตรได้ทำการตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์อาร์บูตินได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความ เข้มข้นถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 20.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (R^2 =0.9996) ได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เมื่อฉีดสารละลายภายในวันเดียวและระหว่างวัน เท่ากับ 0.98 เปอร์เซ็นต์ และ 1.15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับได้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เท่ากับ 0.002 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์หาปริมาณเท่ากับ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร±1 และค่าร้อยละของการกลับคืนเฉลี่ยของอาร์บูตินที่เติมลงไปในตัวอย่างเท่ากับ 99.88 1.12 เปอร์เซ็นต์วิธีที่เสนอขึ้นมาได้ประยุกต์ในการวิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินในตัวอย่างเครื่องสำอางขจัดสีผิวจากตัวอย่างArbuwhite cream, Super whitening cream และ Shiseido cream พบปริมาณอาร์บูตินเฉลี่ยเท่ากับ 7.60, 5.30 และ 57.90 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับและได้ประยุกต์วิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินในตัวอย่างสารสกัดพืชสมุนไพรจากตัวอย่าง

*BetulaalnoidesBuch. Ham.,Clerodendrumpetasites S. Moore, CurculigolatifoliaDryand. Var. latifoliaและHesperethusacrenulata (Roxb.)Roem.*พบว่าในตัวอย่างมีอาร์บูตินเท่ากับ 3.50, 1.50, 1.10 และ 0.12 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ วิธีที่นำเสนอนี้เป็นวิธีที่วิเคราะห์ได้รวดเร็วง่าย และเป็นวิธีที่ เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์อาร์บูตินในงานประจำ

สุภัทรา บุญเสริม.(2547 : บทคัดย่อ).การบริหารความเสี่ยงเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของอาร์บูติน สารอาร์บูตินเป็นอนุพันธ์ของไฮโดรควิโนน ที่เป็นสารห้ามใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง มีชื่อทางเคมีว่าไฮโดรควิโนนกลูโคส ขณะนี้มิได้จัดเป็นสารห้ามใช้หรือสารควบคุมพิเศษหรือสารควบคุม จากการซื้อหรือเก็บตัวอย่างที่มีส่วนผสมของอาร์บูตินจากแหล่งผลิต แหล่งจำหน่าย ส่งตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอาร์บูตินและไฮโดรควิโนนจำนวน 21 ตัวอย่าง พบว่า เครื่องสำอางที่มีฉลากระบุว่ามีส่วนผสมของอาร์บูตินทุกตัวอย่าวิเคราะห์แล้วไม่พบสารไฮโดรควิโนนสอดคล้องกับข้อมูลทางวิชาการในปัจจุบันซึ่งยังไม่มีข้อที่แสดงถึงการสลายตัวเป็น ไฮโดรควิโนนของอาร์บูติน และยังไม่มีรายงานถึงอาการแพ้ ระคายเคือง เกิดเป็นจุดด่างขาวที่หน้า หรือผิวหน้าดำคล้ำเป็นฝ้าถาวร รักษาไม่หายเหมือนการใช้ ไฮโดรควิโนนดังนั้นการกล่าวอ้างของผู้ประกอบการว่าไม่ได้ลักลอบผสมสารห้ามใช้ ไฮโดรควิโนนแต่การวิเคราะห์พบไฮโดรควิโนน เกิดจากการสลายตัวของอาร์บูตินจึงเป็นเหตุผลที่ฟังไม่ขึ้น การตรวจพบน่าจะเป็นการลักลอบผสมสารไฮโดรควิโนนที่เป็นสารห้ามใช้ลงไปโดยตรงมากกว่า แต่ทั้งนี้กลุ่มควบคุมเครื่องสำอางก็จะต้องติดตามและตรวจสอบ รวบรวมข้อมูลเรื่องความปลอดภัยของสารอาร์บูตินต่อไป เพื่อที่จะได้กำหนดมาตรการในการควบคุมกำกับดูแลเครื่องสำอางซึ่งมีส่วนผสมของอาร์บูตินทำให้ผู้บริโภคได้รับเครื่องสำอางที่มีคุณภาพ มีมาตรฐาน มีความปลอดภัยและสมประโยชน์ยิ่งขึ้น

วิภพ สุทธนะ และคณะ, 2549 ศึกษาการแยกบริสุทธิ์สารโพลีฟีนอลในไวน์แดงสยามมัวส์และศึกษาประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและการชักนำการตายแบบอาปอบโตซีสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดและมะเร็งปอด ชนิดเซลล์เล็กโดยการวิเคราะห์ แยกบริสุทธิ์สารโพลีฟีนอลในไวน์แดงสยามมัวส์ และศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กที่ไวและดื้อต่อยาพบว่าผงไวน์แดงของสยามมัวส์ประกอบด้วยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ กรดฟินอลิก และโปรแอนโธไซยานิดิน โดยคิดเป็นมวลรวม 45% ของน้ำหนักแห้ง สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาได้ดีกว่าเซลล์ที่ไวต่อยา 2 เท่าและการผสมสารสกัดจากไม้มะเม่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีกว่าไวน์แดงสยามมัวส์อย่างเดียว และยังพบอีกว่า ผงไวน์แดงสยามมัวส์สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิด

การตายแบบอาปอปโตซีส ซึ่งมีโมเลกุลฟลาโวนอยด์เป็นสารออกฤทธิ์หลักและมีตำแหน่งการออกฤทธิ์ที่ไมโตรคอนเดรียของเซลล์

PatricFontannaz , Tamara Kilinc and Olivier Heudi.(2551: บทคัดย่อ).การพัฒนาวิธี HPLCเพื่อหาปริมาณวิตามินซีทั้งหมดและกรดไอโซแอสคอบิก(Isoascorbic acid, isoAA) ในผลิตภัณฑ์อาหารพรีมิกซ์ (Premixes) และดูโอมิกซ์ (Duomixes) ที่เสริมคุณค่าทางโภชนาการด้วยส่วนผสมของวิตามินและ/หรือ แร่ธาตุโดยสกัดกรดแอสคอบิกจากตัวอย่างด้วยสารละลาย Tris[2-carboxyethyl] phosphine hydrochloride (TCEP.HCl) เพื่อรักษาสภาพของกรดแอสคอบิกให้อยู่ในรูปของรีดิวส์ฟอร์ม(Reduced form) ทำการแยกโดยใช้คอลัมน์ C18 และใช้สารละลายโซเดียมอาซีเตตพีเอช5.4ที่มีสาร TCEPและDecylamineทำหน้าที่เป็นอิออนแพร์ริง (Ion pairing agent) ปริมาณวิตามินซีต่ำสุดที่สามารถรายงาน ผลวิเคราะห์ได้(LOD) เท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เมื่อทำการเติมวิตามินซีในปริมาณที่แตกต่างกันลงในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ พบว่าได้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับอยู่ระหว่าง 93-105 ค่า reproducibilityที่ได้จากผลการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการจำนวน 9 แห่งมีค่าอยู่ระหว่าง2.0 และ 8.0 เปอร์เซ็นต์(n=10) จากการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่เสริมคุณค่าทางโภชนาการ(fortified food products)พรีมิกซ์และดูโอมิกซ์ที่แตกต่างกันจำนวน 25 ชนิด โดยใช้วิธี High Pressure Liquid Chromatography(HPLC) เปรียบเทียบกับ วิธีไตเตรชั่นตามวิธีของ The Association of Official Analytical Chemist(AOAC) พบว่าได้ผลเหมือนกัน แสดงว่าการหาปริมาณกรดแอสคอบิกโดยวิธี HPLC-UV นี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบปริมาณกรดไอโซแอสคอบิกที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารที่เสริมคุณค่าได้