หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในน้ำผลไม้

Method Development for the Determination of Phenolic Acids in Fruit Juices

1. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ผศ.ดร.สุภัทรา ลิลิตชาญ

ภาควิชาโภชนวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

420/1 ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

โทรศัพท์ 0-2354-8539, 0-2354-8543 ต่อ 1203

โทรสาร 0-2640-9839

E-mail: supathra.lil@mahidol.ac.th, supathral@hotmail.com

2. สาขาที่ทำการวิจัย การวิเคราะห์อาหารและผลิตภัณฑ์อาหาร

3. งบประมาณรวมทั้งโครงการ 480,000 บาท

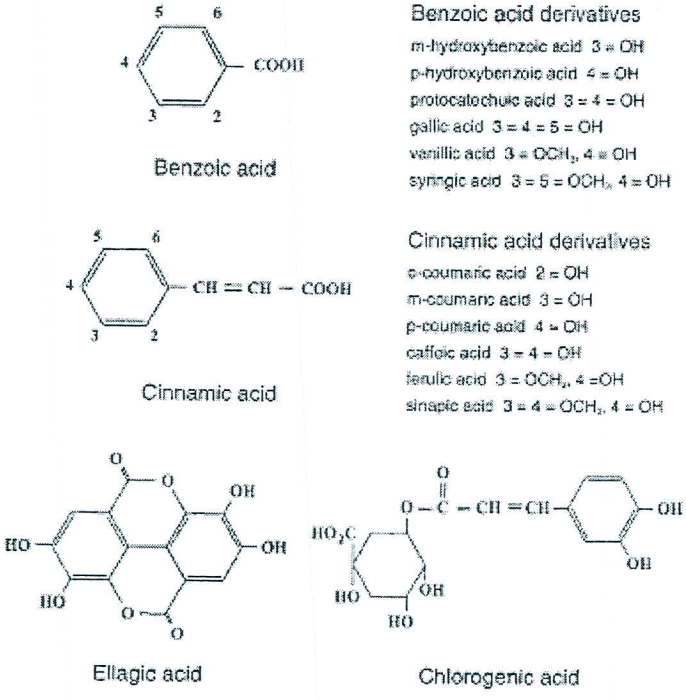
4. ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี

5. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เป็นที่ทราบกันว่าสารประกอบหลักในผักและผลไม้ที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาวานอยด์ กรดฟีนอลิก และ แอนโธไซยานิน ซึ่งพบทั่วไปในใบ ลำต้นและเปลือกของพืช กลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกจะอยู่ในรูปของการกำจัดอนุมูลอิสระ การให้ไฮโดรเจนอะตอม และการกำจัดออกซิเจนที่ขาดอิเลคตรอน รวมทั้งการรวมตัวกับโลหะ [1] สารกลุ่มนี้มีส่วนช่วยส่งเสริมสุขภาพของระบบต่างๆ ในร่างกายหลายประการ เช่น ยับยั้งการถูกทำลายของเซลล์ [2] มีบทบาทในการช่วยชะลอความแก่ ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถลดอุบัติการณ์ของโรคร้ายหลายชนิด เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ และความดันโลหิตสูง [3-8]

ในปัจจุบันจึงมีนักวิจัยมากมายให้ความสนใจในการศึกษาวิธีการสกัดแยกและวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกในอาหารโดยเฉพาะในผักและผลไม้ เนื่องจากสารเหล่านี้พบว่ามีความหลากหลายและอุดมสมบูรณ์ในผักและผลไม้ชนิดต่างๆ เช่น องุ่น แอปเปิ้ล ผลไม้ประเภทส้ม ผลไม้พวกเบอรี แครอท บร็อกโคลี และมะเขือเทศ [9-13] เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ จากผลไม้ เช่น น้ำผลไม้ แยมผลไม้ และเนื้อผลไม้ตีป่น (puree) [14-16] กรดฟี

นอลิกเป็นอนุพันธ์ของกรด benzoic และกรด cinnamic ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่ในตำแหน่งต่างๆ (รูปที่ 5.1) โดยอนุพันธ์ของกรด cinnamic ที่พบมากที่สุด คือ กรด ρ-coumaric, caffeic และ ferulic โดยทั่วไปที่พบในอาหารจะอยู่ในรูปของเอสเทอร์กับกรด quinic หรือ glucose ดังตัวอย่างเช่น กรด chlorogenic สำหรับอนุพันธ์ของกรด benzoic ที่พบมากที่สุด คือ ρ-hydroxybenzoic, vanillic และ protocatechuic นอกจากนี้ยังพบกรดฟีนอลิกที่เป็น dimeric condensation products ของกรด gallic มีชื่อเรียกว่า กรด ellagic



รูปที่ 5.1 โครงสร้างโมเลกุลของกรดฟีนอลิก

สำหรับการสกัดแยกกรดฟีนอลิกในผักและผลไม้ด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) ซึ่งเป็นวิธีการแยกสารพื้นฐาน [17-18] โดยทั่วไปนิยมใช้เทคนิค liquid-liquid extraction [19-20] และ solid-phase extraction [21-24] ในการสกัดแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารฟีนอลิกในผักและผลไม้ การสกัดแยกสารด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นจำนวนมากเพื่อสกัดสารออกจากตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้เปลืองตัวทำละลาย และการใช้ตัวทำละลายปริมาณมากยังทำให้สารตัวอย่างถูกเจือจาง ซึ่งจะต้องนำไปทำให้เข้มข้น (preconcentration) อีกครั้งหนึ่ง หากการทำให้เข้มข้นด้วยการระเหยตัวทำละลายออก สารตัวอย่างที่ระเหยง่าย (volatile solute) จะระเหยออกมาพร้อมกับตัวทำละลาย ปริมาณสารอาจเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดได้ นอกจากนี้ยังจะต้องทำการพิสูจน์ให้ได้ว่าการสกัดนั้นสกัดสารได้หมดจด ซึ่งมักจะทำได้ไม่ง่ายนัก การสกัดด้วยวิธีนี้สิ้นเปลืองสารเคมีและต้องเสียทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในการกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้แล้ว

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการสกัดด้วยเทคนิคใหม่ที่ง่าย สะดวก และใช้ตัวทำละลายในการสกัดสารในปริมาณน้อย เช่น เทคนิคที่เรียกว่า solid phase microextraction (SPME) [25-26] โดยใช้ SPME fiber จุ่มลงในตัวอย่าง สารจะถูกดูดซับอยู่บน fiber จากนั้นจึงนำ SPME fiber นี้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography; GC) จะเห็นว่าวิธีนี้ค่อนข้างสะดวกและไม่ต้องใช้ตัวทำละลายในการสกัดสาร แต่ก็มีข้อจำกัดคือ จะต้องเตรียมสารให้อยู่ในรูปของอนุพันธุ์ที่มีจุดเดือดต่ำและระเหยได้ง่าย กรดฟีนอลิกในรูปกรดคาร์บอกซิลิคจะระเหยกลายเป็นไอ (volatility) ได้ยาก เนื่องจากกรดฟีนอลิกมีขนาดโมเลกุลใหญ่และสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) ได้ ทำให้จุดเดือด (boiling points) สูงขึ้น เมื่อทำให้อยู่ในรูปอนุพันธุ์จะระเหยกลายเป็นไอได้ง่ายขึ้น และค่าจุดเดือดต่ำลง อีกทั้งเทคนิค SPME จำเป็นต้องใช้ SPME fiber ซึ่งมีราคาแพง และเมื่อมีการใช้งานไประยะหนึ่งจะต้องเปลี่ยน SPME fiber อันใหม่ เนื่องจากสารที่เคลือบบน SPME fiber ที่ใช้ในการดูดซับตัวอย่างจะค่อยๆ หลุดไปทำให้ใช้งานต่อไปไม่ได้ นอกจากนี้ยังมีอีกวิธีที่กำลังเป็นที่นิยมคือการใช้เทคนิคที่เรียกว่า single drop microextraction (SDME) [27] เป็นการใช้ตัวทำละลายเพียงหยดเดียวในการสกัดสาร ซึ่งเทคนิคนี้ Jeannot และ Cantwell เป็นผู้พัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1997 โดยใช้ microsyringe ดูดตัวทำละลายที่มีปริมาตรเพียง 1 ไมโครลิตรหรือเพียงหยดเดียว แล้วจุ่มปลายเข็มของ syringe ลงในตัวอย่าง จากนั้นกด plunger ของ syringe จะทำให้ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดไหลออกมาจาก syringe เกิดเป็นหยดของตัวทำละลายอยู่ที่ปลายเข็ม สารที่ต้องการวิเคราะห์ที่อยู่ในตัวอย่างจะถูกสกัดเข้าไปอยู่ในหยดของตัวทำละลาย จากนั้นดึง plunger ของ syringe เพื่อดูดหยดของตัวทำละลายกลับเข้าไปใน syringe แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC เพื่อทำการแยกสารและวิเคราะห์ปริมาณของสารต่อไป ข้อจำกัดของวิธีนี้ก็เช่นเดียวกับวิธี SPME คือ จะต้องเตรียมสารให้อยู่ในรูปของอนุพันธุ์ที่มีจุดเดือดต่ำและระเหยได้ง่าย นอกจากนี้วิธีนี้เป็นการสกัดสารที่ไม่ถึงจุดสมดุลของการสกัด ทำให้ได้ปริมาณการสกัดแต่ละครั้งไม่เท่ากัน หากการควบคุมเวลาหรือขนาดของหยดไม่เท่ากัน ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณของสารจึงจำเป็นต้องทำการเตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยให้มีสภาวะของการทดลองได้แก่ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด อัตราการกวนและเวลาที่ใช้ในการสกัดสาระลายมาตรฐานเหมือนกับตัวอย่างทุกประการ ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยากและเกิดความคลาดเคลื่อนได้ อีกทั้งการควบคุมตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างให้มีปริมาตรแน่นอนหรือคงที่เพียง 1 ไมโครลิตรหรือเพียงหยดเดียว มักทำได้ไม่ง่ายนัก ซึ่งหากปริมาตรเปลี่ยนแปลงไปก็จะมีผลต่อปริมาณสารที่สกัดออกมาได้เปลี่ยนแปลงไปด้วยทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ไม่ถูกต้อง

จากการศึกษาของ Lilitchan et al [28] พบว่า วิธีการสกัดสารเพียงบางส่วน (partial extraction method) และอาศัยค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับของสาร (adsorption coefficient; K_d) มาช่วยคำนวณหาปริมาณสารทั้งหมดในตัวอย่าง สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมด และแกมมาโอไรซานอลในรำข้าวได้อย่างถูกต้อง ค่าที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับการ

วิเคราะห์ปริมาณสารด้วยวิธีดั้งเดิม โดยวิธีใหม่ที่นำเสนอนี้มีข้อดีกว่า คือ เป็นวิธีที่รวดเร็วและสามารถลดปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เมื่อเทียบกับวิธีการดั้งเดิม และเมื่อเทียบกับวิธี SPME และ SDME วิธีการของ Lilitchan et al [28] ให้ข้อดีคือ การสกัดแต่ละครั้งจะสกัดที่จุดสมดุล ความแปรปรวนของข้อมูลจะลดน้อยลงกว่า 2 วิธีที่กล่าวมา อีกทั้งสารที่สกัดได้ยังสามารถนำมาวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธีการทางเคมีต่างๆ ได้ดี หรืออาจจะใช้เตรียมอนุพันธ์เพื่อการวิเคราะห์โดย GC

ดังนั้นในการศึกษานี้สนใจศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกในน้ำผลไม้ด้วยวิธีการของ Lilitchan et al [28] โดยทำการสกัดสารเพียงบางส่วน และอาศัยค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายของสาร (partition coefficient; K_p) มาช่วยในการคำนวณปริมาณสารทั้งหมดในตัวอย่าง และการวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกและแกมมา-โอไรซานอลในตัวอย่างรำข้าว และกากรำข้าวด้วยวิธีการของ Lilitchan et al [28] โดยทำการสกัดสารเพียงบางส่วน และอาศัยค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับของสาร (adsorption coefficient; K_d) มาช่วยในการคำนวณปริมาณสารทั้งหมดในตัวอย่าง

6. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

6.1 เพื่อพัฒนาวิธีใหม่สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกในน้ำผลไม้ด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเพียงบางส่วน และอาศัยค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายของสาร (partition coefficient; K_p) มาช่วยในการวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างถูกต้อง สะดวกและรวดเร็ว

6.2 เพื่อพัฒนาวิธีใหม่สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกและแกมมา-โอไรซานอลในตัวอย่างรำข้าว และกากรำข้าวด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเพียงบางส่วน และอาศัยค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับของสาร (adsorption coefficient; K_d) มาช่วยในการวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างถูกต้อง สะดวกและรวดเร็ว

7. ขอบเขตของการวิจัย

7.1 ศึกษาหาค่า K_p ของกรดฟีนอลิกระหว่างชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดกับชั้นของน้ำผลไม้ด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนโดยตรวจวัดปริมาณสารด้วยเทคนิค isocratic HPLC

7.2 ศึกษาการวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในน้ำผลไม้ด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วน และใช้ค่า K_p เข้าช่วย โดยทำการตรวจวัดปริมาณสารด้วยเทคนิค isocratic HPLC

7.3 ศึกษาหาค่า K_d ของกรดฟีนอลิกและแกมมา-โอไรซานอลระหว่างชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดกับชั้นของตัวอย่างรำข้าวและกากรำข้าวด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนโดยตรวจวัดปริมาณสารด้วยเทคนิค isocratic HPLC

7.4 ศึกษาการวิเคราะห์กรดฟีนอลิกและแกมมา-โอไรซานอลในตัวอย่างรำข้าวและกากรำข้าวด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วน และใช้ค่า K_d เข้าช่วย โดยทำการตรวจวัดปริมาณสารด้วยเทคนิค isocratic HPLC

7.5 ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในน้ำผลไม้ด้วยวิธีในข้อ 7.2 และในรำข้าวและกากรำข้าวด้วยวิธีในข้อ 7.4 โดยเทียบกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม (Sovent extraction หรือ Soxhlet extraction)

8. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผักและผลไม้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ดังนั้นผักและผลไม้จึงจัดเป็นแหล่งอาหารที่จำเป็นของมนุษย์ในแง่ของสุขภาพ และการต้านทานต่อโรคภัยที่เป็นผลมาจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันขององค์ประกอบ พวกไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลีอิกในร่างกาย รวมถึงองค์ประกอบต่างๆ ของอาหารที่บริโภค ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับเซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกาย เป็นผลทำให้เซลล์ถูกทำลาย อนุมูลอิสระสามารถทำอันตรายต่อ ดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมได้ ในระยะยาวการได้รับอนุมูลอิสระสะสมเรื่อยๆ มีส่วนทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคไขมันในหลอดเลือด โรคความดันสูง โรคที่เป็นความผิดปรกติที่เกิดจากการเสื่อมสลายของเซลล์ เช่น โรค Parkinson's และ Ahlzeimer's diseases รวมถึงการเกิดริ้วรอยและการแก่ก่อนวัย [3-8, 29-30]

Wang และคณะ [31] ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระจากผลไม้ชนิดต่างๆ พบว่า สตรอเบอรี่ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้สูงที่สุด รองลงมาเป็น พลัม ส้ม องุ่นแดง ผลกีวี เกรฟฟรุท องุ่นเขียว แอปเปิ้ล มะเขือเทศ honeydew แพร์ และ กล้วย ตามลำดับ สำหรับประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระจากน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ ที่มีขายในท้องตลาดพบว่า น้ำองุ่นมีค่าสูงที่สุด รองลงมาเป็น น้ำเกรฟฟรุท น้ำมะเขือเทศ น้ำส้ม และน้ำแอปเปิ้ล ตามลำดับ

Prior และคณะ [32] ได้วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณ anthocyanin และประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระของเบอร์รีสายพันธุ์ต่างๆ พบว่า เมื่อผลไม้มีความบริบูรณ์ (maturity) เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณ anthocyanin และปริมาณสารประ กอบฟีนอลิกทั้งหมดก็เพิ่มขึ้นด้วย

การศึกษาถึงวิธีการสกัดแยกและการวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกในผักและผลไม้ ก็เป็นงานวิจัยอีกส่วนที่มีนักวิจัยมากมายให้ความสนใจ

ตัวอย่างเช่น Fernandez de Simon และคณะ [14] ได้ศึกษาการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำส้ม น้ำแอปเปิ้ล น้ำสับประรด น้ำลูกพีช น้ำแอพริคอท น้ำลูกแพร์ และน้ำองุ่น โดยทำการสกัดสารในน้ำผลไม้แต่ละชนิดด้วยตัวทำละลาย diethyl ether และ ethyl acetate จากนั้นนำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) และ thin layer chromatography (TLC) ทำการตรวจวัดสารด้วย diode array detector จากการศึกษาพบกรด gallic ในน้ำองุ่นเพียงอย่างเดียวเท่านั้น นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนอลิกอิสระ เช่น cinnamic acid, caffeic

acid, ρ-coumaric acid, ferulic acid, และ sinapic acid พบว่ามีในน้ำผลไม้เกือบทุกชนิด ยกเว้น sinapic acid ที่พบในน้ำส้มและน้ำสับประรดเท่านั้น

Tomás-Lorente และคณะ [15] ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์แยมผลไม้ จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า การวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในแยมผลไม้ชนิดต่างๆ มักมีปัญหาและอุปสรรคในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เนื่องจากในตัวอย่างแยมผลไม้จะประกอบด้วยน้ำตาลและเพคตินในปริมาณที่สูง ทำให้การสกัดสารประกอบฟีนอลิกออกจากตัวอย่างได้ยาก ในการศึกษาได้เสนอแนวทางในการแก้ไขด้วยการกรองสารที่สกัดได้จากตัวอย่างมาผ่านคอลัมน์ชนิด XAD-2 resin ก่อนนำตัวอย่างไปวิเคราะห์องค์ประกอบกรดฟีนอลิกด้วยเทคนิค HPLC พบว่าวิธีการนี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในผลิตภัณฑ์แยมผลไม้ชนิดต่างๆ ได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณ flavaniods และสารประกอบ ฟีนอลิกในแยมผลไม้ชนิดต่างๆ เช่น แยมแอพริคอท แยมลูกพีช แยมพลัม แยมสตอเบอร์รี แยมส้ม แยมแอปเปิ้ล และแยมลูกแพร์

Suárez Vallés และคณะ [33] ได้ศึกษาการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในแอปเปิ้ลสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction โดยทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และทำการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค RP-HPLC บนคอลัมน์ C_{18} ทำการตรวจวัดสารด้วย diode array detector จากผลการทดลอง พบว่า สารประกอบฟีนอลิกชนิดไม่มีขั้ว (neutral phenolic compounds) ที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำแอปเปิ้ล ได้แก่ เอสเทอร์ของ caffeic acid และ ρ-coumaric acid กับ quinic acid

จากการศึกษาของ Oleszek และคณะ [34] รายงานว่ากรดฟีนอลิกที่พบมากในลูกแพร์ ได้แก่ chlorogenic acid, caffeic acid, ρ-coumaroyl quinic และ ρ-coumaric acid โดยในการศึกษานี้ได้ทำการสกัดแยกกรดฟีนอลิกจากตัวอย่างลูกแพร์ด้วย 25% เมทานอล และทำการสกัดแยกสารและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

Andrade และคณะ [16] ได้ทำการศึกษาวิธีการสกัดแยกและวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก 13 ชนิด ได้แก่ arbutin, 3-*O*-caffeoylquinic acid, (+)-catechin, ρ-hydroxybenzoic acid, 5-*O*-caffeoyl quinic acid, (-)-epicatechin, ρ-coumaric acid, phloretin 2′-xylosylglucoside, phloretin 2′-glucoside, rutin, quercetin 3-galactoside, quercetin 3-xyloside, quercetin 3-rhamnoside จากตัวอย่างน้ำผลไม้ตีป่น (puree) จำนวน 3 ชนิด คือ น้ำลูกควินซ์ตีป่น (quince puree) น้ำลูกแพร์ตีป่น (pear puree) น้ำแอปเปิ้ลตีป่น (apple puree) ในการทดลองนี้ได้ทำการสกัดตัวอย่าง 2 ครั้งด้วยวิธีที่ต่างกัน ซึ่งการสกัดในครั้งแรกอาศัยวิธี solid phase extraction โดยนำตัวอย่างน้ำผลไม้ตีป่นมาผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Amberlite XAD-2 ที่มีขนาดอนุภาค 0.3-1.2 มิลลิเมตร และมีขนาดรูพรุนเท่ากับ 9 นาโนเมตร ทำการชะสารออกจากคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นนำตัวอย่างมาทำการสกัดอีกครั้งด้วยวิธี solvent extraction ด้วยตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นทำการวิเคราะห์สารด้วย PHLC-Diode array detection จากการ

ทดลอง สามารถตรวจพบ phloretin 2′-xylosylglucoside และ phloretin 2′-glucoside เป็นองค์ประกอบในแอปเปิ้ล แต่ในลูกแพร์ตรวจพบ arbutin เป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้พบว่าในน้ำลูกควินซ์ตีป่นมีปริมาณ 3-*O*-caffeoylquinic acid ประมาณ 23.4 % ในขณะที่น้ำลูกแพร์ตีป่นมีเพียง 8.2 % และไม่พบในน้ำแอปเปิ้ลตีป่น

Amakura และคณะ [35] ได้ทำการศึกษาการวิเคราะห์กรดฟีนอลิก 5 ชนิด ได้แก่ gallic, chlorogenic , caffeic , ellagic และ ferulic acid ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพธรรมชาติ (bioactive) ที่พบในตัวอย่างน้ำผลไม้ต่างๆ เช่น น้ำแอปเปิ้ล น้ำองุ่น น้ำทับทิม น้ำลูกพรุน การทดลองนี้ได้ทำการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี solid phase extraction และทำการตรวจวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค LC ที่ความดันคงที่ โดยตรวจวัดสารด้วย photodiode array UV detector จากการศึกษา พบว่าน้ำลูกพรุนและน้ำแอปเปิ้ลมีกรด chlorogenic เป็นองค์ประกอบมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 190.2 และ 16.6 μg/g ตามลำดับ ในขณะที่น้ำทับทิมมีกรด ellagic เป็นองค์ประกอบมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 14.3 μg/g และน้ำองุ่นมีกรด gallic เป็นองค์ประกอบมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 12.5 μg/g

Chen และคณะ [22] ศึกษาการพัฒนาวิธีการสกัดแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระฟลาวานอยด์และสารประกอบฟีนอลิกในน้ำผลไม้แครนเบอร์รี โดยทำการสกัดสารด้วยวิธี solid phase extraction และทำการตรวจวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค HPLC จากผลการทดลองพบว่าในน้ำผลไม้แครนเบอร์รีมีปริมาณรวมของฟลาวานอยด์และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด มีค่าเท่ากับ 400 mg/g ของน้ำผลไม้ โดยมีกรดฟีนอลิกเป็นองคีประกอบอยู่ประมาณ 44 % และฟลาวานอยด์เป็นองค์ประกอบประมาณ 56 % สำหรับสารประกอบฟีนอลิกที่พบเป็นองค์ประกอบหลัก คือ benzoic acid

ต่อมา Schieber และคณะ [17] ได้ศึกษาวิธีการวิเคราะห์และแยกกรดฟีนอลิกและฟลาวานอยด์ในแอปเปิ้ลและลูกแพร์ โดยทำการสกัดแยกสารด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และทำการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค HPLC จากการศึกษา พบว่ากากผลแอปเปิ้ลที่คั้นน้ำออกแล้ว (apple pomace) เป็นแหล่งของกรดฟีนอลิก โดยปริมาณของกรดฟีนอลิกในกากผลแอปเปิ้ลจะขึ้นอยู่กับสภาวะของการทำแห้งและจากการทดลองพบว่า chlorogenic acid เป็นกรดฟีนอลิกที่พบมากในน้ำแอปเปิ้ลและน้ำลูกแพร์สายพันธุ์ต่างๆ

Mattila และ Kumpulainen [36] ได้ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกอิสระ (free phenolic acids) และปริมาณกรดฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic acids) ในผักและผลไม้ เช่น มันฝรั่ง แอปเปิ้ล มะเขือเทศ แครอท ราสเบอร์รี สตอเบอร์รี น้ำแอปเปิ้ล ไวน์ และกาแฟ ที่ทำการสกัดแยกกรดฟีนอลิกจากตัวอย่างอาหารด้วยวิธี solvent extraction โดยการสกัดแยกกรดฟีนอลิกอิสระใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลและกรดอะซิติก เข้มข้น 10 % สำหรับกรดฟีนอลิกที่ไม่อิสระ (bound phenolic acids) นำมาไฮโดรไลซ์ด้วยด่างและกรด ตามลำดับ จากนั้นนำมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง diethyl ether และ ethyl acetate ที่อัตราส่วน 1:1 และทำการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค HPLC โดยตรวจวัดสารด้วยเครื่อง diode array

detector จากการศึกษากรดฟีนอลิกที่พบในอาหาร ได้แก่ *m*-hydroxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, gallic acid, vanillic acid, syringic acid, *o*-coumaric acid, *m*-coumaric acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, sinapic acid, chlorogenic acid และ ellagic acid

Zuo และคณะ [37] ได้ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณของ benzoic และ phenolic acids ในแครนเบอร์รีที่เตรียมให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ trimethylsilyl โดยทำการตรวจวัดและวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค GC-MS จากการวิเคราะห์พบสารทั้งสองในแครนเบอร์รีทั้งหมด 15 ชนิด ได้แก่ benzoic, *o*-hydroxy- benzoic, cinnamic, *m*-hydroxybenzoic, *p*-hydroxybenzoic, *p*-hydroxyphenyl acetic, phthalic, 2,3-dihydroxybenzoic, vanillic, *o*-hydroxycinnamic, 2,4-dihydroxybenzoic, *p*-coumaric, ferulic, caffeic และ sinapic acid จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าแครนเบอร์รีมีกรดฟีนอลิกและกรดเบนโซอิกเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูง (5.7 g/Kg ของน้ำหนักผลสด) โดยมีกรดเบนโซอิกเป็นองค์ประกอบมากที่สุด (4.7 g/Kg ของน้ำหนักผลสด) รองมาเป็น *p*-coumaric acid (0.25 g/Kg ของน้ำหนักผลสด) และ sinapic acid (0.21 g/Kg ของน้ำหนักผลสด) และพบว่ากรดเบนโซอิกและกรดฟีนอลิกส่วนใหญ่อยู่ในรูปไม่อิสระ (bound forms) ซึ่งมีเพียง 10% เท่านั้นที่พบในรูปอิสระ (free acid)

Tian และคณะ [24] ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในข้าว โดยทำการแยกสกัดตัวอย่างข้าวด้วยตัวทำละลาย 70% เอทานอล ทำการกรองและสกัดไขมันออก จากนั้นนำส่วน aqueous solution มาทำการสกัดด้วยเทคนิค SPE โดยใช้ C_{18} silica gel cartridge และทำการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค HPLC-ESI-MS (electrospray ionization mass) จากการศึกษา พบว่าวิธีนี้สามารถนำมาตรวจวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในข้าวได้ กรดฟีนอลิกที่พบในข้าว ได้แก่ 6′-*O*-feruloylsucrose, 6′-*O*-sinapoylsucrose, ferulic acid, sinapinic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic (3-caffeoylquinic) acid, caffeic acid, protocatechuic acid, hydroxybenzoic acid, vanillic acid และ syringic acid

Tarnawski และคณะ [38] ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกในตัวอย่างสารสกัดลูกพีทเข้มข้น โดยทำการสกัดแยกสารด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate จากนั้นทำการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค RP-HPLC และตรวจวัดด้วย UV-vis spectrophotometer จากการศึกษา พบว่าในสารสกัดลูกพีทมีกรดฟีนอลิกที่องค์ประกอบ ดังนี้ gallic acid, ferulic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, vanillic acid และ protocatechuic acid

Kerem และคณะ [23] ได้เสนอวิธีอย่างง่ายและรวดเร็วในการวิเคราะห์สารประกอบกรดอินทรีย์ (organic acids) และสารประกอบฟีนอลิกไปพร้อมๆ กันในตัวอย่างไวน์และมัสท์ (must) ด้วยเทคนิค LC-UV โดยใช้คอลัมน์แบบ polar end-capping และใช้ตัวทำละลายน้ำที่ pH ต่ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) จากการศึกษา พบว่าสามารถทำการแยก carboxylic acids และสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างไวน์ออกจากกันได้ดี โดยสารประกอบ

ต่างๆ ที่พบในตัวอย่างไวน์ ได้แก่ citric, tartaric, malic, lactic, acetic, caffeic, ellagic และ gallic acids, (-)-epicatechin, quercetin และ resveratrol

Nardini และ Ghiselli [39] ได้เสนอวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกอิสระและไม่อิสระในเบียร์ เนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าการวิเคราะห์กรดฟีนอลิกไม่อิสระส่วนมากมักใช้วิธีการไฮโดรไลซ์ด้วยด่าง ซึ่งมีผลทำให้กรดฟีนอลิกหลายชนิดเกิดการสูญเสียไปในระหว่างการวิเคราะห์ โดยเฉพาะอนุพันธุ์ของไดไฮดรอกซี ในการศึกษานี้จึงได้เสนอการเติมสาร ascorbic acid ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ ethylenediamine -tetraacetic acid ซึ่งเป็นสารคีเลตกับโลหะ ทั้งนี้เพื่อช่วยลดหรือป้องกันการสูญเสียกรดฟีนอลิกในขั้นตอนการไฮโดรไลซ์สารด้วยด่าง จากผลการทดลอง พบว่าสามารถ recovery สาร caffeic acid ได้อย่างสมบูรณ์ (98.7 $\pm$ 4.3 %) นอกจากนี้ ได้นำวิธีการวิเคราะห์นี้ไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกอิสระและปริมาณกรดฟีนอลิกทั้งหมด (ปริมาณกรดฟีนอลิกอิสระ+ กรดฟีนอลิกไม่อิสระ) ในตัวอย่างเบียร์ พบว่าหลังการไฮโดรไลซ์ตัวอย่างเบียร์ยี่ห้อต่างๆ จำนวน 3 ชนิด มีปริมาณกรดฟีนอลิกไม่อิสระถูกปลดปล่อยออกมา ซึ่งทำให้ปริมาณกรดฟีนอลิกมีปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น โดยกรดฟีนอลิกที่สามารถตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ 4-hydroxyphenylacetic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid และ sinapic acid จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากรดฟีนอลิกส่วนใหญ่ในเบียร์จะอยู่ในรูปของกรดฟีนอลิกไม่อิสระ และมีเพียงส่วนน้อยที่พบในรูปกรดฟีนอลิกอิสระเท่านั้น

นอกจากวิธีทั่วไปซึ่งได้กล่าวมาแล้ว ปัจจุบันมีงานวิจัยที่พยายามจะลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ลงโดยการนำเทคนิคอื่นๆ มาใช้ในการสกัดแยกกรดฟีนอลิกในตัวอย่างอาหาร เช่น เทคนิคที่เรียกว่า solid phase microextraction (SPME) และ single drop microextraction (SDME) ดังเช่นในงานวิจัยของ Saraji และ Mousavinia [27] ได้เสนอวิธีการวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในตัวอย่างอาหาร 3 ชนิด คือ น้ำแอปเปิ้ล น้ำทับทิม และเปลือกแอปเปิ้ลอบแห้ง โดยใช้เทคนิค SDME มาใช้ในการสกัดแยกกรดฟีนอลิกด้วยตัวทำละลาย hexyl acetate และเตรียมกรดฟีนอลิกให้อยู่ในรูปอนุพันธุ์ด้วย *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide ภายใน syringe จากนั้นจึงนำไปทำการวิเคราะห์ต่อด้วย GC-MS โดยกรดฟีนอลิกที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ cinnamic acid, *o*-coumaric acid และ *p*-hydroxybenzoic acid จากการศึกษานี้ยังพบว่าชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ ปริมาตรของตัวทำละลาย เวลาที่ใช้ในการสกัด อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ค่า pH และ ionic strength ของสารละลายเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดกรดฟีนอลิกในผลไม้และน้ำผลไม้ด้วยเทคนิค SDME

Citová และคณะ [26] ได้เสนอวิธีการวิเคราะห์กรดฟีนอลิกด้วยเทคนิคการสกัดสารแบบ SPME และทำการเตรียมตัวอย่างให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ ethyl และ methyl chloroformate จากนั้นนำไปวิเคราะห์และตรวจวัดด้วย GC-FID โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการวิเคราะห์กรดฟีนอลิกชนิดต่างๆ ได้แก่ *p*-coumaric, protocatechuic, syringic และ vanillic acid จากการทดลอง พบว่าการเตรียมกรดฟีนอลิกให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ methyl chloroformate เหมาะสม

สำหรับการสกัดด้วยเทคนิค SPME และในงานวิจัยได้ศึกษาการสกัดสารด้วย SPME fiber ชนิดต่างๆ ได้แก่ polyacrylate (PA), polydimethyl siloxane (PDMS) และ polydimethylsiloxane/divinylbenzane (PDMS/DVB) พบว่า PA เป็น fiber ที่ให้ผลการวิเคราะห์ดีที่สุด ภายใต้สภาวะการทดลองที่อุณหภูมิ 25 °C และ desorption time เป็นเวลา 10 นาที

จากงานวิจัยที่ผ่านมาของผู้วิจัย [28] ซึ่งได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยวิธีการสกัดสารออกมาเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลาย สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอไรซานอลในรำข้าว โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การการดูดซับของสาร (adsorption coefficient; K_d) ได้จากการสกัดสารตัวอย่าง 2 ชุดในปริมาณเท่ากัน แต่ให้ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์ ในชุดที่ 2 เป็น 2 เท่าของตัวทำละลายในชุดที่ 1 ร่วมกับการแก้สมการทางคณิตศาสตร์ และวิเคราะห์สารด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) จากผลการวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอไรซานอลในรำข้าวสายพันธุ์ กข 6 ด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมีร้อยละ 20.72 (น้ำหนักแห้ง) และ 3.43 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการหาปริมาณไขมันทั้งหมดและแกมมาโอไรซานอลด้วยวิธี Soxhlet extraction ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 21.25 และ 3.67 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ โดยวิธีใหม่ที่นำเสนอนี้สามารถลดปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์ อีกทั้งไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะสำหรับการสกัดสาร จากหลักการการวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธีใหม่นี้น่าจะสามารถขยายผลนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างอาหารอื่นๆ ต่อไปได้ด้วย

9. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

9.1. วัตถุดิบและสารเคมี

- น้ำแอปเปิ้ล (บริษัททิปโก้ ประเทศไทย จำกัด)
- รำข้าวพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ หอมนิล, ปราจีนบุรี 7, ขาวดอกมะลิ 105, กข 5 จากจังหวัดอำนาจเจริญ ประเทศไทย
- กากรำข้าว (บริษัทน้ำมันรำข้าวสุรินทร์ จำกัด)
- ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นชนิด HPLC grade

9.2. อุปกรณ์

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) : HPLC pump รุ่น Waters 510 เครื่องตรวจวัดชนิด UV Spectrophotometer รุ่น Waters 2487 (ทั้งหมดจากบริษัท Waters ประเทศ

สหรัฐอเมริกา) ประมวลผลด้วย Clarity software (บริษัท Data Apex ประเทศสาธารณรัฐเช็ก)

- ACE C18-AR column (5 µm, 200 x 4.6 mm) was from Phenomenex (Phenomenex, Inc., Torrance, CA).
- Soxtec system HT 1043
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น Ab204 ของบริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- ตู้อบความร้อน
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง รุ่น model 4040 Series (4000 series) ของบริษัท Centurion scientific LTD จาก West Sussex UK
- เครื่องปั่นผสม (Vortex Mixer) ; Lab – line Instruments ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่อง Rotary evaporator รุ่น BUCHI Rotavapor R-200 (ประเทศเยอรมันนี)
- โถดูดความชื้น (Desiccator)
- ถ้วยหาความชื้น (Moisture can)
- เครื่องแก้วต่างๆ เช่น บีกเกอร์ ขวดวัดปริมาตร หลอดทดลองฝาเกลียว ปิเปต (Pipete)
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร

9.3 วิธีทำการทดลอง

9.3.1 สารละลายมาตรฐานและการเตรียม

สารละลายมาตรฐานกรดฟีนอลิก (stock solution) 10 มิลลิกรัมในเมทานอล 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ด้วย HPLC (mobile phase) จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (1-50 มิลลิกรัม/ลิตร)

สารละลายมาตรฐานแกมมา-โอไรซานอล (stock solution) 10 มิลลิกรัมในเมทานอล 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ด้วย HPLC (mobile phase) จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (10-500 มิลลิกรัม/ลิตร)

9.3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของสารสกัดฟีนอลิกด้วยเทคนิค HPLC

วิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกด้วยเครื่อง HPLC คอลัมน์ C 18 reversed-phase HPLC pump รุ่น Waters 510 UV-Detector โดย Mobile phase ที่ใช้คือ 2% acetic acid ในน้ำต่อเมทานอลในอัตราส่วน 82:18 (ปริมาตร/ปริมาตร) [38] โดยควบคุมอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.2 มิลลิลิตร/นาที ใช้ระบบการแยกสารแบบ isocratic elution ตรวจวิเคราะห์ด้วย UV- spectrophotometry detector รุ่น Waters 2487 ที่ความยาวคลื่นที่ 280 และ 320 nm

การวิเคราะห์ลักษณ์ของสารทำโดยการใช้ค่าเวลาคงค้างและการหาปริมาณของสารด้วยวิธีการใช้สารมาตราฐานภายนอก ทำได้โดยสร้างกราฟมาตรฐานหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดฟีนอลิกแต่ละความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟ

9.3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของสารสกัดแกมมา-โอไรซานอลด้วยเทคนิค HPLC

วิเคราะห์หาองค์ประกอบของแกมมา-โอไรซานอลด้วยเครื่อง HPLC คอลัมน์ C 18 reversed-phase HPLC pump รุ่น Waters 510 UV-Detector โดย Mobile phase ที่ใช้คือ เมทานอลต่อกรดอะซิติกในอัตราส่วน 99.5:0.5 (ปริมาตร/ปริมาตร) โดยควบคุมอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.2 มิลลิลิตร/นาที ใช้ระบบการแยกสารแบบ isocratic elution ตรวจวิเคราะห์ด้วย UV- spectrophotometry detector รุ่น Waters 2487 ที่ความยาวคลื่นที่ 326 nm

การวิเคราะห์ลักษณ์ของสารทำโดยการใช้ค่าเวลาคงค้างและการหาปริมาณของสารด้วยวิธีการใช้สารมาตราฐานภายนอก ทำได้โดยสร้างกราฟมาตรฐานหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแกมมา-โอไรซานอลแต่ละความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟ

9.3.4 การหาปริมาณสารด้วยวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม (Classical method)

9.3.4.1 การหาปริมาณกรดฟีนอลิกในน้ำผลไม้

หาปริมาณกรดฟีนอลิกในน้ำผลไม้ด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) โดยนำน้ำผลไม้ 150 มิลลิลิตรมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตรต 150 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง นำมาเจือจางด้วยด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ด้วย HPLC (mobile phase) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มากรองด้วย Syring filter 0.45 µm จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกด้วยเครื่อง HPLC และคำนวณหาปริมาณของกรดฟีนอลิกในน้ำผลไม้ได้โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

9.3.4.2 การหาปริมาณกรดฟีนอลิกและแกมมา-โอไรซานอลในตัวอย่างรำข้าว

หาปริมาณกรดฟีนอลิกและแกมมา-โอไรซานอลในรำข้าวด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้รำข้าว 1 กรัม ใส่ใน thimble และสกัดด้วยเมทานอล ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟี

นอลิกและแกมมา-โอไรซานอล โดยการนำสารที่สกัดได้มาระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ด้วย HPLC (mobile phase) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มากรองด้วย Syring filter 0.45 µm จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกและแกมมา-โอไรซานอลด้วยเครื่อง HPLC และคำนวณหาปริมาณของกรดฟีนอลิกและแกมมา-โอไรซานอลในรำข้าวได้โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

9.3.5 การหาปริมาณสารด้วยการสกัดเพียงบางส่วน (Partial extraction)

9.3.5.1 การหาปริมาณกรดฟีนอลิกในน้ำผลไม้

โดยพิจารณาจากสมการ (1) และ (2) แสดงถึงความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสภาวะสมดุล เขียนได้

$$K_p = \frac{[U]}{[L]} \quad (1)$$

หรือ

$$K_p = \left(\frac{M_U}{V_U}\right)\left(\frac{V_L}{M_L}\right) \quad (2)$$

K_p = สัมประสิทธิ์การแบ่งละลาย (partition coefficient; K_p)

[U] = ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลายชั้นบน

[L] = ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลายชั้นล่าง

M_U = ปริมาณของตัวถูกละลายในตัวทำละลายชั้นบน

M_L = ปริมาณของตัวถูกละลายในตัวทำละลายชั้นล่าง

V_U = ปริมาตรของตัวทำละลายชั้นบน

V_L = ปริมาตรของตัวทำละลายชั้นล่าง

โดยตวงน้ำผลไม้ 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว 2 หลอด โดยในหลอดที่ 1 เติมตัวทำละลายลงไป 4 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 2 เติมตัวทำละลายลงไป 8 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าอย่างแรงโดยใช้เครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนสารแขวนลอยต่างๆ หลังจากนั้นจึงกรองผ่านกระดาษกรอง นำส่วนสารละลายใสที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณและการหาค่า K_p ทำได้โดยกำหนดให้

W = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

Y = ปริมาณสารทั้งหมดในตัวอย่าง

X_1 = ปริมาณตัวถูกละลายในวัฏภาคของตัวทำละลายที่สกัดได้ในชุดที่ 1

X_2 = ปริมาณตัวถูกละลายในวัฏภาคของตัวทำละลายที่สกัดได้จากการใช้ปริมาตรของตัวทำละลายเป็น 2 เท่าในการสกัดชุดที่ 2

ดังนั้นสมการของการสกัดในชุดที่ 1 คือ

$$K_1 = \left(\frac{X_1}{V_1}\right)\left(\frac{W}{Y - X_1}\right) \quad (3)$$

การสกัดในชุดที่ 2

$$K_2 = \left(\frac{x_2}{V_2}\right)\left(\frac{W}{Y - X_2}\right) \quad (4)$$

แต่ K_1 = K2 และ V_2 = $2V_1$

$$\left(\frac{X_1}{V_1(Y - X_1)}\right) = \left(\frac{X_2}{V_2(Y - X_2)}\right) \quad (5)$$

จะได้

$$Y = \frac{X_1 X_2}{2X_1 - X_2} \quad (6)$$

ดังนั้นจะสามารถหาปริมาณสารทั้งหมดในตัวอย่าง (Y) จากสมการ (6) ได้ และเมื่อแทนค่า Y ลงในสมการ (3) หรือ (4) จะได้ค่า K_p

9.3.5.2 การหาปริมาณกรดฟีนอลิกและแกมมา-โอไรซานอลในตัวอย่างรำข้าว

โดยพิจารณาจากสมการ (7) และ (8) แสดงถึงความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสภาวะสมดุล เขียนได้

$$K_d = \frac{C_m}{A_s} \quad (7)$$

หรือ $$K_d = \left(\frac{M_m}{V_m}\right) \Big/ \left(\frac{M_s}{g_s}\right) \quad (8)$$

K_d = สัมประสิทธิ์การดูดซับ (adsorption coefficient)

C_m = ความเข้มข้นของสารในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์

A_s = ปริมาณของสารที่กระจายอยู่ในชั้นของของแข็งต่อหน่วยน้ำหนัก

M_m = ปริมาณของตัวถูกละลายในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์

M_s = ปริมาณของตัวถูกละลายในชั้นของของแข็ง

V_m = ปริมาตรของตัวทำละลายอินทรีย์

g_s = น้ำหนักของของแข็ง

โดยชั่งตัวอย่างต่างๆ ประมาณ 1.0 กรัม ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว 2 หลอด โดยในหลอดที่ 1 เติมตัวทำละลายลงไป 4 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 2 เติมตัวทำละลายลงไป 8 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าอย่างแรงโดยใช้เครื่อง Vortex เป็นเวลา 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ

ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนสารแขวนลอยต่างๆ หลังจากนั้นจึงกรองผ่านกระดาษกรอง นำส่วนสารละลายใสที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณและการหาค่า K_d ทำได้โดยกำหนดให้

W = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

Y = ปริมาณสารทั้งหมดในตัวอย่าง

X_1 = ปริมาณตัวถูกละลายในวัฏภาคของตัวทำละลายที่สกัดได้ในชุดที่ 1

X_2 = ปริมาณตัวถูกละลายในวัฏภาคของตัวทำละลายที่สกัดได้จากการใช้ปริมาตรของตัวทำละลายเป็น 2 เท่าในการสกัดชุดที่ 2

จากสมการที่ (8) การสกัดในชุดที่ 1

$$K_1 = \left(\frac{X_1}{V_1}\right)\left(\frac{W}{Y - X_1}\right) \tag{9}$$

การสกัดในชุดที่ 2

$$K_2 = \left(\frac{x_2}{V_2}\right)\left(\frac{W}{Y - X_2}\right) \tag{10}$$

แต่ $K_1 = K_2$ และ $V_2 = 2V_1$

$$\left(\frac{X_1}{V_1(Y - X_1)}\right) = \left(\frac{X_2}{V_2(Y - X_2)}\right) \tag{11}$$

จะได้

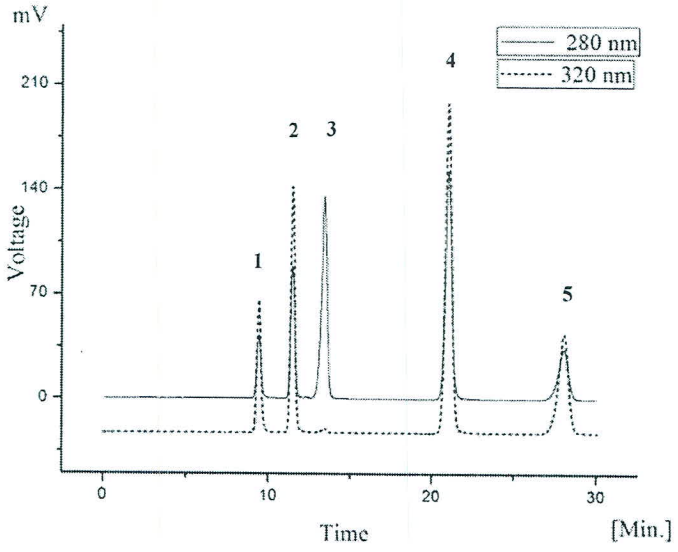
$$Y = \frac{X_1 X_2}{2X_1 - X_2} \tag{12}$$

ดังนั้นจะสามารถหาปริมาณสารทั้งหมดในตัวอย่าง (Y) จากสมการ (12) ได้ และเมื่อแทนค่า Y ลงในสมการ (9) หรือ (10) จะได้ค่า K_d

10. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

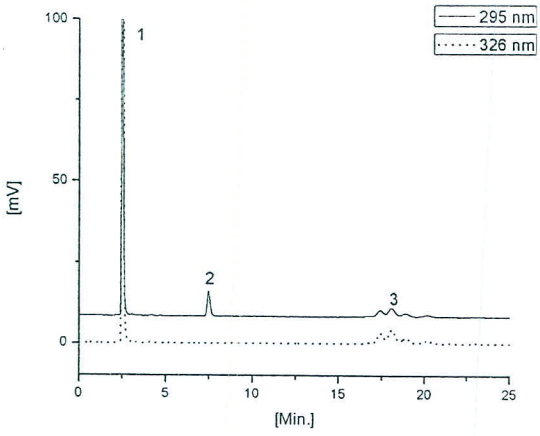
10.1 การทดสอบการใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ในการศึกษานี้มุ่งเน้นพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค HPLC แบบ isocratic elution เพื่อให้เหมาะสมกับเครื่องมืออุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ โดยระบบ isocratic นี้จะมีข้อดีที่องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นสามารถทำการวิเคราะห์สารได้อย่างต่อเนื่อง โดยสภาวะ HPLC ที่ใช้ในการศึกษานี้สามารถแยกพีคของสารออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 10.1 และ 10.2



รูปที่ 10.1 Chromatogram of standards at wavelength of 280 and 320 nm using ACE C18-AR column in mobile phase as 2% (v/v) acetic acid in water – methanol 82:18 (v/v) at flow rate 1.2 ml/min. Peaks : (1) chlorogenic acid; (2) caffeic acid; (3) syringic acid; (4) *p*-Coumaric acid; (5) ferulic acid.

ผลการทดสอบการใช้ได้ของการวิเคราะห์ด้วย HPLC สรุปไว้ในตารางที่ 10.1 เมื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคที่วัดได้กับความเข้มข้นของสารละลายหาความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง โดยการคำนวณค่า R^2 จากกราฟ มีค่าสูงกว่า 0.999 ซึ่งมีค่าใกล้เคียง 1 ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC-UV detection นี้มีความเป็นเส้นตรงสูงและให้ความคลาดเคลื่อนสุ่ม (random error) น้อยมาก สามารถใช้วัดปริมาณกรดฟีนอลิกในตัวอย่างได้ จากผลการทดสอบหาค่า LOD จาก 3 เท่าของ SD และ LOQ จาก 10 เท่าของ SD ได้ LOD เท่ากับ 0.0001 และ LOQ เท่ากับ 0.0003 mg/kg ซึ่งแสดงถึงว่าวิธีนี้มีสมรรถนะดี สามารถวิเคราะห์ปริมาณตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำได้ ซึ่งเหมาะสมกับการวิเคราะห์หากรดเฟอรลิกในตัวอย่างกากรำข้าว



รูปที่ 10.2 Chromatogram of standards at wavelength of 295 and 326 nm using ACE C18-AR column in mobile phase as methanol : acetic acid (99.5:0.5) at flow rate 1.2 ml/min. Peaks: (1) ferulic acid (2) α-tocopherol (3) γ-oryzanol

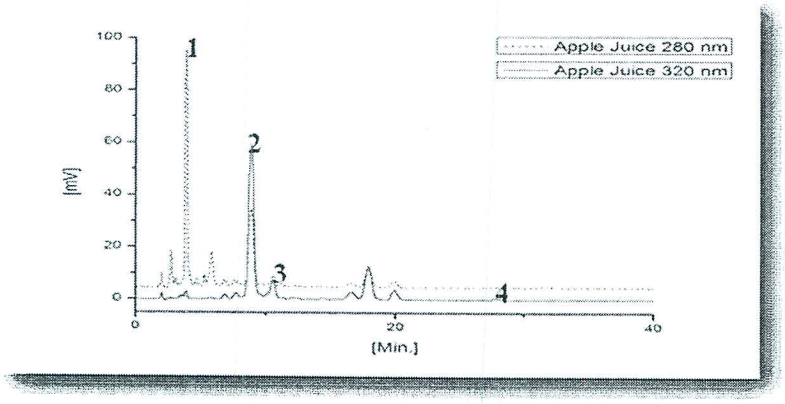
ตารางที่ 10.1 Standard calibration curves, maximum wavelengths (λ_{max}) and method validation data for determination of phenolic compounds by isocratic HPLC-UV detection

Compound	**Linear range (mg/ml)**	**Calibration curves Regression equation** [a]	R^2	**LOD (mg/ml)**	**LOQ (mg/ml)**	λ_{max} **(nm)**
Caffeic acid	0.001-0.1	Y = 66334.53x	0.9997	0.0001	0.0003	320
Chlorogenic acid	0.001-0.1	Y = 37736.06x	0.9987	0.0003	0.001	320
Syringic acid	0.001-0.1	Y = 38998.54x	0.9998	0.0001	0.0002	280
p-Coumaric acid	0.001-0.1	Y = 85720.67x	0.9999	0.0001	0.0004	320
Ferulic acid	0.001-0.1	Y = 69463.45x	0.9959	0.0001	0.0003	320
γ-Oryzanol	0.01-1	$Y = 7.126 \times 10^3 X$	0.9994	0.0021	0.0070	326

[a] y = peak area, x = concentration (mg/ml)

2. วิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณกรดฟีนอลิกในน้ำผลไม้

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกในแอปเปิ้ลประกอบกรดแกลลิก กรดคลอโรจินิก กรดแคฟเฟอิก และกรดเฟอรูลิก (รูปที่ 10.3) โดยพบกรดคลอโรจินิกมีปริมาณสูงที่สุด



รูปที่ 10.3 HPLC chromatograms of apple juice extract at wavelength of 280 and 320 nm using ACE C18-AR column in mobile phase as 2% (v/v) acetic acid in water – methanol 82:18 (v/v) at flow rate 1.2 ml/min. Peaks : (1) gallic acid; (2) chlorogenic acid; (3) caffeic acid; (4) ferulic acid

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกในน้ำแอปเปิ้ลด้วยวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม (classical method) และวิธีการสกัดเพียงบางส่วน (partial extraction) ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 10.2 พบว่าปริมาณกรดฟีนอลิกในน้ำแอปเปิ้ลโดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตรตมีค่าใกล้เคียงกับการหาปริมาณกรดฟีนอลิกโดยใช้ Solvent extraction นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลาย (partition coefficient, K_p) ของกรดแกลลิก กรดเฟอรูลิก และกรดคลอโรจีนิกระหว่างตัวทำละลายเอทิลอะซิเตรตและน้ำแอปเปิ้ลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 0.91, 0.46 และ 0.73 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 10.2 Comparison of the phenolic contents in apple juice using Solvent extraction and partial extraction with isocratic HPLC-UV detection

Compound	Solvent Extraction (mg/L)	Partial Extraction	
		Content (mg/L)	K_p
Gallic acid	1.66 ± 0.09	1.38 ± 0.01	0.91 ± 0.08
Ferulic acid	0.42 ± 0.04	0.42 ± 0.01	0.46 ± 0.09
Chlorogenic acid	36.87 ± 1.80	36.03 ± 0.002	0.73 ± 0.06

นอกจากนี้ได้ศึกษาผลของระยะเวลาต่อปริมาณกรดฟีนอลิกที่สกัดได้ โดยศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดกรดแกลลิกในน้ำองุ่นที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่ 1-5 นาที พบว่าปริมาณกรดแกลลิกที่สกัดมีปริมาณใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 10.3 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธีการสกัดสารเพียงบางส่วนร่วมกับการแก้สมการทางคณิตศาสตร์เป็นวิธีที่มีความถูกต้อง สะดวกและรวดเร็ว โดยวิธีใหม่ที่นำเสนอนี้มีข้อดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม คือ สามารถลดปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (ใช้เพียง 10-15 มิลลิลิตร) ลดปริมาณตัวอย่างที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ (ประมาณ 2-4 มิลลิลิตร) และช่วยลดเวลาในการสกัด (เพียง 1 นาที)

ตารางที่ 10.3 Effect of extraction time on the amount of gallic acid in grape juice using partial extraction

ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด	Content (mg/L)
1 นาที	6.21 $\pm$ 0.71
2 นาที	6.13 $\pm$ 0.30
3 นาที	6.18 $\pm$ 0.71
4 นาที	6.16 $\pm$ 0.17
5 นาที	6.19 $\pm$ 0.27

3. วิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณกรดฟีนอลิกและแกมมา-โอไรซานอลในรำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ และกากรำข้าว

จากการศึกษาของ Lilitchan และคณะ, 2008 [28] แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดสารด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง สะดวก รวดเร็ว และประหยัด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบดั้งเดิม (classical solvent extraction) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาที่ผ่านมายังไม่สามารถวิเคราะห์แยกสารประกอบฟีนอลิกแต่ละตัวที่เป็นองค์ประกอบของรำข้าวได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีความสนใจที่จะขยายวิธีการสกัดสารเพียงบางส่วนนี้ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค isocratic HPLC เพื่อสามารถนำไปวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกแต่ละตัวได้ โดยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนที่ใช้ในการศึกษานี้เลือกใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ทั้งนี้เนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านมานิยมใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดกรดฟีนอลิกและแกมมา-โอไรซานอลจากตัวอย่างรำข้าว [40-42] นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาถึงค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (K_d) ของทั้งกรดฟีนอลิกและแกมมา-โอไรซานอลระหว่างชั้นของเมทานอลกับรำข้าว พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเลือกใช้วิธีการสกัดสารด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วน ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง0.67-3.65 [28] ดังแสดงในตารางที่ 10.5 จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่ารำข้าวสายพันธุ์ต่างๆ มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 10.13-13.79 และกากรำข้าวมีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 9.80 (โดยน้ำหนักแห้ง) จากผลการวิเคราะห์

ปริมาณแกมมา-โอไรซานอลด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วนร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค isocratic HPLC-UV detection ได้เท่ากับ 5.28 ± 0.02 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) มีค่าใกล้เคียงกับการหาปริมาณแกมมา-โอไรซานอลโดยใช้ Soxhlet extraction (5.07 ± 0.05 มิลลิกรัม/รำข้าว 1 กรัม) ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา [28] ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าวิธีการสกัดเพียงบางส่วนนี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์แยกสารประกอบที่สำคัญทางชีวภาพในตัวอย่างรำข้าวได้ ตารางที่ 10.4 แสดงปริมาณกรดฟีนอลิกแต่ละตัวและแกมมา-โอไรซานอลที่สกัดได้จากรำข้าวสายพันธุ์ต่างๆ และกากรำข้าว รวมทั้งค่าที่ได้จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา [43-45] ปริมาณกรดเฟอรูลิกและแกมมา-โอไรซานอลในรำข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) มีอยู่ 20.33 ไมโครกรัม/กรัม และ 5.39 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์กรดฟีนอลิกอื่นๆ ได้แก่ กรดพารา-คูมาริก กรดแคฟฟาอิก กรดไซรินจิกด้วย โดยมีปริมาณน้อยกว่ากรดเฟอรูลิก ซึ่งค่าที่วิเคราะห์ได้เหล่านี้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Butsat & Siriamornpun (2010) แต่มีค่าแตกต่างจากการศึกษาของ Laokuldilok และคณะ (2011) และ Harukaze และคณะ (1999) เนื่องจากมีความแตกต่างของสายพันธุ์ นอกจากนี้พบว่าวิธีการสกัดเพียงบางส่วนสามารถใช้วิเคราะห์หาสารประกอบเหล่านี้ในตัวอย่างกากรำข้าวได้ด้วย โดยพบว่าในกากรำข้าวมีแกมมา-โอไรซานอลเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.48 มิลลิกรัม/กรัม ซึ่งน้อยกว่าในตัวอย่างรำข้าว (3.53-7.98 มิลลิกรัม/กรัม) ทั้งนี้เนื่องจากแกมมา-โอไรซานอลจะถูกสกัดออกไปพร้อมกับกระบวนการสกัดน้ำมันจากรำข้าว ส่วนกรดฟีนอลิกต่าง ๆ ยังคงสามารถตรวจพบในตัวอย่างกากรำข้าวด้วยเช่นกัน โดยกรดฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบหลักในกากรำข้าว ได้แก่ กรดเฟอรูลิก กรดพารา-คูมาริก และกรดแคฟฟาอิก ซึ่งมีอยู่ในปริมาณ 6.17, 31.17 and 1.89 ไมโครกรัม/กรัม ตามลำดับ จากผลการศึกษานี้ พบว่ากรดฟีนอลิกส่วนใหญ่ยังคงเหลืออยู่ในกากรำข้าว หรือกล่าวได้ว่ากรดฟีนอลิกไม่ถูกสกัดออกไปในช่วงการสกัดน้ำมันจากรำข้าวด้วยเฮกเซน ทั้งนี้เพราะกรดฟีนอลิกเป็นสารที่ค่อนข้างโพลาร์ ดังนั้นเฮกเซนซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจึงไม่สามารถสกัดออกไปได้ จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ากากรำข้าวยังคงเป็นแหล่งของกรดฟีนอลิกที่สำคัญ ซึ่งสารสำคัญดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เช่น ด้านอาหาร เครื่องสำอางค์ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เป็นต้น ตารางที่ 10.5 แสดงค่า K_d ของกรดฟีนอลิกแต่ละตัวและแกมมา-โอไรซานอลระหว่างชั้นของเมทานอลและรำข้าวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าอยู่ในช่วง 2.18-3.65 สำหรับกรดฟีนอลิก และ 0.67 สำหรับแกมมา-โอไรซานอล ส่วนค่า K_d ของกรดฟีนอลิกแต่ละตัวและแกมมา-โอไรซานอลระหว่างชั้นของเมทานอลและกากรำข้าวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าอยู่ในช่วง 2.83-3.51 สำหรับกรดฟีนอลิก และ 0.76 สำหรับแกมมา-โอไรซานอล จากผลการศึกษานี้พบว่าค่า K_d ของสารในรำข้าวและกากรำข้าวมีความแตกต่างกันเล็กน้อย น่าจะมาจากผลขององค์ประกอบของน้ำมันและปริมาณความชื้นในตัวอย่าง [28]

พบว่าหากทราบค่า K_d ของสารสามารถนำมาใช้ทำนายหาปริมาณของสารเหล่านั้นได้ด้วยวิธีการสกัดเพียงบางส่วน โดยทำการสกัดเพียงครั้งเดียว ซึ่งจะช่วยให้การวิเคราะห์ทำได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น ผลการทดลองที่ศึกษาได้แสดงไว้ในตารางที่ 10.6 และ10.7 ซึ่งพบว่ามีค่าความแตกต่างที่ได้จากการวิเคราะห์สูงสุดเพียงร้อยละ $\pm$ 3.93 เท่านั้น นอกจากนี้ พบว่าสามารถนำความรู้ของค่า K_d มาช่วยในการทำนายหาค่าประสิทธิภาพของการสกัดได้ ดังแสดงในตารางที่ 10.8 ซึ่งสามารถทำได้โดยสกัดเพียงครั้งเดียวหากทราบค่า K_d ของสาร ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วเพื่อใช้ในการศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดสารต่อไปได้

ตารางที่ 10.4 The amount of phenolic acids and γ-oryzanol in different rice bran varieties and defatted rice bran using partial extraction method with isocratic HPLC-UV detection.

Sample		Content (μg/g)					γ-Oryzanol (mg/g)
		Ferulic acid	*p*-Coumaric acid	Syringic acid	Chlorogenic acid	Caffeic acid	
Rice Bran	Hom Nin	5.05 ± 0.16	36.87 ± 0.97	trace	trace	trace	7.35 ± 0.25
	Prachin Buri 7	7.77 ± 0.27	2.46 ± 0.14	5.09 ± 0.12	8.05 ± 0.36	trace	3.53 ± 0.02
	Khao Dawk Mali 105	20.33 ± 0.61	15.14 ± 0.88	trace	1.27 ± 0.03	trace	5.39 ± 0.10
	RD 5	16.72 ± 0.15	10.93 ± 0.28	trace	trace	3.15 ± 0.96	7.98 ± 0.04
	Laokuldilok et al., 2011[a]	52.3	15.7	-	-	-	3.68
	Butsat & Siriamornporn, 2010[b]	20.70-33.45	5.0-13.0	trace	trace	trace	3.43-5.18
	Harukaze et al., 1999[c]	2.51-29.20	0.10-10.80	-	-	-	-
Defatted rice bran	Surin Bran Oil Co., Ltd.	6.84 ± 0.46	31.17 ± 0.70	trace	trace	1.89 ± 0.03	0.48 ± 0.001
	Renuka Devi & Arumughan, 2007	233 ± 2	-	-	-	-	0.32 ± 0.004

[a] Rice bran of California long grain rice

[b] Rice bran of Khao Dawk Mali 105

[c] Rice bran of 21 Japonica cultivars

ตารางที่ 10.5 Adsorption coefficient (K_d) of phenolic acids and γ-oryzanol in rice bran and defatted rice bran using partial extraction method with isocratic HPLC-UV detection.

Sample	K_d value					
	Ferulic acid	*p*-Coumaric acid	Syringic acid	Chlorogenic acid	Caffeic acid	γ-Oryzanol
Rice bran	3.65	2.89	2.59	2.18	2.24	0.67
Defatted rice bran	3.51	2.83	-	-	2.54	0.76

ตารางที่ 10.6 Comparison the amount of γ-oryzanol in various rice bran samples by using partial extraction and single extraction.

Sample		Content (mg/g)		% Deviation
		Partial extraction	Single extraction *	
Rice bran	Hom Nin	3.68 ± 0.12	3.75 ± 0.04	1.90
	Prachin Buri 7	3.53 ± 0.02	3.62 ± 0.01	2.55
	Khao Dawk Mali 105	5.39 ± 0.10	5.25 ± 0.05	-2.60
	RD 5	7.98 ± 0.04	7.99±0.03	0.13
Defatted rice bran	Surin Bran Oil Co., Ltd	0.489 ± 0.001	0.493±0.007	0.82

* The content was calculated from the K_d value by using Eq. (1).

Data represented mean ± standard deviation (n = 3).

ตารางที่ 10.7 Comparison the amount of phenolic acids in various rice bran samples by using partial extraction and single extraction.

Phenolic acid	Sample		Content (ug/g)		% Deviation
			Partial extraction	Single extraction *	
Ferulic acid	Rice bran	Hom Nin	5.05 ± 0.16	4.93±0.16	-2.38
		Prachin Buri 7	7.77 ± 0.27	8.02 ± 0.62	3.22
		Khao Dawk Mali 105	20.33 ± 0.61	20.36 ± 0.69	0.15
		RD 5	16.72 ± 0.15	17.08 ± 0.07	2.15
	Defatted rice bran	Surin Bran Oil Co., Ltd	6.84 ± 0.46	6.69 ± 0.40	-2.19
p-Coumaric acid	Rice bran	Hom Nin	36.87 ± 0.97	36.11 ± 0.91	-2.06
		Prachin Buri 7	2.46 ± 0.14	2.43 ± 0.05	-1.23
		Khao Dawk Mali 105	15.14 ± 0.88	14.72 ± 0.66	-2.77
		RD 5	10.93 ± 0.28	11.36 ± 0.26	3.93
	Defatted rice bran	Surin Bran Oil Co., Ltd	31.17 ± 0.70	30.93 ± 1.17	-0.77
Syringic acid	Rice bran	Prachin Buri 7	5.09 ± 0.12	4.91 ± 0.16	-2.78
Chlorogenic acid	Rice bran	Prachin Buri 7	8.05 ± 0.36	7.79 ± 0.22	-3.31
		Khao Dawk Mali 105	1.27 ± 0.03	1.24 ± 0.03	-2.21
Caffeic acid	Rice bran	RD 5	3.15 ± 0.96	3.24 ± 0.61	2.99
	Defatted rice bran	Surin Bran Oil Co., Ltd	1.98 ± 0.03	2.00 ± 0.22	1.01

* The content was calculated from the K_d value by using Eq. (1).

Data represented mean ± standard deviation (n = 3).

ตารางที่ 10.8 Extractability of phenolic acids and γ-oryzanol from rice bran (Prachin Buri 7 variety) and defatted rice bran by using single extraction.

Phenolic compounds	Sample	4 ml		8 ml	
		Amount	Extractability* (%)	Amount	Extractability* (%)
Phenolic acids		**(μg/g)**		**(μg/g)**	
Ferulic acid	RB	7.23±0.13	96.27	7.76±0.60	100.00
	DRB	6.24±0.25	99.98	6.47±0.38	100.13
p-Coumaric acid	RB	2.16±0.21	96.63	2.25±0.13	96.35
	DRB	28.08±0.14	98.81	29.65±1.12	100.09
Syringic acid	RB	4.55±0.06	101.61	4.69±0.16	100.27
	DRB	-	-	-	-
Chlorogenic acid	RB	6.86±0.03	98.22	7.42±0.16	100.74
	DRB	-	-	-	-
Caffeic acid	RB	-	-	-	-
	DRB	1.90±0.07	104.15	1.97±0.14	103.26
γ-Oryzanol		**(mg/g)**		**(mg/g)**	
	RB	2.66±0.58	101.05	3.01±0.07	98.61
	DRB	0.370±0.003	99.77	0.423±0.006	100

* The extractability (%) was calculated from equation as $(E_1 \times 100)/ E_2$; E1 was extractable value of single extraction and E_2 was extractable value of PE.

11. สรุปผลการทดลอง

วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเพียงบางส่วนร่วมกับการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค isocratic HPLC สามารถวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนอลิกในน้ำแอปเปิ้ล รำข้าวสายพันธุ์ต่างๆ และกากรำข้าวได้ค่าใกล้เคียงกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม (classical method) ในงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนอลิกและแกมมา-โอไรซานอลในรำข้าวสายพันธุ์ต่างๆ 4 สายพันธุ์ และกากรำข้าวโดยใช้วิธีการสกัดเพียงบางส่วนด้วย กรดฟีนอลิกที่สามารถวิเคราะห์ได้มี 5 ชนิด คือ กรดเฟอรูลิก กรดพารา-คูมาริก กรดคลอโรจีนิก กรดแคฟเฟอิก และกรดไซลินจิก และสามารถหาค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลาย (partition coefficient, K_p) ของกรดฟีนอลิกระหว่างตัวทำละลายเอทิลอะซิเตรตและน้ำแอปเปิ้ลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.46-0.91 และค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ (adsorption coefficient, K_d) ของกรดฟีนอลิกทั้ง 5 ชนิด และแกมมา-โอไรซานอลระหว่างตัวทำละลายเมทานอลและตัวอย่างรำที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าค่า K_d ของกรดฟีนอลิกทั้ง 5 ชนิดมีค่าสูงกว่าค่า K_d ของแกมมา-โอไรซานอลใน

ทุกตัวอย่างของรำข้าว นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ พบว่าวิธีการสกัดเพียงบางส่วนนี้สามารถนำมาใช้ในการทำนายหาค่าปริมาณของสารเหล่านี้ในตัวอย่างรำข้าวทำได้อย่างง่ายๆ โดยสกัดเพียงครั้งเดียวเมื่อทราบค่า K_d ของสาร จากผลการทดลองพบว่าปริมาณของสารที่หาด้วยวิธีการสกัดเพียงครั้งเดียวนี้มีค่าถูกต้องใกล้เคียงกับการสกัดเพียงบางส่วนที่ทำการสกัด 2 ครั้ง โดยมีค่าความแตกต่างของกรดฟีนอลิกทั้ง 5 ชนิด และแกมมา-โอไรซานอลสูงสุดเพียงร้อยละ $\pm$ 3.93 และ $\pm$ 2.60 ตามลำดับ อีกทั้งวิธีการสกัดเพียงบางส่วนเพียงครั้งเดียวนี้ยังสามารถนำไปใช้ในการทำนายหาค่าความสามาถในการสกัดได้ของกรดฟีนอลิก (ร้อยละ 96-104) และ แกมมา-โอไรซานอล (ร้อยละ 99-101) ในตัวอย่างรำข้าวได้อีกด้วย วิธีที่ได้จากการศึกษานี้พบว่าเป็นวิธีที่มีความสะดวก รวดเร็ว และมีความถูกต้องจึงเหมาะสำหรับการใช้วิเคราะห์ในงานประจำ

11. เอกสารอ้างอิง

1. Pietta, P.-G. 2000. Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prod. 63; 1035–1042.
2. Lodovici, M.; Guglielmi, F.; Meoni, M.; Dolara, P. 2001. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. Food Chem. Toxicol. 39; 1205-1210.
3. Ames, B. N.; Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90; 7915-7922.
4. Block, G.; Patterson, B.; Subar, A. 1992. Fruits, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. Nutr. Cancer 18; 1-29.
5. Feldman, E. B. 2001. Fruits and vegetable and the risk of stroke. Nutr. Rev. 59; 24-27.
6. Hertog, M. G.; Fesken, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Kromhout, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary artery disease, the Zutphen Elderly Study. Lancet 342; 1007-1011.
7. Hertog, M. G.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Fidanza, F.; iampaoli, S.; Jansen, A.; Menoti, A.; Nedeljkovic, S.; Pekkarinen, M.; Simic, B. S.; Toshima, H.; Fesken, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. 1995. Flavonoid intake and longterm risk of coronary heart disease and cancerin the seven countries study. Arch. Internal Med. 155; 381-386.
8. Ho, C. T. Phenolic compounds in Food: An overview. In phenolic compounds in food and their effects on health II; Huang, M. T., Ho, C. T., Lee, C. Y., Eds.; ACS Symposium Series 507; American Chemical Society: Washington, DC, 1992; pp 2-7.
9. Macheix, J.-J.; Fleuriet, A.; Billot. J. Fruit Phenolics. CRC Press: Boca Raton, FL, 1990.

10. Ha¨kkinen, S. H.; Ka¨renlampi, S. O.; Heinonen, I. M.; Mykka¨nen, H. M.; To¨rro¨nen, A. R. 1999. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. J. Agric. Food Chem. 47; 2274-2279.
11. Häkkinen, S.; Heinonen, M.; Kärenlampi, S.; Mykkänen, H.; Ruuskanen, J.; Törrönen, R. 1999. Screening of selected favonoids and phenolic acids in 19 berries. Food Res. Int. 32; 345-353.
12. Romani, A.; Mulinacci, N.; Pinelli, P.; Vincieri, F.F.; Cimato, A. 1999. Polyphenolic content in five Tuscany Cultivars of *Olea europaea* L. J. Agric. Food Chem. 47; 964-967.
13. Lee, D.; Kang, S.J.; Lee, S.H.; Ro, J.; Lee, K.; Kinghorn, A.D. 2000. Phenolic compounds from the leaves of *Cornus controversa*. Phytochemistry 53; 405-407.
14. Fernandez de Simon, B.; Perez-Ilzarbe, J.; Hernandez, T.; Gomez-Cordoves, C.; Estrella, I.; 1992. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. J. Agric. Food Chem. 40; 1531-1535.
15. Tomas-Lorente, F.; Garcia-Viguera, C.; Ferreres, F.; Tomas-Barberan, F.A. 1992. Phenolic compounds analysis in the determination of fruit jam Genuineness. J. Agric. Food Chem. 40; 1800-1804.
16. Andrade, P.B.; Carvalho, A.R.F.; Seabra, R.M.; Ferreira, M.A. 1998. A Previous study of phenolic profiles of quince, pear, and apple purees by HPLC diode array detection for the evaluation of quince puree Genuinenes. J. Agric. Food Chem. 46; 968-972.
17. Schieber, A.; Keller, P.; Carle, R. 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A 910; 265–273.
18. Degenhardt, A., Hofmann, S., Knapp, H., Winterhalter, P. 2000. Preparative isolation of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and application of the color activity concept to red wine. J. Agric. Food Chem. 48; 5812–5818.
19. Parejo, I.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Codina, C. 2004. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C18 column. Anal.Chim. Acta 512; 271–280.
20. Fiamegos, Y. C.; Nanos, C. G.; Vervoort, J.; Stalikas, C. D. 2004. Analytical procedure for the in-vial derivatization—extraction of phenolic acids and flavonoids

in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. J. Chromatogr. A 1041; 11–18.

21. Adams, M. A.; Chen, Z.; Landman, P.; Colmer, T. D. 1999. Simultaneous determination by capillary gas chromatography of organic acids, sugars, and sugar alcohols in plant tissue extracts as their trimethylsilyl derivatives. Anal. Biochem. 266; 77–84.
22. Chen, H.; Zuo, Y.; Deng, Y. 2001. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A 913; 387–395.
23. Kerem, Z.; Bravdo, Z.; Shoseyov, Z.; Tugendhaft, Y. 2004. Rapid liquid chromatography–ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. J. Chromatogr. A 1052; 211–215.
24. Tian, S.; Nakamura, K.; Cui, T.; Kayahara, H. 2005. High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. J. Chromatogr. A 1063; 121–128.
25. Zeng, Z.; Zhang, H.; Chen, J.Y.; Zhang, T.; Matsunaga, R. 2008. Flavor volatiles of rice during cooking analyzed by modified headspace SPME/GC-MS. Cereal Chem. 85; 140-145.
26. Citová, I.; Sladkovský, R.; Solich, P. 2006. Analysis of phenolic acids as chloroformate derivatives using solid phase microextraction-gas chromatography. Anal Chim Acta. 573-574; 231-241.
27. Saraji, M.; Mousavinia, F. 2006. Single-drop microextraction followed by in-syringe derivatization and gas chromatography-mass spectrometric detection for determination of organic acids in fruits and fruit juices. J. Sep. Sci. 29; 1223 – 1229.
28. Lilitchan, S.; Tangprawat, C.; Aryusuk, K.; Krisnangkura, S.; Chokmoh, S.; Krisnangkura, K. 2008. Partial extraction method for the rapid analysis of total lipids and γ-oryzanol contents in rice bran. Food Chem. 106; 752-759.
29. Sawa, T.; Nakao, M.; Akaike, T.; Ono, K.; Maeda, H. 1999. Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. J. Agric. Food Chem. 47; 397-402.
30. Shrikhande, A. J. 2000. Wine by-products with health benefits. Food Res. Int. 33; 469-474.

31. Wang, H.; Cao, G.; Prior, R. L. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. J. Agric. Food Chem. 44; 701-705.
32. Prior, R. L.; Cao, G.; Martin, A.; Sofic, E.; McEwen, J.; O'Brien, C.; Lischner, N.; Ehlenfeldt, M.; Kalt, W.; Krewer, G.; Mainland, C. M. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of Vaccinium species. J. Agric. Food Chem. 46; 2686-2693.
33. Suarez Valles, B.; Santamaria Victorero, J.; Mangas Alonso, J. J.; Blanco Gomis, D. 1994. High-performance liquid chromatography of the neutral phenolic compounds of low molecular weight in apple juice. J. Agric. Food Chem. 42; 2732 – 2736.
34. Oleszek, W.; Amiot, M.J.; Aubertt, S.Y. 1994. Identification of some phenolics in pear fruit. J. Agric. Food Chem. 42; 1261-1265.
35. Amakura, Y.; Okada, M.; Tsuji, S.; Tonogai, Y. 2000. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. J. Chromatogr. A 891; 183-188.
36. Mattila, P.; Kumpulainen, J. 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. J. Agric. Food Chem. 50; 3660-3667.
37. Zuo, Y.; Wang, C.; Zhan, J. 2002. Separation, characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. J. Agric. Food Chem. 50; 3789-3794.
38. Tarnawski , M.; Depta, K.; Grejciun, D.; Szelepin, B. 2006. HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract—a natural immunomodulator. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41; 182–188.
39. Nardini, M.; Ghiselli, A. 2004. Determination of free and bound phenolic acids in beer. Food Chem. 84; 137-143.
40. Chen, M.-H.; Bergman, C. J. 2005. A rapid procedure for analyzing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ-oryzanol contents. Journal of Food Composition and Analysis 18; 319–331.
41. Renuka Devi, R.; Jayalekshmy, A.; Arumughan, C. 2007. Antioxidant efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran in the bulk oil system. Food Chemistry 104; 658–664.
42. Chotimarkorn, C.; Benjakul, S.; Silalai, N. 2008. Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. Food Chemistry 111; 636–641.

43. Laokuldilok, T.; Shoemaker, C. F.; Jongkaewwattana, S.; Tulyathan, V. 2011. Antioxidants and antioxidant activity of several pigmented rice bran. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59; 193–199.
44. Butsat, S.; Siriamornpun, S. 2010. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. Food Chemistry 119; 606–613.
45. Harukaze, A.; Murata, M.; Homma, S. 1999. Analyses of free and bound phenolics in rice. Food Science and Technology Research 5; 74–79.

12. ภาคผนวก

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
    1.1 ผลงานวิจัยที่ส่งตีพิมพ์แล้ว
    1.2 ผลงานวิจัยที่กำลังอยู่ในช่วงดำเนินการ

2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ
    2.1 การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์
    2.2 การนำเสนอผลงานแบบบรรยาย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1.1 ผลงานวิจัยที่ส่งตีพิมพ์แล้ว

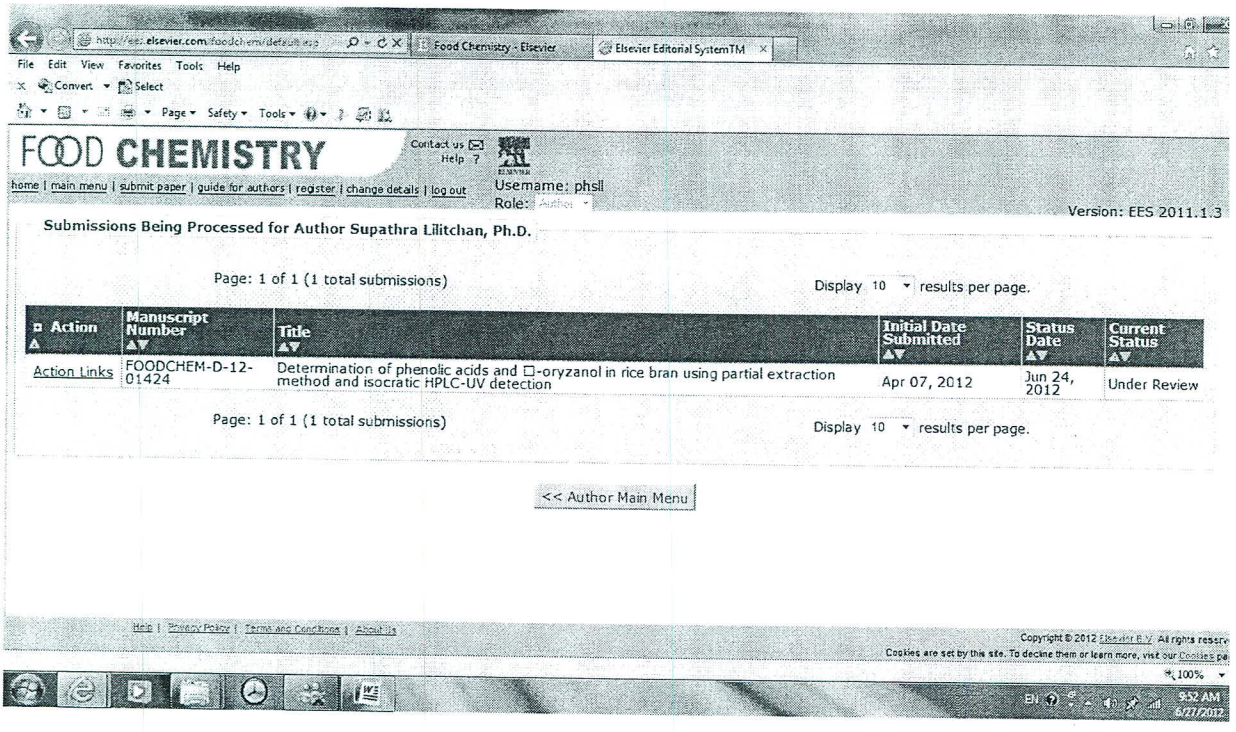
ชื่อผู้แต่ง : Supathra Lilitchan, Chaluntorn Sawetavong, Kornkanok Aryusuk, and Kanit Krisnangkura

ชื่อเรื่อง : Determination of phenolic acids and γ-oryzanol in rice bran using partial extraction method and isocratic HPLC-UV detection

ชื่อวารสาร : Food Chemistry

วันที่ส่งตีพิมพ์: 27 April 2012

สถานะ: Under review



1.2 ผลงานวิจัยที่กำลังอยู่ในช่วงดำเนินการ

ชื่อผู้แต่ง : Supathra Lilitchan, Nattaya Ongphimai, Kornkanok Aryusuk, and Kanit Krisnangkura

ชื่อเรื่อง : Phenolic acids content and antioxidant capacity of fruit extracts

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Food Chemistry หรือ Journal of Food Composition and Analysis

2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

2.1 การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

- **เรื่องที่ 1**: The determination of ferulic acid and γ-oryzanol in rice bran using partial extraction method and HPLC

  ชื่อการประชุม: การประชุมประจำปี "นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 7

  สถานที่ประชุม: โรงแรมรีเจนท์ ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

  ปีที่นำเสนอ: 14-16 ตุลาคม 2553

- **เรื่องที่ 2:** The determination of bioactive compounds in different rice brans

  ชื่อการประชุม: International Rice Research Conference (IRRC28)

  สถานที่ประชุม: ฮานอย, เวียดนาม

  ปีที่นำเสนอ: 8-12 พฤศจิกายน 2553

- **เรื่องที่ 3:** The determination of phenolic acids in fruit juices

  ชื่อการประชุม: การประชุมประจำปี "นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 8

  สถานที่ประชุม: โรงแรมรีเจนท์ ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

  ปีที่นำเสนอ: 19-21 ตุลาคม 2554

2.2 การนำเสนอผลงานแบบบรรยาย

ชื่อผู้นำเสนอผลงาน : Supathra Lilitchan

ชื่อเรื่อง: Determination and extraction of bioactive compounds from defatted rice bran for food and cosmetics use

ชื่อการประชุม: International conference entitled **"New challenges for Health Research Worldwide: Sharing international experiences and responses"** TMU's 50th anniversary celebration ceremony

สถานที่ประชุม: Taipei, Taiwan

ปีที่นำเสนอ: May 31st, 2010