



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เครื่องมือต้นแบบสำหรับสกัดและแยกองค์ประกอบน้ำส้มควันไม้

Prototype for extraction and separation of wood vinegar

ดร. ณัฐวุฒิ เชิงชั้น

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย จากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2555 - 2556

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เครื่องมือต้นแบบสำหรับสกัดและแยกองค์ประกอบน้ำส้มควันไม้

Prototype for extraction and separation of wood vinegar

ดร. ณัฐวุฒิ เชิงชัน

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย จากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2555 - 2556

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) เครื่องมือต้นแบบสำหรับสกัดและแยกองค์ประกอบน้ำส้มควันไม้
แหล่งเงิน ทุนวิจัยประเภทงานวิจัยเชิงบูรณาการและเชิงพาณิชย์ เงินรายได้
คณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ 2555 - 2556 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 240,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2554 ถึง 30 กันยายน 2556

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ดร. ณัฐวุฒิ เชิงชั้น

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ เป็นการพัฒนาเครื่องมือต้นแบบสำหรับสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มควันไม้ โดยใช้เทคนิคซีเควนเชียลอินเจกชันโครมาโทกราฟี (Sequential Injection Chromatography, SIC) ร่วมกับคอลัมน์ชนิดรูพรุนสูง (Chromolith® HPLC column) และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง ในการทดลองจะสกัดแยกสารประกอบฟีนอลิกสามชนิดได้แก่ กรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล สภาพการทดลองที่เหมาะสมคือ ใช้สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่เตรียมในสารละลาย อะซิเตทบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.0 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ใช้อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร จากผลการทดลองพบว่า สารทั้งสามแยกออกจากกันได้ ภายใน 6 นาที ได้ผลการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานดังนี้: พื้นที่ใต้กราฟ = $22730 [\text{กรดแกลลิก}] - 2724.9, r^2 = 1.0$ / พื้นที่ใต้กราฟ = $25083 [\text{กรควานิลลิก}] - 8701.2, r^2 = 0.9999$ และ พื้นที่ใต้กราฟ = $1941.2 [\text{ไซรินจอล}] + 4209.5, r^2 = 0.9929$ มีค่าความเที่ยงของเวลาที่ดูกรีเทนสูง (RSD = 1.14 to 2.70 %) มีค่าร้อยละของการวิเคราะห์ที่คืนกลับอยู่ในช่วง 82.4 - 98.2 เครื่องมือต้นแบบนี้สามารถเจือจางตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ (100 เท่า) ได้โดยอัตโนมัติ ผลจากการวิเคราะห์น้ำส้มควันไม้ที่ได้จากการเผาไม้ยูคาลิปตัส พบว่าไซรินจอลมีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือกรดแกลลิก และ กรควานิลลิก ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์นี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับผลวิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High performance liquid chromatography, HPLC) จึงกล่าวได้ว่า เครื่องมือต้นแบบนี้สามารถประยุกต์ใช้สำหรับสกัดและแยกองค์ประกอบน้ำส้มควันไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : น้ำส้มควันไม้, สารประกอบฟีนอลิก, ซีเควนเชียลอินเจกชันโครมาโทกราฟี, คอลัมน์ชนิดรูพรุนสูง

Research Title: Prototype for extraction and separation of wood vinegar

Researcher: Dr. Nathawut Choengchan

Department of Chemistry, Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

ABSTRACT

In this work, sequential injection system with monolithic column, or so called ‘sequential injection chromatography’ was developed as a prototype for separation of phenolic compounds *viz.*, gallic acid, vanillic acid and syringol. A Chromolith[®] flash RP-18e (25 mm x 4.6 mm) column was used as analytical column. An Auto-pret[™] system with a syringe pump and an eight-port multi-selection valve module was used for ‘on-line’ sample dilution and for automated liquid delivery manipulation. Absorbance was detected at 264 nm. Methanol (10%) in 0.1 mol/L acetate buffer (pH 3.0) was used as mobile phase for isocratic elution. After optimization and validation, the system provided good results. Separation was complete within 6 min. Linear calibration curves were obtained ($\text{Area} = 22730 [\text{Gallic}] - 2724.9$, $r^2 = 1.0$ / $\text{Area} = 25083 [\text{vanillic}] - 8701.2$, $r^2 = 0.9999$ and $\text{Area} = 1941.2 [\text{Syringol}] + 4209.5$, $r^2 = 0.9929$). Retention times were highly precise (RSD = 1.14 to 2.70 %). Recoveries were observed from 82.4 - 98.2 %. The system was applied to wood vinegar sample, from Eucalyptus tree. Prior sample pretreatment was not required except filtration. The samples were on-line diluted 100 fold with mobile phase. Syringol contents were higher than gallic and vanillic, respectively, for all investigated samples. The contents were statistically compared to the results obtained from HPLC system by paired-*t* test. The results were not significantly different between the two systems. This indicated that the prototype was successfully developed.

Keywords : wood vinegar, phenolic compounds, Sequential Injection Chromatography and monolithic column

กิตติกรรมประกาศ

การดำเนินงานวิจัยตามโครงการนี้ สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์เป็นอย่างดี เนื่องด้วยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย จาก ทุนวิจัยประเภทงานวิจัยเชิงบูรณาการและเชิงพาณิชย์ เงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 - 2556 ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพดล มณีรัตน์ สาขาวิชาวิศวกรรมการวัดและควบคุม คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ร่วมพัฒนาโปรแกรมที่ใช้ควบคุมการทำงานของชุดเครื่องมือต้นแบบ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นพ.วิรัตน์ วงศ์แสงนาค ประธานกรรมการ และ รองศาสตราจารย์ อรุณี คงศักดิ์ไพศาล ที่ปรึกษา บริษัท ศูนย์ห้องปฏิบัติการและวิจัยทางการแพทย์และการเกษตรแห่งเอเชีย จำกัด (AMARC) ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการพัฒนาชุดเครื่องมือต้นแบบสู่เชิงพาณิชย์

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ นายอาจณรงค์ เมธาวิสรเสรีญ นักศึกษาปริญญาโท สาขาเคมี (เคมีวิเคราะห์) คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้ช่วยนักวิจัยของโครงการนี้ ที่ตั้งใจและทุ่มเทกับงานวิจัยนี้ด้วยดีตลอดมา ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดโครงการ

ดร. ณัฐวุฒิ เชิงชั้น
หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม.....	5
2.1 แนวคิด และทฤษฎี.....	5
2.1.1 น้ำส้มควันไม้	5
2.1.2 กระบวนการเกิดน้ำส้มควันไม้	5
2.1.3 สารประกอบฟีนอลิก	6
2.1.3.1 ลักษณะทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิก.....	6
2.1.3.2 ชนิดของสารประกอบฟีนอลิก	6
2.1.3.3 สมบัติการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก	9
2.1.3.4 คุณสมบัติของกรดฟีนอลิกบางชนิด.....	10
2.1.4 หลักการวิเคราะห์แบบซีเควนเชียลอินเจกชัน	11
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	15
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์	15
3.1.1 สารเคมี.....	15
3.1.2 อุปกรณ์ เครื่องตรวจวัด	15

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 การดำเนินการวิจัย.....	16
3.2.1 การเตรียมสารละลาย.....	16
3.2.1.1 สารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท.....	16
3.2.1.2 สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์	16
3.2.1.3 สารละลายอะซิโตนไทรล์ เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร	16
3.2.1.4 สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร	16
3.2.1.5 สารละลายมาตรฐานกรดวานิลลิก เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร	16
3.2.1.6 สารละลายมาตรฐานไซรีนจอล เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	17
3.2.1.7 สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	17
3.2.1.8 สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	17
3.2.2 วิธีดำเนินการทดลอง.....	17
3.2.2.1 ศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัด	17
3.2.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง.....	18
3.2.2.3 คุณลักษณะเด่นของวิธี	19
3.2.2.4 ศึกษาการแยกสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำส้มควันไม้	20
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	21
4.1 ศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมใช้ในการตรวจวัด.....	21
4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง.....	22
4.2.1 ชนิดของสารละลายเฟสเคลื่อนที่	22
4.2.2 อัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่	23
4.2.3 ค่าพีเอชของสารละลายเฟสเคลื่อนที่.....	26
4.2.4 อัตราการไหลของสารละลายเฟสเคลื่อนที่.....	32
4.2.6 ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีด	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 คุณลักษณะเด่นของวิธี	36
4.3.1 ความแม่นยำ	36
4.3.2 ความเที่ยง	37
4.3.3 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)	38
4.3.4 ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (Limit of Quantitation, LOQ)	38
4.4 ศึกษาการแยกสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้เทคนิค Sequential Injection Chromatography	38
4.5 ศึกษาการแยกสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำส้มควันไม้	39
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	42
5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	42
5.2 ข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก ก	45
ก.1 เอกสารตีพิมพ์ประกอบการประชุมวิชาการนานาชาติ PACCON 2013	45
ก.2 เอกสารบทคัดย่อนำเสนอในงานประชุมวิชาการนานาชาติ ICFA ครั้งที่ 18	50
ภาคผนวก ข	53
ข.1 รูปแสดงผลงานในงานวันวิทยาศาสตร์ ปี 2555	53
ข.2 รูปแสดงผลงานในงานวันวิทยาศาสตร์ ปี 2556	54

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพในการแยก (Resolution, R) ของสารประกอบฟีนอลิกในสารละลาย	
มาตรฐานผสมที่พีเอชต่างๆ	33
ตารางที่ 4.2 สภาพที่เหมาะสมในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิก	36
ตารางที่ 4.3 ผลการคำนวณหาร้อยละค่าคืนกลับของสารประกอบฟีนอลิก.....	39

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 โครงสร้างหลักของสารประกอบฟลาโวนอยด์	7
รูปที่ 2.2 โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์กลุ่มต่างๆ	8
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของกรดแกลลิก กรควานิลลิก และ ไอซินกอล	10
รูปที่ 2.4 ระบบซีเควนเซียลอินเจกชัน(SIA)	11
รูปที่ 4.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไอซินกอล ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-4} โมลาร์	23
รูปที่ 4.2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม กรดแกลลิก กรควานิลลิก และไอซินกอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร	24
รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม กรดแกลลิก กรควานิลลิก และไอซินกอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายอะซิโตนในไตรคลอโรเอทิลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร	25
รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไอซินกอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร	26
รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไอซินกอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 25 โดยปริมาตร	26
รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไอซินกอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร	27
รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไอซินกอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 75 โดยปริมาตร	27
รูปที่ 4.8 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไอซินกอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร	28

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.9 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 5.0	29
รูปที่ 4.10 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.5.....	29
รูปที่ 4.11 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.0	30
รูปที่ 4.12 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.5	30
รูปที่ 4.13 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0	31
รูปที่ 4.14 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	32
รูปที่ 4.15 กราฟมาตรฐานของกรควานิลลิกที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	32
รูปที่ 4.16 กราฟมาตรฐานของไซรินจอลที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	33

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.17 กราฟแสดงผลของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่มีผลต่อเวลาในการแยกและ ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ต่อหนึ่งตัวอย่าง.....	34
รูปที่ 4.18 กราฟมาตรฐานของกรดแกดอลิกที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	35
รูปที่ 4.19 กราฟมาตรฐานของกรดวานิลลิกที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	35
รูปที่ 4.20 กราฟมาตรฐานของไซรินจอลที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	36
รูปที่ 4.21 กราฟมาตรฐานของ ก. กรดแกดอลิก ข. กรดวานิลลิก และ ค. ไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	37
รูปที่ 4.22 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกดอลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร	41
รูปที่ 4.23 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐาน ของสารต้านอนุมูลอิสระลงไป.....	42
รูปที่ 4.24 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่มีการเติมสารมาตรฐานผสม กรดแกดอลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ของสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิดลงไป.....	42
รูปที่ 4.25 โครมาโทแกรมจากเทคนิค HPLC ของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่ไม่มีการเติม สารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระลงไป	43
รูปที่ 4.26 โครมาโทแกรมจากเทคนิค HPLC ของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่มีการเติม สารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระกรดแกดอลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ลงไป ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละชนิดเป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	43
รูปที่ 5.1 ชุดเครื่องมือต้นแบบอัตโนมัติสำหรับการสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลิก.....	45

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

น้ำส้มควันไม้ (Wood vinegar หรือ Pyroligneous acid) เป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากการเผาถ่านไม้ ในเตาเผาภายใต้ภาวะจำกัดอากาศ ซึ่งทำให้เกิดการระเหยของน้ำ น้ำมันดิน(tar) และการสลายตัวของ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ออกจากเนื้อไม้ในรูปของควัน ไม้แล้วเกิดการควบแน่นเป็นน้ำส้มควันไม้ น้ำส้มควันไม้มี 2 ประเภท คือ น้ำส้มควันไม้ดิบ และ น้ำส้ม ควันไม้กลั่น[1]

น้ำส้มควันไม้มีองค์ประกอบโดยปริมาตร คือ น้ำ ร้อยละ 85 กรดอินทรีย์ ร้อยละ 3 และ สารอินทรีย์อื่นๆ ร้อยละ 12 สามารถแบ่งสารประกอบในน้ำส้มควันไม้เป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่

1. กลุ่ม Organic acids ได้แก่ formic acid, acetic acid, propionic acid
2. กลุ่ม Phenols ได้แก่ phenol, guaiacol, cresol, syringol, gallic acid, vanillic acid
3. กลุ่ม Carbonyl compounds ได้แก่ formaldehyde, acetone, acetaldehyde, furfural
4. กลุ่ม Alcohols ได้แก่ methanol, ethanol, propanol, isopropanol

จะเห็นได้ว่า ในน้ำส้มควันไม้ นอกจากจะประกอบด้วยกรดอะซิติกซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักแล้ว ยังมีสารประกอบจำพวกฟีนอลิก (Phenolic compounds) ด้วย ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกนี้เองที่มีฤทธิ์ใน การต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง และรอยเหี่ยวย่น สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้ จากธรรมชาติมีราคาค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับน้ำส้มควันไม้ ซึ่งมีการลงทุนในการผลิตที่ไม่สูงมาก นักเพราะ วัตถุดิบหาได้ง่ายในท้องถิ่น เทคโนโลยีในการผลิตไม่ซับซ้อน สามารถผลิตได้ในระดับชุมชน

ในต่างประเทศ เช่น ประเทศญี่ปุ่น ได้มีนักวิจัยพบว่า สารสกัดจากน้ำส้มควันไม้ที่ได้จากการเผา ไม้ไผ่ สามารถออกฤทธิ์ด้านการแพ้ (Anti-allergy) ได้ และกลุ่มนักวิจัยดังกล่าว ได้จดสิทธิบัตรกรรมวิธี การเตรียมน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่เรียบร้อยแล้ว [2] ในบางประเทศอาจนำสารสกัดจากน้ำส้มควันไม้ไป ผลิตเป็นอาหารเสริม นอกจากนี้ ยังมีรายงานการนำไปใช้เป็นองค์ประกอบในเครื่องสำอางอีกด้วย [3]

สำหรับในประเทศไทย เกษตรกรยังคงนิยมนำน้ำส้มควันไม้ (ที่ยังไม่ได้ผ่านการสกัด) ซึ่งเตรียม เองด้วยภูมิปัญญาท้องถิ่น ไปใช้แค่เพิ่มผลผลิตทางการเกษตร โดยนำไปใช้ฉีดพ่นใบ เพื่อกำจัดแมลง ศัตรูพืช หรือ รดโคนต้นไม้เพื่อป้องกันและกำจัดจุลินทรีย์ที่อาจเป็นสาเหตุของโรครากและโคนเน่า [3] เท่านั้น ถึงแม้ว่าการนำไปใช้ประโยชน์ดังกล่าว จะช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีได้ แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่ ค่อยมีการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ น้ำส้มควันไม้แต่อย่างใด (หากเทียบกับต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศ ญี่ปุ่น) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในประเทศไทย ยังไม่ค่อยมีการวิจัยถึงประโยชน์ของน้ำส้มควันไม้อย่างลึกซึ้ง การนำไปใช้ประโยชน์จึงยังไม่ค่อยแพร่หลาย

ในน้ำส้มควันไม้ นอกจากจะประกอบด้วยกรดอะซิดิกซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักแล้ว ยังอุดมไปด้วยสารประกอบจำพวกฟีนอลิก (Phenolic compounds) หลายตัว เช่น กรดแกลลิก และ กรควานิสิก เป็นต้น ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันและลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งได้ อีกทั้งยังช่วยยับยั้งการเกิดรอยเหี่ยวย่นได้ด้วย แต่อย่างไรก็ดี สารประกอบฟีนอลิกดังกล่าวยังปนรวมอยู่กับกรดอะซิดิกและองค์ประกอบอื่นๆในน้ำส้มควันไม้ คือยังไม่ใช่สารประกอบฟีนอลิกที่บริสุทธิ์ ดังนั้น จำต้องสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลออกมาให้ได้ก่อนที่จะนำไปใช้ประโยชน์

กรรมวิธีการสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลนั้น ในเทคโนโลยีปัจจุบัน สามารถทำได้ด้วยเครื่องมือที่อาศัยหลักการทางโครมาโทกราฟี ถึงแม้จะแยกสารประกอบฟีนอลได้ดี แต่เครื่องมือดังกล่าวยังคงต้องนำเข้าจากต่างประเทศจึงมีราคาแพงมาก มาก ถ้าพิจารณาในแง่ของการผลิตสารสกัดฟีนอลิกจากน้ำส้มควันไม้อาจไม่คุ้มทุน

ดังนั้น โครงการวิจัยนี้ จึงมีแนวคิดที่จะสร้างเครื่องมือต้นแบบสำหรับสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลออกจากน้ำส้มควันไม้ เครื่องมือต้นแบบดังกล่าวยังคงอาศัยหลักการทางโครมาโทกราฟี เพื่อให้ประสิทธิภาพการแยกเทียบเท่าเครื่องมือที่มีขายในปัจจุบัน แต่สิ่งที่จะแตกต่างกันก็คือ เครื่องมือต้นแบบจะราคาถูกกว่ามาก

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อสร้าง ‘เครื่องมือต้นแบบ’ สำหรับสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลออกจากน้ำส้มควันไม้

1.2.3 เพื่อนำเครื่องมือที่พัฒนาขึ้นไป ‘ประยุกต์ใช้’ ในการสกัดและแยกองค์ประกอบในน้ำส้มควันไม้ และขยายสู่เชิงพาณิชย์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เครื่องมือต้นแบบสำหรับสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลิกจะประกอบไปด้วยอุปกรณ์ย่อย 3 ส่วน คือ (1) ส่วนการนำส่งสารตัวอย่างน้ำส้มควันไม้เข้าสู่ส่วนของการสกัดและแยก (2) ส่วนของการสกัดและแยก และ (3) ส่วนของการตรวจวัดหาความบริสุทธิ์ของสารประกอบฟีนอลที่แยกออกมาได้

ในโครงการนี้ จะเริ่มจาก พัฒนาส่วนของการเตรียมตัวอย่างและการนำส่งตัวอย่างน้ำส้มควันไม้เข้าสู่ส่วนของการสกัดและแยก ซึ่งจะอาศัยหลักการวิเคราะห์ที่ใช้การไหลของของเหลวภายในท่อขนาดเล็ก ที่มีชื่อว่า Sequential injection analysis, SIA [4] ข้อดีของเทคนิคนี้คือ สามารถเตรียมตัวอย่าง (เช่นการกรอง) และนำส่งสารตัวอย่างได้อย่างอัตโนมัติ

จากนั้นพัฒนาในส่วนของการสกัดและแยกเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะทำให้สารประกอบฟีนอลิกตัวต่างๆ แยกออกจากกันได้ดีในเวลาที่ไม่นานจนเกินไป ซึ่งในส่วนนี้จะอาศัยหลักการทางโครมาโทกราฟีแบบของเหลว โดยใช้คอลัมน์แบบใหม่ที่ไม่ต้องใช้แรงดันสูง (Monolithic column [5]) ซึ่งมี

รายงานที่สามารถเตรียมคอลัมน์ชนิดนี้ขึ้นเองได้ในห้องปฏิบัติการ แต่ในโครงการนี้จะใช้แบบที่มีขายในเชิงพาณิชย์แล้วไปก่อนเพื่อความรวดเร็ว

ขั้นต่อไปจะตรวจวัดหาความบริสุทธิ์ของสารประกอบฟีนอลิกที่แยกออกมาได้ โดยหลักการตรวจวัดจะใช้หลักการทางทางแสงในการตรวจวัด

ท้ายที่สุดจะนำองค์ความรู้ที่ได้จากในแต่ละส่วนมาบูรณาการรวมกันเพื่อสร้างเป็นเครื่องมือต้นแบบและนำไปประยุกต์ใช้จริงเพื่อสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ พร้อมทั้งนำเครื่องมือต้นแบบที่ได้ไปต่อยอดในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

- 1.4.1 สืบค้นเอกสารอ้างอิงและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
- 1.4.2 พัฒนาส่วนของการเตรียมตัวอย่างและการนำส่งตัวอย่างโดยอาศัยหลักการ SIA
- 1.4.3 พัฒนาส่วนของการสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งอาศัยหลักการโครมาโทกราฟีแบบของเหลวโดยจะใช้คอลัมน์แบบใหม่แบบที่ใช้กับแรงดันไม่สูงได้
- 1.4.4 พัฒนาส่วนของการตรวจวัดหาความบริสุทธิ์ของสารประกอบฟีนอลิก
- 1.4.5 สร้างชุดเครื่องมือต้นแบบโดยบูรณาการองค์ความรู้ในแต่ละส่วนที่พัฒนาไว้แล้วทั้งสามส่วนเข้าด้วยกัน
- 1.4.6 ประเมินคุณลักษณะเด่นของชุดเครื่องมือต้นแบบ โดยการหา Analytical performances
- 1.4.7 ประยุกต์ชุดเครื่องมือต้นแบบที่พัฒนาขึ้น เพื่อสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำส้มควันไม้
- 1.4.8 เตรียมเผยแพร่ผลงานวิจัยแบบสมบูรณ์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ผลงานตีพิมพ์ ในวารสารวิชาการระดับชาติและนานาชาติ
- 1.5.2 สิทธิบัตร ที่มีข้อถือสิทธิครอบคลุมถึงการสร้างเครื่องมือต้นแบบสกัดและแยกองค์ประกอบในน้ำส้ม
- 1.5.3 หน่วยงานที่ต้องการให้นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

เนื่องจากโครงการนี้ มุ่งหวังให้ตระหนักถึงคุณประโยชน์ของน้ำส้มควันไม้ มากกว่าเป็นเพียงยาปราบศัตรูพืชหรือยาฆ่าแมลง คือต้องการให้นำน้ำส้มควันไม้ไปต่อยอดสร้างเป็นมูลค่าเพิ่ม เช่น นำไปเติมในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม หรือ ในเครื่องสำอาง ดังนั้นหน่วยงานที่ต้องการให้นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้แก่

- 1.5.3.1 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เพื่อเผยแพร่ข้อมูลจากการวิจัยให้กับภาคประชาชนและเกษตรกร จะได้กระตุ้นให้มีการผลิตน้ำส้มควันไม้มากขึ้น

1.5.3.2 กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม เพื่อเผยแพร่และชี้แนะให้ภาคอุตสาหกรรมเล็งเห็นถึงประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้มควันไม้ เพื่อจะได้นำน้ำส้มควันไม้ไปเป็นวัตถุดิบ นำไปต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

2.1 แนวคิด และทฤษฎี

2.1.1 น้ำส้มควันไม้

น้ำส้มควันไม้ (Wood vinegar หรือ Pyroligneous acid) เป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากการเผาถ่านไม้ กล่าวคือ ในกรรมวิธีการผลิตถ่านไม้จะต้องเผาฟืน ในระหว่างเผาโดยมีอุณหภูมิของเตาเผาเท่ากับ 300 ถึง 400 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะจำกัดอากาศ จะได้ควันสีขาวปนเหลือง กลิ่นฉุนจัด หากต่อหน้าควันนี้แล้วทำให้เกิดการควั่นแฉก จะได้ของเหลวมีลักษณะสีน้ำตาล มีกลิ่นไหม้ รสเปรี้ยว โดยน้ำส้มควันไม้มี 2 ประเภท คือ น้ำส้มควันไม้ดิบ และ น้ำส้มควันไม้กลั่น น้ำส้มควันไม้ดิบ จะได้จากการนำของเหลวที่กลั่นได้จากการเผาถ่านตั้งทิ้งไว้ 90 วัน ให้อนุภาคต่างๆที่แขวนลอยอยู่ ตกตะกอนแล้วนำไปกรอง ส่วนน้ำส้มควันไม้กลั่นจะนำน้ำส้มควันไม้ดิบมากลั่นต่อที่ 70 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ประโยชน์

2.1.2 กระบวนการเกิดน้ำส้มควันไม้

กระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการเผาไหม้ในการผลิตน้ำส้มควันไม้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. ช่วงอุณหภูมิไม่เกิน 200 องศาเซลเซียส สารบางชนิดจะถูกไล่ออกมาพร้อมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เช่น กรดแอซิดิก กรดฟอร์มิก เป็นต้น เนื่องจากการสลายเฮมิเซลลูโลสแต่ยังมีสัดส่วนน้อยมาก

2. ช่วงอุณหภูมิ 200 - 280 องศาเซลเซียส ช่วงนี้เฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสจะแตกตัวมากขึ้น รวมทั้งลิกนินเริ่มสลายตัว เมื่ออุณหภูมิใกล้เซลลูโลสแตกตัว จะได้ก๊าซต่างๆ เนื้อไม้เริ่มกลายเป็นถ่านอย่างช้าๆ และเกิดปฏิกิริยาดูดความร้อน จึงต้องการความร้อนเพิ่มจากภายนอก

3. ช่วงอุณหภูมิ 280 - 500 องศาเซลเซียส องค์ประกอบไม้เกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็ว เกิดก๊าซต่างๆ หลายชนิดที่สามารถควั่นแฉกและเก็บเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ เช่น น้ำส้มควันไม้ ทาร์ เป็นต้น ไม้ที่เหลือถูกเปลี่ยนสภาพโดยการจับตัวใหม่ของคาร์บอนกลายเป็นถ่าน

4. ช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 500 องศาเซลเซียส ก่อนที่ไม้จะกลายเป็นถ่านหมด ไม้ส่วนนอกที่กลายเป็นถ่านแล้ว อาจจะทำปฏิกิริยากับก๊าซที่ออกมาจากภายใน เกิดปฏิกิริยาการรวมตัวของก๊าซคาร์บอน ได้ก๊าซต่างๆเพิ่มขึ้นอีก ส่วนถ่านจะเกิดการสลายตัวไปบางส่วน ทำให้ผลผลิตถ่านลดลง

2.1.3 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารเคมีที่พบได้ทั่วไปในพืชหลายชนิด ปัจจุบันได้รับความสนใจมาก เนื่องจากมีสมบัติการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ อีกทั้งยังมีผลต่อการชะลอความชรา อันมีสาเหตุมาจาก Oxidative stress ภายในร่างกาย นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้กับอาหาร เพื่อป้องกันการเสื่อมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันขององค์ประกอบไขมัน

2.1.3.1 ลักษณะทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันแบบ Primary anti-oxidant ที่พบในพืช มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของพืช รวมทั้งช่วยปกป้องพืชจากการติดเชื้อหรือถูกทำลายโดยแมลง จุลินทรีย์ หรือพาหะนำโรค (pathogens) และยังมีบทบาทเกี่ยวกับการเกิดสี กลิ่น และรส ในผักและผลไม้อีกด้วย โดยทั่วไป สารประกอบฟีนอลิกจะพบมากบริเวณผิวชั้นนอกของพืช เช่น เปลือก ทำหน้าที่ปกป้องสารต่างๆ ที่อยู่ภายใน ปัจจุบันพบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่ทราบโครงสร้างที่แน่นอนแล้วมีมากกว่า 8,000 ชนิด ตั้งแต่สารประกอบฟีนอลิกที่มีโมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acid) ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เช่น แทนนิน (tannin) เป็นต้น โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่

ไฮดรอกซิล (-OH) ตั้งแต่ 1 หมู่ ขึ้นไปเกาะอยู่ ในธรรมชาติสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระจะพบเพียงเล็กน้อย โดยส่วนใหญ่จะพบอยู่ในรูปที่รวมอยู่กับสารประกอบอื่นๆ ซึ่งละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ และอยู่ในรูปที่จับกับสารพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ โดยมักพบสารประกอบฟีนอลิกรวมอยู่กับโมเลกุลของน้ำตาล เช่น น้ำตาลกลูโคส (Glucose) กาแลคโตส (Galactose) แรมโนส (Rhamnose) ไซโรส (Xylose) อะราบินโนส (Arabinose) และอนุพันธ์ของน้ำตาล เช่น กรดกลูโคโรนิก (Glucuronic acid) กรดกาแลคโตโรนิก (Galacturonic acid) ในรูปไกลโคไซด์ (Glycosides) นอกจากนี้ สารประกอบฟีนอลิกยังอาจรวมกับสารประกอบอื่นอีกหลายชนิด เช่น โพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) กรดอินทรีย์ (Organic acids) ไขมัน (Fats) และเอมีน (Amines)

2.1.3.2 ชนิดของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

(1) แบ่งตามวงแหวนฟีนอล (Phenol rings) สามารถแบ่งย่อยเป็น

- โมโนไซคลิกฟีนอล (Monocyclic phenol) มีวงแหวนฟีนอลหนึ่งวง ที่พบทั่วไปในพืชได้แก่ ฟีนอล, คาทีคอล, ไฮโดรควิโนน และกรดไฮดรอกซีซินนามิก เป็นต้น

- ไดไซคลิกฟีนอล (Dicyclic phenols) มีวงแหวนฟีนอลสองวง ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ และ ลิกแนน เป็นต้น

- โพลีไซคลิกฟีนอล (Polycyclic phenols) หรือ โพลีฟีนอล (Polyphenol) ได้แก่ ลิกนิน, คาทีคอลเมลานิน และฟลาโวนแทน เป็นต้น

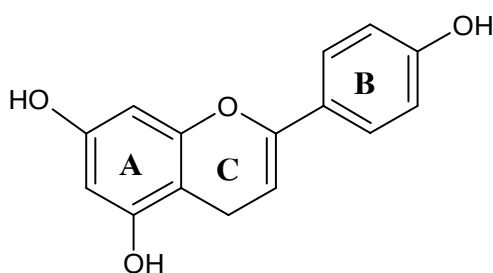
(2) แบ่งตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในโครงสร้าง ที่พบในพืชส่วนใหญ่ ได้แก่

1. กรดฟีนอลิก ประกอบด้วย กรดไฮดรอกซีซินนามิก (Hydroxycinnamic acid) และกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acid)

- กรดไฮดรอกซีซินนามิก ที่พบทั่วไปในพืช ได้แก่ กรดคาเฟอิก (caffeic acid), กรดเฟอร์ริก (Ferulic acid), กรดพาราคูมาริก (p-Coumaric acid) และกรดซินแนปิก (Sinapic acid)

- กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก ส่วนมากพบในรูปอนุพันธ์ และพบปริมาณน้อยในพืช ความหลากหลายของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก ขึ้นอยู่กับการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิลและเมทอกซิลบนวงอะโรมาติก โดยมากจะเกิดพันธะไกลโคไซด์หรือพันธะเอสเทอร์กับกรดอินทรีย์ เช่น กรดมาเลอิก (Maleic acid) และกรดทาร์ทาริก (Taranc acid) หรือเกิดพันธะกับฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ตัวอย่างกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก เช่น กรดแกลลิก (Gallic acid), กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก (p-Hydroxybenzoic acid) และกรดวานิลลิก (Vanillic acid) โดยกรดแกลลิกสามารถพบได้ทั่วไป กรดแกลลิกสองโมเลกุลสามารถรวมตัวกันกลายเป็นกรดแอลลาจิก (ellagic acid) ซึ่งกรดแอลลาจิกนี้ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีคุณสมบัติในการต้านการเกิดมะเร็ง และต้านการเกิดออกซิเดชันได้

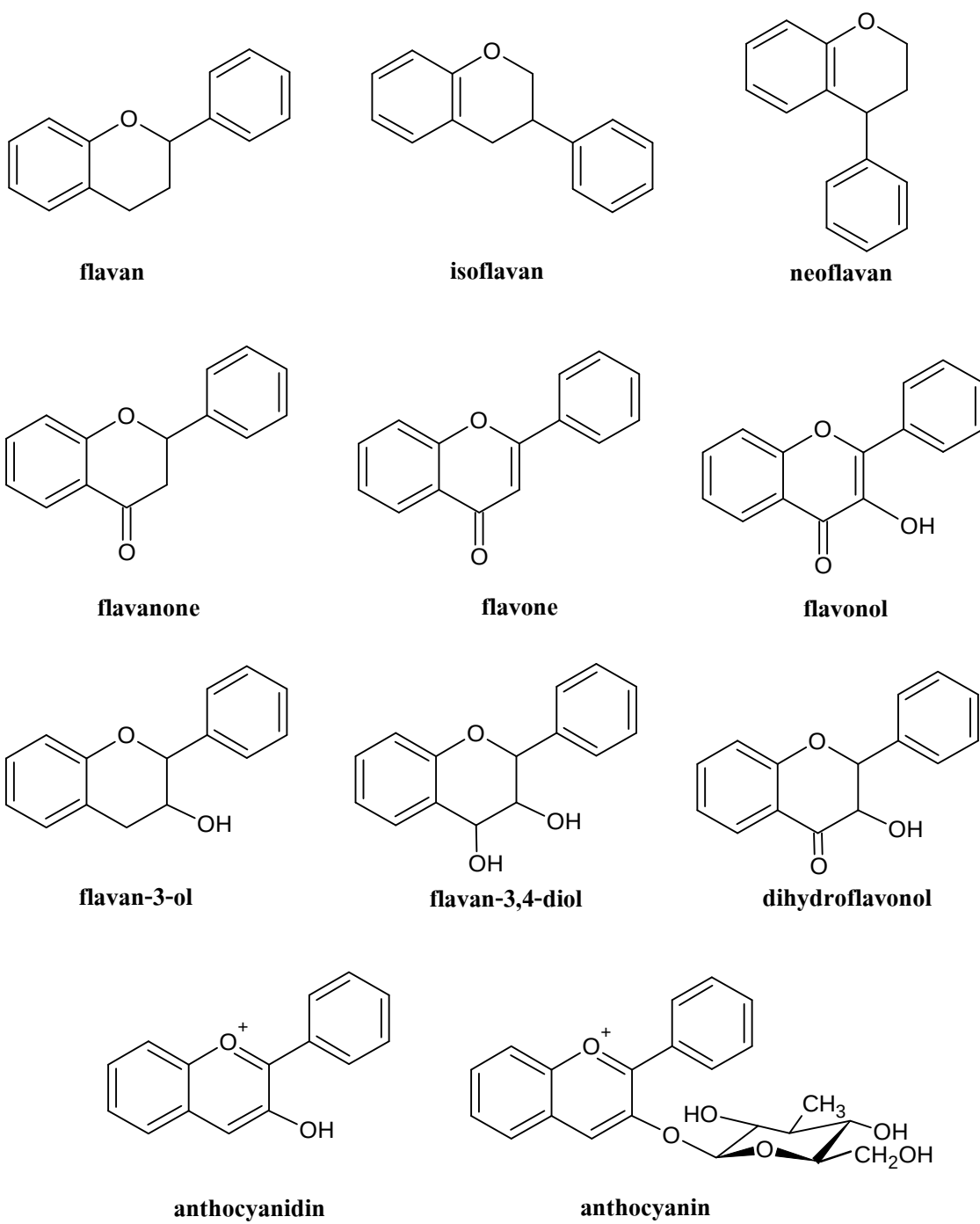
2. ฟลาโวนอยด์ จัดเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกพบมากที่สุดในบรรดาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบทั่วไปในพืชสีเขียว และพบในทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็นใบ ราก เนื้อไม้ เปลือกต้น ดอก ผล หรือเมล็ด มีสูตรโครงสร้างหลักเป็น ฟลาเวน (flavan) หรือ 2-ฟีนิลเบนโซไพแรน (2-phenylbenzopyran) ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม เรียงกันเป็นระบบ C6-C3-C6 โดยมีวงเบนซีนสองวง จับกันด้วยคาร์บอนสามอะตอม ซึ่งอาจจัดเรียงเกิดเป็นวงที่ 3 ทำให้โครงสร้างหลักที่ได้เหมือนโครงสร้างหลักของวิตามินอี ที่เป็นโครงสร้างแบบโครแมน (chroman) หรือเบนโซไพแรน (benzopyran)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างหลักของสารประกอบฟลาโวนอยด์

จากสูตรโครงสร้างหลักจะมีหมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่งต่างๆ โดยเฉพาะที่วง A และ B ส่วนใหญ่จะเป็นหมู่ไฮดรอกซิล เมทอกซิล และน้ำตาลต่างๆ สิ่งเหล่านี้ ทำให้เกิดเป็นฟลาโวนอยด์ในธรรมชาติที่แตกต่างกันเป็นจำนวนมาก ฟลาโวนอยด์มักพบในลักษณะของอนุพันธ์ของไกลโคไซด์

สารฟลาโวนอยด์กลุ่มต่างๆสามารถแสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์กลุ่มต่างๆ

2.1.3.3 สมบัติการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก

คุณสมบัติที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากของสารประกอบฟีนอลิก คือ การเป็นสารต้านออกซิเดชัน และการเป็นสารต้านการกลายพันธุ์ (Anti-mutagens) สารประกอบฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแทนนิน เป็นต้น ตัวอย่างเช่น สารประกอบฟีนอลิกในผักและผลไม้สามารถป้องกันการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ ได้ เช่น โรคหัวใจ และโรคมะเร็ง เป็นต้น ด้านการอักเสบ ด้านการแพ้ และมีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือด และสามารถลดความดันโลหิตจากฤทธิ์ขยายหลอดเลือด เป็นต้น ความสามารถต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก มีกลไกการเกิดปฏิกิริยาอยู่ 3 กลไก ดังนี้

1. ความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ (scavenging free radical)

สารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว ดังปฏิกิริยา 2.1 - 2.2



(PPH คือ Polyphenolic compound)

เมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ จะเปลี่ยนเป็นอนุมูลฟีนอล ซึ่งมีสภาพค่อนข้างเสถียร เนื่องจากอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวจะเกิด resonance stabilized delocalization ภายในวงอะโรมาติก ดังนั้นอนุมูลฟีนอลจึงเกิดปฏิกิริยาต่อได้ยาก เป็นการชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้ อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้ ทำให้ลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า ดังปฏิกิริยา 2.3 - 2.4



2. ความสามารถในการจับกับโลหะ (chelating transition-metals)

สารประกอบฟีนอลิกสามารถจับกับโลหะ ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สามารถเกิดสารเชิงซ้อนกับเหล็ก และไอออนของทองแดงได้

3. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งให้เกิดอนุมูลอิสระ

สารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระได้ เช่น ไนตริกออกไซด์ ซินเทส (nitricoxide synthase) ไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinase) และแซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase)

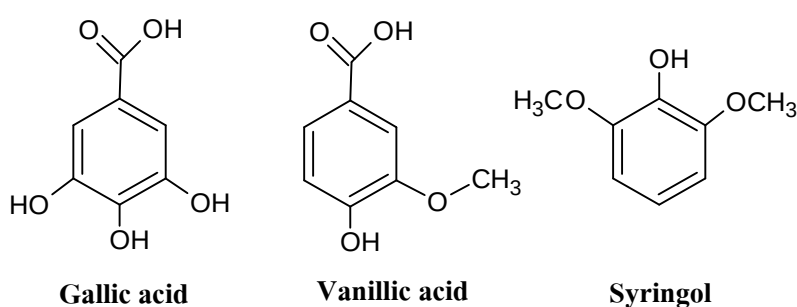
2.1.3.4 คุณสมบัติของกรดฟีนอลิกบางชนิด

จากที่กล่าวข้างต้น น้ำส้มควันไม้มีสารประกอบฟีนอลิกหลากหลายชนิด แต่ที่พบมากและเป็นที่สนใจถูกนำไปใช้ในด้านต่างๆ ได้แก่ ไชรินจอล กรดแกลลิก และกรดวานิลลิก ซึ่งสารทั้งสามชนิดนี้มีคุณสมบัติที่หลากหลาย ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะวิเคราะห์หาปริมาณสารทั้งสามชนิดนี้

1. กรดแกลลิก (Gallic acid) เกิดจากการสลายตัวของแทนนินประเภท Hydrolysable tannins กรดแกลลิกรวมกันสองโมเลกุลจะได้สารประกอบที่เรียกว่า Ellagic acid กรดแกลลิกมีคุณสมบัติสมานผิวและกำจัดสารอนุมูลอิสระ ยับยั้งเชื้อราและไวรัส และใช้ในการรักษาภาวะอะลูมินูเลียในคนเป็นโรคเบาหวาน และ สาร Ellagic acid ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนส ทำให้ผิวขาวขึ้นและปรับสีผิวให้สม่ำเสมอ ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้ จึงได้มีการนำไปเติมในเครื่องสำอาง

2. กรดวานิลลิก (Vanillic acid) เป็นสารประกอบในรูปออกซิไดส์ของวานิลลิน วานิลลินสังเคราะห์ หรือเอทิลวานิลลิน (ethyl vanillin) จะมีราคาแพงกว่า วานิลลินที่ได้จากธรรมชาติ และวานิลลินสังเคราะห์ จะให้กลิ่นหอมรุนแรงกว่าอีกด้วย กรดวานิลลิก หรือวานิลลิน เป็นสารที่มักจะนำไปใช้ผสมกับสินค้า ของกิน ขนม ของหวาน หรือแม้แต่ยารักษาโรคหลากหลายชนิด โดยเป้าหมายการใช้งานหลักก็คือเพื่อเติมแต่งเพิ่มกลิ่นหอมวนวลให้กับตัวผลิตภัณฑ์

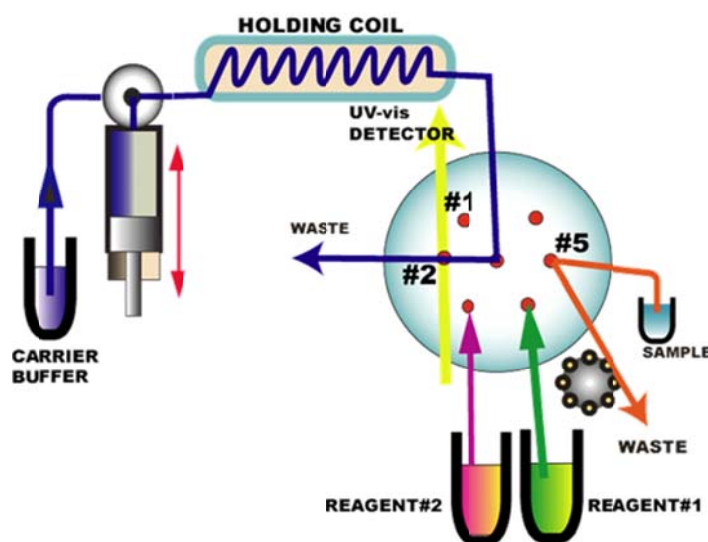
3. ไชรินจอล (Syringol) เป็นองค์ประกอบที่มีมากในควันไม้ ให้กลิ่นควันธรรมชาติ นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์รมควัน และสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ ทำให้ยืดอายุอาหารและเพิ่มคุณภาพของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการลดการอักเสบ ลดไข้ และแก้ปวด



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และ ไชรินจอล

2.1.4 หลักการวิเคราะห์แบบฉีดวนเวียนต่อเนื่อง (Sequential Injection Analysis, SIA)

ในปี ค.ศ. 1990 Ruzicka และ Marshall [5] ได้พัฒนาระบบวิเคราะห์ที่ชื่อว่า Sequential injection analysis, SIA) ซึ่งเป็นระบบที่มีการดูดสารที่ต้องการวิเคราะห์และรีเอเจนต์เข้ามาเป็นลำดับตามลำดับการเกิดปฏิกิริยา สารตัวอย่างและสารเคมีจะถูกดูดเข้ามาในปริมาณที่น้อยมากจึงไม่สิ้นเปลืองและลดการผลิตของเสีย ระบบ SIA แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 2.4 ระบบฉีดวนเวียนต่อเนื่อง (SIA)

ที่มา : <http://www.flowinjection.com/method2.html>

ส่วนประกอบของระบบฉีดวนเวียนต่อเนื่อง

- 1) หน่วยของการขับเคลื่อน (Propulsion unit) คือส่วนของปั๊ม ปั๊มที่ใช้มักเป็นปั๊มกำลังขับเคลื่อนสูง เพื่อเป็นตัวขับเคลื่อนรีเอเจนต์และตัวอย่างเข้าสู่ตัวตรวจวัด เช่น Syringe pump
- 2) ระบบของการฉีด (Multiposition valve) คือ ส่วนที่ดูดสารเคมี และ/หรือ สารตัวอย่างเข้าไปเก็บไว้ที่ holding coil มีลักษณะเป็น multiport valve สามารถมี port ได้มากถึง 10 port
- 3) Holding coil คือ เป็นส่วนที่ดูดสารเคมี และ/หรือ ตัวอย่างมาเก็บไว้ (ส่วนที่ 1 ถึง 3 นี้ เป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเจือจางตัวอย่าง)
- 4) Flow through cell คือส่วนที่เป็นระบบท่อที่ใช้ลำเลียงรีเอเจนต์และตัวอย่างเข้าสู่ตัวตรวจวัด

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

กรดฟีนอลิกจะประกอบด้วย 2 กลุ่มคือ ไฮดรอกซีเบนโซอิก ได้แก่พวก กรดแกลลิก วานิลิก และกรดไซลิบิก เป็นต้น ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งคือ กรดไฮดรอกซีซินนามิก ได้แก่ กรดคาเฟอิล เพอรูลิกและ ซินาปิก ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ขั้นตอนแรกซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ คือการสกัด สารเหล่านี้ออกมาจากวัตถุดิบ จากนั้นทำการตรวจวัดเพื่อระบุชนิดและหาปริมาณ [6] กรดฟีนอลิกที่อยู่ในรูปที่ต่างกันจะส่งผลให้ สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดต่างกัน วิธีสกัดพื้นฐานที่นิยมใช้คือ อาศัยหลักการทางโครมาโทกราฟี [7] ไม่ว่าจะเป็นแก๊สโครมาโทกราฟี(GC) หรือโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) โดยใช้ร่วมกับ mass spectrometry (MS) ตลอดจนเทคนิคอื่นๆ[6,7] ในการตรวจวัด

ความแตกต่างของเทคนิค HPLC ในการแยก หาปริมาณ และความสามารถในการวิเคราะห์ จะมีความแตกต่างในส่วนของคอลัมน์ที่ใช้ โดยส่วนใหญ่จะใช้คอลัมน์ Reversed-phase C-18 และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้จะใช้ตัวทำละลายผสมเพื่อปรับความเป็นขั้ว และค่าความเป็นกรดเบสให้เหมาะสม นอกจากนี้ ยังมีความแตกต่างในระบบการตรวจวัด โดยมีการใช้เครื่องตรวจจับที่หลากหลาย[7] เช่น เครื่องตรวจวัดยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์[8,9] เครื่องตรวจวัดไดโอดอาร์เรย์ [10,11,12]

A. Alonso Garcia และคณะ เสนอการใช้เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง ตามด้วยการใช้ Reversed-phase C-18 HPLC ร่วมกับการตรวจวัดอัลตราไวโอเลต ในการแยกสารประกอบฟีนอลิก 10 ชนิด ซึ่งได้ค่า Repeatability ต่ำกว่า 10% และ r^2 เท่ากับ 0.993 [8]

Domingo Blanco Gomis และคณะ ได้เสนอการใช้ Capillary liquid chromatography สำหรับใช้กับระบบ HPLC ในการตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิกในน้ำแอปเปิล ได้ค่าคืนกลับอยู่ในช่วง 90 – 105% และ RSD น้อยกว่า 7% [9]

M.A. Rodriguez-Delgado และคณะ พัฒนาเทคนิค HPLC โดยใช้ร่วมกับเครื่องตรวจวัดยูวี-วิสิเบิล และใช้ เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวัดคาเทชิน กรควานิลลิก กรดไซลิบิก อีพิกาทะชิน และ ทราน-เรสเวอราทอล ในตัวอย่างไวน์ จากการวิเคราะห์ให้ผลที่ดี มีค่าความไวสูงขึ้น [10]

Andreas Schieber และคณะ ทำการตรวจวัดกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในแอปเปิล และสาลี่ โดยใช้ HPLC ร่วมกับ Diode array และ MS ซึ่งพัฒนาเฟสอยู่กับที่ขึ้นมาใหม่ พบว่าสามารถแยกสารประกอบมาตรฐาน 26 ชนิด ได้ภายใน 1 ชั่วโมง และมีความสามารถในการแยกที่ดี [11]

B. Abad-Garcia และคณะ ได้สกัดสารประกอบฟีนอลิกจากน้ำผลไม้ โดยใช้เมทานอล-น้ำ-กรดอะซิติก (30:69:1, v/v/v) จากนั้นทำการแยกโดยใช้ Reversed-phase HPLC ร่วมกับการตรวจวัดด้วย Photodiode array (DAD) ได้ %RSD น้อยกว่า 8% ซีดจำกัดการตรวจวัดอยู่ระหว่าง 0.005 ถึง 0.03 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ได้ค่าคืนกลับ 98-100% [12]

Guanghou Shui และ Lai Peng Leong ได้พัฒนาเทคนิค HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดโฟโตไดโอดอาร์เรย์ ในการตรวจวัด กรดอินทรีย์และสารประกอบฟีนอลิกแบบพร้อมกัน ในน้ำผลไม้และเครื่องดื่ม ซึ่งประสบความสำเร็จโดยใช้เวลาในการแยกสารทั้งหมด 80 นาที มีค่า RSD ของเวลาในการแยกอยู่ระหว่าง 0.3 – 1.6% และมีค่าคืนกลับอยู่ในช่วง 85 – 106% [13]

นอกจากนั้นแล้วยังมีการใช้คอลัมน์ชนิดอื่นสำหรับการแยกในระบบ HPLC คือ คอลัมน์โมโนลิติกซึ่งได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง [14] Massimo Castellari และคณะ วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในไวน์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์โมโนลิติก ชนิด Reversed-phase C-18 ซึ่งพบว่าสามารถแยกและหาปริมาณได้ในการฉีดเพียงครั้งเดียว และใช้เวลาที่สั้น [15]

ในการระบุชนิดและหาปริมาณได้มีการนำเอาเครื่องมือ HPLC-MS และ GC-MS มาใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก เช่น ในงานของ Anna Maria Gioacchini และคณะ ใช้เทคนิค HPLC-ES-MS ในการวิเคราะห์ฟีนอลิกและอัลดีไฮด์ ซึ่งให้ค่าความไวที่สูง [16] Jiri Gruz และคณะ วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในเครื่องดื่มโดยใช้ UPLC-MS/MS ซึ่งไม่ต้องมีขั้นตอนเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่าง อีกทั้งยังรวดเร็ว ใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่เกิน 12 นาที [17]

C. Proestos และคณะ ตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิกในพืชที่มีกลิ่นหอม โดยใช้เทคนิค HPLC และ GC-MS โดยในส่วนของ GC-MS จะวิเคราะห์หลังจากการทำให้สารประกอบฟีนอลิกเกิดปฏิกิริยาซิลิเลชัน และสำหรับสารที่ไม่ระเหย จะทำให้เกิดเป็นอนุพันธ์ [18]

นอกจากเทคนิคการแยกและวิเคราะห์ปริมาณด้วย HPLC และ GC แล้ว ยังมีการใช้ Capillary electrophoresis (CE) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการวิเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบที่มีขั้ว และประจุที่มีมวลโมเลกุลต่ำถึงปานกลาง เช่น ในงานของ Kazuhiko Tsukagoshi และคณะ ใช้เทคนิค CE ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (phenol, 2-chlorophenol, 4-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,6-dichlorophenol และ 2,4,6-trichlorophenol)[19]

Saleh M.S. Sawalha และคณะ ได้พัฒนา CE ใช้ร่วมกับ MS/MS ในการหาปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกหลักในเปลือกส้ม จากผลที่ได้เหมาะสำหรับวิเคราะห์สารประกอบธรรมชาติ [20] นอกจากนี้ยังมีงานของ C. Garcia-Viguera และ Peter Bridle ได้เปรียบเทียบเทคนิค HPLC กับ CE [21] และงานของ Juhani Kronholm เปรียบเทียบระหว่าง GC-MS กับ CE [22] ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ซึ่ง HPLC กับ CE และ GC-MS กับ CE ให้ผลที่คล้ายกัน แต่การแยกใน CE ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความแรงประจุของบัฟเฟอร์ ศักย์ไฟฟ้าที่ให้และอุณหภูมิ

อีกทั้งยังมีการใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าในการตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิก M.N. Peyrat-Mailard, S. Bonnely และ C. Berset ใช้ HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดคลอโรเมตริก พบว่าเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วงที่ต่ำ (100-450mV) สารประกอบฟีนอลิก สามารถให้ค่าการตอบสนองที่สูง [23]

เทคนิคการไหลอย่างต่อเนื่องแบบโพลินเจกชัน ได้มีการนำมาใช้ในการตรวจวัดสารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน โดยการตรวจวัดการยับยั้งการเรืองแสงของลูมินอล ซึ่งให้ค่าความไวที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี [24]

ด้วยเทคนิคที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้นนี้ถึงแม้จะมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่ดี แต่ยังมีความยุ่งยากในการเตรียมสารเคมี อีกทั้งเครื่องมือยังมีราคาแพง อีกเทคนิคคือการไหลแบบซีเควนเชียลอินเจกชัน(SIA) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากได้ถูกต้อง รวดเร็ว และมีราคาถูก [25] งานวิจัยที่มีการใช้ SIA คือ Andreu Cladera และคณะ ใช้ระบบ SIA ในการวิเคราะห์ไนโตรฟีนอลในน้ำร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และการเพิ่มความเข้มข้น ซึ่งผลที่ได้เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่า เวลาปริมาณตัวอย่าง และตัวทำละลายอินทรีย์ลดลงอย่างมาก [26]

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก โดยนำระบบ SIA มาใช้ร่วมกับคอลัมน์แบบโมโนลิติกเพื่อใช้สำหรับการแยก

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

- 3.1.1.1 สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) – Sigma, USA
- 3.1.1.2 สารละลายมาตรฐานกรดวานิลลิก (Vanillic acid) – Fluka, Switzerland
- 3.1.1.3 สารละลายมาตรฐานไซลีนกอล (Syringol) – Sigma, USA
- 3.1.1.4 สารละลายเมทานอล เกรด HPLC- Carlo Erba, Italy
- 3.1.1.5 กรดอะซิติก
- 3.1.1.6 โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride)
- 3.1.1.7 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (DiPotassiumhydrogenphosphate)
- 3.1.1.8 โพแทสเซียมโบรไมด์ (Potassium bromide)
- 3.1.1.10 โพแทสเซียมไนเตรด (Potassium Nitrate)
- 3.1.1.10 โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide)
- 3.1.1.11 โพแทสเซียมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต (Potassium Hexacyanoferrate)

3.1.2 อุปกรณ์เครื่องตรวจวัด

- 3.1.2.1 ขวดวัดปริมาตร
- 3.1.2.2 บีกเกอร์
- 3.1.2.3 ปิเปต
- 3.1.2.4 หลอดหยด
- 3.1.2.5 เครื่องกรองสุญญากาศ
- 3.1.2.6 เครื่องให้คลื่นความถี่สูง (Sonicator)
- 3.1.2.7 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) - UV-Visible spectrophotometer (Water 486)
- 3.1.2.8 Syringe pump (HAMILTON, PSD4)
- 3.1.2.9 8-port Multi-selection valve (HAMILTON, Serial MVP)
- 3.1.2.10 Revers phase C-18 packed column (KYA TECH Corporation, HiQ sil C18HS)
- 3.1.2.11 Revers phase C-18 Monolithic column (Merck, Chromolith®HPLC column)

3.2 การดำเนินการวิจัย

สารละลายทั้งหมดเตรียมจากน้ำกลั่นปราศจากไอออน และสารละลายที่ต้องฉีดเข้าเครื่อง HPLC จะกรองผ่านกระดาษกรองในลอนขนาด 0.45 ไมโครเมตร และไล่ฟองอากาศด้วย Sonicator ทุกครั้ง

3.2.1 การเตรียมสารละลาย

3.2.1.1 สารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท

เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมอะซิเตท ไตรไฮเดรต มา 13.6 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000.0 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยเปิดกรดกลacialอะซิติกมา 5.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000.0 มิลลิลิตร

จากนั้นนำสารละลายโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ มาผสมกับสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ วัดพีเอชให้เท่ากับที่ต้องการ (3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0)

3.2.1.2 สารละลายเฟสเคลื่อนที่ เมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ตวงสารละลายเมทานอลเข้มข้น 99.9% มา 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.1.3 สารละลายเฟสเคลื่อนที่ อะซิโตนไนโตรล์เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร

ตวงสารละลายอะซิโตนไนโตรล์เข้มข้น 99.9% มา 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3.2.1.4 สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

- ละลายกรดแกลลิก 0.05 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50.0 มิลลิลิตร

3.2.1.5 สารละลายมาตรฐานควานิลลิกเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

- ละลายกรดควานิลลิก 0.05 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50.0 มิลลิลิตร

3.2.1.6 สารละลายมาตรฐานไซรีนจอล เข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร

- ละลายไซรีนจอล 0.05 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50.0 มิลลิลิตร

3.2.1.7 สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

- สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก สารละลายมาตรฐานกรควานิลลิก สารละลายมาตรฐานไซรีนจอล ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มาอย่างละ 5.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่จนครบ 25.0 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 10.0, 50.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1000.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งสามมา 0.25, 1.25 และ 2.50 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่จนครบ 25.0 มิลลิลิตร

3.2.1.8 สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่จนครบ 25.0 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้นผสม 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่จนครบ 25.0 มิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้นผสม 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่จนครบ 25.0 มิลลิลิตร

3.2.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.2.1 ศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัด

- เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (เพียงสารเดียว) ความเข้มข้น 10-4 โมลาร์
- เทสารละลายกรดแกลลิกเข้มข้น 10-4 โมลาร์ ลงในคิวเวท ทำการสแกนสเปกตรัม
- นำสเปกตรัมที่ได้ หาความยาวคลื่นสูงสุดเพื่อใช้ติดตามประกอบฟีนอลิกที่แยกได้
- สำหรับสารละลายมาตรฐานวานิลลิก และไซรีนจอล ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 – 3

3.2.2.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

(1) ชนิดของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

- เตรียมสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในน้ำกลั่น เพื่อเป็นเฟสเคลื่อนที่

- บั้มสารละลายเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ บั้มจนกระทั่งคอลัมน์มีแต่สารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ โดยสังเกตจากสัญญาณ base line

- กำหนดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้งค่าดูคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร

- ฉีดสารละลายมาตรฐานผสมเข้มข้น 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง HPLC บันทึกโครมาโทแกรม และฉีดสารละลายเข้าเครื่องซ้ำจนครบสามครั้ง

- ทำซ้ำข้อ 1 – 4 โดยปรับเปลี่ยนสารละลายเฟสเคลื่อนที่ใหม่เป็นอะซิโตนไทรล์เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร

(2) อัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

- เตรียมสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10, 25, 50, 75 โดยปริมาตร ในน้ำกลั่น

- ทำการทดลองเช่นเดียวกับในหัวข้อที่ (1)

- ทำซ้ำจนครบทุกอัตราส่วน

(3) ค่าพีเอชของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

- เตรียมสารละลายเฟสเคลื่อนที่ เมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร โดยเปิดสารละลายเมทานอลเข้มข้น 99.9% มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดแกลเชียลอะซิติก 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

- เตรียมสารละลายเฟสเคลื่อนที่ เมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท เข้มข้น 0.1 พีเอช 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0

- ทำการทดลองเช่นเดียวกับในหัวข้อที่ (1)

- ทำซ้ำจนครบทุกค่าพีเอช

- ถ้าค่าพีเอชไหนเกิดการแยกของสารประกอบฟีนอลิก ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานผสม เข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มจนครบทุกความเข้มข้น

(4) อัตราการไหลของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

- เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมเข้มข้น 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

- กำหนดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้ง ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร

- นิดสารละลายมาตรฐานผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง HPLC บันทึกโครมาโทแกรม และนิตสารละลายเข้าเครื่องซ้ำจนครบสามครั้ง

- ทำซ้ำโดยปรับเปลี่ยนอัตราการไหลเพิ่มขึ้นครั้งละ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการปรับเปลี่ยนอัตราการไหลในช่วง 1.0 – 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที

(5) ปริมาตรสารตัวอย่างที่นิต

- เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมเข้มข้น 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

- กำหนดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้งค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร

- นิดสารละลายมาตรฐานผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง HPLC บันทึกโครมาโทแกรม และนิตสารละลายเข้าเครื่องซ้ำจนครบสามครั้ง

- ทำซ้ำโดยปรับเปลี่ยนปริมาตรสารที่นิตเพิ่มขึ้นครั้งละ 5 ไมโครลิตรต่อนาที ทำการปรับเปลี่ยนปริมาตรสารที่นิตในช่วง 10 – 20 ไมโครลิตร

3.2.2.3 คุณลักษณะเด่นของวิธี

(1) ความแม่นยำ

- ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำส้มคว้น และตัวอย่างน้ำส้มคว้นไม้ที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิก ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไป โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละสามซ้ำ

- คำนวณหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในตัวอย่างและตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน

- คำนวณหาค่าร้อยละของการวิเคราะห์ค่าคืนกลับ

(2) ความเที่ยง

- ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมฟีนอลิก ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซ้ำๆเป็นจำนวน 5 ครั้ง

- คำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของเวลาที่สารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดถูกชะออกมา

(3) ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)

- สร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ
- คำนวณหาค่า LOD จากสมการ

(4) ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (Limit of quantitation, LOQ)

- สร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ
- คำนวณหาค่า LOQ จากสมการ

3.2.2.4 ศึกษาการแยกสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างน้ำส้มควันไม้

- เตรียมตัวอย่างโดยกรองตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ด้วยไซริงเมมเบรน ขนาด 0.22

ไมโครเมตร

- ปิบน้ำส้มควันไม้มา 0.25 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่จนครบปริมาตร

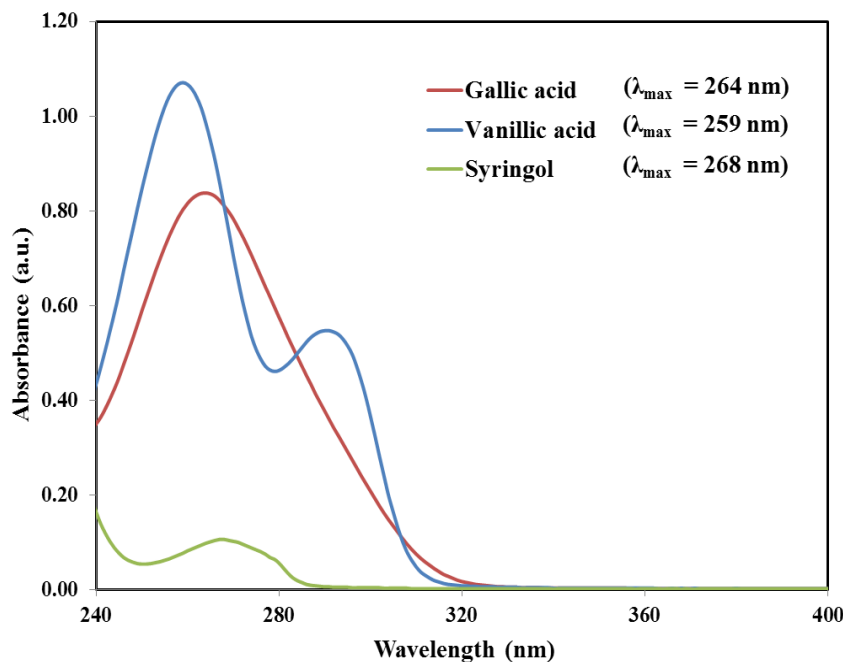
- ใช้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่หาได้ ทำการฉีดตัวอย่างน้ำส้มควันไม้เข้าเครื่อง
- ทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมดสามครั้ง
- คำนวณหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มควันไม้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัด

เนื่องจากกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล มีค่าความยาวคลื่นสูงสุดในการดูดกลืนแสงที่ต่างกันดังแสดงในรูปที่ 4.1 และข้อจำกัดของเครื่องตรวจวัดที่ใช้ คือ เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ไม่สามารถตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงหลายความยาวคลื่นได้พร้อมกันเนื่องจากไม่ได้ใช้แบบไดโอดอาร์เรย์ จึงจำเป็นต้องศึกษาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัดสารทั้งสามชนิดพร้อมกัน



รูปที่ 4.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-4} โมลาร์

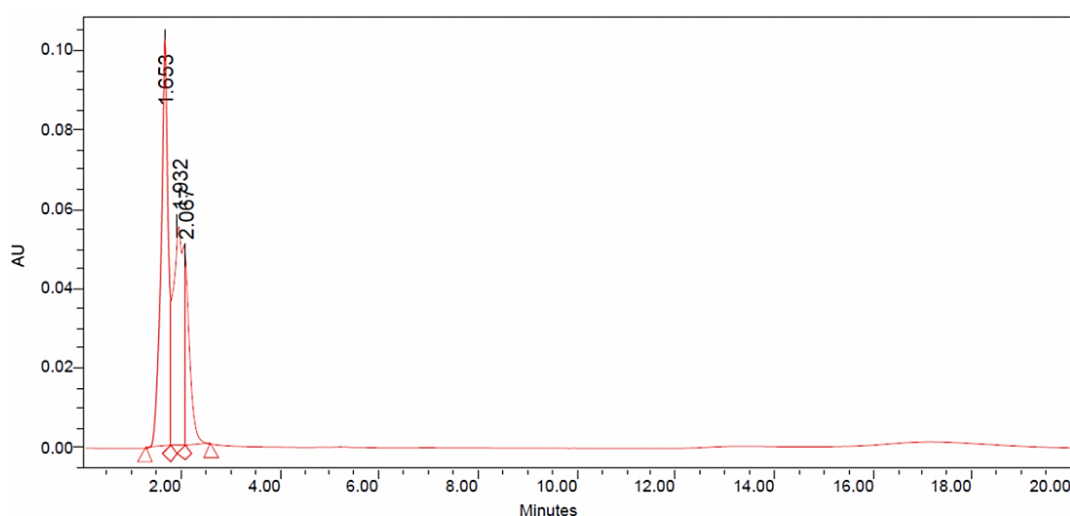
จากรูปที่ 4.1 กรดแกลลิกมีค่าความยาวคลื่นสูงสุดเท่ากับ 264 นาโนเมตร กรดวานิลลิก มีค่าความยาวคลื่นสูงสุดเท่ากับ 259 นาโนเมตร และไซรินจอล มีค่าความยาวคลื่นสูงสุดเท่ากับ 268 นาโนเมตร ดังนั้นจึงเลือกติดตามที่ 264 นาโนเมตร เพราะเป็นค่าความยาวคลื่นที่ใกล้เคียงกับความยาวคลื่นสูงสุดของสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิด อีกทั้งจากการศึกษาเบื้องต้นโดย พิสมัย และคณะ (2011) โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าในตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ (ซึ่งเป็นชนิดเดียวกันกับที่ศึกษาในงานวิจัยนี้) มีปริมาณกรดแกลลิกน้อยที่สุด การเลือกติดตามที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร จะช่วยให้หาปริมาณกรดแกลลิกได้

4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลอง

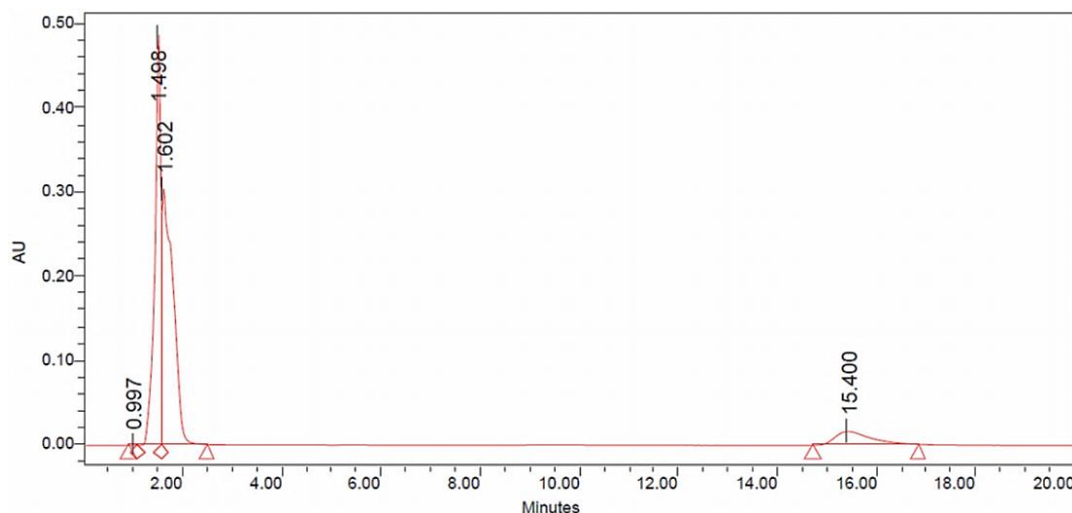
ในส่วนนี้จะเป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิด ซึ่งเกณฑ์ในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมจะพิจารณาจากประสิทธิภาพการแยกเป็นหลัก อิทธิพลของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการแยก มีดังหัวข้อต่อไปนี้

4.2.1 ชนิดของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

แยกสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิก โดยเฟสเคลื่อนที่ที่เลือกศึกษามีสองชนิด คือ สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร และสารละลายอะซิโตนไนโตรเจนเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร แสดงผลดังรูปที่ 4.2 และ 4.3



รูปที่ 4.2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม กรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร



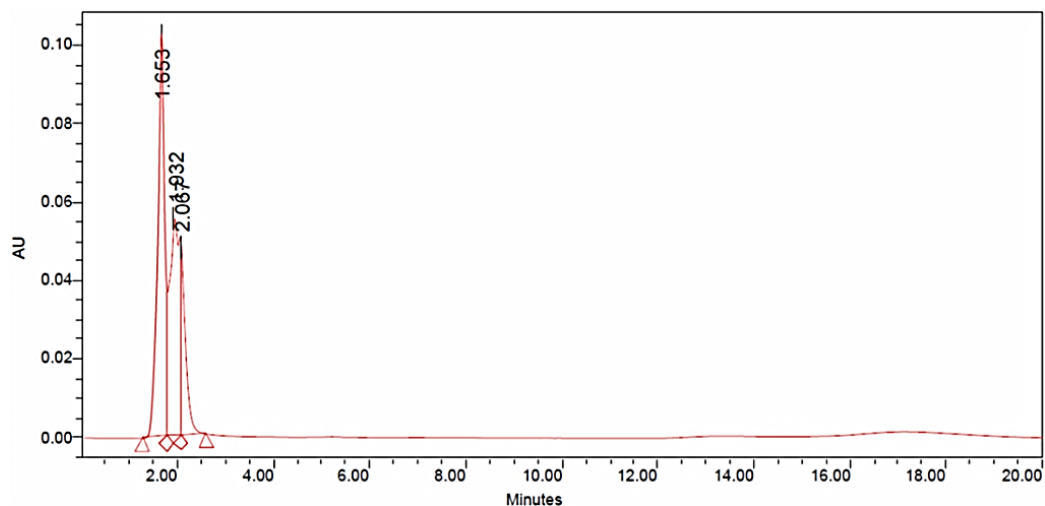
รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม กรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น สารละลายอะซิโตไนไตรล์เข้มข้น

ร้อยละ 10 โดยปริมาตร

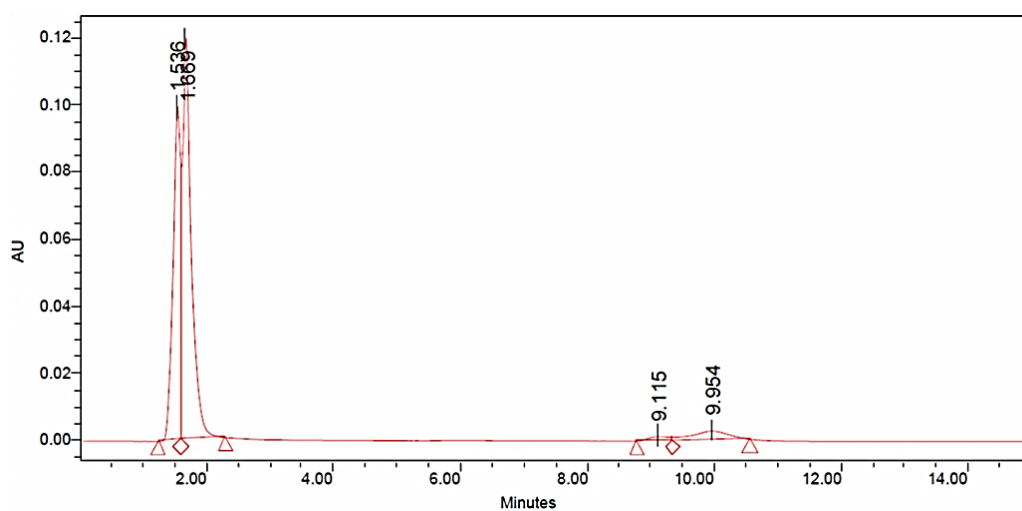
จากรูปที่ 4.2 และ 4.3 แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร และสารละลายอะซิโตไนไตรล์เข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ยังไม่สามารถแยกสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามในสารละลายมาตรฐานผสมออกจากกันได้ แต่อย่างไรก็ได้จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า งานวิจัยส่วนใหญ่เลือกใช้สารละลายเมทานอลในการศึกษา อีกทั้งสารละลายเมทานอลมีราคาถูกกว่า ดังนั้นในงานนี้จึงเลือกศึกษาเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลต่อไป เพื่อทำการศึกษาอัตราส่วนของสารละลายเมทานอล เพื่อให้สารประกอบฟีนอลิกทั้งสามแยกออกจากกัน

4.2.2 อัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

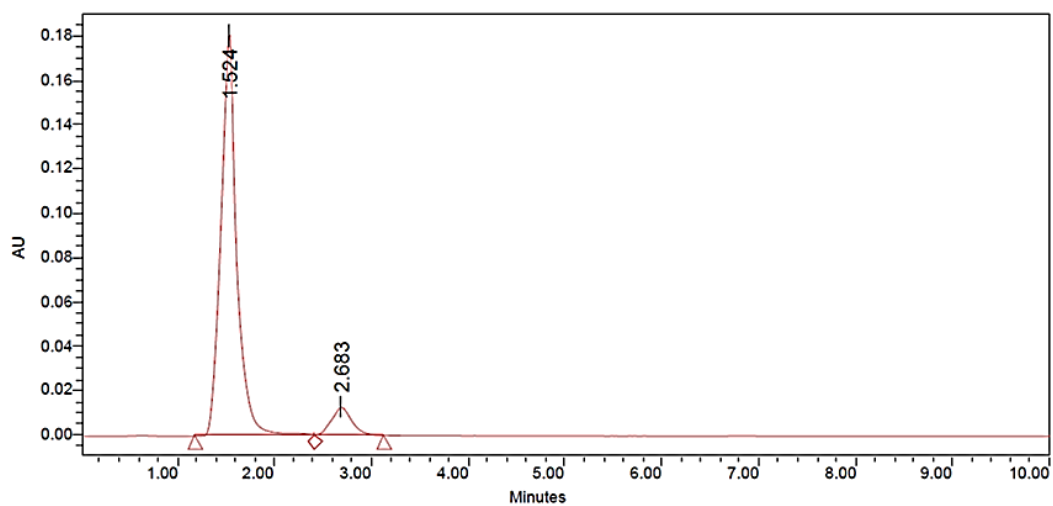
แยกสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิก โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10, 25, 50 และ 75 โดยปริมาตร และสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร ใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร แสดงผลดังรูปที่ 4.4 - 4.8



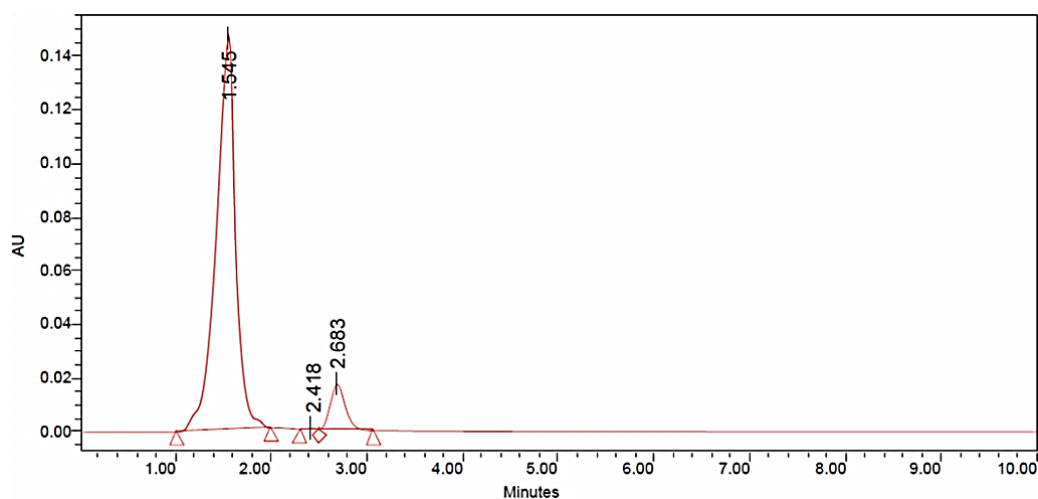
รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร



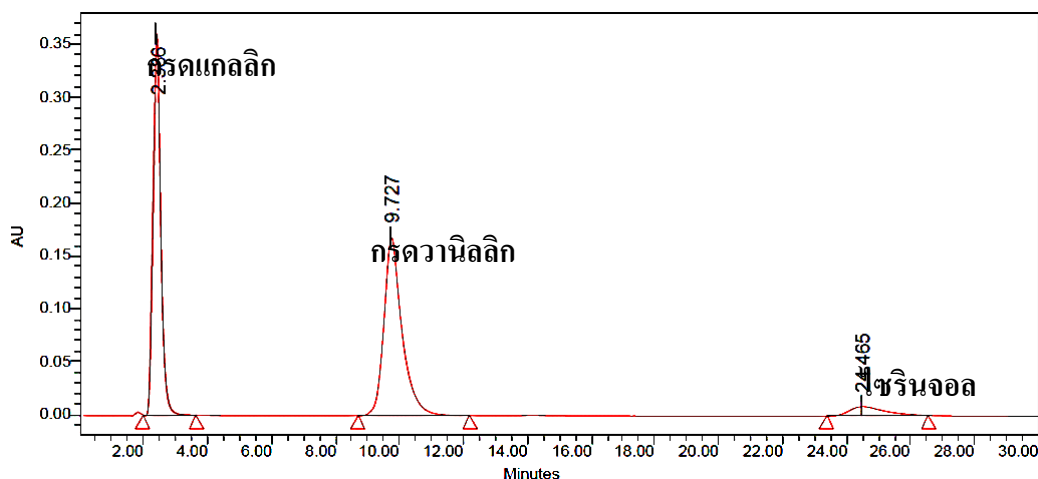
รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 25 โดยปริมาตร



รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 50 โดยปริมาตร



รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 75 โดยปริมาตร

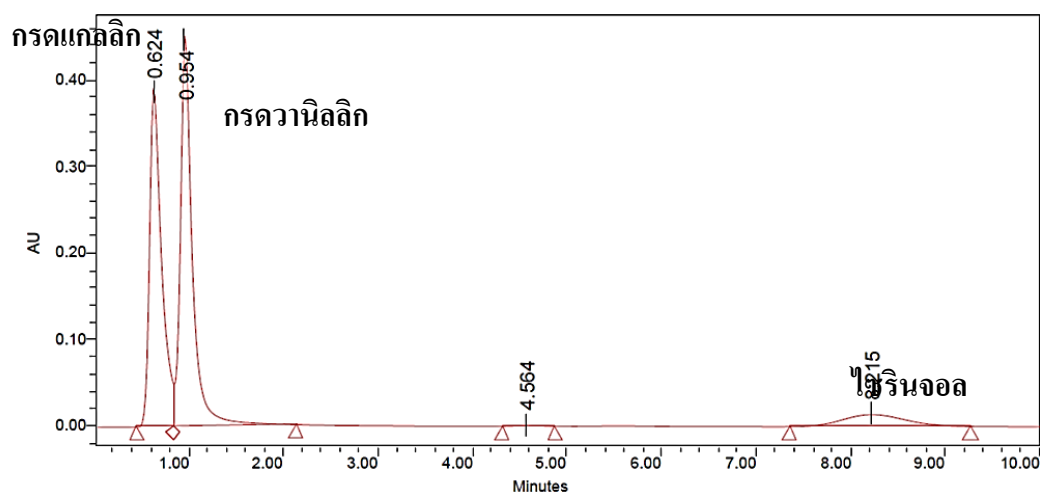


รูปที่ 4.8 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรควานิคลิก และซเรซินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร

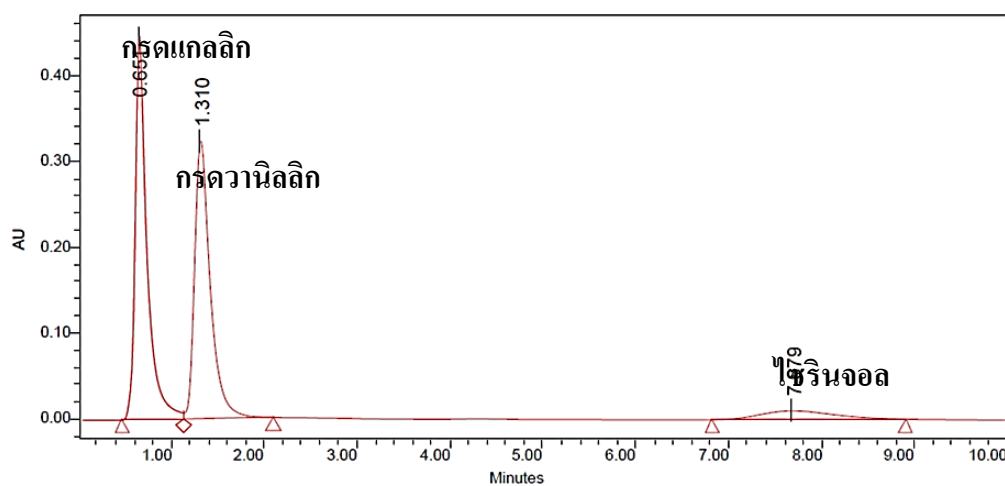
จากรูปที่ 4.4 – 4.7 พบว่า ไม่ว่าสารละลายเฟสเคลื่อนที่ มีความเข้มข้นของสารละลายเมทานอลเท่าใดก็ตาม ก็ยังไม่สามารถแยกสารประกอบฟีนอลิกออกจากกันได้ จึงเลือกใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เพื่อศึกษาอิทธิพลขององค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ โดยเปลี่ยนมาใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร พบว่าสามารถแยกและวิเคราะห์สารด้านอนุมูลอิสระได้ดี ดังรูปที่ 4.8 จากการผสมกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร ลงไป ทำให้ได้ค่าพีเอชของสารละลายเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2.6 ซึ่งมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับเมื่อใช้สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 เพียงอย่างเดียว (พีเอชเท่ากับ 6.4) จึงสรุปได้ว่า ค่าพีเอชน่าจะมีอิทธิพลต่อการแยกอยู่พอสมควร จึงได้ทำการศึกษาอิทธิพลของพีเอชโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทต่อไป

4.2.3 ค่าพีเอชของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

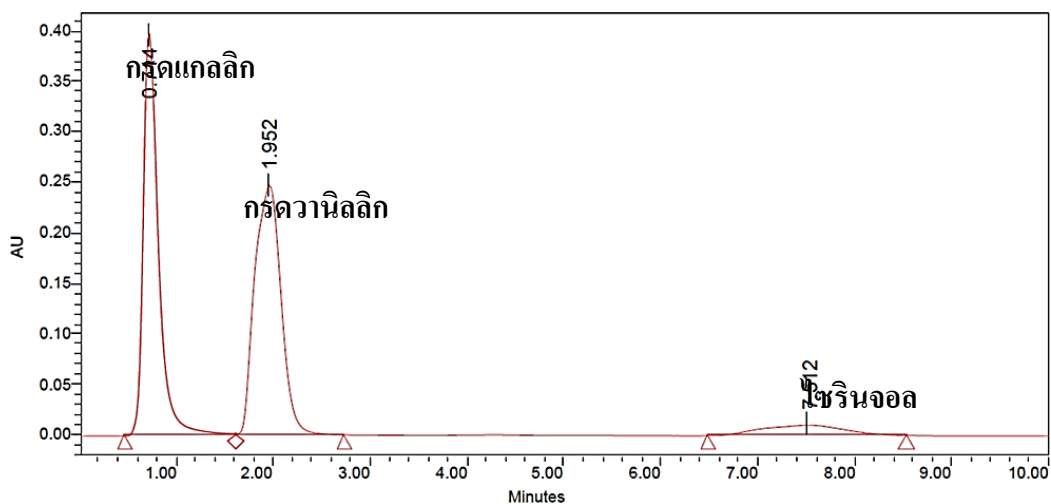
ในส่วนนี้เป็นการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิด โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เตรียมในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอช โดยทำการลดค่าพีเอชลงเป็นลำดับ ดังนี้ 5.0, 4.5, 3.0, 3.5 และ 3.0 ใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.9 – 4.13



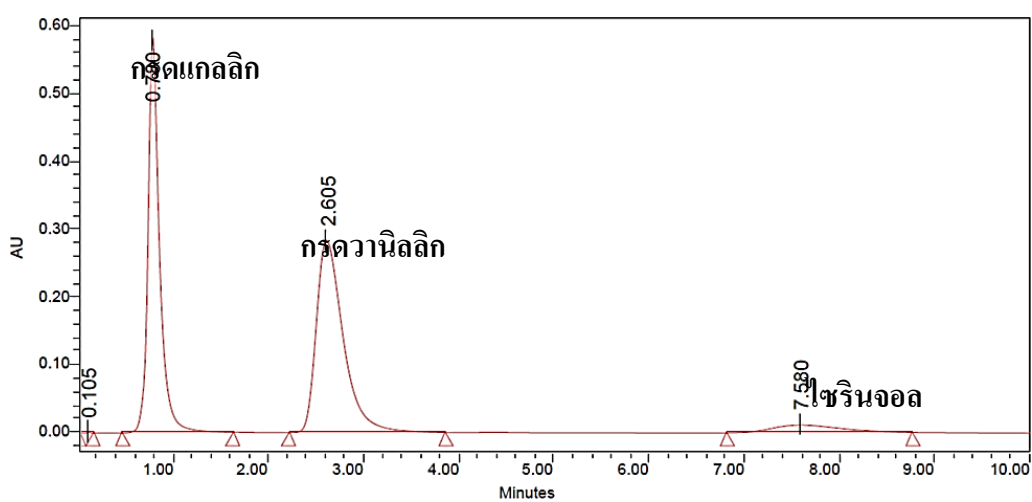
รูปที่ 4.9 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไชรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 5.0



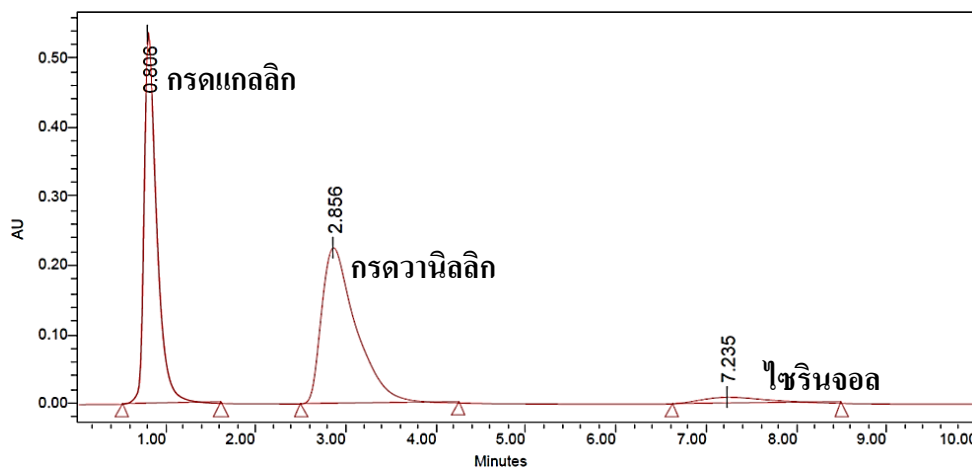
รูปที่ 4.10 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไชรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.5



รูปที่ 4.11 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 4.0

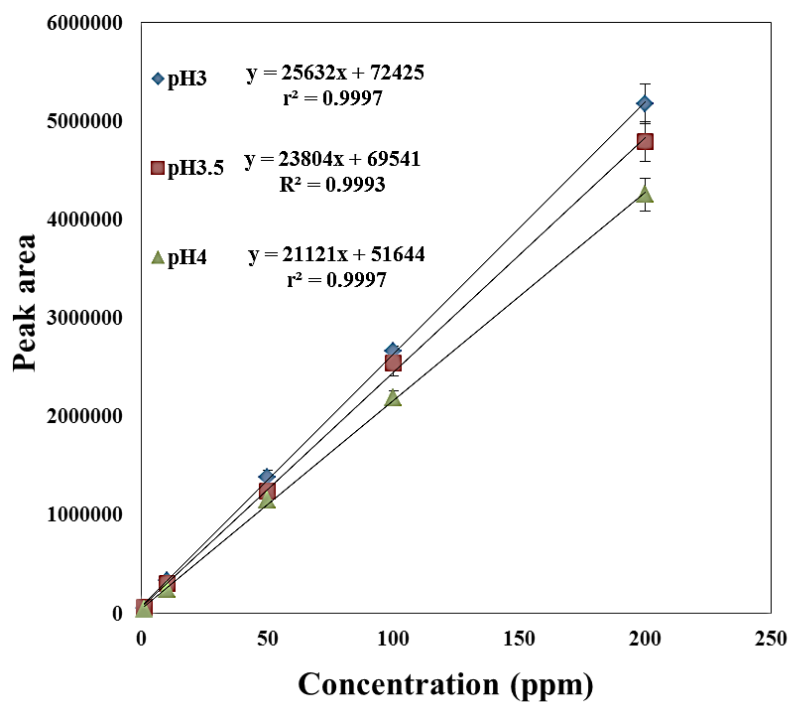


รูปที่ 4.12 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.5

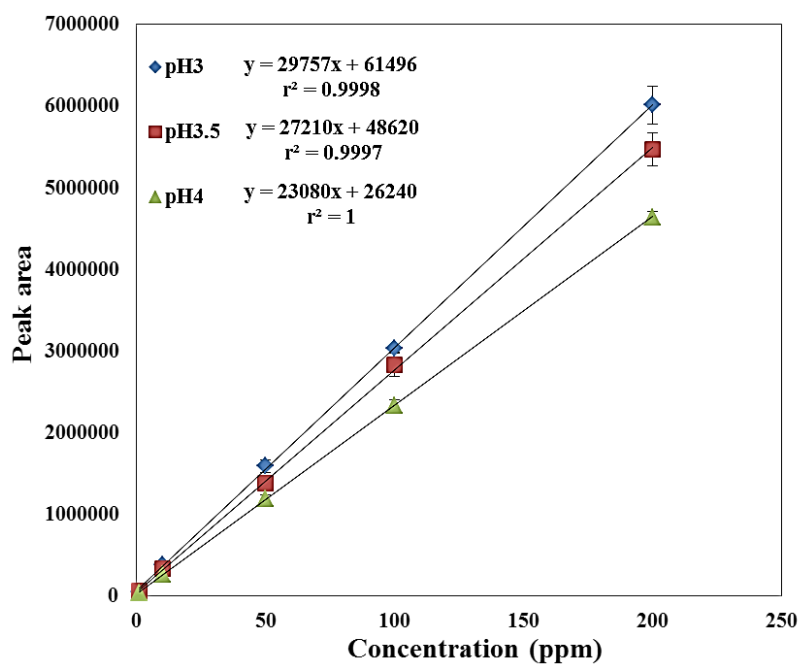


รูปที่ 4.13 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไชรินจอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ **ค่าพีเอช 3.0**

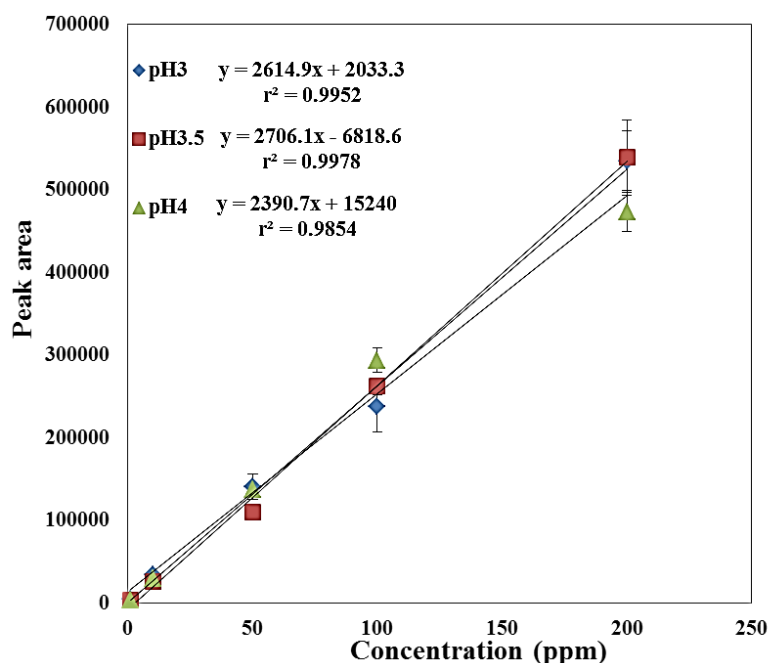
จากรูปที่ 4.9 – 4.13 แสดงให้เห็นว่า เมื่อค่าพีเอชต่ำลง สารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิดจะสามารถแยกออกจากกันได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานของ [27] เพราะ เมื่อเฟสเคลื่อนที่มีค่าพีเอชสูงกว่าค่าคงที่การแตกตัว (pK_a) ของกรดแกลลิก ($pK_a = 4.5$) และ กรดวานิลลิก ($pK_a = 4.5$) จะเกิดการแตกตัวทำให้มีสภาพขั้วที่มากขึ้น จึงถูกชะออกมาเร็ว ส่วนไชรินจอลมีค่าการแตกตัวที่สูง ($pK_a = 9.98$) อีกทั้งจากโครงสร้างโมเลกุลของมันค่อนข้างมีขั้วต่ำ จึงถูกชะออกมาทีหลัง เมื่อลดค่าพีเอชลง กรดแกลลิก และ กรดวานิลลิกจะแตกตัวได้ยากขึ้น เมื่อพิจารณาพร้อมกับโครงสร้างโมเลกุล กรดวานิลลิกจะมีสภาพความเป็นขั้วน้อยกว่ากรดแกลลิก ยิ่งเมื่อลดค่าพีเอช กรดวานิลลิกจะแตกตัวได้ยากขึ้น ความเป็นขั้วจะยิ่งน้อยลง จึงใช้เวลาในการชะนานขึ้น อีกทั้งสารประกอบในกลุ่มกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดแกลลิก และกรดวานิลลิก) ลำดับการชะจะขึ้นกับหมู่ไฮดรอกซี และเมทอกซี ดังนั้นกรดแกลลิก ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซีมากกว่าจึงถูกชะออกมาก่อน [28] เมื่อพิจารณาเฉพาะพีเอช 3.0 – 4.0 พบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิดสามารถแยกจากกันได้ดี และใช้เวลาในการแยกใกล้เคียงกัน จึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไชรินจอล ที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้น และหาสมการเส้นตรง พบว่า ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.14 - 4.16



รูปที่ 4.14 กราฟมาตรฐานของกรดแกดอลิกความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มก./ลิตร



รูปที่ 4.15 กราฟมาตรฐานของกรดวานิลลิกความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มก./ลิตร



รูปที่ 4.16 กราฟมาตรฐานของไซริงจอลที่มีความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มก./ลิตร

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพในการแยก (Resolution, R) ของสารประกอบฟีนอลิกในสารละลายมาตรฐานผสมที่พีเอชต่างๆ

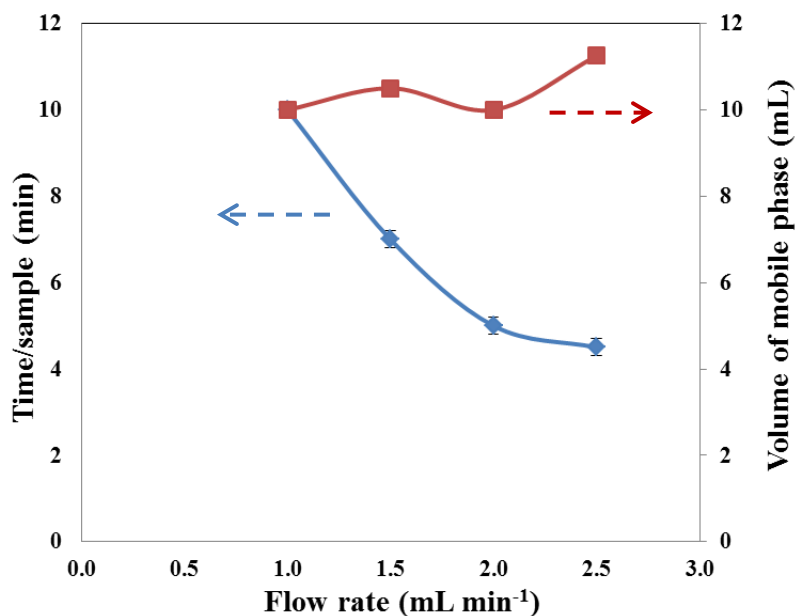
ค่าพีเอช	R _{Gallic - Vanillic}	R _{Vanillic - Syringol}
pH 3.0	1.4	3.5
pH 3.5	1.3	2.7
pH 4.0	1.0	3.3

จากรูปที่ 4.14 – 4.16 แสดงกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซริงจอล ที่ค่าพีเอชต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์ (ดูจากความชันของสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน) และค่าความเป็นเส้นตรง (ดูจากสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์, r^2) พบว่า ที่พีเอชเท่ากับ 3.0 มีความไวในการวิเคราะห์ และค่าความเป็นเส้นตรงดีที่สุด อีกทั้งเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการแยก (Resolution) ของสารประกอบทั้งสามชนิด พบว่า ที่พีเอชเท่ากับ 3.0 มีประสิทธิภาพในการแยกดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ดังนั้น จึงเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 3.0 ในการศึกษาต่อไป

ทั้งนี้ ไม่ได้ศึกษาที่พีเอชต่ำกว่า 3 เนื่องจากขีดจำกัดของคอลัมน์ ซึ่งมีขีดจำกัดความสามารถที่ทนต่อค่าพีเอชในช่วง 2 – 7 เพื่อเป็นการรักษาประสิทธิภาพของคอลัมน์จึงไม่ได้ศึกษาที่พีเอชต่ำ 3

4.2.4 อัตราการไหลของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

ส่วนนี้เป็นการหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดการแยกของสารประกอบฟีนอลิกที่ดี โดยเกณฑ์ในการเลือก จะพิจารณาจากเวลาในการแยก จนเสร็จสิ้น และ ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 กราฟแสดงผลของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่มีผลต่อเวลาในการแยกและปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ต่อหนึ่งตัวอย่าง

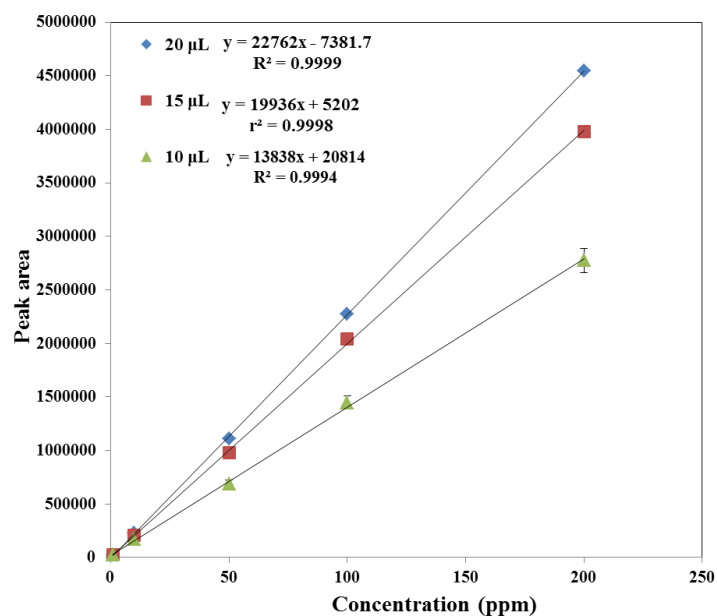
จากรูปที่ 4.17 จะเห็นว่า เมื่อใช้อัตราการไหลที่สูงขึ้นจาก 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จนถึง 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อเพิ่มอัตราการไหลจาก 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที เป็น 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที จะใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน จากนั้นจึงพิจารณา ปริมาตรเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ พบว่าที่อัตราการไหล 1.0 - 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที จะใช้ปริมาตรเฟสเคลื่อนที่ ใกล้เคียงกัน คือเท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อหนึ่งตัวอย่าง แต่ที่อัตราการไหล 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที จะใช้ ปริมาตรเฟสเคลื่อนที่มากกว่า ดังนั้น เมื่อพิจารณาทั้งเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์และปริมาตรเฟสเคลื่อนที่ที่ ใช้ ในงานนี้จึงเลือกใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์ เสร็จสิ้นภายใน 5 นาที ต่อหนึ่งตัวอย่าง

อนึ่ง ทุกๆอัตราการไหลที่ศึกษา สารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิดยังคงแยกออกจากกันได้ดี

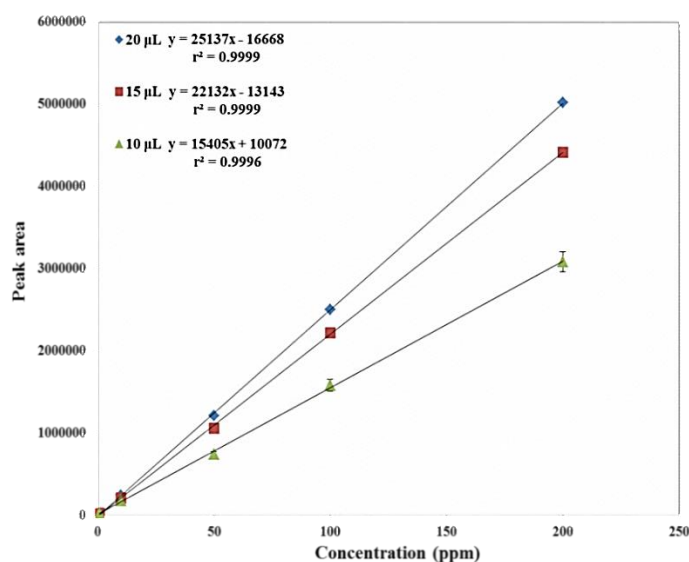
4.2.5 ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีด

เป็นการศึกษาปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดที่เหมาะสม ปริมาตรที่ศึกษา คือ 10, 15 และ 20 ไมโครลิตร โดยการทดลองได้วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และ

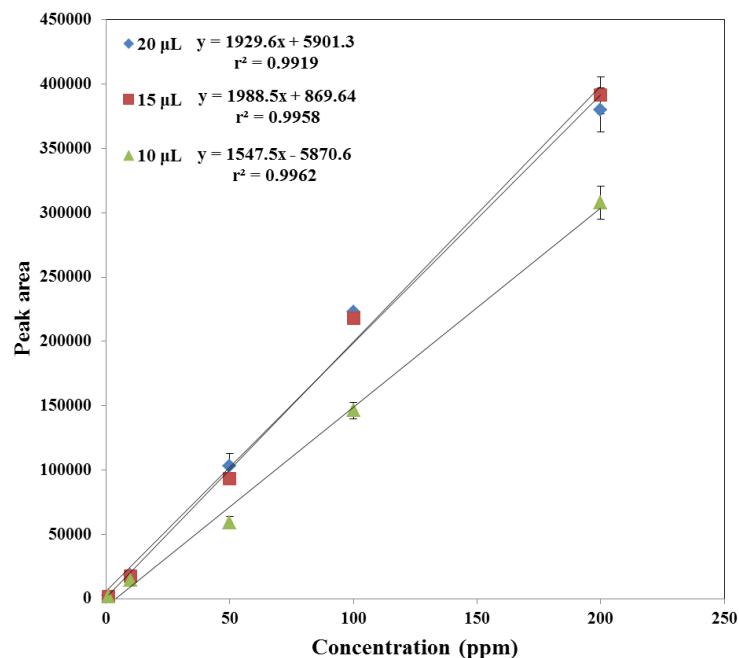
ไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลาย เมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0 และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นสร้างกราฟ มาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้น แสดงผลดังรูปที่ 4.18 – 4.20



รูปที่ 4.18 กราฟมาตรฐานของ กรดแกลลิก ที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มก./ลิตร



รูปที่ 4.19 กราฟมาตรฐานของ กรดวานิลลิก ที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มก./ลิตร



รูปที่ 4.20 กราฟมาตรฐานของ ไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มก./ลิตร

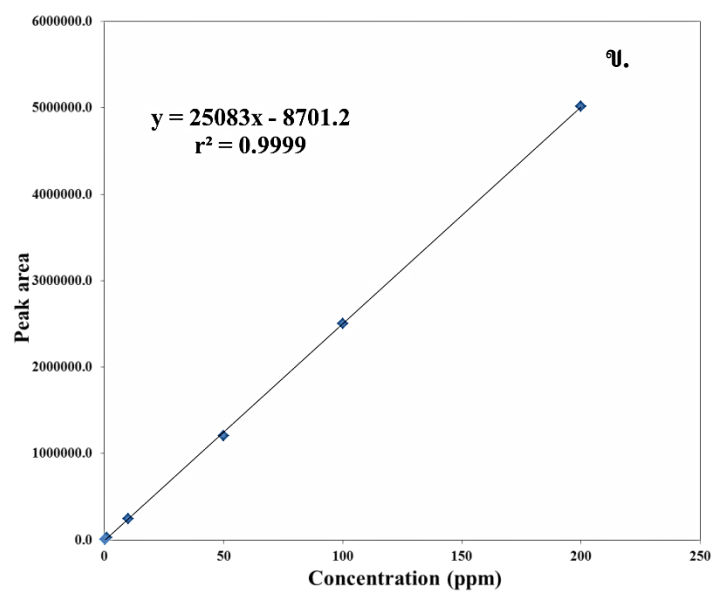
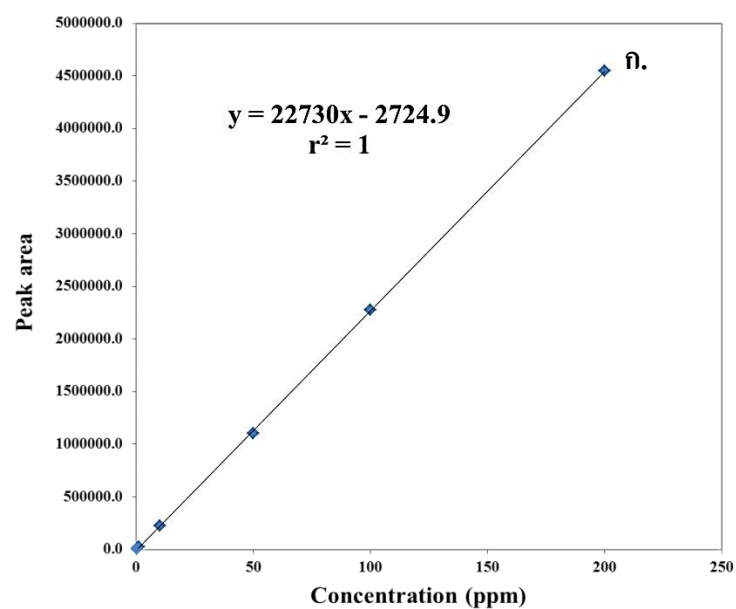
จากรูปที่ 4.18 – 4.20 เมื่อปริมาตรเพิ่มขึ้น พบว่า ความไวในการวิเคราะห์ (ความชันของสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน) เพิ่มขึ้น ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2) ที่ดีมากสำหรับทุกๆ ปริมาตรที่ศึกษา แต่ที่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มีความไวในการวิเคราะห์สูงที่สุด ดังนั้น จึงเลือกใช้ปริมาตรที่ใกล้เคียงกับ 20 ไมโครลิตร

จากผลการทดลองตั้งแต่หัวข้อ 4.2.1 – 4.2.5 สามารถสรุปสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ได้ ดังตารางที่ 4.2

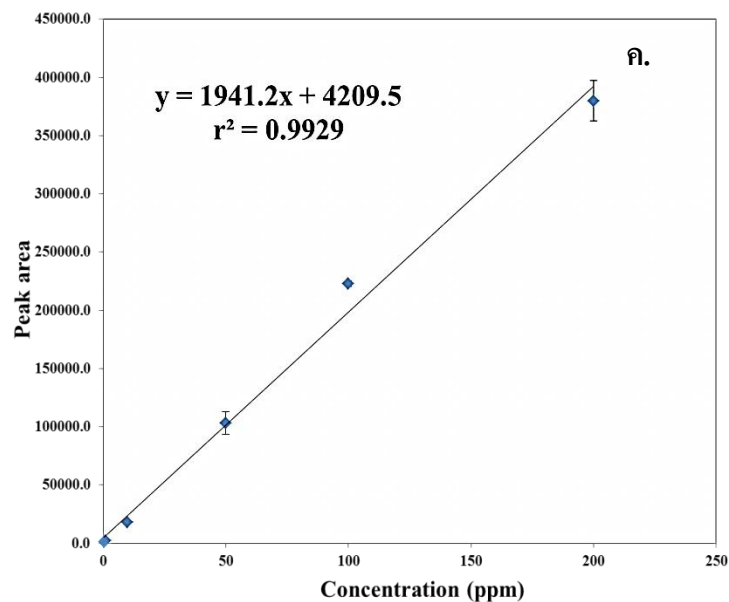
ตารางที่ 4.2 สถานะที่เหมาะสมในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิก

ตัวแปรที่ศึกษา	ค่าที่เหมาะสม
ขนาดของมอนอลิติกคอลัมน์	4.6 มม. X 25.0 มม. Macropore 2.0 ไมโครเมตร และ Mesopore 13.0 นาโนเมตร
สารละลายเฟสเคลื่อนที่	สารละลายเมทานอลเข้มข้น 10% ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์
ค่าพีเอชของสารละลายเฟสเคลื่อนที่	3.0
อัตราการไหล	2.0 มิลลิลิตร/นาที
ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีด	20 ไมโครลิตร

จากนั้นได้นำสถานะการทดลองที่เหมาะสมนี้มาใช้ในการศึกษาเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิกในช่วยความเข้มข้น 0.1 – 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.21



รูปที่ 4.21 กราฟมาตรฐานของ ก. กรดแกลลิก ข. กรดวานิลลิก และ ค. ไซรินจอลที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.21 (ต่อ)

4.3 คุณลักษณะเด่นของวิธี

4.3.1 ความแม่นยำ

ในการหาความแม่นยำของวิธี จะพิจารณาโดยในการทดลองนี้จะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำส้มคว้น และตัวอย่างน้ำส้มคว้นไม้ที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิก ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไป จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในตัวอย่างและตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน และคำนวณหาร้อยละของการคืนกลับ ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการคำนวณหาร้อยละค่าคืนกลับของสารประกอบฟีนอลิก

ตัวอย่าง	ร้อยละค่าคืนกลับ		
	กรดแกลลิก	กรดวานิลลิก	ไซรินจอล
1	85.2	93.2	92.2
2	92.2	98.2	92.1
3	95.7	97.1	82.4
4	94.5	106.7	74.0
5	96.3	98.1	86.1
6	95.5	96.6	94.6
7	97.0	98.8	98.2
8	96.5	97.3	90.3
9	95.7	97.2	86.8
10	94.8	97.7	92.4
11	96.4	100.0	97.4
12	95.7	98.7	93.2

จากตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งสามชนิดในตัวอย่าง ส่วนใหญ่มีร้อยละค่าคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 85 - 100 จึงถือได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำสูง

4.3.2 ความเที่ยง

ในการหาความเที่ยงของวิธี จะพิจารณาจากค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดยในการทดลองนี้จะทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมฟีนอลิก ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซ้ำๆเป็นจำนวน 5 ครั้ง จากนั้นหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของเวลาที่สารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดถูกชะออกมา ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ ข.1 ในภาคผนวก

ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดในการวิเคราะห์ซ้ำมีค่าดังนี้ กรดแกลลิกเท่ากับร้อยละ 1.85 กรดวานิลลิกเท่ากับร้อยละ 4.56 และไซรินจอลเท่ากับร้อยละ 3.22 ซึ่งน้อยกว่าร้อยละ 5 ดังนั้น จึงถือได้ว่าวิธีนี้มีความเที่ยงที่สูง

4.3.3 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) (Miller and Miller, 1993)

ในส่วนนี้เป็นการหาขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดของวิธี ซึ่งคำนวณได้จากสูตรที่ (4.1)

$$LOD = \frac{3SD}{slope} \quad (4.1)$$

เมื่อแทนค่าที่วิเคราะห์ได้ลงในสมการ 4.1 ได้ค่า LOD ดังนี้ กรดแกลลิกเท่ากับ 0.0022 มิลลิกรัมต่อลิตร กรควานิลลิกเท่ากับ 0.0047 มิลลิกรัมต่อลิตร และไซรินจอลเท่ากับ 0.23 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.3.4 ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (Limit of Quantitation, LOQ) (Miller and Miller, 1993)

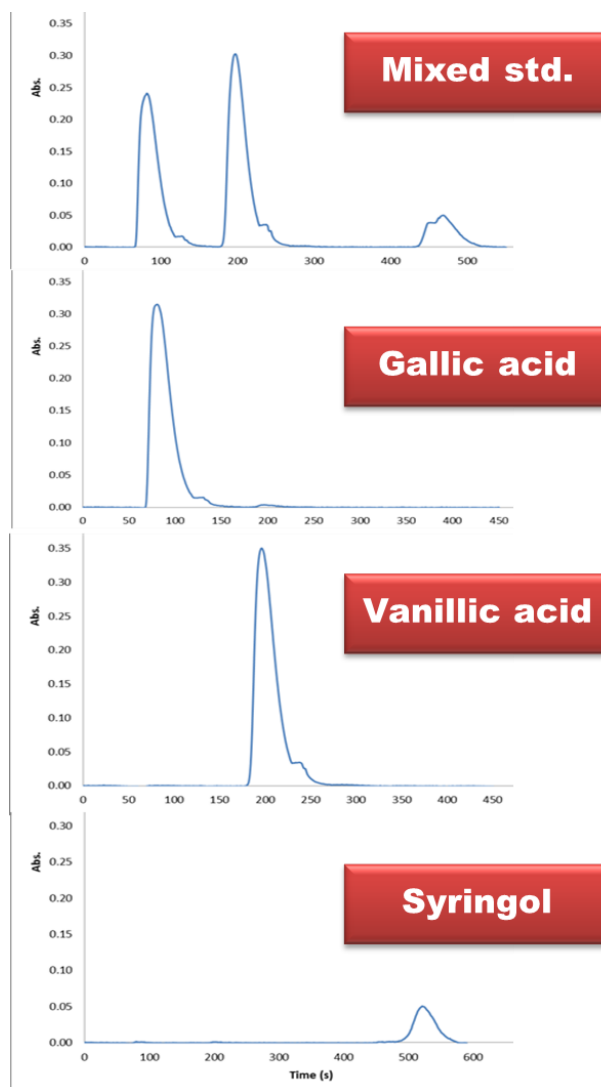
ในส่วนนี้เป็นการหาขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ของวิธี ซึ่งคำนวณได้จากสูตรที่ (4.2)

$$LOQ = \frac{10SD}{slope} \quad (4.2)$$

เมื่อแทนค่าที่วิเคราะห์ได้ลงในสมการ 4.2 ได้ค่า LOQ ดังนี้ กรดแกลลิกเท่ากับ 0.0072 มิลลิกรัมต่อลิตร กรควานิลลิกเท่ากับ 0.017 มิลลิกรัมต่อลิตร และไซรินจอลเท่ากับ 0.77 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.4 ศึกษาการแยกสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้เทคนิค Sequential Injection Chromatography

ในการทดลองนี้ ได้ใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในตอนต้นมาแยกสารมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้คอลัมน์มอนอลิติก ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการแยกเป็นดังนี้ เฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายเมทานอลเข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0 อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร ได้ผลดังรูปที่ 4.24

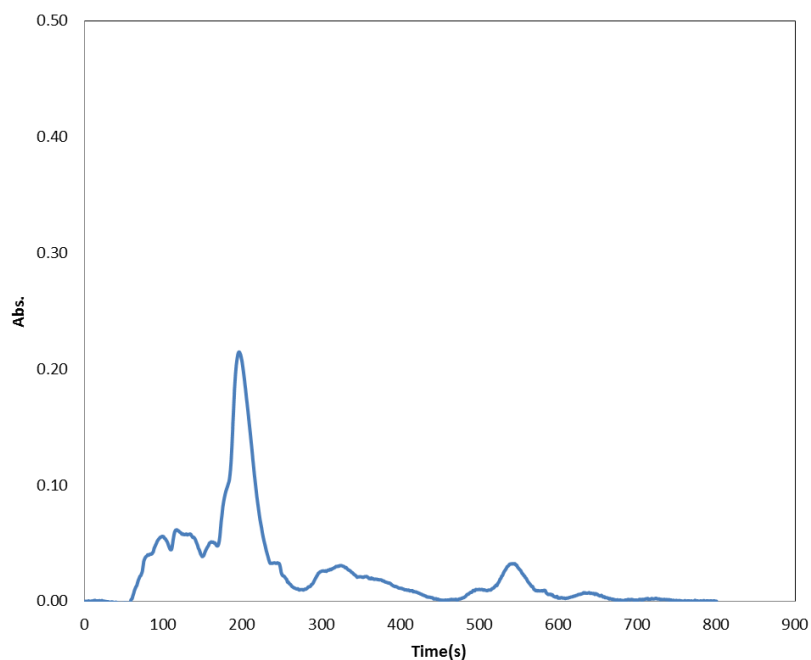


รูปที่ 4.22 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมกรดแกลลิก กรดวานิลลิก และไซรินจอล ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

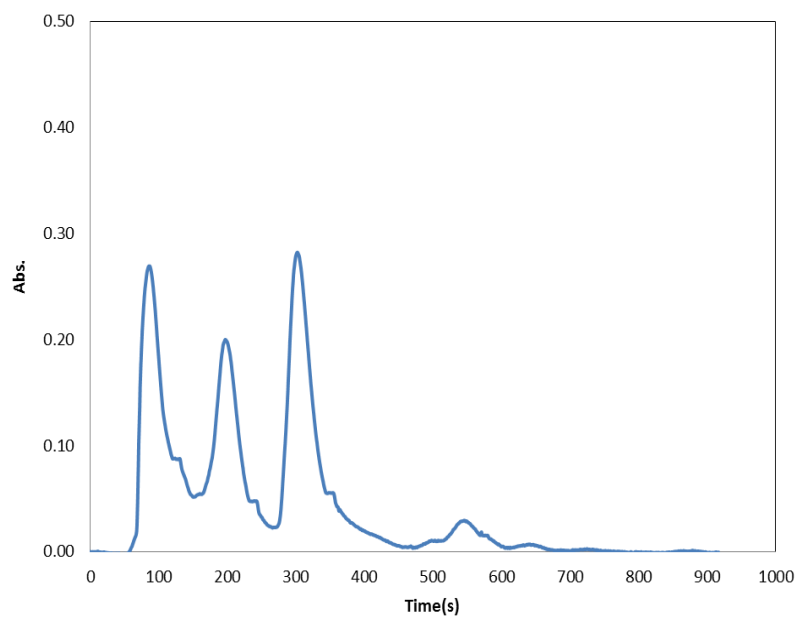
จากรูปที่ 4.26 เมื่อใช้เทคนิค Sequential Injection Chromatography มาใช้ในการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของสารประกอบฟีนอลิก จะเห็นว่าสามารถแยกสารทั้งสามออกจากได้ดี และสามารถวิเคราะห์เสร็จได้เร็วภายในเวลา 6 นาทีต่อหนึ่งตัวอย่าง

4.5 ศึกษาการนำไปใช้กับตัวอย่างน้ำส้มคว้นไม้

เมื่อพัฒนาหลักการได้แล้วจึงนำมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างน้ำส้มคว้นไม้จริง ในการวิเคราะห์จะนำสภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่ได้มาใช้กับตัวอย่าง ศึกษาโดยแยกและตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำส้มคว้นไม้ กับน้ำส้มคว้นไม้ที่มีการเติมสารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระทั้งสามชนิดลงไป

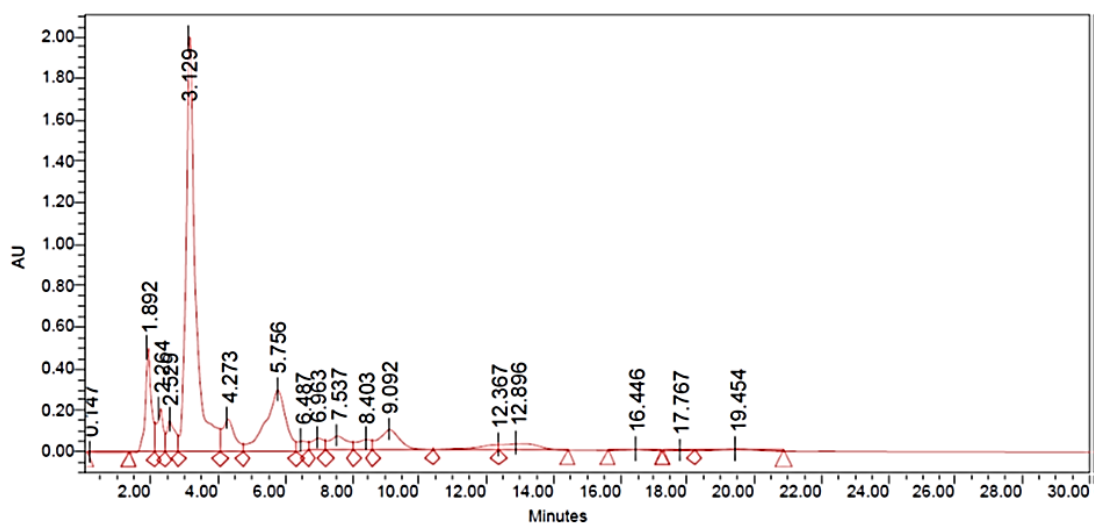


รูปที่ 4.23 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำส้มคว้นไม้ที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระลงไป

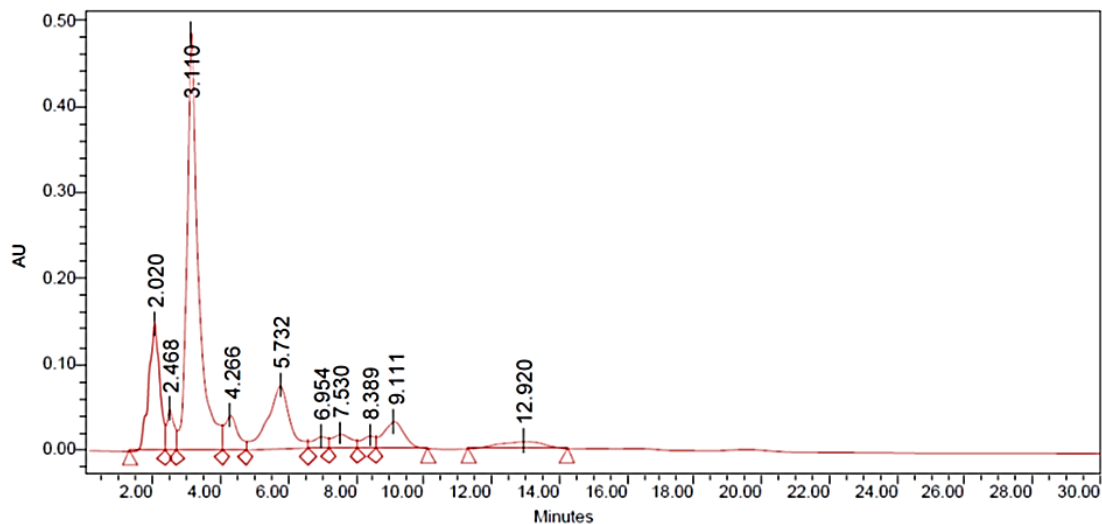


รูปที่ 4.24 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำส้มคว้นไม้ที่มีการเติมสารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระ กรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซตินจอล ลงไป ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละชนิดเป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากภาพที่ 4.23 – 4.24 เป็นการแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มควันไม้โดยใช้เทคนิค SIC จะเห็นว่ายังไม่พบสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างชนิดเดียวกันด้วยเทคนิค HPLC ดังภาพที่ 4.25 – 4.26



รูปที่ 4.25 โครมาโทแกรมจากเทคนิค HPLC ของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระลงไป



รูปที่ 4.26 โครมาโทแกรมจากเทคนิค HPLC ของตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ที่มีการเติมสารมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระกรดแกลลิก กรควานิลลิก และไซลิโนจอล ลงไป ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละชนิดเป็น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคในการสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มควันไม้ โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์ที่ใช้การไหลของของเหลวภายในท่อขนาดเล็ก ร่วมกับคอลัมน์ชนิดรูปทรงสูง ซึ่งมีชื่อเรียกว่า Sequential Injection Chromatography, SIC และตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงยูวี

5.1.1 จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกและตรวจวัด พบว่าเป็นดังนี้

(1) เฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายเมทานอล เข้มข้น ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในสารละลาย บัฟเฟอร์อะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าพีเอช 3.0

(2) อัตราการไหลที่ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที

(3) ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร

(4) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร

5.1.2 ผลจากการประเมินคุณลักษณะเด่นของวิธี เป็นดังนี้

(1) สมการเชิงเส้นของสารประกอบฟีนอลิก

- กรดแกลลิก (พื้นที่ใต้กราฟ = 22730 [กรดแกลลิก] - 2724.9) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 1.0

- กรควานิลลิก (พื้นที่ใต้กราฟ = 25083 [กรควานิลลิก] - 8701.2) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9999

- ไชลินจอล (พื้นที่ใต้กราฟ = 1941.2[ไชลินจอล] + 4209.5) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9929

(2) ค่าร้อยละของการวิเคราะห์คืนกลับอยู่ในช่วง 82.4 – 98.2

(3) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า ร้อยละ 5

(4) ขีดจำกัดในการตรวจวัดสำหรับกรดแกลลิกเท่ากับ 0.0022 มิลลิกรัมต่อลิตร กรควานิลลิก เท่ากับ 0.0047 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไชรินจอลเท่ากับ 0.23 มิลลิกรัมต่อลิตร

(5) ขีดจำกัดในการวิเคราะห์สำหรับกรดแกลลิกเท่ากับ 0.0072 มิลลิกรัมต่อลิตร กรควานิลลิกเท่ากับ 0.017 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไชรินจอลเท่ากับ 0.77 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากนั้นนำหลักการที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มควันไม้ พบว่าการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มควันไม้ด้วยเทคนิค SIC ยังไม่พบสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างชนิดเดียวกันด้วยเทคนิค HPLC

เมื่อพัฒนาหลักการในการสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลิกแล้ว จากนั้นได้ออกแบบชุดเครื่องมือต้นแบบอัตโนมัติขึ้นมาดังแสดงในรูปที่ 5.1 ซึ่งจะได้พัฒนาชุดต้นแบบเพื่อต่อยอดสู่เชิงพาณิชย์ต่อไป



รูปที่ 5.1 ชุดเครื่องมือต้นแบบอัตโนมัติสำหรับการสกัดและแยกสารประกอบฟีนอลิก

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.1.1 ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำส้มควั่นไม้ ควรมีการกรองตัวอย่างให้สะอาด เพื่อป้องกันการอุดตันของคอลัมน์

5.1.2 เมื่อวิเคราะห์แต่ละครั้งเสร็จแล้ว ควรล้างคอลัมน์ให้สะอาด เพื่อยืดอายุการใช้งาน

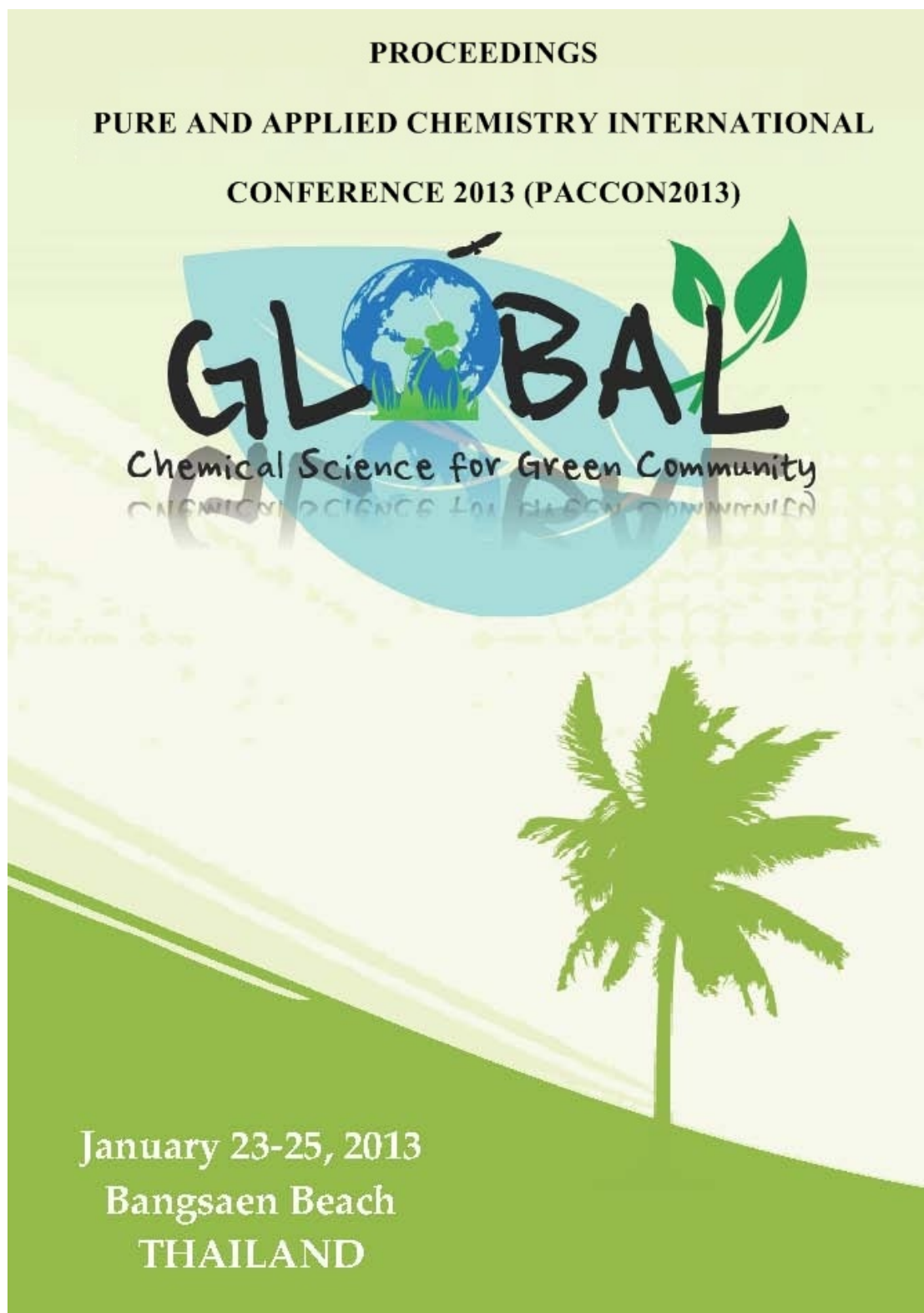
เอกสารอ้างอิง

- [1] http://www.chuansin.com/wood_vinegar
- [2] E. Imamura, Y. Watanabe, US Patent, No. US 7,214,393 B2
- [3] ผศ. ดร. นิคม แหยมสั๊ก, เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตร: การพัฒนาการผลิตและการใช้ประโยชน์น้ำส้มไม้, ศูนย์วิจัยป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- [4] <http://www.flowinjection.com>
- [5] G. Guiochon. Journal of Chromatography A. 1168 (2007) 101-168
- [6] Marian Naczka and Fereidoon Shahidi. Journal of Chromatography A. 1054 (2004) 95-111
- [7] Ioana Ignat, Irina Volf and Valentin I. Popa. Food Chemistry. 126 (2011) 1821-1835
- [8] A. Alonso Garcia, B. Cancho Grande and J. Simal Gandara. Journal of Chromatography A. 1054 (2004) 175-180
- [9] D. Blanco Gomis, N. Fraga Palomini and J. J. Mangas Alonso. Analytica Chimica Acta. 426 (2001) 111-117
- [10] M.A. Rodriguez-Delgado, S. Malovana, et al. Journal of Chromatography A. 912 (2001) 249-257
- [11] Andreas Schieber, Petra Keller and Reinhold Carle. Journal of Chromatography A. 910 (2001) 265-273
- [12] B. Abad-Garcia, L.A. Berrueta, et al. Journal of Chromatography A. 1154 (2007) 87-96
- [13] Guanghou Shui and Lai Peng Leong. Journal of Chromatography A. 977 (2002) 89-96
- [14] A. Maruska and O. Kornysova. Journal of Chromatography A. 1112 (2006) 319-330
- [15] M. Castellari, A. Fabiani, et al. Journal of Chromatography A. 973 (2002) 221-227
- [16] A. M. Gioacchini, Aldo Roda, et al. Journal of Chromatography A. 730 (1996) 31-37
- [17] Jiri Gruz, Ondrej Novak and Miroslav Strnad. Food Chemistry. 111(2008) 789-794
- [18] C. Proestos, D. Sereli and M. Komaitis. Food Chemistry. 95 (2006) 44-52
- [19] Kazuhiko Tsukagoshi, Takahide Kameda, et al. Journal of Chromatography A. 978 (2002) 213-220
- [20] Saleh M.S. Sawalha, Cavid Arraez-Roman, et al. Food Chemistry. 116 (2009) 567-574
- [21] Cristina Garcia-Viguera and Peter Bridle. Food Chemistry. (1995) 349-352
- [22] J. Kronholm, P. Revilla-Ruiz, et al. Journal of Chromatography A. 1022 (2004) 9-16
- [23] M.N. Peyrat-Maillard, S. Bonnely and C. Berset. Talanta. 51 (2000) 709-716
- [24] E. Nalewaiko-Sieliwoniuk, J. Nazaruk, et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 48 (2008) 579-586
- [25] R. Perez-Olmos, J.C. Soto, et al. Analytica Chimica Acta. 554 (2005) 1-16

- [26] A. Cladera, M. Miro, et al. *Analytica Chemica Acta*. 421 (2000) 155-166
- [27] M. Tarnawski, K. Depta, D. Grejciun and B. Szelepin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 182-188
- [28] P. Swatsitang, G. Tucker, K. Robards and D. Jardine. *Analytica Chemica Acta* 417 (2000) 231–240

ภาคผนวก ก

ก.1 เอกสารตีพิมพ์ประกอบการประชุมวิชาการนานาชาติ PACCON 2013



SEPARATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN WOOD VINEGAR USING SEQUENTIAL INJECTION CHROMATOGRAPHY

Arjnarong Mathaweesansurn^{1,2*}, Suwannee Janyapoon², Nathawut Choengchan^{1,2}

¹Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs),

²Applied Analytical Chemistry Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520 Thailand

*E-mail: a.mathawee@live.com

Abstract: In this work, sequential injection chromatography (SIC) with monolithic column (Chromolith® flash RP-18e column) and UV detection was developed for separation of major phenolic compounds existed in wood vinegar, i.e., syringol, vanillic acid and gallic acid. Optimal conditions of SIC were listed as the following: injected volume; 10 μL , mobile phase composition; methanol (10 %) in 0.1 M acetate buffer (pH 4.0), flow rate; 25.0 $\mu\text{L s}^{-1}$ and detection wavelength; 264 nm. Gallic acid was firstly eluted, followed by vanillic and syringol, respectively. Separation was complete within 10 min. Retention times were highly precise (RSD = 1.14 to 2.70 %). Good linearity ranges of all analytes were also achieved (linear regression coefficients (r^2) were range from 0.997 to 0.999). The system was then applied to a wood vinegar sample from eucalyptus. Analytical recoveries were observed from 97 to 114 %.

1. Introduction

'Wood vinegar' or 'Pyroligneous acid' is a by-product in charcoal production. It is condensate of smoke which is occurred during wood burning. One interesting component in wood vinegar is phenolic groups due to their high radical scavenging activity [1].

P. Rungruang *et al.* [2] found that major phenolic compounds, existed in wood vinegar from eucalyptus, are syringol, vanillic acid and gallic acid. Syringol and vanillic acid can be exploited as food flavoured additives. Gallic acid is useful by taking into account of its anti-wrinkle property, thus it is widely used as supplement in many cosmetic products. However, it is necessary to separate and purify the mentioned phenolic compounds from wood vinegar matrix prior further applications.

There are many analytical methods developed for separation of phenolic compounds. Those methods are based on gas chromatography (GC) [2, 3] and liquid chromatography (LC) [4-9]. Although GC, especially with mass detection (MS), is appropriate to identify kinds of phenolic compounds in wood vinegar, the separated fractions are damaged during detection. LC is more applicable since the liquid fractions can be individually collected for advanced uses without any destruction. Most of LC methods [4-9] employed conventional packed columns for separation of phenolic compounds in various kinds of samples. Despite the fact that all LC methods mentioned above provided high separation efficiency, some drawbacks

such as long retention time and use of high pressure pump were not negligible. These can be solved by exploiting more porosity column, namely 'monolithic column' [10]. M. Castellar *et al.* [11] demonstrated advantages of monolithic column by coupling with HPLC for determination of phenolic groups in wines. Even though the results gave short analysis time with good separation under low pressure, samples were manually injected which is not suitable for routine works.

Recently, a sequential injection chromatography or 'SIC' was reported for the sake of fast separation under low pressure and fully automated manipulation [12, 13]. Those publications were involved in development of SIC methods for separation with subsequent detection of pesticides [12] and sulfonated-azo dyes [13]. To our knowledge, application of the SIC to phenolic compounds in wood vinegar has not been reported so far.

In this work, we therefore aimed to develop a monolithic-based SIC method for separation and determination of phenolic compounds, i.e., syringol, vanillic acid and gallic acid in wood vinegar from eucalyptus. Separation conditions were optimized in order to obtained high resolution with short retention time. Validation by evaluation of the method performances was also carried out.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents and samples preparation

All solvents were of HPLC grade and were purchased from Carlo Erba. Deionized-distilled water was used throughout. Exactly 0.1 g of standard syringol, vanillic acid and gallic acid (all from Sigma-Aldrich) were weighed and dissolved in mobile phase (100.00 mL). Mixed working standard solutions were prepared by diluted from the stock solutions to give final concentration ranges of 50 to 200 mg L^{-1} . The mobile phase consisted of 10 % methanol in acetate buffer pH 4.0 was prepared by mixing 0.1 M acetic acid and 0.1 M sodium acetate. All solutions were filtered through 0.45 μm Nylon membrane prior to analysis unless commercial wood vinegar samples (from eucalyptus wood, similar sample to [2]) were filtered through 0.22 μm Nylon syringe filter after centrifugation for 15 min.

2.2 Chromatographic system and operating conditions

The SIC system consisted of syringe drive module equipped with 2.5 mL Gastight® syringe and an 8-port multi-selection valve (All devices were purchased from Hamilton, USA). The system was automatically manipulated by Auto-pret® software (MKG Company, Japan). Separation was done on a Chromolith® Flash RP-18e silica based monolithic column (25 x 4.6 mm, Merck, Germany) with flow rate of 25 $\mu\text{L s}^{-1}$. The injection volume was kept constant at 10 μL for all injections. Detection was carried out on Jasco v-630 UV-visible spectrophotometer (USA) at 264 nm.

3. Results and Discussion

3.1 Choices for monitored wavelength

Since maximum absorption wavelengths (λ_{max}) for syringol, vanillic acid and gallic acid are different (Fig. 1) and the available spectrophotometer for SIC system is not diode array detector, it is necessary to investigate the compromised wavelength for appropriate detection of all analytes.

It is clearly noticed from Fig. 1 that syringol is very less absorption than vanillic acid and gallic acid. However, from our previous results [2], syringol content was much greater than the other two phenolic substances in wood vinegar. A wavelength at 264 nm was therefore selected as a monitored wavelength in order to enhance sensitivity for determination of vanillic acid and gallic acid in real sample.

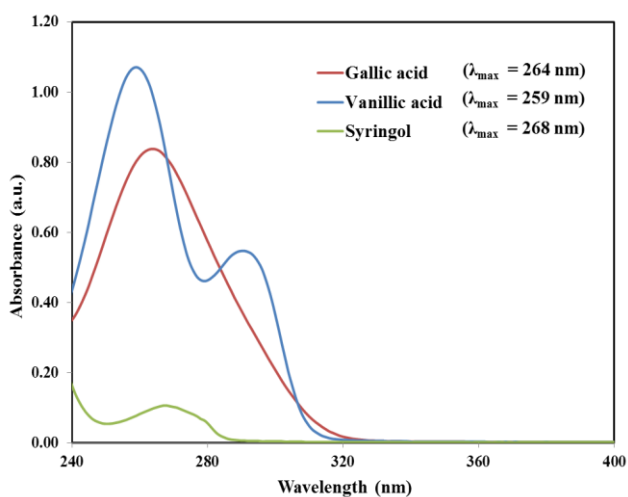


Fig. 1. UV spectra of the interested phenolic compounds at equivalence concentrations of 10^{-4} M.

3.2 Optimization of SIC system

Optimization of the SIC system was performed using standard solution of syringol, vanillic acid and gallic acid (at 100 mg L^{-1} for all standards). Mobile phase composition was primarily studied. Results in Fig. 2 illustrate the influence of mobile phase composition on resolution and retention time. Although decreasing in the methanol (MeOH) concentration in mobile phase from pure to 5 % can

improve resolution of the separation, analysis time is prolonged. This reduces throughput of the method. Therefore, we selected 10 % for further study.

From literature [5], addition of acetic acid into the mobile phase can enhance separation efficiency of the phenolic compounds. In this work, effect of acetic acid concentration was also investigated. As expected when the acid (2 %) is added into 10 % MeOH, resolution is improved (Fig. 2). However, this concentration led to the mobile phase's pH of 2.0 which reach tolerance pH for the exploited monolithic column. This can damage the column in case of long usage term. We, therefore, changed to prepare the mobile phase in acetate buffer solution (pH 4.0) instead. This mobile phase composition gave satisfied resolution and analysis time.

Besides of the mobile phase component, the other parameters, including flow rate and injection volume, were also examined. Higher flow rate and injection volume resulted in worse separation. A flow rate of 25 $\mu\text{L s}^{-1}$ and an aliquot of 10 μL were regarded as appropriate flow rate and injection volume, respectively, by compromising between resolution and analysis time.

Optimal conditions for the proposed SIC system were summarized in Table 1.

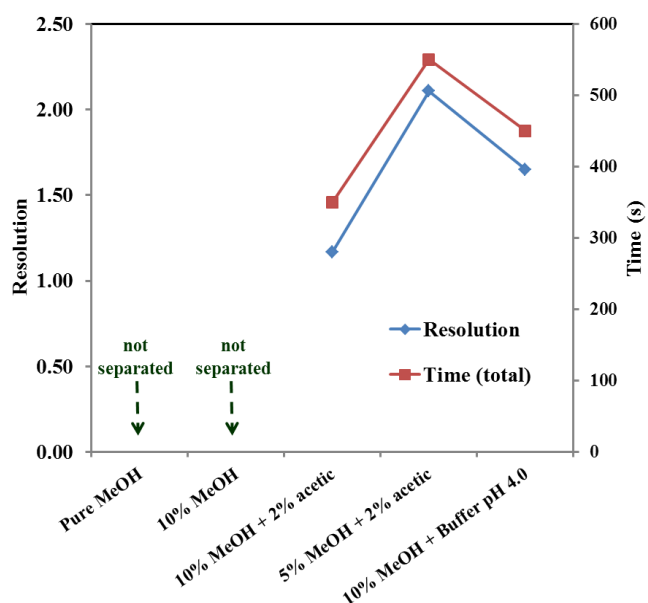


Fig. 2. Effect of the mobile phase composition on resolution of the separation and analysis time.

Table 1. Optimal conditions of the SIC system.

Parameter	Optimal value
Sample volume (μL)	10
Flow rate ($\mu\text{L s}^{-1}$)	25
Mobile phase composition (isocratic elution)	10% methanol in acetate buffer pH 4.0
Detection wavelength (nm)	264
Sample volume (μL)	10
Flow rate ($\mu\text{L s}^{-1}$)	25

3.3 Analytical performances

An example of chromatograms obtained from the optimal conditions is shown in Fig. 3. Under isocratic elution, gallic acid is initially eluted, followed by vanillic acid and syringol. Results in Fig. 3 indicate that all the phenolics can be completely separated within 10 min.

Although satisfied separation efficiency was achieved under isocratic elution, we are now studying on gradient elution system for the aim of shortening the retention time for syringol.

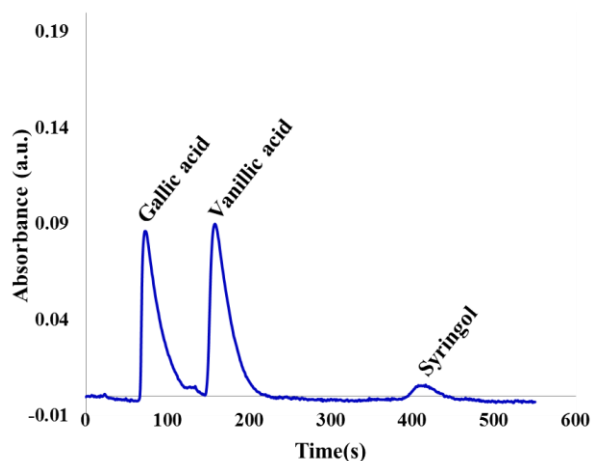


Fig. 3. Example of chromatograms of mixed standard phenolic compounds at 100 mg L⁻¹.

Table 2. Analytical performances of the SIC method

Performances	Phenolic compounds		
	Gallic	Vanillic	Syringol
Retention time (min)	1	3	7
Linearity range (mg L ⁻¹)	50-200	50-200	50-200
Calibration equation	$y = 0.0012x + 0.007$	$y = 0.0013x + 0.004$	$y = 0.0001x - 0.0003$
Linear regression coefficients (r^2)	0.992	0.997	0.996
RSD (%) of retention time	1.86	1.14	2.70
Recovery (%)	114.3	103.3	97.2
LOD ^a (mg L ⁻¹)	0.063	0.034	0.007
LOQ ^b (mg L ⁻¹)	0.182	0.098	0.023

Note ^a; LOD = $y_b + 3S_B$
^b; LOQ = $y_b + 10S_B$

The other analytical performances were also examined and the results are concluded in Table 2. Linearity ranges of 50 to 200 mg L⁻¹ were achieved with good linearity for all analytes. The SIC system also gave high precision of retention time with high

accuracy (by regarding analytical recovery). Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were evaluated accordingly to [14]. In accordance with our previous results [2], the calculated limits are adequate to be applied the developed method to determine the interested phenolic substances existed in wood vinegar from eucalyptus wood.

3.4 Application to wood vinegar sample

The SIC method was applied to determination of syringol, vanillic acid and gallic acid in wood vinegar sample, from eucalyptus. Concentrations of the phenolic compounds are presented in Table 3.

Table 3. Concentrations of the phenolic compounds in wood vinegar samples, determined by the SIC method.

Sample	Concentration (mg L ⁻¹ , mean $\pm$ SD)		
	Gallic	Vanillic	Syringol
1	113 ($\pm$ 2.5)	127 ($\pm$ 0.7)	453 ($\pm$ 1.2)
2	76.4 ($\pm$ 0.5)	90.2 ($\pm$ 1.9)	310 ($\pm$ 1.7)
3	60.1 ($\pm$ 1.3)	64.5 ($\pm$ 0.7)	251 ($\pm$ 0.5)
4	51.3 ($\pm$ 0.9)	46.1 ($\pm$ 0.2)	238 ($\pm$ 0.4)

The phenolic concentration trends are similar to our previous results by GC-MS [2] where the most abundance phenolic compound in this kind of wood is syringol.

Nevertheless, in order to verify the developed method, further validation of the method with LC is required and the process is now going on. We selected LC with UV detection as the validating method instead of GC-MS because any derivatization procedure is not required.

4. Conclusions

The monolithic SIC method was developed for determination of syringol, vanillic acid and gallic acid in wood vinegar. The method provides fast separation (< 10 min/sample) under low pressure with fully automated manipulation. High analytical performances (such as precision and accuracy) were also achieved. However, further validation by statistical comparison of the results with LC-UV technique is necessary.

Acknowledgements

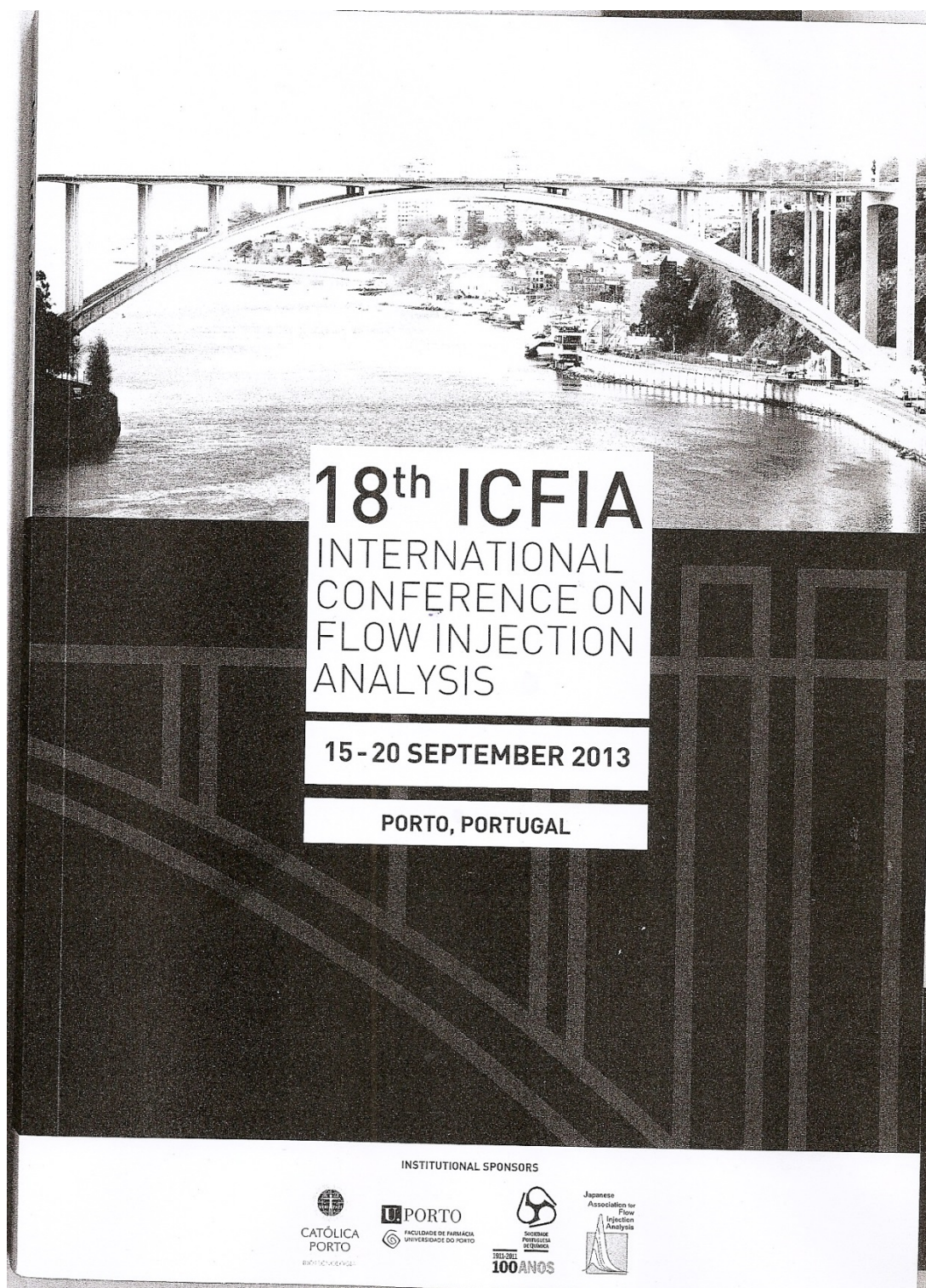
Applied Analytical Chemistry Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang is grateful acknowledged for equipments and financial support.

References

- [1] A.Y. Loo, K. Jain and I. Darah, *Food Chem.* **107** (2008) 1151-1160.

- [2] P. RungRuang, *Antioxidation activity of phenolic compounds in pyroligneous acid produced from bamboo wood, eucalyptus wood and teak slab*, Master's Thesis, KMITL, (2011).
- [3] A.Y. Loo, K. Jain and I. Darah, *Food Chem.* **104** (2007) 300-307.
- [4] B. Abad-Garcia, L.A. Berrueta, D.M. Lopez-Marquez, I. Crespo-Ferrer, B. Gallo and F. Vicente, *J. Chrom. A.* **1154** (2007) 87-96.
- [5] M. Tarnawski, K. Depta, D. Grejciun and B. Szelepin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (2006) 182-188.
- [6] H. Kelebek, S. Selli, A. Canbas and T. Cabaroglu, *Microchem. J.* **91** (2009) 187-192.
- [7] M.A. Rodriguez-Delgado, S. Malovana, J.P. Perez, T. Borges and F.J. G. Montelongo, *J. Chrom. A.* **912** (2001) 249-257.
- [8] D. Blanco Gomis, N. Fraga Palomini and J. J. Mangas Alonso, *Anal. Chem. Acta.* **426** (2001) 111-117.
- [9] A. Schieber, P. Keller and R. Carle, *J. Chrom. A.* **910** (2001) 265-273.
- [10] G. Guiochon, *J. Chrom. A.* **1168** (2007) 101-168.
- [11] M. Castellari, E. Sartini, A. Fabiani, G. Arfelli and A. Amati, *J. Chrom. A.* **973** (2002) 221-227.
- [12] P. Chocholous, D. Satinsky, R. Sladkovsky, M. Pospisilova and P. Solich, *Talanta.* **77** (2008) 566-570.
- [13] C. Fernandez, M. Soledad Larrechi, R. Forteza, V. Cerda and M. Pilar Callao, *Talanta.* **82** (2010) 137-142.
- [14] J. N. Miller and J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, fourth ed., Pearson Education, Essex, 1993.

ก.2 เอกสารบทความนำเสนอในงานประชุมวิชาการนานาชาติ ICFIA ครั้งที่ 18



PB16

**COUPLING OF SEQUENTIAL INJECTION WITH MONOLITHIC
COLUMN FOR ON-LINE SAMPLE DILUTION PRIOR TO
SEPARATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN WOOD VINEGAR**

Nathawut CHOENGCHAN, Arjnarong Mathaweesansurn

*Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs),
Applied Analytical Chemistry Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520 Thailand*

P

In this work, sequential injection system incorporated with monolithic column, or so-called 'sequential injection chromatography' [1, 2] was developed for separation of phenolic compounds, *i.e.*, gallic acid, vanillic acid and syringol. A Chromolith™ Flash RP-18e (25 mm × 4.6 mm) column was used as analytical column. An Auto-pret™ system with a syringe pump and an eight-port multi-selection valve module were used for 'on-line' sample dilution and for automated liquid delivery manipulation. Absorbance was detected at 264 nm. Methanol (10 %) with acetic acid (2 %) in 0.1 mol/L acetate buffer (pH 3.0) was used as mobile phase for isocratic elution. After optimization and validation, the system provided good results. Separation was complete within 6 min. Retention times were highly precise (RSD = 1.14 to 2.70 %). Recoveries were observed from 97 to 114 %. The system was applied to wood vinegar samples, from Eucalyptus tree. Prior sample pretreatment was not required unless filtration. The samples were on-line dilution for 100 times with mobile phase. Syringol contents were higher than gallic and vanillic's contents, respectively, for all investigated samples. The contents were statistically compared to the results obtained from HPLC system by paired-*t* test. The results were not significant difference between two systems.

References

- [1] Dalibor Šatinsky, Petr Solich, Petr Chocholouš and Rolf Karlíček. *Analytica Chimica Acta* 494 (2003) 205.
- [2] Jitka Huclová, Dalibor Šatinsky and Rolf Karlíček, *Analytica Chimica Acta* 494 (2003) 133.

ภาคผนวก ข



รูปที่ ข.2 รูปแสดงผลงานในงานวันวิทยาศาสตร์ ปี 2555