การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ embelin และ cyanidin-3-O-glucosideจากสารสกัดผลพิลังกาสาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

VALIDATION OF HPLC METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATIONOF EMBELIN AND CYANIDIN-3-O-GLUCOSIDE EXTRACTEDFROM FRUITS OF*ARDISIA ELLIPTICA* THUNB

ศรัญญา เบญจกิจนิธิ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2564

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ embelin และ cyanidin-3-O-glucoside จากสารสกัดผลพิลังกาสาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ศรัญญา เบญจกิจนิธิ

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

VALIDATION OF HPLC METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATIONOF EMBELIN AND CYANIDIN-3-O-GLUCOSIDE EXTRACTEDFROM FRUITS OF*ARDISIA ELLIPTICA* THUNB

SARANYA BENCHAKITNITHI

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of MASTER OF SCIENCE

(Pharmaceutical Product Development)

Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ embelin และ cyanidin-3-O-glucosideจากสารสกัดผลพิลังกาสาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ของ

ศรัญญา เบญจกิจนิธิ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี)

..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชุดา จิตตสุโภ)

..... ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย)

ชื่อเรื่อง	การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ embelin และ cyanidin-3-O-glucosideจากสารสกัดผลพิลังกาสาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
ผู้วิจัย	ศรัญญา เบญจกิจนิธิ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ สามี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง

พิลังกาสาเป็นสมุนไพรที่ปรากฏในตำรับยาสมุนไพรไทยหลายตำรับ ในผลมีสารสำคัญคือ cyanidin-3-O-glucoside เป็นสารในกลุ่ม anthocyanins และ สาร embelin เป็นสารในกลุ่ม benzoquinones งานวิจัยนี้จัดทำเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside และ embelin ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยศึกษาในหัวข้อต่างๆ ได้แก่ ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ ตรวจสอบด้วยสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside ได้สมการเส้นตรง y = 1.0265x - 0.0381 ค่า R^2 = 0.9998 มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.104 และ 0.316 µg/mL ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 96.74 – 101.32% ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ Intraday และ Inter day precision มี %RSD อยู่ในช่วง 0.10-1.80 และ 1.60-1.93 ส่วน embelin ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ตรวจสอบด้วยสารมาตรฐาน embelin ได้สมการเส้นตรง y = 1.5696x - 0.2786 ค่า R^2 = 0.9972 มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.013 และ 0.039 µg/mL ตามลำดับ ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 95.88 – 98.85% ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ Intraday และ Inter day precision มี %RSD อยู่ในช่วง 0.70-0.92 และ 0.65-1.21 ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ของ AOAC และเมื่อนำวิธีวิเคราะห์ไปหาปริมาณ ได้ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ใกล้เคียงกับการทดสอบ total flavonoid content และ total anthocyanin content ส่วนปริมาณ embelin มีความสัมพันธ์กับปริมาณ total phenolic content

คำสำคัญ : พิลังกาสา การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ Embelin Anthocyanin

Title	VALIDATION OF HPLC METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATIONOF EMBELIN AND CYANIDIN-3-O-GLUCOSIDE EXTRACTEDFROM FRUITS OF*ARDISIA ELLIPTICA* THUNB
Author	SARANYA BENCHAKITNITHI
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Associate Professor Weerasak Samee , Ph.D.
Co Advisor	Associate Professor Sarin Tadtong , Ph.D.

Fruit of *Ardisia elliptica* Thunb is reported to be used in many Thai herbal recipes. This research aims to validate the method for analyzing cyanidin-3-O-glucoside and embelin in Ardisia elliptica Thunb. with high performance liquid chromatography (HPLC). The study of the method validation of cyanidin-3-O-glucoside was included in the topics of Linearity, an r-square was 0.9998 with the range 0.4-2.0 µg/ml, the LOD and LOQ was 0.104 and 0.316 µg/mL, the recovery for Accuracy were 96.74-101.32%. The precision results in the %RSD were 0.10-1.80 for intraday and 1.60-1.93 for interday. The study of method validation of embelin was included in the topics of Linearity, with a rsquare of 0.9972, with a range of 0.8-4.0 µg/ml, the LOD and LOQ was 0.013 and 0.039 µg/mL, the recovery for accuracy were 95.88-98.85%, The precision results in the RSD were 0.70-0.92 for intraday and 0.65-1.21 for interday. The method met the general requirement of AOAC and can be used for analyzing for cyanidin-3-O-glucoside and embelin in Ardisia elliptica Thunb.

Keyword : Ardisia elliptica Embelin Anthocyanin Method validation

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความเมตตาและกรุณาให้ความช่วยเหลือ ทั้งในด้านความรู้ การให้คำปรึกษา และการสนับสนุนจาก รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง ที่ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษาร่วม รวมทั้งให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะในการทำงานวิจัยครั้งนี้ด้วย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ทั้งสองท่าน ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าปรับปรุงให้ปริญญานิพนธ์มีความสมบูรณ์และถูกต้อง ตลอดจนดูแลเอาใจใส่การดำเนินงานวิจัยทุกขั้นตอน ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชุดา จิตตสุโภ ที่ให้ความกรุณาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัยในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ รวมถึงการเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในชั้นปริญญาโทครั้งนี้ด้วย อาจารย์ได้ให้คำปรึกษา และสนับสนุนผู้วิจัยตลอดการเรียนในระดับชั้นปริญญาโทเสมอมา

ขอกราบพระคุณคณาจารย์หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านที่ถ่ายทอดความรู้ ช่วยเหลือและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคนที่ให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณมารดาที่ให้ทั้งกำลังกาย กำลังใจและกำลังทรัพย์ในการศึกษา และการทำวิจัยให้ผ่านลุล่วงไปด้วยดี

ศรัญญา เบญจกิจนิธิ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูปภาพ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ 1

ภูมิหลัง 1

ความมุ่งหมายงานวิจัย 2

ตัวแปรที่ศึกษา 2

กรอบแนวคิดงานวิจัย 3

สมมติฐานงานวิจัย 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 18

1. อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี (Materials, Instruments and Reagents) 18

สารเคมี 18

อุปกรณ์และเครื่องมือ 18

2. การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในงานวิจัย 20

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ cyanidin-3-O-glucoside 20

2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ embelin 20

2.3 การเตรียมตัวอย่าง 21

3. วิธีการทดลอง 22
3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเครื่อง HPLC-MS ของ cyanidin-3-O-glucoside 22
3.2 การทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability) ของ cyanidin-3-o-glucoside 24
3.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) ของ cyanidin-3-O-glucoside 25
3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ในสารสกัดผลพิลังกาสา 28
3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเครื่อง HPLC-MS ของ embelin 28
3.6 การทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)ของ embelin 30
3.7 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) ของ embelin 31
3.8 การวิเคราะห์หาปริมาณ embelin ในสารสกัดผลพิลังกาสา 33
3.9 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิก (Total phenolic content) 33
3.10 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content) 34
3.11 การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน (Total anthocyanin content) 35
บทที่ 4 ผลดำเนินการวิจัย 37
ลักษณะตัวอย่างสมุนไพร 37
การเตรียมตัวอย่าง 37
ค่าร้อยละปริมาณของสารสกัดสมุนไพร 38
ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเครื่อง HPLC-MS ของ cyanidin-3-O-glucoside 38
ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเครื่อง HPLC-MS ของ embelin 39
ผลการทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)ของ cyanidin-3-O-glucoside 40
ผลการทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)ของ embelin 40

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) ของ cyanidin-3-o-glucoside 41
ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ cyanidin-3-o-glucoside ในสารสกัดผลพิลังกาสา 45
ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) ของ embelin 45
ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ embelin ในสารสกัดผลพิลังกาสา 49
ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิก (Total phenolic content) 49
ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content) 50
ผลการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินรวม (Total anthocyanin content) 51
เปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญที่ทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด 52
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 55
สรุปผลการวิจัย 55
อภิปรายผลการวิจัย 58
ข้อเสนอแนะ 61
บรรณานุกรม 62
ภาคผนวก 65
ประวัติผู้เขียน 82

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แสดงรายละเอียดพรรณไม้ของพิลังกาสา 5

ตาราง 2 แสดงสารสำคัญในพืชพิลังกาสา 8

ตาราง 3 แสดงชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายในการสกัดผลพิลังกาสาเพื่อทดสอบหาองค์ประกอบทางเคมี 22

ตาราง 4 แสดงอัตราส่วนของ mobile phase ที่เวลาต่าง ๆ 23

ตาราง 5 แสดงอัตราส่วนของ mobile phase ที่เวลาต่าง ๆ 24

ตาราง 6 เกณฑ์การยอมรับค่าจากการตรวจสอบความเหมาะสมของพารามิเตอร์ 25

ตาราง 7 เกณฑ์การยอมรับ %recovery ในการทดสอบหัวข้อ Accuracy 27

ตาราง 8 เกณฑ์การยอมรับ %rsd ในการทดสอบหัวข้อ Precision 28

ตาราง 9 แสดงอัตราส่วนของ mobile phase ที่เวลาต่าง ๆ 30

ตาราง 10 แสดงร้อยละปริมาณของสารสกัดสมุนไพรผลพิลังกาสา 38

ตาราง 11 แสดง parameter ที่ทดสอบความเหมาะสมของระบบวิธีวิเคราะห์ cyanidin-3-o-glucoside 40

ตาราง 12 แสดง parameter ที่ทดสอบความเหมาะสมของระบบวิธีวิเคราะห์ embelin 41

ตาราง 13 แสดง retention time และ peak purity factor 42

ตาราง 14 แสดงสมการเชิงเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานและ coefficient of determination (R^2) 43

ตาราง 15 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ 44

ตาราง 16 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Intraday precision) 44

ตาราง 17 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Inter day precision) 45

ตาราง 18 แสดง retention time และ peak purity factor 46

ตาราง 19 แสดงสมการเชิงเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานและ coefficient of determination (R^2) 47

ตาราง 20 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ 48

ตาราง 21 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Intraday precision) 48

ตาราง 22 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Inter day precision) 49

ตาราง 23 แสดงปริมาณ Total phenolic content จากสารสกัดผลพิลังกาสา 50

ตาราง 24 แสดงปริมาณ Total flavonoid content จากสารสกัดผลพิลังกาสา 51

ตาราง 25 แสดงปริมาณ Total anthocyanin content จากสารสกัดผลพิลังกาสา 52

ตาราง 26 แสดงปริมาณสารสำคัญจากสารสกัดผลพิลังกาสาโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ 53

ตาราง 27 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณ Total flavonoid content ระหว่างตัวทำละลายชนิดต่างๆทางสถิติด้วยสถิติ independent t-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 54

ตาราง 28 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณ Total phenolic content ระหว่างตัวทำละลายชนิดต่างๆทางสถิติด้วยสถิติ independent t-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 54

ตาราง 29 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณ Total anthocyanin content ระหว่างตัวทำละลายชนิดต่างๆทางสถิติด้วยสถิติ independent t-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 54

ตาราง 30 แสดงปริมาณของสารสกัดสมุนไพรผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethyl acetate 67

ตาราง 31 แสดงปริมาณของสารสกัดสมุนไพรผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethanol 67

ตาราง 32 แสดงปริมาณของสารสกัดสมุนไพรผลพิลังกาสาที่สกัดด้วยน้ำ 68

ตาราง 33 แสดงความเหมาะสมของระบบในการวิเคราะห์ cyanidin-3-o-glucoside 68

ตาราง 34 แสดงความเหมาะสมของระบบในการวิเคราะห์ embelin 69

ตาราง 35 แสดงผลความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ของ cyanidin-3-o-glucoside 69

ตาราง 36 แสดงผลความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ของ embelin 70

ตาราง 37 แสดงผลความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของ cyanidin-3-o-glucoside 70

ตาราง 38 แสดงผลความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของ embelin 71

ตาราง 39 แสดงค่าปริมาณ Total flavonoid content ทางสถิติด้วย independent t-test เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วย ethyl acetate และ ethanol..... 72

ตาราง 40 แสดงค่าปริมาณ Total flavonoid content ทางสถิติด้วย independent t-test เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วย ethyl acetate และน้ำ..... 73

ตาราง 41 แสดงค่าปริมาณ Total flavonoid content ทางสถิติด้วย independent t-test เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วย ethanol และน้ำ..... 74

ตาราง 42 แสดงค่าปริมาณ Total phenolic content ทางสถิติด้วย independent t-test เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วย ethyl acetate และ ethanol..... 75

ตาราง 43 แสดงค่าปริมาณ Total phenolic content ทางสถิติด้วย independent t-test เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วย ethyl acetate และน้ำ..... 76

ตาราง 44 แสดงค่าปริมาณ Total phenolic content ทางสถิติด้วย independent t-test เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วย ethanol และน้ำ..... 77

ตาราง 45 แสดงค่าปริมาณ Total anthocyanin content ทางสถิติด้วย independent t-test เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วย ethanol และน้ำ..... 78

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 Herbarium ของพิลังกาสา 6

ภาพประกอบ 2 พิลังกาสา 7

ภาพประกอบ 3 โครงสร้างแอนโทไซยานิดิน 9

ภาพประกอบ 4 โครมาโทแกรมของสารสกัดมันม่วง 10

ภาพประกอบ 5 TLC fingerprint ของสารสกัดผลพิลังกาสาโดยใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย 12

ภาพประกอบ 6 TLC plate ของสารสกัดผลพิลังกาสาโดยใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย 12

ภาพประกอบ 7 ส่วนประกอบเครื่อง Mass spectrophotometer 13

ภาพประกอบ 8 การแตกตัวเป็นไอออนด้วยอิเล็กตรอนของโมเลกุล 14

ภาพประกอบ 9 Mass spectrum 15

ภาพประกอบ 10 ส่วนประกอบเครื่อง HPLC 16

ภาพประกอบ 11 แสดงตัวอย่างผลพิลังกาสาสวนสมุนไพรจากคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 37

ภาพประกอบ 12 แสดงผงสมุนไพรจากผลพิลังกาสา 37

ภาพประกอบ 13แสดง Mass spectrum ของสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside 38

ภาพประกอบ 14 แสดง Mass spectrum ของสารสกัดผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วย ethanol 39

ภาพประกอบ 15 แสดง Mass spectrum ของสารสกัดผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ ... 39

ภาพประกอบ 16 แสดง Mass spectrum ของสารมาตรฐาน embelin 39

ภาพประกอบ 17 แสดง Mass spectrum ของสารสกัดผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วย Ethyl acetate 40

ภาพประกอบ 18 แสดง Chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน cyanidin-3-o-glucoside (บน) และสารสกัดผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วย ethanol (ล่าง) 42

ภาพประกอบ 19 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของ Cyanidin-3-o-glucoside 43

ภาพประกอบ 20 แสดง Chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน embelin (ล่าง) และสารสกัดผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วย ethyl acetate (บน) 46

ภาพประกอบ 21 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของ embelin..... 47

ภาพประกอบ 22 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน gallic acid..... 50

ภาพประกอบ 23 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน quercetin 51

ภาพประกอบ 24 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน cyanidin-3-o-glucoside .. 52

ภาพประกอบ 25 รูปแบบการสลายตัวของ anthocyanin..... 59

ภาพประกอบ 26 รูปแบบการสลายตัวของ embelin 60

ภาพประกอบ 27 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน cyanidin-3-o-glucoside 80

ภาพประกอบ 28 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน embelin 80

ภาพประกอบ 29 โครมาโตแกรมของสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethanol 80

ภาพประกอบ 30 โครมาโตแกรมของสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วยน้ำ 81

ภาพประกอบ 31 โครมาโตแกรมของสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethyl acetate..... 81

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ในปัจจุบันสมุนไพรเป็นทางเลือกที่นิยมในการนำมาเป็นผลิตภัณฑ์รักษาหรือป้องกันโรค ซึ่งสมุนไพรมีความหมายว่า ยาที่ได้มาจากพืช สัตว์ หรือแร่ธาตุจากธรรมชาติ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพ ซึ่งสมุนไพรที่ได้จากพืชนั้น เรียกว่าพืชวัตถุ ส่วนต่าง ๆ ที่นำมาใช้เป็นยาได้ ได้แก่ ใบ ดอก ผล เปลือกผล เมล็ด เปลือกเมล็ด ราก แก่น เนื้อไม้ เปลือกไม้ การใช้สมุนไพรมีตั้งแต่สมัยกรีก อินเดีย จีน และการแพทย์แผนไทยโบราณ จนมาถึงปัจจุบันมีการค้นคว้าวิจัยนำสมุนไพรมาทำการสกัดให้ได้สารสำคัญ เพื่อนำมาเป็นตัวยาสำคัญในการรักษาและป้องกันโรคต่อไป

พิลังกาสา *(Ardisia elliptica* Thunb.) เป็นพืชในวงศ์ Myrsinaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ลำต้นตั้งตรง กิ่งก้านกลม หรือเป็นเหลี่ยม กิ่งอ่อนมีสีน้ำตาลแดง ส่วนกิ่งแก่มีสีน้ำตาลอมเทา ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว ออกหนาแน่นที่ปลายกิ่ง เป็นรูปรีปลายแหลมถึงมน ดอกออกเป็นช่อที่ปลายกิ่งหรือซอกใบ มีสีขาวแกมชมพู ผลเป็นรูปทรงกลม ผลอ่อนมีสีแดง ผลสุกมีสีม่วงเข้ม พบตามป่าดงดิบเขาทั่วไป สรรพคุณตามตำรายาไทย ผลมีรสฝาด ร้อน และสุขุม ใช้แก้ไข้ แก้ธาตุพิการ แก้ท้องเสีย แก้ลมพิษ แก้ซาง (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2553) มีรายงานว่าพบสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารที่พบในผลพิลังกาสา ได้แก่สารในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน (กันต์กนิษฐ์ จงรัตนวิทย์, 2012) และ เอมเบลิน

แอนโทไซยานิน เป็นสารสีที่พบได้ตามธรรมชาติ ส่วนใหญ่จะพบในพืชที่มีสีม่วง แดง หรือน้ำเงิน เช่น องุ่นสีแดง แอปเปิ้ล เบอร์รี่ต่าง ๆ และผักต่าง ๆ ที่มีสีม่วงแดง โดยแอนโทไซยานิน เป็นสารที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง มีผลดีต่อระบบเลือดและระบบประสาท (Burton-Freeman, Sandhu, & Edirisinghe, 2016) แอนโทไซยานินเป็นสารสีที่ละลายน้ำได้ โดยสารสีนี้จะอยู่ในรูป glycosylated form เป็นสารในกลุ่มฟีนอลิก สีและความคงตัวของแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับ pH แสง และโครงสร้าง โดยในสภาวะที่เป็นกรด แอนโทไซยานิน จะเป็นสีแดง และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเมื่อ pH สูงขึ้น การศึกษาในหลอดทดลอง สัตว์ทดลอง และในมนุษย์แสดงให้เห็นว่าแอนโทไซยานินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ช่วยในการมองเห็นและดีต่อระบบประสาท สารในกลุ่มแอนโทไซยานิน ที่พบหลัก ๆ ในพืชได้แก่ cyanidin-3-O-glucoside (Khoo, Azlan, Tang, & Lim, 2017)

เอมเบลิน (Embelin) เป็นสารในกลุ่ม benzoquinone ละลายน้ำได้ไม่ดี สามารถพบได้จากพืชในวงศ์ Myrsinaceae และ Oxalidaceae มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านอาการอักเสบ ลดอาการปวด (Chitra, Devi, & Sukumar, 2003; Poojari, 2014; Prasad, 2017) เนื่องจากสารสำคัญในสารสกัดผลพิลังกาสามีฤทธิ์ที่น่าสนใจ สามารถนำมาพัฒนาเป็นสารสำคัญในการรักษาและป้องกันโรคต่าง ๆ ได้ แต่การที่จะนำพิลังกาสามาใช้นั้น ต้องทำการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรทั้งด้านคุณภาพและปริมาณ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาปริมาณสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ สารแอนโทไซยานิน และเอมเบลิน โดยการศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compound) สารฟลาโวนอยด์ (total flavonoid) สารแอนโทไซยานิน (total anthocyanins) เป็นการตรวจสอบเบื้องต้นถึงองค์ประกอบทางเคมีของสารที่พบในผลพิลังกาสา เพื่อนำไปพัฒนาวิธีวิเคราะห์และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดผลพิลังกาสา และสามารถใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาตำรับยาสมุนไพรที่มาจากผลพิลังกาสาไปสู่ผลิตภัณฑ์ต่อไป

ความมุ่งหมายงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของสาร cyanidin-3-O-glucoside ด้วยวิธี HPLC
2. เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของสาร embelin ด้วยวิธี HPLC

ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง เป็นการศึกษา พัฒนาวิธีวิเคราะห์ของสาร cyanidin-3-O-glucoside และ embelin ในสารสกัดผลพิลังกาสาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถภาพสูง ทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ โดยทำการสกัดสารโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ hexane, 95% ethanol และน้ำ และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC2002

ตัวแปรที่ศึกษา

1. การทดสอบหาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside, embelin

ตัวแปรอิสระ: ปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside, embelin

ตัวแปรตาม: % Assay

2. การทดสอบหาปริมาณ Total phenolics

ตัวแปรอิสระ: ปริมาณ Total phenolics

ตัวแปรตาม: mg of gallic acid equivalent/ g extract

3. การทดสอบหาปริมาณสาร Total flavonoids

ตัวแปรอิสระ: ปริมาณสาร Total flavonoids

ตัวแปรตาม: mg of quercetin equivalent / g extract

4. การทดสอบหาปริมาณสาร Total anthocyanin

ตัวแปรอิสระ: ปริมาณสาร Total anthocyanin

ตัวแปรตาม: mg of C3G/g extract

นิยามศัพท์เฉพาะ

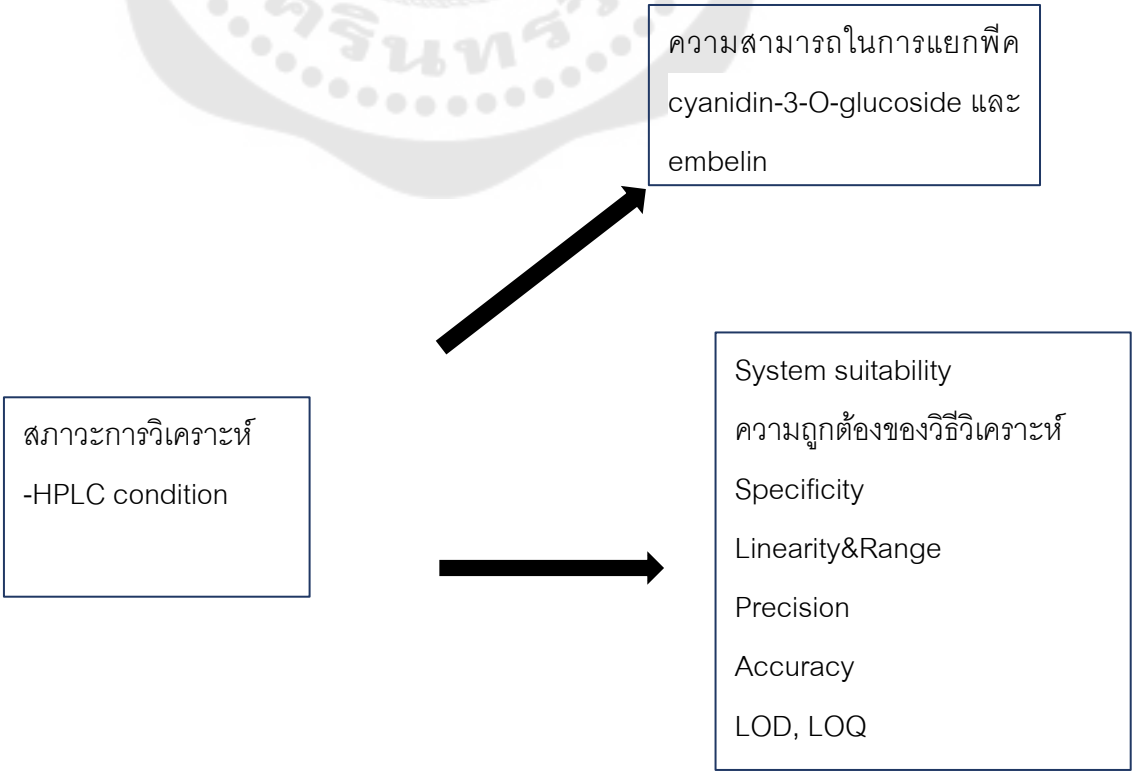
Total phenolics คือ ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดผลพิลังกาสา

Total flavonoids คือ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดผลพิลังกาสา

Total anthocyanins คือ ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดผลพิลังกาสา

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ คือ การผ่านการทดสอบวิธีวิเคราะห์ในหัวข้อ Specificity, Accuracy, Precision, Limit of quantitative, Limit of detection และ Linearity and Range

กรอบแนวคิดงานวิจัย



สมมติฐานงานวิจัย

1. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถภาพสูง สามารถแยก cyanidin-3-O-glucoside และ embelin และหาปริมาณได้
2. วิธีวิเคราะห์มีความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐานของ AOAC2002

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงปริมาณของของสาร cyanidin-3-O-glucoside, embelin สารฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์
2. สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินและ embelin จากสารสกัดจากพืชชนิดอื่น ๆ ต่อไปได้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

- พิลังกาสา (*Ardisia elliptica* thumb)
- แอนโทไซยานิน (Anthocyanins)
- เอมเบลิน (Embelin)
- แมสสเปคโทรมิเตอร์ (Mass spectrometer)
- เทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถภาพสูง (HPLC)

พิลังกาสา (Ardisia elliptica thumb)

พิลังกาสา มีชื่ออื่น ๆ ได้แก่ ลังพิสา(ตราด) ทุลังกาสา รวมใหญ่ (ชุมพร) ตาปลา จ้ำก้อง มาตาอาแย ปือนา ชื่อวิทยาศาสตร์ Ardisia elliptica thumb อยู่ในวงศ์ Myrsinaceae โดยมีการระบุรายละเอียดพรรณไม้ดังตาราง 1 (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2553)

ตาราง 1 แสดงรายละเอียดพรรณไม้ของพิลังกาสา

รายละเอียดพรรณไม้ (Specimen Details)	
Herbarium no.	PHUBU00075
Family	Myrsinaceae
Scientific name	*Ardisia elliptica* Thunb.
Thai name	พิลังกาสา (Pi lang ka sa)
Collector	Sudarat Homhual
Collection date	31 July 2010
Country	Thailand
Location	Herbal Garden (Faculty of Pharmacy, Ubon Ratchathani University)
Habitat	Montane rain forest
Plant part	Leaf, flower, fruit

ตาราง 1 (ต่อ)

รายละเอียดพรรณไม้ (Specimen Details)	
Note	White with pink flower
Botanical description	www.phargarden.com

ภาพประกอบ 1 Herbarium ของพิลังกาสา

ที่มา : ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ ม.อุบลราชธานี (2010 : online)

พิลังกาสามีลักษณะเป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดเล็ก ลำต้นตั้งตรง กิ่งก้านกลมหรืออาจเป็นเหลี่ยม สีน้ำตาลอมเทา กิ่งอ่อนสีน้ำตาลแดง ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับกัน ขึ้นหนาแน่นที่ปลายกิ่งเป็นรูปรี ปลายแหลม โคนใบรูปลิ่ม ผิวใบและขอบใบเรียบ แผ่นใบมีต่อมเป็นจุดกระจาย ใบหนา

มัน ก้านใบสั้น สีแดง เส้นใบไม่ค่อยชัดเจน ดอกออกเป็นช่อจากซอกใบ และปลายกิ่ง ช่อละ 4-8 ดอก กลีบดอกสีขาวแกมชมพู ติดกันที่โคนเป็นหลอดสั้น ๆ ปลายแยกเป็น 5 แฉก ปลายกลีบดอกแหลม กลีบเลี้ยงสีเขียว โคนเชื่อมติดกัน ผลรูปทรงกลมแป้น ผิวเรียบ ผลอ่อนสีแดง ผลสุกมีสีม่วงเข้ม เมล็ดเดี่ยว กลม พบตามป่าดงดิบเขาทั่วไป ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด

สรรพคุณในตำรายาไทย ใช้ผลที่มีรสร้อน ฝาด สุขุม ในการแก้ไข้ แก้ท้องเสีย แก้ลมพิษ แก้ธาตุพิการ แก้ซาง ใช้ใบที่มีรสเฝื่อนร้อน แก้ตับพิการ แก้ปอดพิการ ใช้ดอกที่มีรสเฝื่อนขมเมา ในการฆ่าเชื้อโรค ใช้รากที่มีรสเฝื่อนเมาและเปรี้ยวเล็กน้อย ในการแก้กามโรค แก้โรคหนองใน โดยตำกับสุราส่วนของน้ำนำมารับประทาน ส่วนของกากจะตำและนำไปพอกปิดแผล ถอนพิษงู ตะขาบ แมงป่อง และแก้ลมพิษ ส่วนต้นที่มีรสเฝื่อนเมา นำมาปรุงผสมกับสมุนไพรอื่นแก้โรคเรื้อน ฆ่าพยาธิที่ผิวหนัง

ภาพประกอบ 2 พิลังกาสา

ที่มา : ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ ม.อุบลราชธานี (2010 : online)

ในแต่ละส่วนของพิลังกาสามีสารสำคัญหลากหลายชนิดโดยเฉพาะสารในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ โดยมีงานวิจัยของนักวิทยาศาสตร์หลายคณะได้ทำการทดสอบหาสารสำคัญในแต่ละส่วนของพิลังกาสาดังตาราง 2

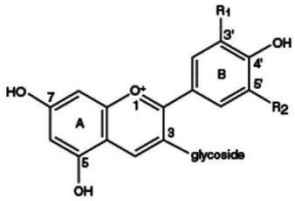
ตาราง 2 แสดงสารสำคัญในพืชพิลังกาสา

สารสำคัญ	ส่วนของพืช	แหล่งอ้างอิง
α-amyrin	ใบ	(Jianhong, 2011)
β-amyrin	ใบ, ลำต้น	(Jianhong, 2011)
isorhamnetin	ผล	(Phadungkit & Vallisuta, 2006)
quercetin	ผล	(Phadungkit & Vallisuta, 2006)
syringic acid	ผล	(Phadungkit & Vallisuta, 2006)
Anthocyanins	ผล	(กันต์กนิษฐ์ จงรัตนวิทย์, 2012)
Embelin	ใบ	(Yukongphan, Thitikornpong, Palanuvej, & Ruangrungsi)

แอนโทไซยานิน (Anthocyanins)

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่พบในส่วนต่าง ๆ พืช ให้สีแดง น้ำเงิน ม่วง ละลายน้ำได้ดี เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) มีบทบาทต่อการป้องการการเกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคหลอดเลือดหัวใจ (Cardiovascular disease) จากการป้องกัน Oxidative stress ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (Edirisinghe, Banaszewski, Cappozzo, McCarthy, & Burton-Freeman, 2011) โรคมะเร็ง จากการยับยั้ง epidermal growth-factor receptor (EGFR) (Meiers et al., 2001) ปัญหาในการมองเห็น โดยช่วยให้เกิดการสร้าง rhodopsin (Matsumoto, Nakamura, Tachibanaki, Kawamura, & Hirayama, 2003)

โครงสร้างของแอนโทไซยานิน ประกอบด้วยสารประกอบ 2 หรือ 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 คือ แอนโทไซยานิดิน หรืออะไกลโคน (Aglycone) โครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานิดิน ประกอบด้วย คาร์บอน 6 อะตอม คาร์บอน 3 อะตอม คาร์บอน 6 อะตอม (C-6-C-3-C-6) เชื่อมต่อกัน แอนโทไซยานิดินที่พบมากมีอยู่ 6 ชนิด คือ เพลาโกนิดิน (Pelargonidin) ไซยานิดิน (Cyanidin) เดลฟินิดิน (Delphinidin) พีโอนิดิน (Peonidin) เพทุนิดิน (Petunidin) และมอลวิดิน (Malvidin)



Anthocyanidins	ตำแหน่ง R1	ตำแหน่ง R2
Pelargonidin	H	H
Cyanidin	H	OH
Delphinidin	OH	OH
Peonidin	OCH_3	H
Petunidin	OCH_3	OH
Malvidin	OCH_3	OCH_3

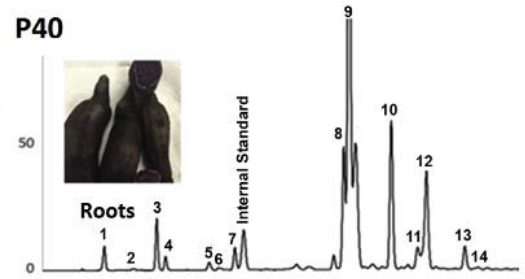
ภาพประกอบ 3 โครงสร้างแอนโทไซยานิดิน

ที่มา : อรอุษา (2011)

ส่วนที่ 2 คือ น้ำตาล ซึ่งน้ำตาลจะเกิดพันธะกับคาร์บอน ตำแหน่งที่ 3 หรือตำแหน่งที่ 3 และ 5 โดยน้ำตาลที่เกิดพันธะ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลกาแลคโตส(Galactose) น้ำตาลรูติโนส (Rutinose) และน้ำตาลแรมโนส (Rhamnose) ส่วนที่ 3 คือ กรด ซึ่งอาจมีหรือไม่มีก็ได้ ถ้ามีกรดเป็นองค์ประกอบจะเรียกว่า นอนอะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน (Nonacylated anthocyanin) แต่ถ้าไม่มีกรดเป็นองค์ประกอบจะเรียกว่า อะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน (Acylated anthocyanin) โดยกรดจะเกิดการเอสเทอริฟิเคชั่น (Esterification) กับน้ำตาลที่จับกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และตำแหน่งที่ 5 กรดที่เกิดพันธะเอสเทอร์กับน้ำตาล ได้แก่ กรดคูมาริก (Coumaric acid) กรดเฟอร์รูริก (Ferulic acid) กรดคาร์เฟอิก (Caffeic acid) เป็นต้น ซึ่งการเกิดเอซิเลชั่น (Acylation) ในโครงสร้างของแอนโทไซยานินจะทำให้มีความคงตัวดีขึ้น (อรอุษา เชาวนลิขิต, 2011)

การสกัดแอนโทไซยานิน สามารถใช้ตัวทำละลายที่เป็นกรด น้ำ แอลกอฮอล์ หรือ อะซีโตน Zhi-feng Fu และคณะ ได้ทำการทดลองสกัดใบและผลมันม่วงด้วย 50%, 70% และ 90% ethanol และ 50%, 70% และ 90% acetone พบว่าการสกัดด้วย 70% ethanol สามารถสกัดแอนโทไซยานินออกมาได้ดี (Fu et al., 2016) Xiaoyu Su และคณะใช้ 1N Formic acid ในการสกัดแอนโทไซยานินจากผลมันม่วงเช่นกัน และนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของแอนโทไซยานินด้วย HPLC-MS

ออกมาได้ โดยโครมาโทแกรมของสารสกัดมันม่วงแสดง 14 peak ของ anthocyanins โดย peak ที่ 8 และ 9 เป็น major anthocyanins ดังภาพประกอบ 3 และเมื่อวิเคราะห์ต่อด้วย Mass spectrometry พบว่าสามารถสกัดเอา Cyanidin และ Peonidin ออกมาได้ซึ่ง Cyanidin มี mass ที่ 287 m/z และ Peonidin-3-glucoside มี mass ที่ 301 m/z (Su et al., 2019)



ภาพประกอบ 4 โครมาโทแกรมของสารสกัดมันม่วง

ที่มา : Xiaoyu Su และคณะ (2019).

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ทำการศึกษาการสกัดสารแอนโทไซยานินในกะหล่ำปลีม่วง โดยใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำ, acidified water, ตัวทำละลายผสมระหว่าง acidified water กับ ethanol ในอัตราส่วนต่าง, acidified methanol, acetone และ 70% aqueous acetone ซึ่งตัวทำละลายส่วนใหญ่เป็นกรด ซึ่งผลการทดสอบพบว่ายิ่งใช้กรดความเข้มข้นสูง จะสามารถสกัดแอนโทไซยานินออกมาได้มาก (Chandrasekhar, Madhusudhan, & Raghavarao, 2012)

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีด้วยเครื่อง HPLC แล้วเทียบกับสารมาตรฐาน จากงานวิจัย Xiaoyu Su และคณะ ที่ได้กล่าวไปข้างต้นได้ทำการศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินด้วยพบว่าทั้งในใบและผลของมันม่วงมีปริมาณ Cyanidin 3-(6,6-O-dicaffeoyl-sophoroside)-5-glucoside มากที่สุด (ในรากมีมากที่สุด 1481.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และสามารถใช้การทดสอบ total anthocyanin content (TAC) จากงานวิจัยของ Zhi-feng Fu และคณะ (2016) มีวิธีทดสอบ total anthocyanin content โดยเจือจาง sample ด้วย 1.49% KCl water buffer pH 1.0 และ 1.64% Sodium acetate water buffer แล้ววัด Absorbance ที่ความยาวคลื่น 520 nm และ 720 nm ซึ่ง TAC แสดงในปริมาณของ cyanidin-3-O-glucoside คำนวณโดย

Anthocyanins (mg/L) = $(A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4.5}$ x Mw x DF x 1000/(ε x L)

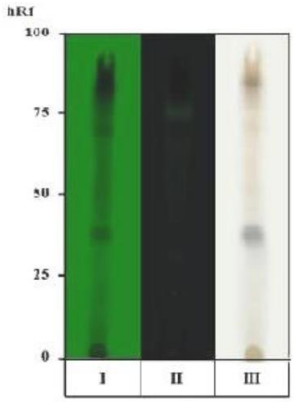
Mw=449.2 g/mol, L=Cell path (1cm), ε=Molar absorbance of cyanidin-3-O-glucoside (26,900 L cm^{-1} mol^{-1}) ผลที่ได้พบว่าการสกัดสารแอนโทไซยานินจาก 70% ethanol ให้ค่า TAC มากที่สุดคือ (36.5 mg c-3-gE/100 g DM)

เอมเบลิน (Embelin)

เอมเบลิน (Embelin) เป็นสารในกลุ่ม benzoquinone ละลายน้ำได้ไม่ดี สามารถพบได้จากพืชในวงศ์ Myrsinaceae และ Oxalidaceae มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านอาการอักเสบ ลดอาการปวด (R. Poojari, 2014, D.R. Swami, 2018, C. Sivasankar, 2017)

มีการงานวิจัยสกัดสารสำคัญจากผลพิลังกาสาโดยใช้ 95% ethanol, hexane และน้ำเป็นตัวทำละลาย ทำการสกัดด้วยการเขย่าเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์และวิเคราะห์ปริมาณด้วย Thin layer chromatography โดยการพิสูจน์เอกลักษณ์จะใช้ mobile phase เป็นอัตราส่วนของ chloroform : ethyl acetate : formic acid (5:4:1) และนำไปตรวจสอบที่ใต้แสงที่ความยาวคลื่น 254 nm และ365 nm ผลที่ได้เป็นดังภาพประกอบที่ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณ Embelin ทำโดยนำสารสกัดจาก Hexane มาทำ calibration curve ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml และเตรียมสารละลายของสารสกัด ใช้ mobile phase เป็นอัตราส่วนของ n-butanol, n-propanol, 4 N ammonia (1:7:2) ผลที่ได้เป็นดังภาพประกอบที่ นำไปตรวจสอบด้วย TLC densitometry และTLC Image Analysis (Yukongphan et al.)

ยังมีงานวิจัยที่ทำการตรวจสอบองประกอบทางเคมีของพิลังกาสา โดยใช้ IR spectrum, Mass spectrum และ ^{1}H-NMR จากนั้นทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่ามี embelin เป็นองค์ประกอบในสารสกัดผลพิลังกาสาและมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* และยังมีความเป็นพิษต่อไรสีน้ำตาลและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทำการทดลองด้วย DPPH assay



TLC fingerprint of ethanol extract
I - UV 254 nm, II - UV 365 nm,
III - phosphomolybdic acid spray reagent
(0.5 %w/v in ethanol) with heat at 120°C

ภาพประกอบ 5 TLC fingerprint ของสารสกัดผลพิลังกาสาโดยใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย

ที่มา : Pongsathorn Y. et al (2013).

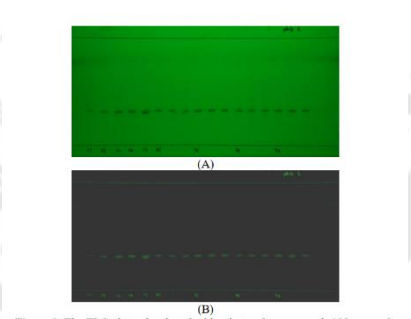


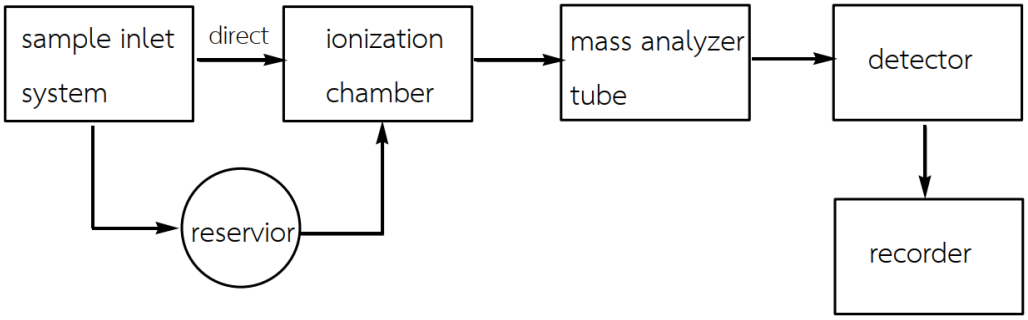
Figure 2. The TLC plates developed with n-butanol, n-propanol, 4 N ammonia (1:7:2) visual under 254 nm original image (A), with subtrack background (B) Hexane extracts of dried *Ardisia elliptica* fruits

ภาพประกอบ 6 TLC plate ของสารสกัดผลพิลังกาสาโดยใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย

ที่มา : Pongsathorn Y. et al (2013).

แมสสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (Mass spectrophotometer: MS)

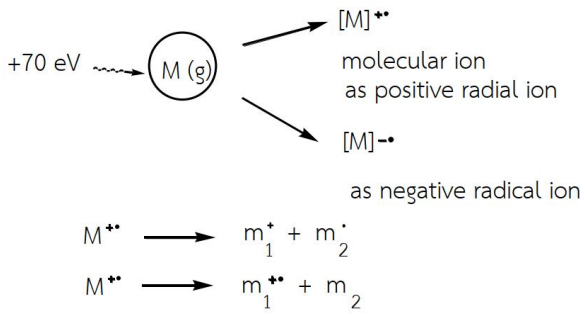
เทคนิคของเครื่อง MS มีหลักกการคือ การทำให้โมเลกุลของสารเกิดการแตกตัวเป็นไอออนที่มีประจุบวกหรือ cation ซึ่งเป็นได้ 2 รูปแบบคือ อิเล็กตรอนเดี่ยว ($M^{+}\bullet$) และ อิเล็กตรอนคู่ M^{+} ขึ้นอยู่กับลักษณะการแตกตัวเป็นไอออน และคุณสมบัติของสารแต่ละชนิด และไอออนจะแตกตัวอีกครั้งเป็น fragment ion ซึ่งไอออนที่มีประจุบวกเท่านั้นที่จะถูกตรวจพบโดย detector โดยจะแสดงผลออกมาเป็นค่ามวลต่อประจุ (m/z) ซึ่งแสดงถึงน้ำหนักโมเลกุลของสารชนิดนั้น ๆส่วนประกอบเครื่อง MS ดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 ส่วนประกอบเครื่อง Mass spectrophotometer

ที่มา : อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, (2020)

1) ระบบนำเข้าตัวอย่าง (Sample inlet system) ทำหน้าที่นำสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบโดยทำให้กลายเป็นไอ และนำส่วนที่เป็นไอส่งต่อเข้าสู่ส่วนที่เป็นระบบการทำให้แตกตัวเป็นไอออน
2) แหล่งกำเนิดไอออน (Ionization chamber) ทำให้สารแตกตัวเป็นไอออนโดยมีเทคนิคในการทำให้สารแตกตัวเป็นไอออน 3 ชนิดได้แก่
    a. อิเล็กตรอนกระแทก (Electron Impact, EI) หลักการคือไอของตัวอย่างถูกยิงด้วยอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง 70 eV ทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกมา 1 ตัว ซึ่งเกิดเป็นไอออนบวกมากกว่าไอออนลบ และมีการแตกตัวเป็น fragment ion ต่อไปดังภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 8 การแตกตัวเป็นไอออนด้วยอิเล็กตรอนของโมเลกุล

ที่มา : อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, (2020)

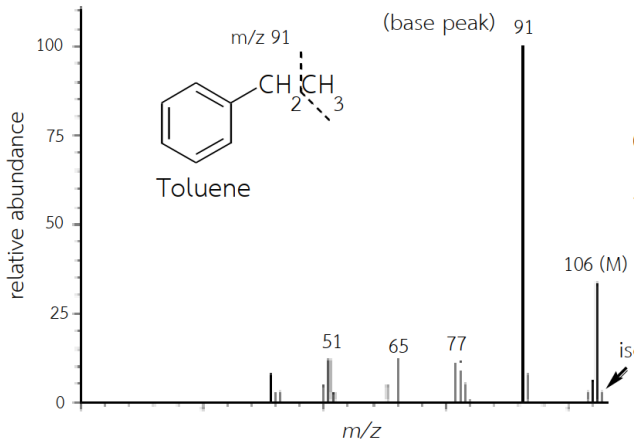
b. การเป็นไอออนทางเคมี (Chemical Ionization, CI) หลักการคือ สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับแก๊สรีเอเจนท์ (reagent gas) ได้แก่ มีเทน โพรเพน แอมโมเนีย อาร์กอน และบิวเทน โดยถูกยิงด้วยอิเล็กตรอนมีพลังงานสูงตรงบริเวณแหล่งกำเนิดไอออน ทำให้แก๊สแตกตัวเป็นไอออน เหมาะกับสารตัวอย่างที่มีขนาดโมเลกุลขนาดเล็ก และระเหยง่าย

c. การระดมยิงอะตอมอย่างเร็ว (Fast Atomic Bombardment, FAB) ใช้แก๊สเฉื่อย ได้แก่ อาร์กอน หรือ ซีนอนเป็นตัวกระแทกกับสารตัวอย่างให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออน

3) ส่วนวิเคราะห์มวล (Mass analyzer tube) แยกความแตกต่างมวลต่อประจุ (m/z) ของไอออนบวก โดยไอออนบวกถูกแยกออกจากไอออนลบโดยศักย์ไฟฟ้าลบก่อนถึงส่วนวิเคราะห์มวล ซึ่งมีแท่งแม่เหล็กเป็นตัวแยกขนาด m/z โดยใช้สนามแม่เหล็กก่อนที่จะถูกส่งไปยังส่วนตรวจหา (detector)

4) ส่วนตรวจหา (detector) ตรวจวิเคราะห์มวลที่มาจากส่วนวิเคราะห์มวล

5) ส่วนบันทึก (recorder) แปลงสัญญาณจาก detector เป็น mass spectrum ดังภาพประกอบที่ (อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, 2020)



ภาพประกอบ 9 Mass spectrum

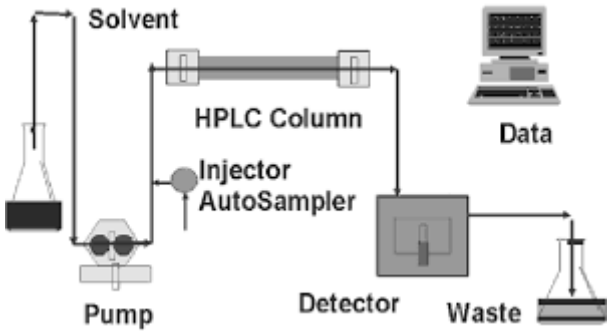
ที่มา : อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, (2020)

เทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถภาพสูง (HPLC)

หลักการการทำงานของเทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถภาพสูง ของเหลวที่มีแรงดันสูงที่เรียกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวพาสารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) ซึ่ง stationary phase สามารถสร้างแรงหน่วงโดยอาศัยความชอบจับกันของสารตามหลัก “like dissolve like” ที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิด ทำให้เกิดความแตกต่างกันของเวลาที่สารนั้น ๆ สามารถเคลื่อนที่ออกจาก stationary phase ทำให้ได้เวลาหน่วง (retention time)ที่แตกต่างกัน เทคนิคโครมาโทกราฟีมีวิธีการแยกสาร 2 ประเภทได้แก่

1) โครมาโทกราฟีแบบปกติ (normal phase chromatography) โดยการใช้ stationary phase ที่มีสภาพขั้วสูงในการแยกสารตัวอย่างที่มีสภาพขั้วสูงเช่นกันออกจาก mobile phase ที่มีสภาพขั้วต่ำกว่า
2) โครมาโทกราฟีแบบผันกลับ (reversed phase chromatography) โดยการใช้ stationary phase ที่มีสภาพขั้วต่ำในการแยกสารตัวอย่างที่มีสภาพขั้วต่ำเช่นกันออกจาก mobile phase ที่มีสภาพขั้วสูงกว่า

ส่วนประกอบเครื่อง HPLC ดังภาพประกอบที่ 9



ภาพประกอบ 10 ส่วนประกอบเครื่อง HPLC

ที่มา : (Sangsrichan, 2014)

1) เครื่องสูบ(pump) มีหน้าที่สูบฉีดของเหลวที่เป็น mobile phase ด้วยความดันสูง ให้เคลื่อนที่ผ่าน stationary phase ด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ ตามที่กำหนดไว้ มี 2 ชนิดได้แก่
   - Binary pump หรือ High pressure mixing gradient เป็นระบบปั๊มคู่โดยปั๊มทั้งสองจะดูด mobile phase จากขวด จากนั้นจึงทำการผสม mobile phase ตามอัตราส่วนที่ตั้งไว้ โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า mixer เป็นตัวผสม
   - Quaternary หรือ Low pressure mixing gradient ปั๊ม 1 ตัวในการดูด mobile phase จากขวด โดยอัตราส่วนของ mobile phase ถูกกำหนดโดย proportional valve
2) ตัวฉีด (injector) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ควบคุมปริมาตรของสารตัวอย่างที่เข้าสู่คอลัมน์ ขั้นแรกจะใช้ไซริงก์ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในท่อพักสารตัวอย่าง (sample loop) ซึ่งมีปริมาตรคงที่ (fixed loop injector) แล้วจึงหมุนให้สารตัวอย่างที่มากับ mobile phase เข้าสู่คอลัมน์
3) ส่วนคอลัมน์ (column compartment) เป็นส่วนที่เก็บคอลัมน์ที่บรรจุ stationary phase ไว้ภายใน สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ในบางรุ่น ส่วนคอลัมน์มีหลายชนิดเช่น C8, C18 ซึ่งแต่ละชนิดจะมีการบรรจุ stationary phase ที่ใช้ในการแยกสารต่างชนิดกัน ขึ้นอยู่กับความต้องการในการใช้งาน
4) ตัวตรวจหา (detector) มีหน้าที่วัดปริมาณของสารเพื่อส่งต่อสู่เครื่องบันทึกผล ซึ่งมีหลายชนิด ขึ้นอยู่กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ได้แก่
   - UV absorption
   - IR absorption

- Fluorometry
- Refractive index
- Conductivity
- Flame ionization
- Mass spectrophotometer

5) เครื่องบันทึกผล ใช้ในการแสดงตำแหน่งของสารที่ออกมาจากคอลัมน์เพื่อจำแนกชนิดของสารหรือคำนวณหาปริมาณสาร ซึ่งสามารถคำนวณได้จากความสูงของพีค (peak high) หรือพื้นที่ใต้พีค (peak area)

ระบบในการเคลื่อนที่ของ mobile phase มี 2 ชนิด

1) Isocratic elution เป็นการใช้อัตราส่วนของ mobile phase อัตราส่วนเดียวคงที่ตลอดการวิเคราะห์
2) Gradient elution มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ mobile phase ที่เวลาต่าง ๆ เพื่อช่วยในการแยกสารต่าง ๆ ได้ดีขึ้น (ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์, 2534)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี (Materials, Instruments and Reagents)

สารเคมี

สารมาตรฐาน

cyanidin-3-O-glucoside (The nature network, Germany)

embelin (Sigma, India)

quercetin (Sigma, India)

acetonitrile (HPLC grade) (Macron fine chemical, USA)

$AlCl_3$ (Kemaus, Australia)

n-Hexane (AR grade) (Carlo Erba, France)

95% ethanol (HPLC grade) (Merck, Germany)

Folin-Ciocalteu reagent (VWR, England)

methanol (HPLC grade) (Honeywell, USA)

orthophosphoric 85% (Carlo Erba, France)

Na_2CO_3 (Univar, Australia)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

beaker ขนาด 25, 50, 100,250 และ 1000 ml (Pyrex®, USA)

centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 ml

cylinder ขนาด 5, 10 และ 500 ml

erlenmeyer flask (Pyrex®, USA)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC Ultimate3000) (Thermo scientific, USA)

-pump: DGP-3600 SD

-column compartment: TCC-3000 SD

-column: HiQ sil C18W 4.6 mm x 250 mm, 5µm

-detector: DAD-3000

HPLC vial & cap

Mass spectrophotometer (MSQ Plus) (Thermo scientific, USA)

incubator (MEMMERT, Germany)

microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

micropipette ขนาด 20–200 µl และ ขนาด 100–1000 µl (GILSON, France)

multichannel micropipette ขนาด 20-200 µl (CORNING, Poland)

96-well microplate (Sterilin, UK)

microplate reader SpectraMax M3 (Molecular devieces, USA)

parafilm (BERMIS, Germany)

pH meter (METTLER TOLEDO, USA)

Rotary evaporator (BUCHI rotavapor R-114, Switzerland)

syringe filter ขนาด 0.45 m (Fortune Sciencetific, Thailand)

ultrasonic sonicator bath (POWERSONIC 410, Korea)

UV-VIS spectrophotometer (SHIMADZU, Japan)

vacuum pump (SPARMAX, Taiwan)

volumetric flask ขนาด 10, 25, 50 และ 100 ml (Witeg Diffigo, Germany)

volumetric pipette ขนาด 2, 4, 5, 6, 7 และ 8 ml

vortex mixer (Scientific Industries, Inc.)

กระดาษกรอง (Whatman™, China)

เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 5 ตำแหน่ง (Mettler Toled XPR205, USA)

เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 6 ตำแหน่ง (Mettler Toled XPE26, USA)

ชุดกรอง buchner funnel filtration

ชุดกรอง glass vacuum filtration

2. การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในงานวิจัย

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ cyanidin-3-O-glucoside

เตรียม Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่ง cyanidin-3-O-glucoside น้ำหนัก 0.002 g ละลายด้วย mobile phase และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 2.0, 1.6, 1.0, 0.6 และ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน โดยทำ serial dilution ดังนี้

1) ปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2) ปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 8 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3) ปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
4) ปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 3 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 0.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
5) ปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ embelin

เตรียม Stock solution ของ embelin ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่ง embelin น้ำหนัก 0.002 g ละลายด้วยน้ำ และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน embelin ที่ความเข้มข้น 4.0, 2.0, 1.6, 1.0 และ 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน โดยทำ serial dilution ดังนี้

1) ปิเปต Stock solution ของ embelin ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 50 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2) ปิเปต Stock solution ของ embelin ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 50 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3) ปิเปต Stock solution ของ embelin ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 4 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 50 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
4) ปิเปต Stock solution ของ embelin ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
5) ปิเปต Stock solution ของ embelin ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 4 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3 การเตรียมตัวอย่าง

1) การเตรียมตัวอย่างของสารสกัดผลพิลังกาสา

ผลพิลังกาสาที่เก็บจากสวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒนำมาตากแห้งและบดด้วยเครื่อง blender จนละเอียด จากนั้นทำการแร่งโดยใช้แร่งเบอร์ 40 ชั่งผงละเอียดของผลพิลังกาสาปริมาณ 50 กรัมใส่ลงในขวดปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยวิธี sonication ระยะเวลา 20 นาที โดยใช้ตัวทำละลายและปริมาตรดังตาราง 1 ตามลำดับ โดยเริ่มจาก ethyl acetate เมื่อครบเวลานำไปกรองแยกกากด้วยกระดาษกรอง (Whatman no.1) ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ทั้ง 3 ครั้ง รวมกันมาทำการระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จนได้สารสกัดหยาบของผลพิลังกาสา แล้วเติม ethanol ลงในขวดผงสมุนไพรเดิม ทำการสกัดเช่นเดียวกับการสกัดด้วย ethyl acetate และเติมน้ำลงในขวดผงสมุนไพรเดิม ทำการสกัดเช่นเดียวกับการสกัดด้วย ethyl acetate เช่นกัน ชั่งสารสกัดที่ได้แล้วบรรจุสารสกัดไว้ในภาชนะปิดสนิทนำไปเก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ก่อนนำ ไปทดสอบต่อไป

ตาราง 3 แสดงชนิดและปริมาตรของตัวทำละลายในการสกัดผลพิลังกาสาเพื่อทดสอบหาองค์ประกอบทางเคมี

ตัวทำละลาย	ปริมาตรตัวทำละลาย (mL)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
Ethyl acetate	200	200	200
Ethanol	200	200	200
Water	200	200	200

2) การวิเคราะห์ร้อยละผลได้ของสารสกัดผลพิลังกาสา

การคำนวณปริมาณสารสกัดผลพิลังกาสาได้จากการสกัดเทียบกับน้ำหนักของผลพิลังกาสาก่อนการสกัด คำนว ณโดยใช้สมการ

Yield of extraction= (A / B) x 100%

A คือ น้ำหนักสารที่สกัดได้ (กรัม)

B คือ ปริมาณผลพิลังกาสาที่ใช้ในการสกัด (กรัม)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเครื่อง HPLC-MS ของ cyanidin-3-O-glucoside

เป็นการทดสอบเพื่อตรวจสอบชนิดของสารแต่ละชนิดที่พบในสารสกัดผลพิลังกาสา โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีในการแยกสารออกมาและใช้ Mass spectrometry ในการระบุถึงมวลโมเลกุลของสารแต่ละชนิดเพื่อนำมวลโมเลกุลนั้นไปเปรียบเทียบกับมวลโมเลกุลของสารที่อาจพบในผลพิลังกาสาซึ่งสามารถทำการทดสอบได้ดังนี้

1) ปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2) ชั่งสารสกัด 100 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วย mobile phase

กรองสารละลายด้วย syringe filter บรรจุใน HPLC vial จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ 1 ความเข้มข้นซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ (condition) ดังนี้ (Su et al., 2019)

- Column: C18 250 mm x 4.6 mm
- Mobile phase: acetonitrile:0.085% phosphoric acid (Gradient elution ดังตาราง 4)

ตาราง 4 แสดงอัตราส่วนของ mobile phase ที่เวลาต่าง ๆ

เวลา (นาที)	0.085% phosphoric acid (%)	Acetonitrile (%)
0	95	5
20	75	25
30	35	65
50	10	90
54	10	90
55	95	5
60	95	5

- Flow rate: 1 ml/min
- Temp: 25 °C
- Wavelength: 210, 286, 520 nm
- Run time: 60 min
- Injection volume: 20 µl
- MS Condition (Su et al., 2019)
- Scanning interval: 100-1000 m/z
- Nebulization: 350 °C
- N_2 flow: 10 psi
- Capillary and cone voltage: 3.5 kV, 40 V
- Drying gas flow rate: 5 L/min
- Detector: ESI/MS

3) เปรียบเทียบพีคที่ได้จาก UV detector จาก HPLC และพีคจาก Mass spectrophotometer ที่ตรงกัน จะได้ค่ามวลโมเลกุลของสารที่ให้พีคนั้น ๆ

3.2 การทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability) ของ cyanidin-3-o-glucoside เป็นการทดสอบเพื่อพิสูจน์ว่าระบบโครมาโทกราฟีที่ใช้มีความสามารถในการแยก (Resolution) และการวิเคราะห์ให้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง (reproducibility) เพียงพอสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยการทดสอบนี้อยู่บนหลักการของเครื่องมือ ระบบอิเล็กทรอนิกการปฏิบัติงานวิเคราะห์ ซึ่งทั้งหมดทำการประเมินแบบองค์รวม สามารถทำการทดสอบได้ดังนี้

1) ปิเปต Stock solution ของ cyanidin-3-O-glucoside ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 2 มิลลิลิตร ใสในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2) กรองสารละลายด้วย syringe filter บรรจุใน HPLC vial จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ 1 ความเข้มข้นซ้ำ 6 ครั้ง โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ (condition) ดังนี้

- Column: C18 250 mm x 4.6 mm
- Mobile phase: acetonitrile: 0.085% phosphoric acid (Gradient elution ดังตาราง 5)

ตาราง 5 แสดงอัตราส่วนของ mobile phase ที่เวลาต่าง ๆ

เวลา (นาที)	0.085% phosphoric acid (%)	Acetonitrile (%)
0	85	15
20	75	25
25	85	15
30	85	15

- Flow rate: 1 ml/min
- Temp: 25 °C
- Wavelength: 512 nm
- Run time: 60 min
- Injection volume: 20 µl

3) ทำการวิเคราะห์ และประมวลผลตามหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้

- Resolution (Rs) คือ การแยกสารสองตัวในของผสม โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม
- Tailing factor (T) เป็นการวัดความสมมาตรของพีค
- Number of theoretical plate (N) เป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์
- Relative standard deviation (%RSD) คือ ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เป็นการวัดความแม่นยำของระบบโดยนำ peak area, peak height และ retention time ที่วัดได้มาคำนวณตามสมการ ดังนี้

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

- เกณฑ์การยอมรับค่าพารามิเตอร์พื้นฐานเพื่อแสดงประสิทธิภาพการแยกของ
- ระบบตามมาตรฐาน USP37 (Pharmacopoeia., 2020) ดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 เกณฑ์การยอมรับค่าจากการตรวจสอบความเหมาะสมของพารามิเตอร์

Parameter	Guideline
Rs	≥2
T	≤2
N	≥2000
%RSD	≤2%

3.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) ของ cyanidin-3-O-glucoside

ตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นมาทำการตรวจสอบความถูกต้องตามหัวข้อต่าง ๆดังนี้

1) Specificity (ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์) เป็นการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ เพื่อดูว่าวิธีวิเคราะห์สามารถแยกสารที่ต้องการได้ และพีคของสารอื่น ๆ จะต้องไม่รบกวนพีคของสารสำคัญหรือสารที่สนใจนำสารสกัดผลพิลังกาสา และสารมาตรฐานบรรจุลงใน HPLC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบพีคของสารสกัดผลพิลังกาสาและสารมาตรฐาน และสังเกตค่า peak purity ของสาระสำคัญ
2) Linearity and range (เป็นการตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์)

Linearity คือ ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลการวิเคราะห์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่จริงภายในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด

Range คือ ช่วงความเข้มข้นระหว่างค่าสูงที่สุดและค่าต่ำที่สุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรงและสามารถวิเคราะห์ปริมาณของสารในช่วงดังกล่าวได้

โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

2.1) นำ stock solution ของ สารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.4, 0.6, 1.0, 1.6 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปต stock solution มา 2, 3, 5, 8 และ 10 มิลลิลิตรตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย mobile phase 100 มิลลิลิตร บรรจุในHPLC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง

2.2) สร้าง calibration curve จาก peak area ที่ได้จากการวิเคราะห์ และคำนวณหาสมการเส้นตรง (y=mx+c) กับ correlation coefficient (r)

เกณฑ์ยอมรับประเมินค่าจาก correlation coefficient ของ regression line ค่าที่ได้ต้องมากกว่า 0.995

3) Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ)

Limit of detection คือ เป็นการหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ตรวจพบได้

Limit of quantitation คือ เป็นการหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ระบุปริมาณที่แน่นอนได้สามารถหาได้จากสมการดังนี้

$$LOD = \frac{3SD\ 0f\ Y\text{-}intercept}{Slope}$$

$$LOQ = \frac{10SD\ 0f\ Y\text{-}intercept}{Slope}$$

4) Accuracy (ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์)

เป็นการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ สามารถแสดงผลการวิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับปริมาณจริง โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

4.1) นำ stock solution ของสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.4 1.0 และ 2.0 µg/ml โดยปิเปต stock solution มา 2, 5 และ 10 มิลลิลิตรตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย mobile phase 100 มิลลิลิตร บรรจุใน HPLC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ทั้งหมด ความเข้มข้น vial ละ 3 ครั้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

4.2) แทนค่า peak area ที่ได้ลงในสมการเส้นตรงของ calibration curve เพื่อหาปริมาณที่วิเคราะห์ได้และนำไปคำนวณหา %recovery โดยคำนวณได้จากสมการดังนี้

%recovery = ปริมาณที่วิเคราะห์ได้x 100%

ปริมาณที่มีอยู่จริง

เกณฑ์ยอมรับ %recovery ตาม AOAC2002 (AOAC, 2002) ดังตาราง 7

ตาราง 7 เกณฑ์การยอมรับ %recovery ในการทดสอบหัวข้อ Accuracy

Concentration	Recovery limits
100%	98 - 101%
10%	95 - 102%
1%	92 – 105%
0.1%	90 – 108%
0.01%	85 – 110%
10 µg/g (ppm)	80 – 110%
1 µg/g	75 – 120%
10 µg/kg (ppb)	70– 125%

5) Precision (ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์)

เป็นการตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ทดสอบโดยใช้ Sample ในการวิเคราะห์โดยผลการวิเคราะห์ที่ได้ควรให้ค่าที่ไม่แตกต่างกัน

5.1) นำ stock solution ของสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.4 1.0 และ 2.0 µg/ml โดยปิเปต stock solution มา 2, 5 และ 10 มิลลิลิตรตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย mobile phase 100 มิลลิลิตรบรรจุใน HPLC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วย

เครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ทั้งหมด ความเข้มข้น vial ละ 3 ครั้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง ในวันเดียวกัน (intra-day precision) และ ทำซ้ำ 3ครั้งในวันที่แตกต่างกันเป็นเวลา 3 วัน (inter-day precision)

5.2) แทนค่า peak area ที่ได้ลงในสมการเส้นตรงของ calibration curve เพื่อหาปริมาณที่วิเคราะห์ได้และนำไปคำนวณหา %RSD

เกณฑ์ยอมรับ %rsd ตาม AOAC2002 (AOAC, 2002) ดังตาราง 8

ตาราง 8 เกณฑ์การยอมรับ %rsd ในการทดสอบหัวข้อ Precision

Concentration	Repeatability (RSD_r)
100%	1%
10%	1.5%
1%	2%
0.1%	3%
0.01%	4%
10 µg/g (ppm)	6%
1 µg/g	8%
10 µg/kg (ppb)	15%

3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ cyanidin-3-O-glucoside ในสารสกัดผลพิลังกาสา

1) ชั่งสารสกัดผลพิลังกาสาจากทั้ง 3 ตัวทำละลาย มา 100 มิลลิกรัม ละลายด้วย mobile phase และปรับปริมาตรจนครบ 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

2) เตรียมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วงของ calibration curve บรรจุใน HPLC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ความเข้มข้น vial ละ 2 ครั้ง

3) แทนค่า peak area ที่ได้ไปแทนค่าลงในสมการเส้นตรงของ calibration curve เพื่อหาปริมาณที่วิเคราะห์ได้ และเปรียบเทียบปริมาณของ cyanidin-3-O-glucoside ที่สกัดได้จากแต่ละวิธี

3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเครื่อง HPLC-MS ของ embelin

เป็นการทดสอบเพื่อตรวจสอบชนิดของสารแต่ละชนิดที่พบในสารสกัดผลพิลังกาสา โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีในการแยกสารออกมาและใช้ Mass spectrometry ในการระบุถึงมวลโมเลกุล

ของสารแต่ละชนิดเพื่อนำมวลโมเลกุลนั้นไปเปรียบเทียบกับมวลโมเลกุลของสารที่อาจพบในผลพิลังกาสาซึ่งสามารถทำการทดสอบได้ดังนี้

1) ปิเปต Stock solution ของ embelin ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2) ชั่งสารสกัด 100 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วย mobile phase
3) กรองสารละลายด้วย syringe filter บรรจุใน HPLC vial จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ 1 ความเข้มข้นซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ (condition) ดังนี้
   - Column: C18 250 mm x 4.6 mm
   - Mobile phase: acetonitrile:0.085% phosphoric acid (Gradient elution ดังตาราง 9)
   - Flow rate: 1 ml/min
   - Temp: 25 °C
   - Wavelength: 210, 286, 520 nm
   - Run time: 20 min
   - Injection volume: 20 µl

MS Condition

- Scanning interval: 200-1200 m/z
- Nebulization: 350 °C
- N_2 flow: 10 psi
- Capillary and cone voltage: 3.5 kV, 40 V
- Drying gas flow rate: 5 L/min
- Detector: ESI/MS

ตาราง 9 แสดงอัตราส่วนของ mobile phase ที่เวลาต่าง ๆ

เวลา (นาที)	0 .085% phosphoric acid (%)	Acetonitrile (%)
0	20	80
15	5	95
16	20	80
20	20	80

4) เปรียบเทียบพีคที่ได้จาก UV detector จาก HPLC และพีคจาก Mass spectrophotometer ที่ตรงกัน จะได้ค่ามวลโมเลกุลของสารที่ให้พีคนั้น ๆ

3.6 การทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)ของ embelin

เป็นการทดสอบเพื่อพิสูจน์ว่าระบบโครมาโทกราฟีที่ใช้มีความสามารถในการแยก(Resolution) และการวิเคราะห์ให้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง (reproducibility) เพียงพอสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยการทดสอบนี้อยู่บนหลักการของเครื่องมือ ระบบอิเล็กทรอนิกการปฏิบัติงานวิเคราะห์ ซึ่งทั้งหมดทำการประเมินแบบองค์รวม สามารถทำการทดสอบได้ดังนี้

1) ปิเปต Stock solution ของ embelin ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2) กรองสารละลายด้วย syringe filter บรรจุใน HPLC vial จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ 1 ความเข้มข้นซ้ำ 6 ครั้ง โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ (condition) ดังนี้
   - Column: C18 250 mm x 4.6 mm
   - Mobile phase: acetonitrile : 0.085% phosphoric acid (Gradient elution ดังตาราง 9)
   - Flow rate: 1 ml/min
   - Temp: 25 °C
   - Wavelength: 286 nm
   - Run time: 20 min
   - Injection volume: 20 µl

3) ทำการวิเคราะห์ และประมวลผลตามหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้

- Resolution (Rs) คือ การแยกสารสองตัวในของผสม โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม
- Tailing factor (T) เป็นการวัดความสมมาตรของพีค
- Number of theoretical plate (N) เป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์
- Relative standard deviation (%RSD) คือ ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เป็นการวัดความแม่นยำของระบบโดยนำ peak area, peak height และ retention time ที่วัดได้มาคำนวณตามสมการ ดังนี้

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

เกณฑ์การยอมรับค่าพารามิเตอร์พื้นฐานเพื่อแสดงประสิทธิภาพการแยกของระบบตามมาตรฐาน USP37 (Pharmacopoeia., 2020) ดังแสดงในตาราง 6

3.7 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) ของ embelin

ตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นมาทำการตรวจสอบความถูกต้องตามหัวข้อ ต่าง ๆ ดังนี้

1) Specificity (ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์) เป็นการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ เพื่อดูว่าวิธีวิเคราะห์สามารถแยกสารที่ต้องการได้ และพีคของสารอื่น ๆ จะต้องไม่รบกวนพีคของสารสำคัญหรือสารที่สนใจนำสารสกัดผลพิลังกาสา และสารมาตรฐานบรรจุลงใน HPLC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบพีคของสารสกัดผลพิลังกาสาและสารมาตรฐาน และสังเกตค่า peak purity ของสาระสำคัญ

2) Linearity and range (เป็นการตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์)

Linearity คือ ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลการวิเคราะห์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่จริงภายในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด

Range คือ ช่วงความเข้มข้นระหว่างค่าสูงที่สุดและค่าต่ำที่สุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรงและสามารถวิเคราะห์ปริมาณของสารในช่วงดังกล่าวได้

โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

2.1) นำ stock solution ของ สารมาตรฐาน embelin มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.8, 1.0, 1.6, 2.0 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปต stock solution มา 4 และ 5 มิลลิลิตรตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย mobile phase 100 มิลลิลิตร ในความเข้มข้น 0.8, 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้น 1.6, 2.0 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปต stock solution 4, 5 และ 10 มิลลิลิตรตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย mobile phase 50 มิลลิลิตร บรรจุในHPLC

vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง

2.2) สร้าง calibration curve จาก peak area ที่ได้จากการวิเคราะห์ และคำนวณหาสมการเส้นตรง (y=mx+c) กับ correlation coefficient (r)

เกณฑ์ยอมรับประเมินค่าจาก correlation coefficient ของ regression line ค่าที่ได้ต้องมากกว่า 0.995

3) Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ)

Limit of detection คือ เป็นการหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ตรวจพบได้

Limit of quantitation คือ เป็นการหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ระบุปริมาณที่แน่นอนได้สามารถหาได้จากสมการดังนี้

$$LOD = \frac{3SD\ 0f\ Y\text{-}intercept}{Slope}$$

$$LOQ = \frac{10SD\ 0f\ Y\text{-}intercept}{Slope}$$

4) Accuracy (ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์)

เป็นการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ สามารถแสดงผลการวิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับปริมาณจริง โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

4.1) นำ stock solution ของสารมาตรฐาน embelin มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.4 1.0 และ 1.6 µg/ml โดยปิเปต stock solution มา 2, 5 และ 8 มิลลิลิตรตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย mobile phase 100 มิลลิลิตร บรรจุใน HPLC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ทั้งหมด ความเข้มข้น vial ละ 3 ครั้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

4.2) แทนค่า peak area ที่ได้ลงในสมการเส้นตรงของ calibration curve เพื่อหาปริมาณที่วิเคราะห์ได้และนำไปคำนวณหา %recovery โดยคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\%recovery = \frac{\text{ปริมาณที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ปริมาณที่มีอยู่จริง}} \times 100\%$$

เกณฑ์ยอมรับ %recovery ตาม AOAC2002 (AOAC, 2002) ดังตาราง 7

5) Precision (ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์)

เป็นการตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ทดสอบโดยใช้ Sample ในการวิเคราะห์โดยผลการวิเคราะห์ที่ได้ควรให้ค่าที่ไม่แตกต่างกัน

5.1) นำ stock solution ของสารมาตรฐาน embelin มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.8 1.6 และ 4.0 µg/ml โดยปิเปต stock solution มา 4 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย mobile phase 100 มิลลิลิตร ในความเข้มข้น 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้น 1.6 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปต stock solution 4 และ 10 มิลลิลิตรตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย mobile phase 50 มิลลิลิตรบรรจุใน HPLC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ทั้งหมด ความเข้มข้น vial ละ 2 ครั้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง ในวันเดียวกัน (intra-day precision) และ ทำซ้ำ 3ครั้งในวันที่แตกต่างกันเป็นเวลา 3 วัน (inter-day precision)

5.2) แทนค่า peak area ที่ได้ลงในสมการเส้นตรงของ calibration curve เพื่อหาปริมาณที่วิเคราะห์ได้และนำไปคำนวณหา %RSD

เกณฑ์ยอมรับ %rsd ตาม AOAC2002 (AOAC, 2002) ดังตาราง 8

3.8 การวิเคราะห์หาปริมาณ embelin ในสารสกัดผลพิลังกาสา

1) ชั่งสารสกัดผลพิลังกาสาจากทั้ง 3 ตัวทำละลาย มา 100 มิลลิกรัม ละลายด้วย mobile phase และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร แล้วปิเปตสารละลายข้างต้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

2) เตรียมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วงของ calibration curve บรรจุใน HPLC vial และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ความเข้มข้น vial ละ 2 ครั้ง

3) แทนค่า peak area ที่ได้ไปแทนค่าลงในสมการเส้นตรงของ calibration curve เพื่อหาปริมาณที่วิเคราะห์ได้ และเปรียบเทียบปริมาณของ embelin ที่สกัดได้จากแต่ละวิธี

3.9 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิก (Total phenolic content)

วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent (Benabdallah, Rahmoune, Boumendjel, Aissi, & Messaoud, 2016) เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร (10% v/v Folin-Ciocalteu reagent) โดยปิเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดปรับปริมาตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 มิลลิลิตร

2) เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (10% w/v) โดยชั่ง Na_2CO_3 anhydrous มา 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

3) เตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรโดยชั่งกรดแกลลิก 0.010 กรัม ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยปิเปต stock solution มา 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 10 มิลลิลิตร
4) เตรียมสารละลายสารสกัดโดยการละลายด้วยน้ำ ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 0.002มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
5) นำสารละลายมาตรฐานและสารสกัดมา 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 4 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 50 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกและแสดงผลเป็นค่ากรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (mg of gallic acid equivalent/ g extract)

3.10 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content)

วิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminum chloride

1) เตรียมสารละลาย $AlCl_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร (10% v/v $AlCl_3$ reagent) โดยชั่ง $AlCl_3.6H_2O$ 18.10 กรัม และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร
2) เตรียมสารละลายโซเดียมอะซีเตตความเข้ม 1 โมลาร์ (1 M) โดยชั่ง $CH_3COONa.3H_2O$ มา 13.61 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
3) เตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิตินความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่ง 20 มิลลิกรัมละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยปิเปต stock solution มา 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 10 มิลลิลิตร
4) เตรียมสารละลายสารสกัดโดยการละลายด้วยเอทานอล ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 0.004 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

5) นำสารละลาย $AlCl_3$ 10 ไมโครลิตรใส่ลงใน 96-well plate เติมสารละลายมาตรฐานและสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตต (CH_3COONa) 50 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเคอร์ซิตินและแสดงผลเป็นค่าเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (mg of quercetin equivalent / g extract)

3.11 การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน (Total anthocyanin content)

การวิเคราะห์หา Total anthocyanin content จากวิธี pH-differential ดัดแปรงมาจากวิธีของ (Lee, Durst, Wrolstad, & Collaborators, 2005)

1) เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH เท่ากับ 1.0 หรือ Potassium chloride (0.025M) โดยชั่ง Potassium chloride 0.186 g ใส่ลงใน beaker เติมน้ำ 95 mL นำไปวัด pH แล้วปรับให้ได้ pH 1.0 (±0.05) ด้วย hydrochloric acid นำสารละลายบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH แล้วปรับปริมาตรสารละลายโดยใช้น้ำ DI จนครบ 100 mL
2) เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 หรือ Sodium acetate (0.4M) โดยชั่ง Sodium acetate 5.443 g ใส่ลงในบีกเกอร์เกอร์ เติมน้ำ 95 mL นำไปวัด pH แล้วปรับให้ได้ pH 4.5 (± 0.05) ด้วย hydrochloric acid นำสารละลายบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH แล้วปรับปริมาตรสารละลายโดยใช้น้ำ DI จนครบ 100 mL
3) เตรียมสารละลายสารสกัดโดยการละลายด้วยเอทานอล ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 0.0005 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
4) เติมสารละลายมาตรฐานและสารสกัดปริมาตร 40 µL และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 160 µL ทำเช่นเดียวกันทั้ง pH 1.0 และ pH 4.5 โดยทำการทดสอบแต่ละตัวอย่าง 3 ครั้ง แล้วนำไปบ่มในที่มืด 30 นาที จากนั้นนำไปวัดความสามารถการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ความยาวคลื่น 510, 700 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณ โดยที่ $A = (A_{510nm} - A_{700nm})\ pH1.0 - (A_{510nm} - A_{700nm})\ pH4.5$ เมื่อได้ค่า A นำไปแทนค่าหาปริมาณของแอนโทไซยานินจากสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของ cyanidin-3-o-glucoside ตามสมการ $y = 0.5611x - 0.0151$

บทที่ 4
ผลดำเนินการวิจัย

ลักษณะตัวอย่างสมุนไพร

ตัวอย่างของสมุนไพรจากต้นพิลังกาสาที่สวนสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ภาพประกอบ 11 แสดงตัวอย่างผลพิลังกาสาสวนสมุนไพรจากคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การเตรียมตัวอย่าง

นำผลพิลังกาสามาทำการแกะเนื้อแยกจากเมล็ดแล้วนำมาตากแห้ง จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่อง blender จนละเอียด จากนั้นทำการแร่งโดยใช้แร่งเบอร์ 40 จนได้เป็นผงสมุนไพรดังภาพประกอบ

ภาพประกอบ 12 แสดงผงสมุนไพรจากผลพิลังกาสา

ค่าร้อยละปริมาณของสารสกัดสมุนไพร

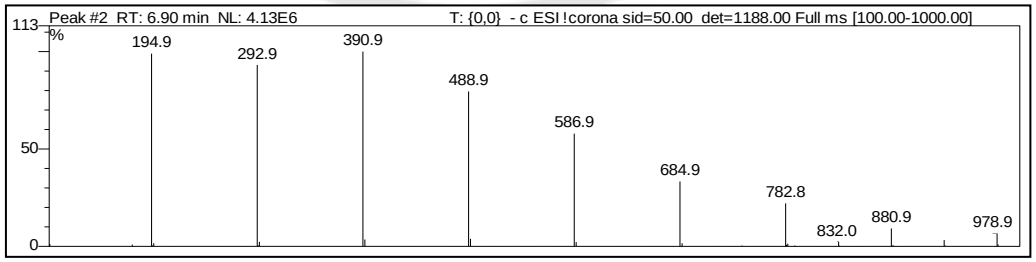
ผลการสกัดสมุนไพรผลพิลังกาสาโดยใช้ ethyl acetate มี %yield คิดเป็นร้อยละ 4.35 ± 0.67 ส่วนการสกัดสมุนไพรผลพิลังกาสาโดยใช้ ethanol มี %yield คิดเป็นร้อยละ 10.15 ± 1.55 และการสกัด สมุนไพรผลพิลังกาสาโดยใช้น้ำ มี %yield คิดเป็นร้อยละ 0.15 ± 0.03 ดังตาราง

ตาราง 10 แสดงร้อยละปริมาณของสารสกัดสมุนไพรผลพิลังกาสา

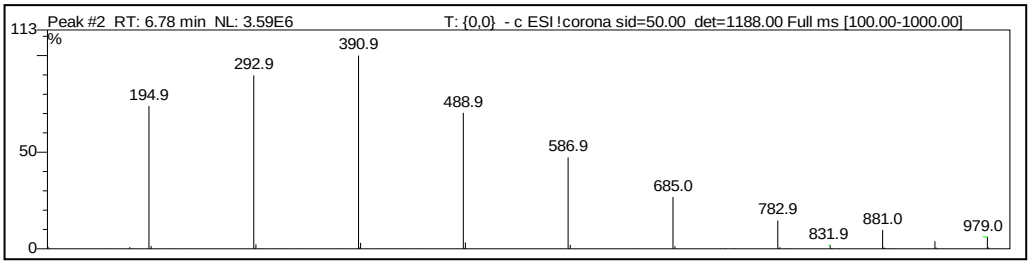
ตัวทำละลาย	น้ำหนักสมุนไพร (กรัม)	น้ำหนักสาร (กรัม)	%yield
Ethyl acetate		2.17 ± 0.33	4.35 ± 0.67
Ethanol	50 ± 0.02	5.08 ± 0.77	10.15 ± 1.55
น้ำ		0.07 ± 0.02	0.15± 0.03

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเครื่อง HPLC-MS ของ cyanidin-3-O-glucoside

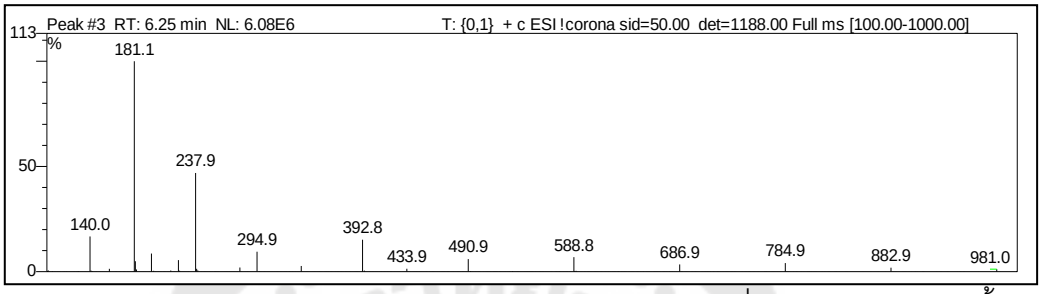
เมื่อทำการเปรียบเทียบ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside กับ Mass spectrum ของสารสกัดผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วย ethanol และน้ำ ซึ่งตัวทำละลายมีขั้วใกล้เคียงกับ cyanidin-3-O-glucoside พบว่าสารสกัดผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วย ethanol มีรูปแบบการแตกตัวเป็นพีคที่มวลโมเลกุลต่างๆ มีความใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside ดังภาพประกอบ 13-15



ภาพประกอบ 13แสดง Mass spectrum ของสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside



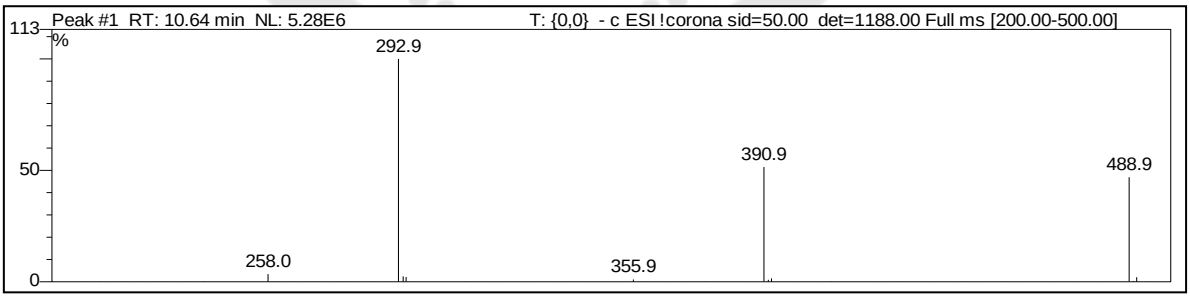
ภาพประกอบ 14 แสดง Mass spectrum ของสารสกัดผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วย ethanol



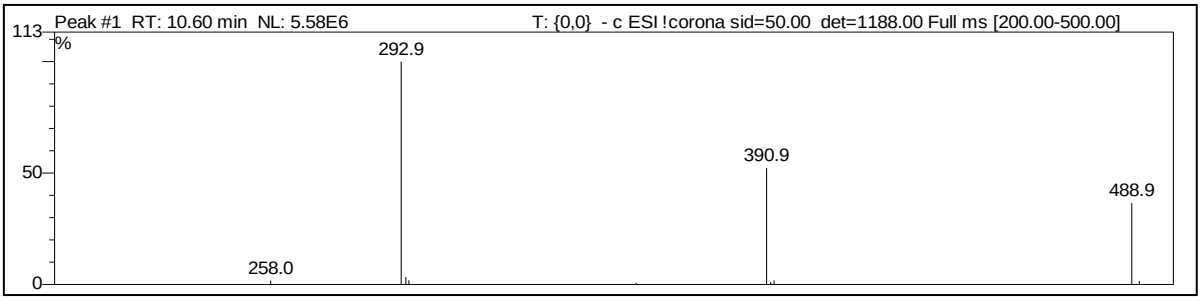
ภาพประกอบ 15 แสดง Mass spectrum ของสารสกัดผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเครื่อง HPLC-MS ของ embelin

เมื่อทำการเปรียบเทียบ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน embelin กับ Mass spectrum ของสารสกัดผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วย ethyl acetate ซึ่งตัวทำละลายมีขั้วใกล้เคียงกับ embelin พบว่าสารสกัดผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วย ethyl acetate มีรูปแบบการแตกตัวเป็นพีคที่มวลโมเลกุลต่างๆ มีความใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน embelin ดังภาพประกอบ 16-17



ภาพประกอบ 16 แสดง Mass spectrum ของสารมาตรฐาน embelin



ภาพประกอบ 17 แสดง Mass spectrum ของสารสกัดผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วย Ethyl acetate

ผลการทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)ของ cyanidin-3-O-glucoside

เมื่อนำสารมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์ดังตาราง 5 ทำการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซ้ำ 6 ครั้ง และบันทึกค่าเฉลี่ยของ system suitability parameter ต่างๆ ได้แก่ Resolution (Rs), Tailing factor (T), Number of theoretical plate (N), Relative standard deviation (%RSD) ได้ผลดังตาราง 11

ตาราง 11 แสดง parameter ที่ทดสอบความเหมาะสมของระบบวิธีวิเคราะห์ cyanidin-3-o-glucoside

Parameter	Guideline	cyanidin-3-O-glucoside (±RSD)
Peak area	-	1.1993 ± 0.78
Retention time	-	6.81 ± 0.41
Symmetry factor	≤2	0.87
Column efficiency (N)	≥2000	3536 ± 1.11
Resolution (Rs)	≥2	-
%RSD	≤2	0.78

ผลการทดสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability)ของ embelin

เมื่อนำสารมาตรฐาน embelin มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์ดังตาราง 7 ทำการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซ้ำ 6 ครั้ง และบันทึก

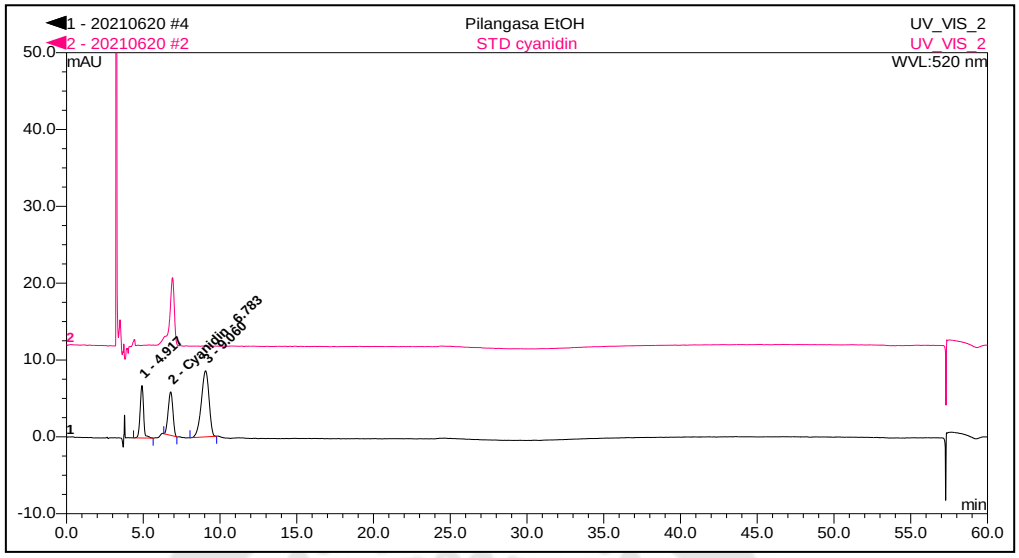
ค่าเฉลี่ยของ system suitability parameter ต่างๆ ได้แก่ Resolution (Rs), Tailing factor (T), Number of theoretical plate (N), Relative standard deviation (%RSD) ได้ผลดังตาราง 12

ตาราง 12 แสดง parameter ที่ทดสอบความเหมาะสมของระบบวิธีวิเคราะห์ embelin

Parameter	Guideline	embelin (±RSD)
Peak area	-	0.8511 ± 1.11
Retention time	-	10.56 ± 0.02
Symmetry factor	≤2	1.87
Column efficiency (N)	≥2000	32463 ± 0.95
Resolution (Rs)	≥2	-
%RSD	≤2	1.11

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) ของ cyanidin-3-o-glucoside

1. Specificity (ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์) เป็นการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ เพื่อดูว่าวิธีวิเคราะห์สามารถแยกสารที่ต้องการได้ และพีคของสารอื่น ๆ จะต้องไม่รบกวนพีคของสารสำคัญหรือสารที่สนใจนำสารสกัดผลพิลังกาสา โดยทำการเปรียบเทียบ retention time ของพีค cyanidin-3-O-glucoside ในสารละลายมาตรฐาน cyanidin-3-O-glucoside กับ สารสกัดผลพิลังกาสา โดยเลือกใช้สารสกัดผลพิลังกาสาที่ใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายมาทำการทดสอบ ดังภาพประกอบ และทำการบันทึกค่า retention time และ peak purity factor ดังตาราง 13



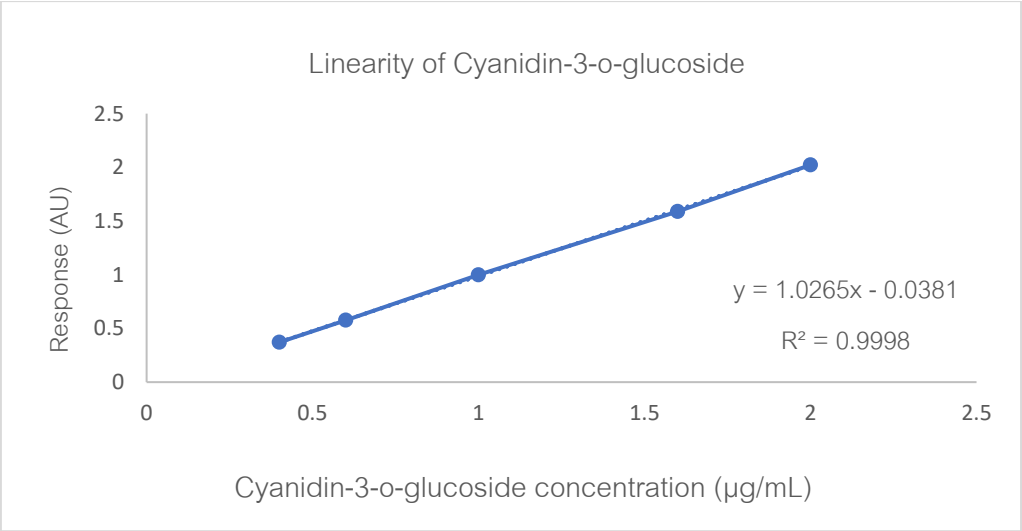
ภาพประกอบ 18 แสดง Chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน cyanidin-3-o-glucoside (บน) และสารสกัดผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วย ethanol (ล่าง)

ตาราง 13 แสดง retention time และ peak purity factor

สารละลาย	Retention time	Peak purity factor
cyanidin-3-O-glucoside STD	6.903	1000
สารสกัดผลพิลังกาสา	6.777	995

2. Linearity and range (เป็นการตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์)

ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน cyanidin-3-o-glucoside ที่ความเข้มข้น 0.4 - 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ UV เป็น detector ที่ความยาวคลื่น 520 nm เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) พบว่าสมการของแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของ cyanidin-3-O-glucoside y = 1.0265x - 0.0381 โดยมีค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9998 ดังภาพประกอบ และตาราง 14



ภาพประกอบ 19 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของ Cyanidin-3-o-glucoside

ตาราง 14 แสดงสมการเชิงเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานและ coefficient of determination (R^2)

สารมาตรฐาน	**ความเข้มข้น** (µg/mL)	**สมการ**	R^2
Cyanidin-3-o-glucoside	0.4 – 2.0	y = 1.0265x - 0.0381	0.9998

3. Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ)

ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (LOD) สามารถหาได้จากการแทนค่าในสูตร LOD = 3.3**σ**/S โดย **σ** คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัดแกน y และ S คือ slopeของกราฟมาตรฐาน ค่า LOD ของ cyanidin-3-o-glucoside มีค่าเท่ากับ 0.104 µg/mL

ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) สามารถหาได้จากการแทนค่าในสูตร LOQ = 10**σ**/S โดย **σ** คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัดแกน y และ S คือ slope ของกราฟมาตรฐาน ค่า LOQ ของ cyanidin-3-o-glucoside มีค่าเท่ากับ 0.316 µg/mL

4. Accuracy (ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์)

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ที่ 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่ามีค่า %recovery ของ

cyanidin-3-o-glucoside อยู่ในช่วง 96.74 – 101.32% ซึ่งเกณฑ์ของ AOAC ระบุว่าควรอยู่ในช่วง 92-105% ดังนั้น cyanidin-3-o-glucoside มีค่า %recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ระบุไว้ ดังตาราง 15

ตาราง 15 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ความเข้มข้น	%Recovery			ค่าเฉลี่ย (±SD)	%RSD
(µg/mL)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.4	99.30	101.32	99.65	100.09 ± 1.08	1.08
1.0	97.71	97.92	96.74	97.46 ± 0.63	0.65
2.0	100.04	100.13	98.79	99.65 ± 0.75	0.75

5. Precision (ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์)

การทดสอบตวามแม่นยำของวิธีวิเคราะห์โดยทำการทดสอบสารละลายมาตรฐาน cyanidin-3-o-glucoside ที่ 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.4, 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ (Intraday precision) พบว่า มีค่า 96.51 – 102.18% และค่ามี %RSD อยู่ในช่วง 0.10-1.80 ดังตาราง 16 และทำการทดสอบซ้ำ 3 วัน (Inter day precision) พบว่า มีค่า 93.18 – 100.35% และค่ามี %RSD อยู่ในช่วง 1.60-1.93 ดังตาราง 17 ซึ่งผ่านตามเกณฑ์ของ AOAC ที่ระบุว่าค่า RSD ต้องมีค่าน้อยกว่า 2%

ตาราง 16 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Intraday precision)

ความเข้มข้น	%Recovery			ค่าเฉลี่ย (±SD)	%RSD
(µg/mL)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.4	102.18	100.29	98.58	100.35 ± 1.80	1.80
1.0	96.72	96.63	96.51	96.62 ± 0.10	0.10
2.0	98.38	98.61	98.50	98.50 ± 0.12	0.12

ตาราง 17 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Inter day precision)

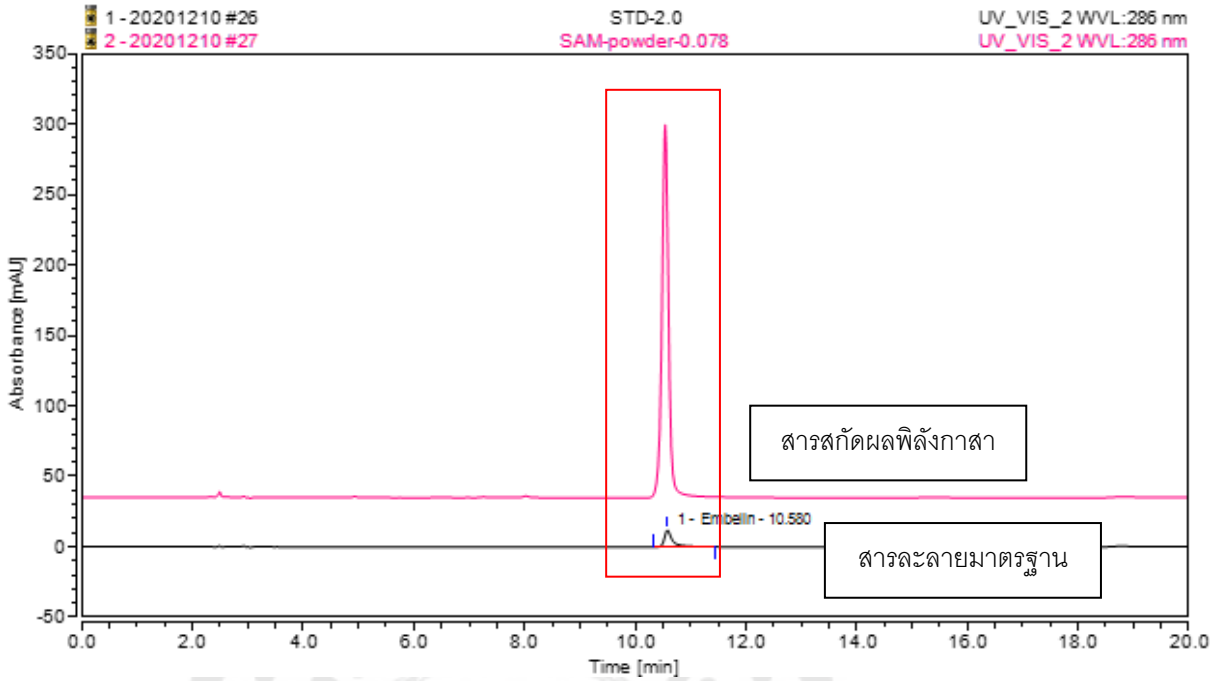
ความเข้มข้น (µg/mL)	%Recovery			ค่าเฉลี่ย (±SD)	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.4	100.35	97.57	96.73	98.22 ± 1.80	1.93
1.0	95.41	96.21	93.18	94.74 ± 1.52	1.60
2.0	98.50	95.65	95.03	96.39 ± 0.12	1.92

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ cyanidin-3-o-glucoside ในสารสกัดผลพิลังกาสา

นำวิธีวิเคราะห์ที่ทำการตรวจสอบความถูกต้องแล้วไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณ cyanidin-3-o-glucoside ในสารสกัดผลพิลังกาสาที่ทำการสกัดด้วย ethanol และน้ำ พบว่าปริมาณ cyanidin-3-o-glucoside ในสารสกัดผลพิลังกาสาที่ทำการสกัดด้วย ethanol มีค่าเท่ากับ 4.66 ± 1.68 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด ส่วนสารสกัดผลพิลังกาสาที่ทำการสกัดด้วยน้ำ ไม่พบพีคของ cyanidin-3-o-glucoside

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) ของ embelin

1. Specificity (ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์) เป็นการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ เพื่อดูว่าวิธีวิเคราะห์สามารถแยกสารที่ต้องการได้ และพีคของสารอื่น ๆ จะต้องไม่รบกวนพีคของสารสำคัญหรือสารที่สนใจนำสารสกัดผลพิลังกาสา โดยทำการเปรียบเทียบ retention time ของพีค embelin ในสารละลายมาตรฐาน embelin กับ สารสกัดผลพิลังกาสา โดยเลือกใช้สารสกัดผลพิลังกาสาที่ใช้ ethyl acetate เป็นตัวทำละลายมาทำการทดสอบ ดังภาพประกอบ 20 และทำการบันทึกค่า retention time และ peak purity factor ดังตาราง 18



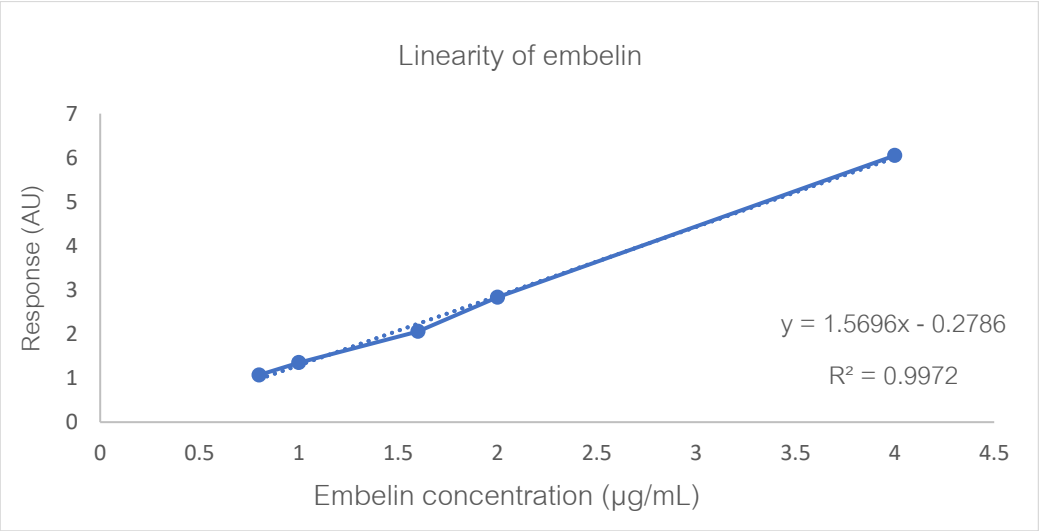
ภาพประกอบ 20 แสดง Chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน embelin (ล่าง) และสารสกัดผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วย ethyl acetate (บน)

ตาราง 18 แสดง retention time และ peak purity factor

สารละลาย	Retention time	Peak purity factor
embelin STD	10.64	1000
สารสกัดผลพิลังกาสา	10.58	1000

2. Linearity and range (เป็นการตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์)

ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน embelin ที่ความเข้มข้น 0.8 – 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ UV เป็น detector ที่ความยาวคลื่น 286 nm เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) พบว่าสมการของแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของ embelin คือ y = 1.5696x - 0.2786 โดยมีค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9972 ดังภาพประกอบ และตาราง 19



ภาพประกอบ 21 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของ embelin

ตาราง 19 แสดงสมการเชิงเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานและ coefficient of determination (R^2)

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (µg/mL)	สมการ	R^2
embelin	0.8 – 4.0	y = 1.5696x - 0.2786	0.9972

3. Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ)

ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (LOD) สามารถหาได้จากการแทนค่าในสูตร LOD = 3.3**σ**/S โดย **σ** คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัดแกน y และ S คือ slopeของกราฟมาตรฐาน ค่า LOD ของ embelin มีค่าเท่ากับ 0.013 µg/mL

ความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) สามารถหาได้จากการแทนค่าในสูตร LOQ = 10**σ**/S โดย **σ** คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัดแกน y และ S คือ slopeของกราฟมาตรฐาน ค่า LOQ ของ embelin มีค่าเท่ากับ 0.039 µg/mL

4. Accuracy (ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์)

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.8, 2.0 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ที่ 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่ามีค่า %recovery ของ embelin อยู่ในช่วง 95.88 – 98.85% ซึ่งเกณฑ์ของ AOAC ระบุว่าควรอยู่ในช่วง 95-102% ดังนั้น embelin มีค่า %recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ระบุไว้ ดังตาราง 20

ตาราง 20 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ความเข้มข้น	%Recovery			ค่าเฉลี่ย (±SD)	%RSD
(µg/mL)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.8	98.85	96.68	95.88	97.14 ± 1.54	1.58
2.0	96.32	98.52	99.13	97.99 ± 1.48	1.51
4.0	98.18	96.85	96.94	97.33 ± 0.74	0.77

5. Precision (ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์)

การทดสอบตวามแม่นยำของวิธีวิเคราะห์โดยทำการทดสอบสารละลายมาตรฐาน embelin ที่ 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.8, 1.6 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ (Intraday precision) พบว่า มีค่า 97.27 – 102.15% และค่ามี %RSD อยู่ในช่วง 0.70-0.92 ดังตาราง 21 และทำการทดสอบซ้ำ 3 วัน (Inter day precision) พบว่า มีค่า 96.59 – 101.30% และค่ามี %RSD อยู่ในช่วง 0.65-1.21 ดังตาราง 22 ซึ่งผ่านตามเกณฑ์ของ AOAC ที่ระบุว่าค่า RSD ต้องมีค่าน้อยกว่า 2%

ตาราง 21 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Intraday precision)

ความเข้มข้น	%Recovery			ค่าเฉลี่ย (±SD)	%RSD
(µg/mL)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0.8	101.39	100.34	102.15	101.30 ± 0.91	0.90
1.6	97.27	98.65	97.73	97.88 ± 0.70	0.72
4.0	99.17	100.77	100.76	100.23 ± 0.92	0.92

ตาราง 22 แสดงผลการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Inter day precision)

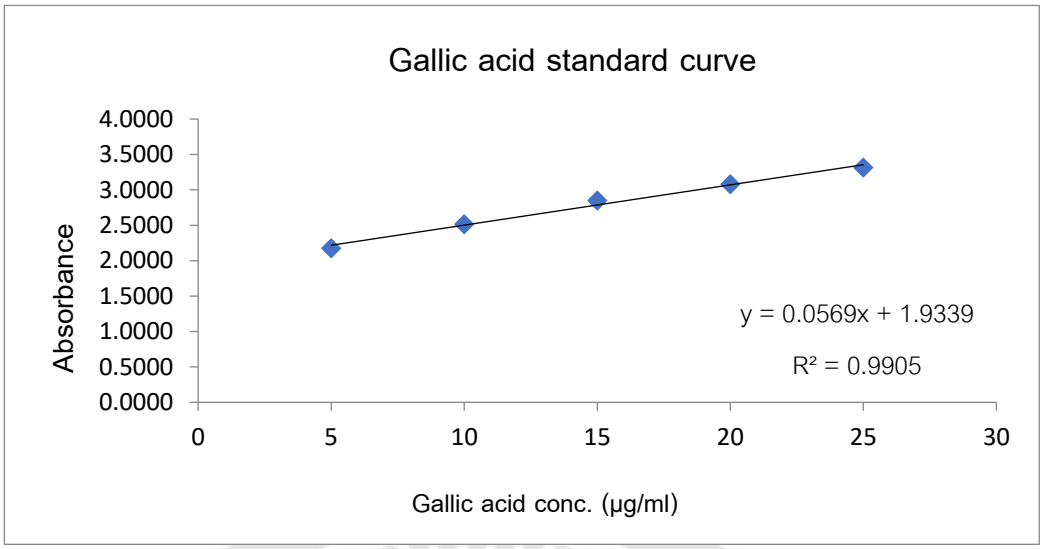
ความเข้มข้น (µg/mL)	%Recovery ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย (±SD)	%RSD
0.8	101.30	99.08	99.35	99.91 ± 1.21	1.21
1.6	97.88	96.59	98.53	97.67 ± 0.99	1.02
4.0	100.23	99.05	99.17	99.49 ± 0.65	0.65

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ embelin ในสารสกัดผลพิลังกาสา

นำวิธีวิเคราะห์ที่ทำการตรวจสอบความถูกต้องแล้วไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณ embelin ในสารสกัดผลพิลังกาสาที่ทำการสกัดด้วย Ethyl acetate พบว่าปริมาณ embelin ในสารสกัดผลพิลังกาสาที่ทำการสกัดด้วย Ethyl acetate มีค่าเท่ากับ 565.27 ± 75.33 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิก (Total phenolic content)

การหาปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดผลพิลังกาสา โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric เทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟีนอลิก สร้างเป็นกราฟมาตรฐานดังภาพประกอบ เพื่อหาสมการความสมพันธ์เชิงเส้นตรงในการคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดผลพิลังกาสา ได้เป็น $y = 0.0569x + 1.9339$ โดยมีค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9905 ได้ปริมาณสารฟีนอลิกต่อกรัมของสารสกัดดังตาราง 23



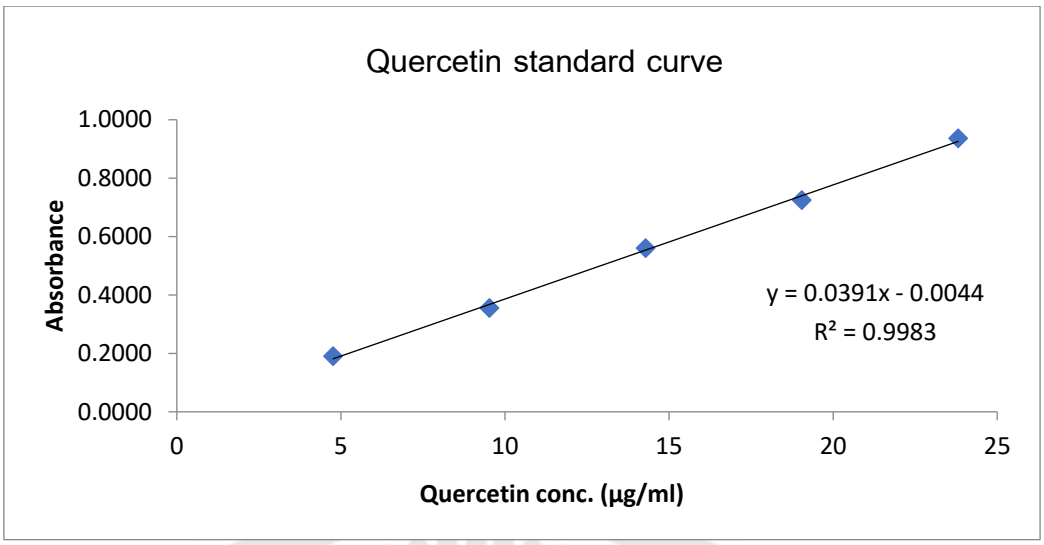
ภาพประกอบ 22 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน gallic acid

ตาราง 23 แสดงปริมาณ Total phenolic content จากสารสกัดผลพิลังกาสา

ตัวทำละลาย	**มิลลิกรัมสมมูลของ gallic acid ต่อกรัมของสารสกัด (mean ± SD) (mg GAE/g crude extract)**
Ethyl acetate	39.22 ± 6.32
Ethanol	27.80 ± 3.91
น้ำ	2.87 ± 0.62

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content)

การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม ในสารสกัดผลพิลังกาสา โดยใช้วิธี aluminium chloride method เทียบกับสารมาตรฐาน quercetin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ สร้างเป็นกราฟมาตรฐานดังภาพประกอบ เพื่อหาสมการความสมพันธ์เชิงเส้นตรงในการคำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม ในสารสกัดผลพิลังกาสา ได้เป็น เป็น $y = 0.0391x + 0.0044$ โดยมีค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9983 ได้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมต่อกรัมของสารสกัดดังตาราง 24



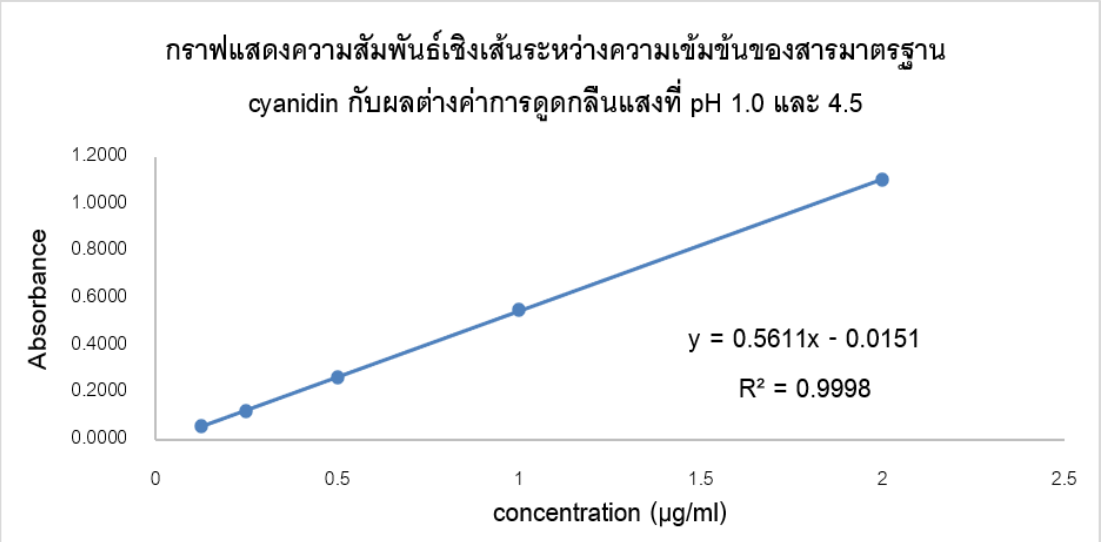
ภาพประกอบ 23 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน quercetin

ตาราง 24 แสดงปริมาณ Total flavonoid content จากสารสกัดผลพิลังกาสา

ตัวทำละลาย	**มิลลิกรัมสมมูลของ quercetin ต่อกรัมของสารสกัด (mean ± SD) (mg QE/g crude extract)**
Ethyl acetate	4.78 ± 0.53
Ethanol	3.28 ± 0.45
น้ำ	1.03 ± 0.07

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินรวม (Total anthocyanin content)

การหาปริมาณแอนโทไซยานินรวม ในสารสกัดผลพิลังกาสา โดยใช้วิธี pH-differential เทียบกับสารมาตรฐาน cyanidin-3-o-glucoside ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน ที่ pH 1.0 และ 5.0 สร้างเป็นกราฟมาตรฐานดังภาพประกอบ เพื่อหาสมการความสมพันธ์เชิงเส้นตรงในการคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินรวม ในสารสกัดผลพิลังกาสา ได้เป็น y = 0.5611x + 0.00151 โดยมีค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9998 ได้ปริมาณแอนโทไซยานินรวม ต่อกรัมของสารสกัดดังตาราง 25



ภาพประกอบ 24 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน cyanidin-3-o-glucoside

ตาราง 25 แสดงปริมาณ Total anthocyanin content จากสารสกัดผลพิลังกาสา

ตัวทำละลาย	มิลลิกรัมสมมูลของ cyanidin-3-o-glucoside ต่อกรัมของ สารสกัด (mean ± SD) (mg C-3-GE/g crude extract)
Ethyl acetate	ไม่พบ
Ethanol	3.39 ± 0.34
น้ำ	0.04 ± 0.00

เปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญที่ทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด

ทำการเปรียบเทียบปริมาณ Total phenolic content, Total flavonoid content และ Total anthocyanin content ที่ทำการสกัดด้วย ethyl acetate, ethanol และน้ำ ดังตาราง 26 โดยใช้สถิติ independent t-test โดยทำการเปรียบเทียบเป็นคู่ได้ผลดังตาราง 26-29

ตาราง 26 แสดงปริมาณสารสำคัญจากสารสกัดผลพิลังกาสาโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ

สารตัวอย่าง	**ครั้งที่สกัด**	Total flavonoid content (mg QE /g crude extract)	Total phenolic content (mg GAE/g crude extract)	Total anthocyanin content (mg C-3-GE/g crude extract)
Ethyl acetate	1	4.2304	34.6463	ไม่พบ
	2	4.8223	36.5800	ไม่พบ
	3	5.2811	46.4284	ไม่พบ
	Mean	4.7779	39.2182	ไม่พบ
	SD	0.5267	6.3186	-
Ethanol	1	2.9087	25.9994	3.1876
	2	3.7914	32.2874	3.7864
	3	3.1672	25.1232	3.2051
	Mean	3.2891	27.8033	3.3930
	SD	0.4538	3.9079	0.3408
น้ำ	1	1.0760	2.7405	0.0419
	2	0.9520	2.3171	0.0451
	3	1.0713	3.5412	0.0438
	Mean	1.0331	2.8663	0.0436
	SD	0.0703	0.6217	0.0016

ตาราง 27 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณ Total flavonoid content ระหว่างตัวทำละลายชนิดต่างๆทางสถิติด้วยสถิติ independent t-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

คู่ที่	ตัวทำละลาย	n	Mean	SD	T	df	Sig.
1	Ethyl acetate	3	4.7779	0.28	3.7090	4	0.0207
	Ethanol	3	3.2891	0.21			
2	Ethyl acetate	3	3.2891	0.28	12.2061	4	0.0003
	น้ำ	3	1.0331	0.00			
3	Ethanol	3	3.2891	0.21	8.5086	4	0.0010
	น้ำ	3	1.0331	0.00			

ตาราง 28 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณ Total phenolic content ระหว่างตัวทำละลายชนิดต่างๆทางสถิติด้วยสถิติ independent t-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

คู่ที่	ตัวทำละลาย	n	Mean	SD	T	df	Sig.
1	Ethyl acetate	3	39.2182	39.93	2.6612	4	0.0563
	Ethanol	3	27.8033	15.27			
2	Ethyl acetate	3	39.2182	39.93	9.9168	4	0.0006
	น้ำ	3	2.8663	0.39			
3	Ethanol	3	27.8033	15.27	10.9152	4	0.0004
	น้ำ	3	2.8663	0.39			

ตาราง 29 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณ Total anthocyanin content ระหว่างตัวทำละลายชนิดต่างๆทางสถิติด้วยสถิติ independent t-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

ตัวทำละลาย	n	Mean	SD	T	df	Sig.
Ethanol	3	3.3930	0.12	17.0238	4	$7x10^{-5}$
น้ำ	3	0.0436	0.00			

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารสกัดจากผลพิลังกาสาเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ embelin และ cyanidin-3-o-glucoside โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งอ้างอิงตามเกณฑ์ ICH guideline และผลการทวนสอบวิธีอ้างอิงตามเกณฑ์ AOAC guideline โดยก่อนนำวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ embelin และ cyanidin-3-o-glucoside มาทำการการตรวจสอบความถูกต้อง ได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณของสารทั้ง 2 ชนิดนี้ โดยการวิธีวิเคราะห์ในเชิงคุณภาพ ได้นำเทคนิคแมสสเปคโทรโฟโตมิเตอร์มาใช้ร่วมกับเทคนิค HPLC ด้วย เพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารทั้ง 2 ชนิด

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร cyanidin-3-o-glucoside โดยใช้เทคนิคแมสสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ร่วมกับ HPLC โดยทำการดัดแปลงสภาวะการวิเคราะห์จากงานวิจัยของ (Su et al., 2019)) ซึ่งเทคนิค HPLC ใช้ 0.1% phosphoric acid และ acetonitrile เป็น mobile phase ที่มีสัดส่วนเปลี่ยนแปลงที่เวลาต่าง ๆ (gradient) ดังตาราง 4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 210, 286 และ 520 นาโนเมตร ส่วนเทคนิคแมสสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ใช้ ESI/MS เป็น detector โดยทำการเทียบแมสสเปคตรัมระหว่างสารสกัดผลพิลังกาสากับสารมาตรฐาน cyanidin-3-o-glucoside จากการทดสอบพบว่าระยะเวลา (retention time) ที่สาร cyanidin-3-o-glucoside ถูกตรวจพบที่เวลา 6.90 นาที ซึ่งพบพีคที่ retention time ใกล้เคียงกันในโครมาโตแกรมของสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethanol และแมสสเปคตรัมของสารมาตรฐาน cyanidin-3-o-glucoside มีความใกล้เคียงกับ แมสสเปคตรัมของสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethanol เช่นกัน

ส่วนการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร embelin ทำการดัดแปลงสภาวะการวิเคราะห์จากงานวิจัยของ (Su et al., 2019)) ซึ่งมีการปรับสัดส่วน mobile phase ที่เวลาต่าง ๆ (gradient) ดังตาราง 9 โดยทำการเทียบแมสสเปคตรัมระหว่างสารสกัดผลพิลังกาสากับสารมาตรฐาน embelin จากการทดสอบพบว่าระยะเวลา (retention time) ที่สาร embelin ถูกตรวจพบที่เวลา 10.58 นาที ซึ่งพบพีคที่ retention time ใกล้เคียงกันในโครมาโตแกรมของสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethyl acetate และแมสสเปคตรัมของสารมาตรฐาน embelin มีความใกล้เคียงกับ แมสสเปคตรัมของสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethyl acetate เช่นกัน

ความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ (system suitability) ที่ใช้ในงานนี้อ้างอิงตามเกณฑ์ USP37 โดยวิธีวิเคราะห์สาร cyanidin-3-o-glucoside ตามตาราง 5 มีค่า symmetry factor เท่ากับ 0.87 และค่าcolumn efficiency เท่ากับ 3535 ค่า RSD มีค่าเท่ากับ 0.78% พิจารณาข้อกำหนดถือว่าผ่านเกณฑ์ของ USP37 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์สาร embelin มีความเหมาะสมต่อระบบเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ส่วนวิธีวิเคราะห์สาร embelin ตามตาราง 5 มีค่า symmetry factor เท่ากับ 1.87 และค่าcolumn efficiency เท่ากับ 32463 ค่า RSD มีค่าเท่ากับ 1.11% พิจารณาข้อกำหนดถือว่าผ่านเกณฑ์ของ USP37 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์สาร embelin มีความเหมาะสมต่อระบบเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์เช่นกัน

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) สาร cyanidin-3-o-glucoside และ embelin ในหัวข้อความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Specificity) ของสาร cyanidin-3-o-glucoside มีค่า peak purity factor เท่ากับ 995 ส่วนสาร embelin มีค่า peak purity factor เท่ากับ 1000 ในหัวข้อความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของสาร cyanidin-3-o-glucoside ในช่วงความเข้มข้น 0.4-2.0 µg/mL ได้สมการของแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง y = 1.0265x - 0.0381 ค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9998 ส่วน Linearity ของสาร embelin ในช่วงความเข้มข้น 0.8-4.0 µg/mL ได้สมการแสดงความสัมพันธ์ของ embelin คือ y = 1.5696x - 0.2786 โดยมีค่าcoefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9972 หัวข้อความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision) เป็นการทดสอบความแม่นยำของเครื่องมือ พบว่าค่า %RSD ของหัวข้อ Intra-day precision ของสาร cyanidin-3-o-glucoside มีค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.10-1.80 และ Inter day precision ของสาร cyanidin-3-o-glucoside มีค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.60-1.93 ส่วนสาร embelin หัวข้อ Intra-day precision มีค่า RSD อยู่ในช่วง 0.70-0.92 และ Inter day precision ของสาร embelin มีค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.65-1.21 ส่วนความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) มีค่า %recovery ของ cyanidin-3-o-glucoside อยู่ในช่วง 96.74 – 101.32% และ embelin อยู่ในช่วง 95.88 – 98.85% ซึ่งถือว่าผ่านเกณฑ์ของ AOAC ค่า LOD ของสาร cyanidin-3-o-glucoside และ embelin เท่ากับ 0.104 และ 0.013 µg/mL ตามลำดับ ส่วนค่า LOQ ของ cyanidin-3-o-glucoside และ embelin มีค่าเท่ากับ 0.316 และ 0.039 µg/mL ตามลำดับ

ปริมาณ cyanidin-3-o-glucoside ในสารสกัดผลพิลังกาสาที่ทำการสกัดด้วย Ethanol และน้ำ พบว่าปริมาณ cyanidin-3-o-glucoside ในสารสกัดผลพิลังกาสาที่ทำการสกัดด้วย Ethanol มีค่าเท่ากับ 4.66 ± 1.68 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด ส่วนสารสกัดผลพิลังกาสาที่ทำการสกัดด้วยน้ำ ไม่พบพีคของ cyanidin-3-o-glucoside ส่วนปริมาณ embelin ในสารสกัดผล

พิลังกาสาที่ทำการสกัดด้วย Ethyl acetate พบว่าปริมาณ embelin ในสารสกัดผลพิลังกาสาที่ทำการสกัดด้วย Ethyl acetate มีค่าเท่ากับ 565.27 ± 75.33 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด

การหาปริมาณ Total phenolic content จากสารสกัดผลพิลังกาสา พบว่าสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethyl acetate มีปริมาณ Total phenolic content อยู่ในช่วง 39.22 ± 6.32 mg GAE/g extract สารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethanol มีปริมาณ Total phenolic content อยู่ในช่วง 27.80 ± 3.91 mg GAE/g extract และสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วยน้ำ มีปริมาณ Total phenolic content อยู่ในช่วง 2.87 ± 0.62 mg GAE/g extract

การหาปริมาณ Total flavonoid content จากสารสกัดผลพิลังกาสา พบว่าสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethyl acetate มีปริมาณ Total flavonoid content อยู่ในช่วง 4.78 ± 0.53 mg QE/g extract สารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethanol มีปริมาณ Total flavonoid content อยู่ในช่วง 3.28 ± 0.45 mg QE/g extract และสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วยน้ำ มีปริมาณ Total flavonoid content อยู่ในช่วง 1.03 ± 0.07 mg QE/g extract

การหาปริมาณ Total anthocyanin content จากสารสกัดผลพิลังกาสา พบว่าสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethyl acetate ไม่พบ anthocyanin content สารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethanol มีปริมาณ Total anthocyanin content อยู่ในช่วง 3.39 ± 0.34 C-3-GE /g extract และสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วยน้ำ มีปริมาณ Total anthocyanin content อยู่ในช่วง 0.04 ± 0.00 mg C-3-GE /g extract

เมื่อเปรียบเทียบผลการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆที่มีต่อปริมาณ Total phenolic content ด้วยสถิติ independent t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าการสกัดด้วย ethyl acetate ให้ผลไม่แตกต่างกับการสกัดด้วย ethanol โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.0563 และการสกัดด้วย ethyl acetate ให้ผลต่างกับการสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.0006 ส่วนการสกัดด้วย ethanol ให้ผลต่างกับการสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.0004

เมื่อเปรียบเทียบผลการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆที่มีต่อปริมาณ Total flavonoid content ด้วยสถิติ independent t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าการสกัดด้วย ethyl acetate ให้ผลต่างกับการสกัดด้วย ethanol อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.0207 และการสกัดด้วย ethyl acetate ให้ผลต่างกับการสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า p-value เท่ากับ

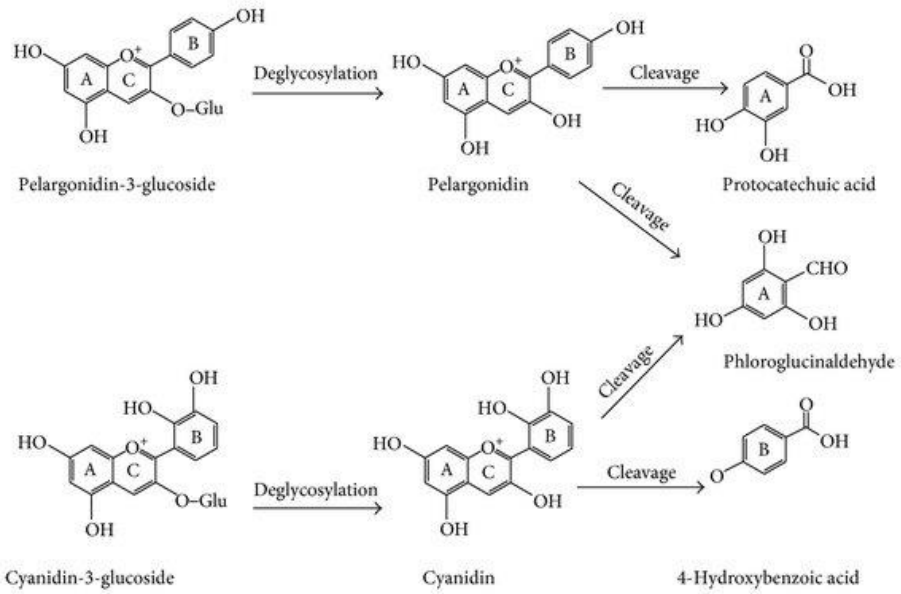
0.0003 ส่วนการสกัดด้วย ethanol ให้ผลต่างกับการสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.0010

เมื่อเปรียบเทียบผลการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆที่มีต่อปริมาณ Total flavonoid content ด้วยสถิติ independent t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าการสกัดด้วย ethanol ให้ผลต่างกับการสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า p-value เท่ากับ $7x10^{-5}$

อภิปรายผลการวิจัย

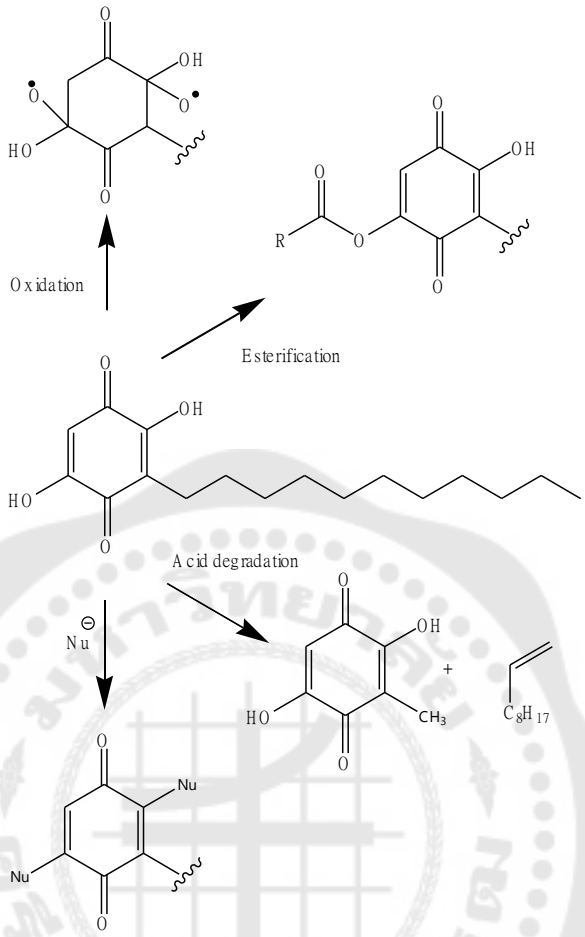
จากผลการวิจัยในการพิสูจน์เอกลักษณของสารสกัดผลพิลังกาสาพบว่าสารทั้ง 2 ชนิดมี retention time ที่ต่างกันอย่างมากเนื่องจากสภาพขั้วของ cyanidin-3-o-glucoside มีโครงสร้างที่มีขั้วสูง ส่วน embelin มีโครงสร้างที่มีขั้วต่ำ ทำให้ต้องมีการปรับสัดส่วนของ mobile phase เพื่อให้เหมาะสมในการวิเคราะห์สารทั้ง 2 ชนิดมากขึ้น ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยลง และการวิเคราะห์โดยการใช้ UV-Vis เป็น detector พบว่าการใช้ wavelength ที่ 520 nm มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ cyanidin-3-o-glucoside ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม anthocyanin เป็นสารที่มีสีม่วง ทำให้มีการดูดกลืนแสงที่มากและมีพีคของสารอื่นๆในกลุ่ม anthocyanin สามารถดูดกลืนแสงได้อีกด้วย ส่วน embelin wavelength ที่เหมาะสมคือ wavelength ที่ 286 nm เนื่องจากให้ peak area ที่มีความสม่ำเสมอในความเข้มข้นเดียวกัน

การวิเคราะห์สาร anthocyanin และ embelin (Ferreira & Laddha, 2013) ต้องป้องกันแสงและใช้อุณหภูมิต่ำในการสกัดและใช้เวลาไม่นานในการวิเคราะห์ เนื่องจากมีโครงสร้างhydroxy group สามารถเกิดปฏิกิริยา esterification กับกรดอินทรีย์ รวมถึงสามารถเกิด nucleophilic substitution ง่ายเมื่ออยู่ในรูปสารละลาย ในสภาวะกรดยังสามารถเกิดปฏิกิริยา dealkylation (Aamir, Ovissipour, Sablani, & Rasco, 2013) ดังแสดงในภาพประกอบ 25



ภาพประกอบ 25 รูปแบบการสลายตัวของ anthocyanin

ที่มา : Aamir และคณะ (2013)



ภาพประกอบ 26 รูปแบบการสลายตัวของ embelin

ที่มา : Ferreira และคณะ (2013)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณ Total phenolic content พบว่าในสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย ethyl acetate มีปริมาณมากที่สุดสอดคล้องกับการหาปริมาณ embelin โดยใช้เทคนิค HPLC ซึ่งพบว่ามี embelin ปริมาณมากเช่นกัน เนื่องจาก embelin มีโครงสร้างของ hydroxyl group ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ทำให้มีปริมาณ Total phenolic content สูง เช่นเดียวกับปริมาณ Total flavonoid content ในสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย ethyl acetate มีปริมาณสูงเนื่องจาก embelin มีโครงสร้างของ hydroxyl group ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ Aluminium chloride colorimetric test (Stasiuk & Kozubek, 2011)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณ Total flavonoid content พบว่าในสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย ethyl acetate มีปริมาณใกล้เคียงกับสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethanol อาจเนื่องมาจาก

ตัวทำละลาย 2 ชนิดนี้สามารถสกัดสารในกลุ่ม flavonoid ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับการหาปริมาณ Total anthocyanin content และการหาปริมาณ cyanidin-3-o-glucoside โดยใช้เทคนิค HPLC พบว่าสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethanol มีปริมาณมากที่สุดเนื่องจาก Ethanol เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วเหมาะสมในการสกัด anthocyanin ออกมา ซึ่ง anthocyanin เป็นสารในกลุ่ม flavonoid

เนื่องจากการสกัด anthocyanin ในงานวิจัยที่ผ่านมานิยมใช้ตัวทำละลายที่เป็นกรดมาทำการสกัด ส่งผลให้การนำกรดออกจากสารสกัดทำได้ยากและมีโอกาสตกค้างสูง เมื่อสังเกตผลของการสกัดสาร anthocyanin ด้วย ethanol พบว่าการสกัดด้วย ethanol นั้นให้ anthocyanin ปริมาณสูงได้เช่นกัน ดังนั้นการสกัดด้วย ethanol จึงเป็นตัวเลือกที่ดีในการสกัด anthocyanin เพราะสามารถหาสารได้จากห้องปฏิบัติการทั่วไป สามารถระเหยเพื่อกำจัดตัวทำละลายได้ง่าย ตกค้างน้อย และเป็นอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภคสารสกัดได้น้อยอีกด้วย นอกจากนี้ ethanol ยังสามารถสกัดสาร flavonoid และ phenolic ออกมาได้ดีไม่แตกต่างจาก ethyl acetate และมีความเป็นพิษน้อยกว่าดังนั้นจึงสามารถนำ ethanol ไปสกัดสารทั้ง 2 ชนิดนี้ได้

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร cyanidin-3-o-glucoside ด้วยเทคนิค HPLC และการวิเคราะห์หาปริมาณ Total flavonoid content ด้วย วิธี Aluminium chloride colorimetric assay และการหาปริมาณ Total anthocyanin content ด้วยวิธี pH-differential พบว่าสาร cyanidin-3-o-glucoside มีปริมาณใกล้เคียงปริมาณ Total flavonoids และ Total anthocyanin content เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยเทคนิค HPLC เป็นการวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำสูง และการวิเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยา Aluminium chloride colorimetric assay เป็นการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม flavonoids ทั้งหมดโดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง aluminium ion กับหมู่ keto และหมู่ hydroxyl หรือทำปฏิกิริยากับหมู่ dihydroxyl บนโครงสร้างของสาร flavonoids

ข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร cyanidin-3-o-glucoside และ embelin โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับแมสสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ โดยการเลือกพีคของมวลโมเลกุลที่มีความเข้มของสัญญาณสูงที่สุด มาทำการวิเคราะห์เพื่อเทียบปริมาณระหว่างสารมาตรฐานกับสารสกัดได้ นอกจากนี้อาจนำส่วนอื่นๆของพืชพิลังกาสามาทำการสกัดและศึกษาปริมาณสาร embelin เทียบกับที่ผล เนื่องจากมีงานวิจัยที่ระบุว่าส่วนใบและลำต้นนั้นมีการพบ embelin เช่นกัน เพื่อเป็นตัวเลือกที่เพิ่มขึ้นสำหรับประชาชนทั่วไปในการนำพิลังกาสาไปใช้ต่อไป

บรรณานุกรม

Aamir, M., Ovissipour, R., Sablani, S., & Rasco, B. (2013). Predicting the Quality of Pasteurized Vegetables Using Kinetic Models: A Review. *International Journal of Food Science,* 2013.

AOAC. (2002). *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary*

Supplements and Botanicals. In. https://members.aoac.org/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf)

Benabdallah, A., Rahmoune, C., Boumendjel, M., Aissi, O., & Messaoud, C. (2016). Total phenolic content and antioxidant activity of six wild Mentha species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,* 6(9), 760-766.

Burton-Freeman, B., Sandhu, A., & Edirisinghe, I. (2016). Anthocyanins (pp. 489-500).

Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M. C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2012). Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioproducts Processing,* 90(4), 615-623.

Chitra, M., Devi, C. S. S., & Sukumar, E. (2003). Antibacterial activity of embelin. *Fitoterapia,* 74(4), 401-403.

Edirisinghe, I., Banaszewski, K., Cappozzo, J., McCarthy, D., & Burton-Freeman, B. M. (2011). Effect of black currant anthocyanins on the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in vitro in human endothelial cells. *J Agric Food Chem,* 59(16), 8616-8624.

Ferreira, G., & Laddha, K. S. (2013). Stress degradation studies on embelin. *Indian journal of pharmaceutical sciences,* 75(2), 246-250.

Fu, Z.-f., Tu, Z.-c., Zhang, L., Wang, H., Wen, Q.-h., & Huang, T. (2016). Antioxidant activities and polyphenols of sweet potato (Ipomoea batatas L.) leaves extracted with solvents of various polarities. *Food Bioscience,* 15, 11-18.

Jianhong, C. (2011). Chemical and Pharmacological Studies of Ardisia Elliptica: Antiplatelet, Anticoagulant Activities and Multivariate Data Analysis for Drug Discovery. In.

Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res,* 61(1), 1361779.

Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E., & Collaborators. (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL,* 88(5), 1269-1278.

Matsumoto, H., Nakamura, Y., Tachibanaki, S., Kawamura, S., & Hirayama, M. (2003). Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin. *J Agric Food Chem,* 51(12), 3560-3563.

Meiers, S., Kemény, M., Weyand, U., Gastpar, R., von Angerer, E., & Marko, D. (2001). The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J Agric Food Chem,* 49(2), 958-962.

Phadungkit, M., & Vallisuta, O. (2006). Anti-Salmonella activity of constituents of Ardisia elliptica Thunb. *Natural product research,* 20, 693-696.

Pharmacopoeia., T. U. S. o. (2020). <621> *Chromatography*. In. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-6C3DF8B8-D12E-4253-A0E7-6855670CDB7B_1_en-US?source=TOC

Poojari, R. (2014). Embelin - a drug of antiquity: shifting the paradigm towards modern medicine. *Expert Opin Investig Drugs,* 23(3), 427-444.

Prasad, D. S. (2017). Embelin: A potential Benzoquinone. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research,* 8.

Sangsrichan, S. (2014). CH210 Chromatography. www.science.mju.ac.th/chemistry/download/s_sangsrichan/Ch210Chromatography2557_2.pdf

Stasiuk, M., & Kozubek, A. (2011). Embelin - a promising bioactive compound from the

Myrsinaceae family. *GLOBAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,* 2, 262-270.

Su, X., Griffin, J., Xu, J., Ouyang, P., Zhao, Z., & Wang, W. (2019). Identification and quantification of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato leaves. *Heliyon,* 5(6), e01964.

Yukongphan, P., Thitikornpong, W., Palanuvej, C., & Ruangrungsi, N.). The pharmacognostic specification of Ardisia elliptica fruits and their embelin contents by TLC image analysis compared to TLC densitometry.

กันต์กนิษฐ์ จงรัตนวิทย์. (2012). ผลของระยะการเจริญเติบโตต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แอนโธไซยานินทั้งหมด และความสามารถต้านออกซิเดชันของผลพิลังกาสา. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. (2553). พิลังกาสา. http://www.phargarden.com/

ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์. (2534). โครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง. home.kku.ac.th › chuare › HPLC

อรอุษา เชาวนลิขิต. (2011). การสกัดและวิธีการวิเคราะห์แอนโทไซยานิน (EXTRACTION AND ANALYSIS OF ANTHOCYANIN)3(6), 26-36.

อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล. (2020). แมสสเปกโทรเมตรี. http://pws.npru.ac.th/arunrat/data/files/ch7%20MS.pdf

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตาราง 30 แสดงปริมาณของสารสกัดสมุนไพรผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethyl acetate

	น้ำหนักสมุนไพร (กรัม)	น้ำหนักฟลาสก์ (กรัม)	น้ำหนักฟลาสก์ + สารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก (%w/w)
1	50.02	121.43	123.99	2.56	5.12
2	49.98	149.57	151.55	1.98	3.96
3	50.01	127.59	129.57	1.98	3.96
Mean	50.00	132.86	135.04	2.17	4.35
SD	0.02	14.79	14.57	0.33	0.67
%RSD	0.04	11.13	10.79	15.41	15.41

ตาราง 31 แสดงปริมาณของสารสกัดสมุนไพรผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethanol

	น้ำหนักสมุนไพร (กรัม)	น้ำหนักฟลาสก์ (กรัม)	น้ำหนักฟลาสก์ + สารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก (%w/w)
1	50.02	205.32	209.95	4.63	9.26
2	49.98	166.66	171.29	4.63	9.26
3	50.01	167.22	173.19	5.97	11.94
Mean	50.00	179.73	184.81	5.08	10.15
SD	0.02	22.16	21.79	0.77	1.55
%RSD	0.04	12.33	11.79	15.24	15.24

ตาราง 32 แสดงปริมาณของสารสกัดสมุนไพรผลพิลังกาสาที่สกัดด้วยน้ำ

	น้ำหนักสมุนไพร (กรัม)	น้ำหนักฟลาสก์ (กรัม)	น้ำหนักฟลาสก์ + สารสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก (%w/w)
1	50.02	165.40	165.34	0.06	0.12
2	49.98	123.95	123.88	0.07	0.14
3	50.01	171.99	171.9	0.09	0.18
Mean	50.00	153.78	153.71	0.07	0.15
SD	0.02	26.04	26.04	0.02	0.03
%RSD	0.04	16.94	16.94	20.83	20.83

ตาราง 33 แสดงความเหมาะสมของระบบในการวิเคราะห์ cyanidin-3-o-glucoside

	Retention time	Area	Symmetry factor	Column efficiency (N)	Resolution
1	6.770	1.2124	0.90	3485	-
2	6.793	1.2060	0.87	3510	-
3	6.813	1.1944	0.87	3545	-
4	6.827	1.1916	0.88	3551	-
5	6.840	1.1922	0.87	3587	-
6	6.770	1.2124	0.90	3485	-
Mean	6.8087	1.1993	0.87	3536	-
%RSD	0.41	0.78	1.25	1.11	-

ตาราง 34 แสดงความเหมาะสมของระบบในการวิเคราะห์ embelin

	Retention time	Area	Symmetry factor	Column efficiency (N)	Resolution
1	10.563	0.8394	1.86	31993	-
2	10.563	0.8425	1.85	32483	-
3	10.567	0.8501	1.87	32309	-
4	10.563	0.8516	1.78	32420	-
5	10.563	0.8592	1.81	32687	-
6	10.560	0.8640	1.85	32884	-
Mean	10.563	0.8511	1.838	32463	-
%RSD	0.02	1.11	1.83	0.95	-

ตาราง 35 แสดงผลความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ของ cyanidin-3-o-glucoside

ความเข้มข้น (µg/ml)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean	SD	%RSD
0.4	0.3605	0.3706	0.3823	0.3711	0.01	2.94
0.6	0.5553	0.5830	0.5902	0.5762	0.02	3.20
1	0.9902	0.9975	1.0089	0.9989	0.01	0.94
1.6	1.6155	1.5805	1.5718	1.5893	0.02	1.46
2	2.0483	2.0382	1.9806	2.0224	0.04	1.80

ตาราง 36 แสดงผลความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ของ embelin

ความเข้มข้น (µg/ml)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Mean	SD	%RSD
0.8	1.0520	1.0900	1.0660	1.0693	0.02	1.79
1	1.3666	1.3600	1.3235	1.3501	0.02	1.72
1.6	2.1282	2.0456	2.0024	2.0587	0.06	3.10
2	2.8137	2.8232	2.8631	2.8333	0.03	0.93
4	6.0786	6.0594	6.0116	6.0499	0.03	0.57

ตาราง 37 แสดงผลความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของ cyanidin-3-o-glucoside

ความเข้มข้น (µg/ml)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Conc.	%Amount	Mean	SD	%RSD
	0.2412	0.2344	0.2392	0.3972	99.30			
0.4	0.2436	0.2443	0.2427	0.4053	101.32	100.09	1.08	1.08
	0.2461	0.2350	0.2365	0.3986	99.65			
	0.6183	0.6153	0.6086	0.9771	97.71			
1.0	0.6203	0.6073	0.6186	0.9792	97.92	97.46	0.63	0.65
	0.6165	0.6103	0.5965	0.9674	96.74			
	1.2708	1.2757	1.2859	2.0008	100.04			
2.0	1.2849	1.2794	1.2716	2.0026	100.13	99.65	0.75	0.75
	1.2668	1.2622	1.2546	1.9758	98.79			

ตาราง 38 แสดงผลความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของ embelin

ความเข้มข้น (µg/ml)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Conc.	%Amount	Mean	SD	%RSD
	0.9781	0.9572	0.9527	0.7908	98.85			
0.8	0.9385	0.9349	0.9328	0.7734	96.68	97.14	1.54	1.58
	0.9377	0.9180	0.9204	0.7670	95.88			
	2.6499	2.7679	2.8174	1.9264	96.32			
2.0	2.7415	2.8335	2.8673	1.9704	98.52	97.99	1.48	1.51
	2.8137	2.8232	2.8631	1.9826	99.13			
	5.9630	5.7941	5.9002	3.9274	98.18			
4.0	5.8614	5.7222	5.8228	3.8741	96.85	97.33	0.74	0.77
	5.4666	6.0850	5.8714	3.8776	96.94			

ตาราง 39 แสดงค่าปริมาณ Total flavonoid content ทางสถิติด้วย independent t-test เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วย ethyl acetate และ ethanol

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	Ethyl acetate	Ethanol
Mean	4.7779	3.2891
Variance	0.28	0.21
Observations	3	3
Pooled Variance	0.2417	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	3.7090	
P(T<=t) one-tail	0.0103	
t Critical one-tail	2.1318	
P(T<=t) two-tail	0.0207	
t Critical two-tail	2.7764	

ตาราง 40 แสดงค่าปริมาณ Total flavonoid content ทางสถิติด้วย independent t-test เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วย ethyl acetate และน้ำ

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	Ethyl acetate	Water
Mean	4.7779	1.0331
Variance	0.28	0.00
Observations	3	3
Pooled Variance	0.1412	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	12.2061	
P(T<=t) one-tail	0.0001	
t Critical one-tail	2.1318	
P(T<=t) two-tail	0.0003	
t Critical two-tail	2.7764	

ตาราง 41 แสดงค่าปริมาณ Total flavonoid content ทางสถิติด้วย independent t-test เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วย ethanol และน้ำ

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	Ethanol	Water
Mean	3.2891	1.0331
Variance	0.21	0.00
Observations	3	3
Pooled Variance	0.105453	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	8.5086	
P(T<=t) one-tail	0.0005	
t Critical one-tail	2.1318	
P(T<=t) two-tail	0.0010	
t Critical two-tail	2.7764	

ตาราง 42 แสดงค่าปริมาณ Total phenolic content ทางสถิติด้วย independent t-test เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วย ethyl acetate และ ethanol

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	Ethyl acetate	Ethanol
Mean	39.2182	27.8033
Variance	39.93	15.27
Observations	3	3
Pooled Variance	27.5986	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	2.6612	
P(T<=t) one-tail	0.0282	
t Critical one-tail	2.1318	
P(T<=t) two-tail	0.0563	
t Critical two-tail	2.7764	

ตาราง 43 แสดงค่าปริมาณ Total phenolic content ทางสถิติด้วย independent t-test เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วย ethyl acetate และน้ำ

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	Ethyl acetate	Water
Mean	39.2182	2.8663
Variance	39.93	0.39
Observations	3	3
Pooled Variance	20.1558	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	9.9168	
P(T<=t) one-tail	0.0003	
t Critical one-tail	2.1318	
P(T<=t) two-tail	0.0006	
t Critical two-tail	2.7764	

ตาราง 44 แสดงค่าปริมาณ Total phenolic content ทางสถิติด้วย independent t-test เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วย ethanol และน้ำ

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

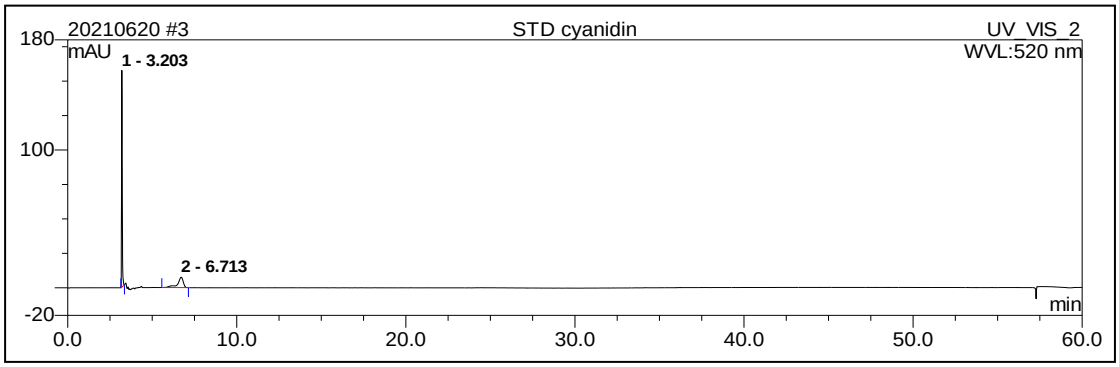
	Ethanol	Water
Mean	27.8033	2.8663
Variance	15.27	0.39
Observations	3	3
Pooled Variance	7.8293	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	10.9152	
P(T<=t) one-tail	0.0002	
t Critical one-tail	2.1318	
P(T<=t) two-tail	0.0004	
t Critical two-tail	2.7764	

ตาราง 45 แสดงค่าปริมาณ Total anthocyanin content ทางสถิติด้วย independent t-test เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วย ethanol และน้ำ

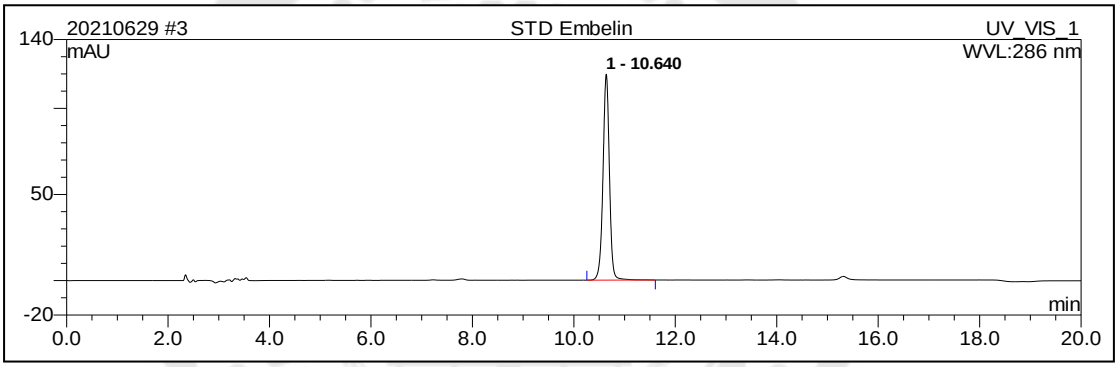
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	Ethanol	Water
Mean	3.3930	0.0436
Variance	0.12	2.54E-06
Observations	3	3
Pooled Variance	0.0581	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	17.0238	
P(T<=t) one-tail	3.49E-05	
t Critical one-tail	2.1318	
P(T<=t) two-tail	6.98E-05	
t Critical two-tail	2.7764	

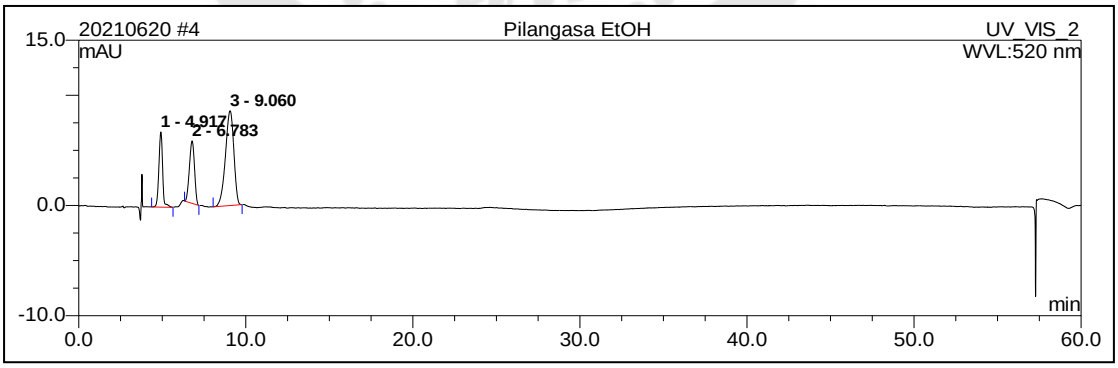
ภาคผนวก ข



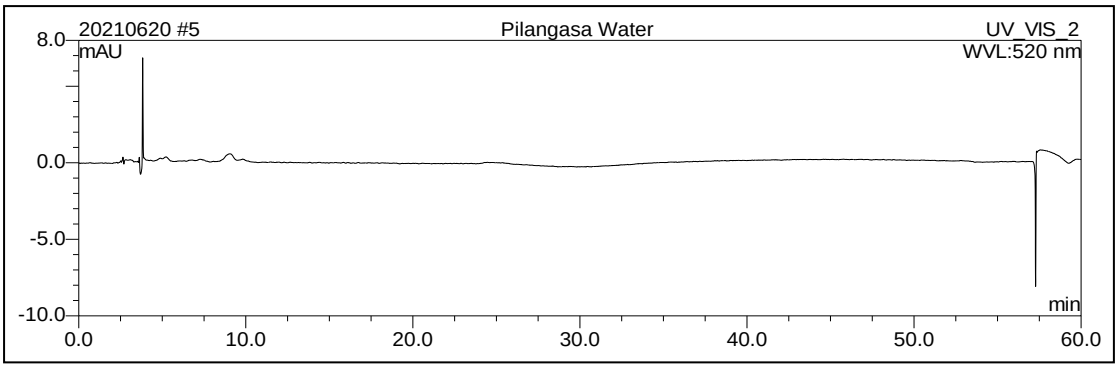
ภาพประกอบ 27 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน cyanidin-3-o-glucoside



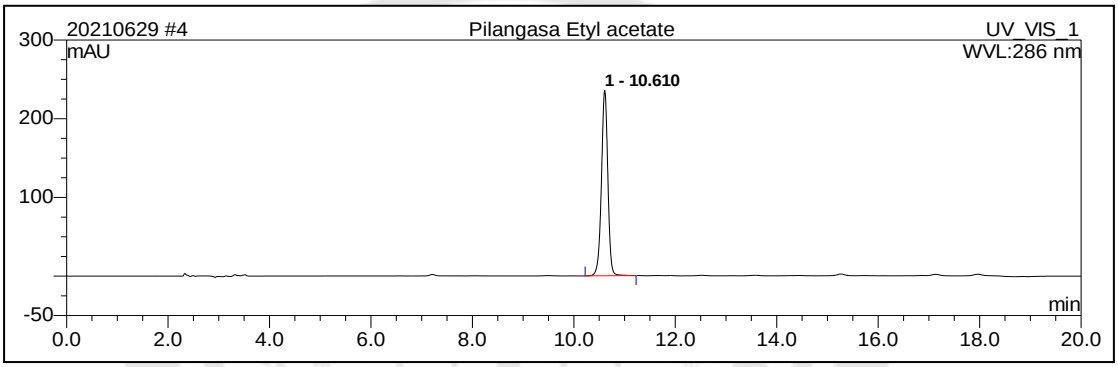
ภาพประกอบ 28 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน embelin



ภาพประกอบ 29 โครมาโตแกรมของสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethanol



ภาพประกอบ 30 โครมาโตแกรมของสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วยน้ำ



ภาพประกอบ 31 โครมาโตแกรมของสารสกัดผลพิลังกาสาที่สกัดด้วย Ethyl acetate

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ศรัญญา เบญจกิจนิธิ
วัน เดือน ปี เกิด	29 เมษายน 2531
สถานที่เกิด	นครปฐม
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2554
	เภสัชศาสตรบัณฑิต
	จาก มหาวิทยาลัยศิลปากร