



การพัฒนาวิธีสกัดและวิธีวิเคราะห์ปริมาณเอมอดินจากเถาวัลย์เหล็ก  
DEVELOPMENT OF EXTRACTION AND VALIDATION METHODS  
FOR THE ANALYSIS OF EMODIN IN *VENTILAGO DENTICULATA*



ปิ่นรส แซ่มขมดาว

การพัฒนาวิธีสกัดและวิธีวิเคราะห์ปริมาณอิมิดีนจากถั่ววัลย์เหล็ก



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF EXTRACTION AND VALIDATION METHODS  
FOR THE ANALYSIS OF EMODIN IN *VENTILAGO DENTICULATA*



PANNAROS CHAMCHOMDAO

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of MASTER OF SCIENCE  
(Pharmaceutical Product Development)  
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญาานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีสกัดและวิธีวิเคราะห์ปริมาณอิมิดีนจากเถาวัลย์เหล็ก

ของ

ปิ่นรส แซ่มชมดาว

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ..... ประธาน  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี่) (รองศาสตราจารย์ ดร.นริศ คำแก่น)

..... ที่ปรึกษาร่วม ..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง) (รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี่)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง)

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

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาวิธีสกัดและวิธีวิเคราะห์ปริมาณอิโมดินจากเถาวัลย์เหล็ก
ผู้วิจัย	ปภัทรธ แซ่มชมดาว
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ สามี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง

วิธีวิเคราะห์สารอิโมดินจากสารสกัดเถาวัลย์เหล็กด้วยเทคนิค HPLC ได้พัฒนาขึ้นโดยใช้คอลัมน์ XSelect CSH ชนิด C18 ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ขนาด 4.6x250 มิลลิเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส สารละลายตัวพาเป็นสารละลายกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ อะเซโทไนไตรล์ผสมกันแบบเกรเดียน อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดแอรเรย์ที่ความยาวคลื่น 288 นาโนเมตร อิโมดินให้พีคที่เวลาประมาณ 10.8 นาที โดยใช้เวลาวิเคราะห์ 20 นาทีต่อการฉีดแต่ละครั้ง พบว่าวิธีมีความจำเพาะเจาะจงกับอิโมดินสามารถแยกออกจากพีคข้างเคียงได้ ช่วงความเข้มข้นที่นำไปสร้างเส้นกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอิโมดินและพื้นที่ใต้พีค พบว่าเป็นสัดส่วนโดยตรงตลอดช่วง 1 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.999 การทดสอบความถูกต้องของวิธีแสดงด้วยค่าร้อยละการกลับคืนของอิโมดินที่ 3 ระดับความเข้มข้น 1.8, 3.5 และ 5.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับร้อยละ 101.99, 102.44 และ 103.16 ตามลำดับ การทดสอบความแม่นยำของระบบด้วยสารละลายมาตรฐาน 3 ตัวอย่าง มีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.14, 0.09 และ 0.12 ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับ 0.008 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจหาเชิงปริมาณได้เท่ากับ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาปริมาณอิโมดินจากสารสกัดเถาวัลย์เหล็กโดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกัน ได้แก่ น้ำ, เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20-100, เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20-100, โพรพานอล และ บิวทานอล ด้วยวิธีการหมักเป็นเวลา 7 วัน พบว่าตัวทำละลายที่สกัดอิโมดินออกมาได้ดีที่สุดคือ เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 60 และสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยไมโครเวฟ คือกำลังของไมโครเวฟ 600 วัตต์ จำนวนรอบการสกัด 3 รอบ และระยะเวลาในการสกัดรอบละ 30 วินาที

คำสำคัญ : อิโมดิน, HPLC, เถาวัลย์เหล็ก

Title	DEVELOPMENT OF EXTRACTION AND VALIDATION METHODS FOR THE ANALYSIS OF EMODIN IN <i>VENTILAGO DENTICULATA</i>
Author	PANNAROS CHAMCHOMDAO
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2020
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Weerasak Samee
Co Advisor	Associate Professor Dr. Sarin Tadtong

The HPLC system was developed in the chromatographic conditions of XSelect CSH, 5  $\mu$  m C18 column, a size of 4.6x250 mm, a column maintained at 30°C, using 0.1% phosphoric acid solution and acetonitrile, mixed by a gradient system in the mobile phase, with a flow rate at 1.0 mL/min and a PDA detector of 288 nm. The chromatogram showed an emodin peak at about 10.8 minutes with a run-time of 20 minutes per injection. The specificity and selectivity parameters were proved by a good separation of emodin from other compounds. The concentration and the area under the curve were linear over a range of 1-10  $\mu$  g of emodin per mL with a correlation coefficient of 0.9999. The accuracy of the method was assessed by percentage recoveries at three concentration levels, at 1.8, 3.5, 5.5  $\mu$  g/mL were 101.99, 102.44 and 103.16, respectively. The system precision was performed by three standard solutions had an %RSD of 0.14, 0.09 and 0.12. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 0.008 and 0.02  $\mu$  g/mL, respectively. The emodin from *Ventilago denticulata* was studied in different solvents; water, 20-100% methanol, 20-100% ethanol, 1-propanol and 1-butanol, by maceration for seven days. The results showed that using 60% ethanol as an extraction solvent provided the highest emodin content. In terms of the microwave-assisted extraction, the optimal conditions were microwave power of 600 watts, a three-extraction cycle and 30 seconds of extraction time.

Keyword : Emodin, HPLC, *Ventilago denticulata*

## กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาและความเมตตาอย่างยิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านที่ให้คำแนะนำ ดูแลเอาใจใส่ดำเนินการวิจัยทุกขั้นตอนอย่างดียิ่ง นับตั้งแต่เริ่มดำเนินการจนสำเร็จเรียบร้อยสมบูรณ์เป็นปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นริศ คำแก่น ที่ให้ความกรุณาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัยในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะเพื่อให้ปริญญานิพนธ์มีความถูกต้องและสมบูรณ์อย่างยิ่ง ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย (กรรมการบริหารหลักสูตร) ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านที่ให้ความกรุณาให้คำแนะนำ ช่วยเหลือและถ่ายทอดวิชาความรู้ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่ผู้วิจัยผู้วิจัย สุดท้ายผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษาและกำลังใจในการทำให้งานวิจัยประสบผลสำเร็จสมบูรณ์

ปัทมรส แซ่มแซมดาว

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูปภาพ .....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์ .....	1
ขอบเขตการวิจัย.....	2
รูปแบบการวิจัย.....	2
นิยามศัพท์เฉพาะ .....	2
กรอบแนวคิดการวิจัย.....	3
สมมุติฐานการวิจัย .....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
เถาวัลย์เหล็ก .....	4
Emodin .....	5
Maceration.....	7
Ultrasonic-Assisted Extraction.....	8
Microwave-Assisted Extraction.....	9
การวิเคราะห์สารกลุ่ม Anthraquinone ด้วยเทคนิค HPLC .....	13

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมี.....	15
วิธีการทดลอง .....	15
พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร emodin ด้วย HPLC.....	15
การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด.....	18
การเปรียบเทียบวิธีการสกัด 3 วิธี.....	18
Maceration .....	18
Ultrasonic-Assisted Extraction .....	18
Microwave-Assisted Extraction .....	19
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	19
การวิเคราะห์ข้อมูล .....	20
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย .....	21
พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร emodin ด้วย HPLC .....	21
การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์.....	22
การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด .....	29
เปรียบเทียบวิธีการสกัด 3 วิธี.....	33
Microwave-Assisted Extraction.....	35
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	39
ข้อเสนอแนะ .....	40
บรรณานุกรม .....	41
ภาคผนวก.....	45
ประวัติผู้เขียน.....	62

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 การสกัดสาร emodin .....	6
ตาราง 2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ emodin .....	7
ตาราง 3 ค่าพารามิเตอร์ทางกายภาพของตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ .....	11
ตาราง 4 ตัวอย่างการวิเคราะห์สารกลุ่ม Anthraquinones ด้วยเทคนิค HPLC .....	13
ตาราง 5 แสดง mobile phase ระบบ gradient elution .....	16
ตาราง 6 แสดงตัวแปรในการสกัดด้วย microwave .....	19
ตาราง 7 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง .....	24
ตาราง 8 ผลการทดสอบหวัข้อ Accuracy .....	26
ตาราง 9 ผลการทดสอบ System precision.....	27
ตาราง 10 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงสภาวะในระบบ HPLC.....	28
ตาราง 11 ค่าที่ใช้ในการคำนวณขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณของ emodin.....	29
ตาราง 12 ปริมาณ emodin ที่สกัดโดยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ.....	30
ตาราง 13 ปริมาณ emodin ที่ได้จากการสกัดด้วย Maceration, Ultrasonic-Assisted Extraction และ Microwave-Assisted Extraction โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย.....	34
ตาราง 14 ปริมาณ emodin ที่ได้จากการสกัดด้วย Microwave-Assisted Extraction โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย .....	36
ตาราง 15 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง เส้นที่ 1.....	46
ตาราง 16 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง เส้นที่ 2.....	47
ตาราง 17 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง เส้นที่ 3.....	48

ตาราง 18 ผล peak area จากการทดสอบหั่วข้อ Accuracy .....	49
ตาราง 19 ผลการทดสอบหั่วข้อ Robustness การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของคอลัมน์.....	50
ตาราง 20 ผลการทดสอบหั่วข้อ Robustness การเปลี่ยนแปลงปริมาตรของสารละลายที่ฉีด ....	50
ตาราง 21 ผลการทดสอบหั่วข้อ Robustness การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของ mobile phase .....	51
ตาราง 22 ผลการทดสอบหั่วข้อ Robustness การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ phosphoric acid ใน mobile phase .....	51
ตาราง 23 ผลการทดสอบหั่วข้อ Limit of Quantitation (LOQ) .....	52
ตาราง 24 ผล peak area ของ emodin ที่สกัดโดย alcohol 4 ชนิด .....	52
ตาราง 25 ผล peak area ของ emodin ที่สกัดโดยตัวทำละลายผสม.....	53
ตาราง 26 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เปรียบเทียบปริมาณสาร emodin จากตัวทำละลายที่ใช้สกัด .....	54
ตาราง 27 ผล peak area ของ emodin ที่ได้จากการสกัดด้วย Maceration, Ultrasonic-Assisted Extraction และ Microwave-Assisted Extraction โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย .....	55
ตาราง 28 ผล peak area ของ emodin ที่ได้จากการสกัดด้วย Microwave-Assisted Extraction โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย.....	56
ตาราง 29 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เปรียบเทียบปริมาณสาร emodin ที่ได้จากการสกัดด้วย Microwave-Assisted Extraction โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย .....	60

## สารบัญรูปภาพ

### หน้า

ภาพประกอบ 1 ลักษณะของเถาวัลย์เหล็ก 1: พุ่ม 2: ลำต้น 3: ลำต้นอ่อน 4: เปลือก 5: ผลและเมล็ด 6: ใบ.....	4
ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างของ Emodin.....	5
ภาพประกอบ 3 การเกิด Ultrasonic Cavitation.....	8
ภาพประกอบ 4 การเกิด Ionic conduction และ Dipole polarization.....	10
ภาพประกอบ 5 ทิศทางของความร้อนและการเคลื่อนที่ของสารสกัด.....	10
ภาพประกอบ 6 UV/VIS Spectrum ของพีค emodin ที่ 200-600 nm จาก 1: สารมาตรฐาน, 2: สารสกัด .....	21
ภาพประกอบ 7 โครมาโตแกรมสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบการวิเคราะห์ emodin ในสารสกัดเถาวัลย์เหล็ก .....	22
ภาพประกอบ 8 โครมาโตแกรมของ 1: สารสกัดเถาวัลย์เหล็ก, 2: สารละลายมาตรฐาน emodin	23
ภาพประกอบ 9 peak purity ของพีค emodin จากสารละลายตัวอย่าง.....	23
ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ emodin กับพื้นที่ใต้พีค ....	24
ภาพประกอบ 11 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 6 ความเข้มข้น 1: 10 µg/mL, 2: 8 µg/mL, 3: 6 µg/mL, 4: 4 µg/mL, 5: 2 µg/mL, 6: 1 µg/mL.....	25
ภาพประกอบ 12 ปริมาณ emodin ที่สกัดโดยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ.....	30
ภาพประกอบ 13 โครมาโตแกรมที่ได้จากการสกัดโดย 1: 80% Ethanol 2: 60% Ethanol 3: 40% Ethanol 4: 20% Ethanol 5: Ethanol 6: 80% Methanol 7: 60% Methanol 8: 40% Methanol 9: 20% Methanol 10: Methanol 11: Water 12: 1-Butanol 13: 1-Propanol.....	31
ภาพประกอบ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ emodin และค่า dielectric constant ของตัวทำละลาย .....	32

ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ emodin กับตัวทำละลายผสม 20-100% ethanol และ 20-100% methanol.....	33
ภาพประกอบ 16 ปริมาณ emodin ที่ได้จากการสกัดด้วย Maceration , Ultrasonic-Assisted Extraction และ Microwave-Assisted Extraction.....	34
ภาพประกอบ 17 ปริมาณ emodin ที่ได้จากการสกัดด้วย Microwave-Assisted Extraction ....	37
ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ emodin กับ microwave power ...	37
ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ emodin กับ จำนวนรอบการสกัด ..	38
ภาพประกอบ 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ emodin กับ เวลาที่ใช้ในการสกัด ..	38
ภาพประกอบ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ emodin กับพื้นที่ได้พืชของสมการเส้นตรง เส้นที่ 1 .....	46
ภาพประกอบ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ emodin กับพื้นที่ได้พืชของสมการเส้นตรง เส้นที่ 2 .....	47
ภาพประกอบ 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ emodin กับพื้นที่ได้พืชของสมการเส้นตรง เส้นที่ 3 .....	48

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ภูมิหลัง

เถาวัลย์เหล็ก หรือ รวงแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Ventilago denticulata* Willd. จัดอยู่ในวงศ์พุทรา (Rhamnaceae) เป็นสมุนไพรไทยไม้เลื้อยที่มีเนื้อไม้ (woody climber) ใช้ลำต้นเกี่ยวพันกับต้นไม้ใหญ่ เถาหรือลำต้นมีสีเทาถึงดำ เปลือกลำต้นแตกเป็นเส้นมีลายแตกสีแดงสามารถพบได้ทั่วไปในป่าแต่ละภาคของประเทศไทย มีการนำมาใช้เป็นสมุนไพรช่วยบำรุงกำลัง บรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อ แก้กระษัย ขับปัสสาวะ ในตำรับยาสมุนไพรมีการใช้เถานำมาต้มกินเพื่อรักษาโรคผิวหนัง ท้องผูก แก้ปวดหลังปวดเอว (จิราภรณ์ ปาลี, 2559) ซึ่งในปัจจุบันนี้มีผลิตภัณฑ์หลากหลายในท้องตลาดจากสมุนไพรเถาวัลย์เหล็กทั้งรูปแบบชาชงและแคปซูล มีการศึกษาสารสำคัญที่พบในเถาวัลย์เหล็ก โดยพบสารในกลุ่ม anthraquinone หลายชนิดเช่น chrysophanol, physcion และ emodin (Molee et al., 2018)

Emodin เป็น secondary metabolites กลุ่ม anthraquinone พบมากในพืชวงศ์ Fabaceae, Polygonaceae และ Rhamnaceae เช่น *Ventilago* spp. พบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Helicobacter pylori* ที่ทำให้เกิดอาการปวดท้อง ท้องเสีย, ยับยั้ง Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่ดื้อยาหลายชนิด, *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นสาเหตุของวัณโรค รวมถึง herpes simplex virus (HSV) ด้วย นอกจากนี้ยังสามารถลดการอักเสบ และลดเซลล์มะเร็งโดยมีการทดลองกับเซลล์มะเร็งปอด, เซลล์มะเร็งตับ, และเซลล์มะเร็งเต้านม (Izhaki, 2002) โดยจากการศึกษาพบว่าเถาวัลย์เหล็กมี emodin ในปริมาณสูง และสามารถแยกจากสารอื่น ๆ ได้ดีโดยการใช้เทคนิค HPLC

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสาร emodin จากเถาวัลย์เหล็ก มีวิธีวิเคราะห์สาร emodin ที่เหมาะสม มีความสะดวกรวดเร็ว เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร และการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์จากเถาวัลย์เหล็กต่อไป

#### วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาวิธีการและตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด emodin จากเถาวัลย์เหล็กให้ได้สารสกัดที่มี emodin ปริมาณสูง
2. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร emodin ด้วยเทคนิค HPLC

### ขอบเขตการวิจัย

1. พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร emodin ด้วย HPLC
2. เปรียบเทียบปริมาณของ emodin ที่ได้จากตัวทำละลายที่ใช้สกัด 5 ชนิด ด้วยวิธี Maceration และวิเคราะห์หาปริมาณ emodin ด้วยเทคนิค HPLC
  - 2.1 น้ำ
  - 2.2 20-100 % Ethanol
  - 2.3 20-100 % Methanol
  - 2.4 1-Propanol
  - 2.5 1-Butanol
3. เปรียบเทียบปริมาณของ emodin ที่วิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค HPLC จากวิธีสกัด 3 วิธี ได้แก่
  - 3.1 Maceration
  - 3.2 Ultrasonic-Assisted Extraction
  - 3.3 Microwave-Assisted Extraction
4. เปรียบเทียบปริมาณของ emodin ที่ใช้ Ethanol เป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัด ด้วยวิธี Microwave-Assisted Extraction ภายใต้ตัวแปรต่าง ๆ ได้แก่
  - 4.1 Microwave power (watt)
  - 4.2 จำนวนรอบการสกัด (รอบ)
  - 4.3 เวลาที่ใช้สกัด (วินาที)

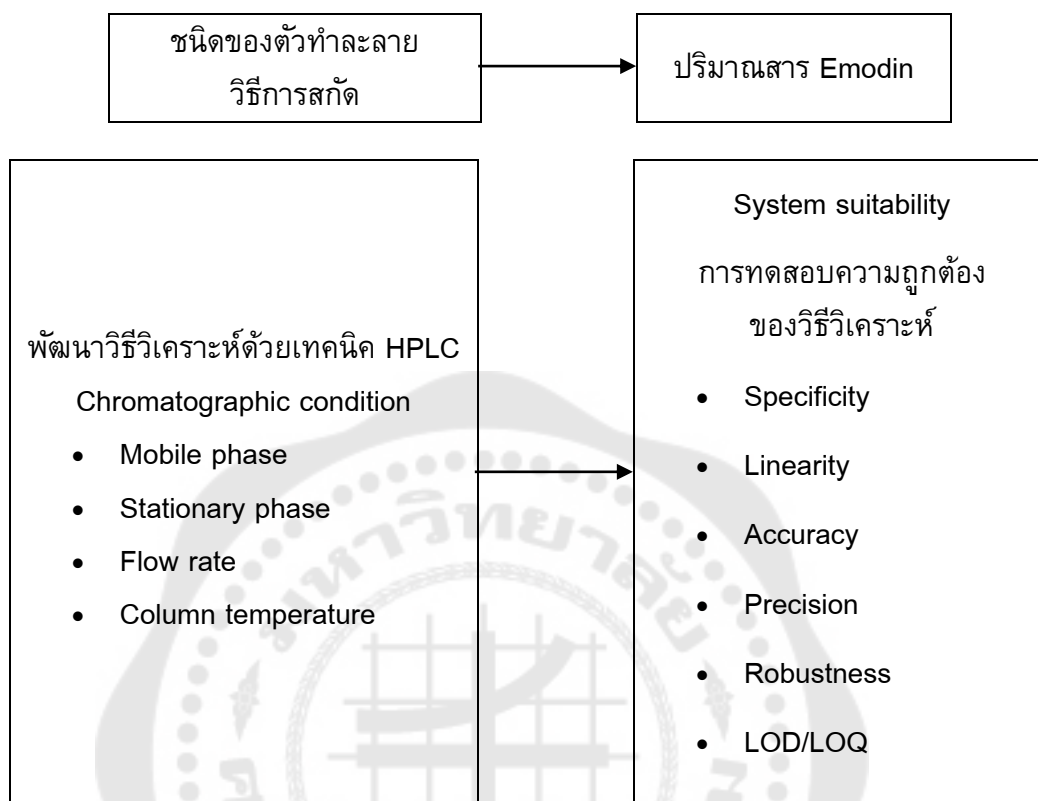
### รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research)

### นิยามศัพท์เฉพาะ

ปริมาณสาร emodin หมายถึง ปริมาณของ emodin ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ในหน่วย mg/Kg

### กรอบแนวคิดการวิจัย



### สมมติฐานการวิจัย

1. การสกัด emodin ด้วยตัวทำละลายต่างกันจะได้ปริมาณสารต่างกัน
2. การสกัด emodin ด้วยวิธีสกัดต่างกันจะได้ปริมาณสารต่างกัน

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

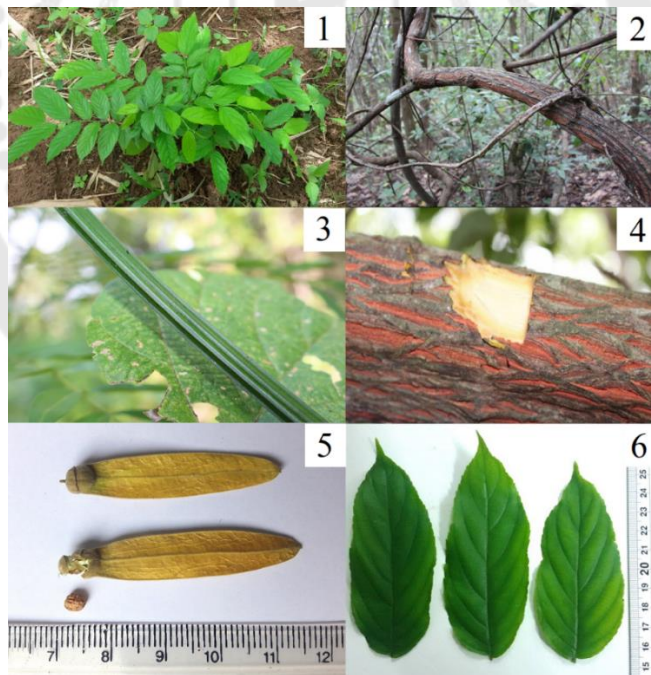
1. ได้วิธีที่เหมาะสมในการสกัดสาร emodin จากเถาวัลย์เหล็ก
2. ได้วิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร emodin

## บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัดสาร emodin และวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ emodin โดยได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. เถาว์ลย์เหล็ก
2. Emodin
3. Maceration
4. Ultrasonic-Assisted Extraction
5. Microwave-Assisted Extraction
6. การวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม anthraquinone ด้วยเทคนิค HPLC

### เถาว์ลย์เหล็ก



ภาพประกอบ 1 ลักษณะของเถาว์ลย์เหล็ก

1: พุ่ม 2: ลำต้น 3: ลำต้นอ่อน 4: เปลือก 5: ผลและเมล็ด 6: ใบ

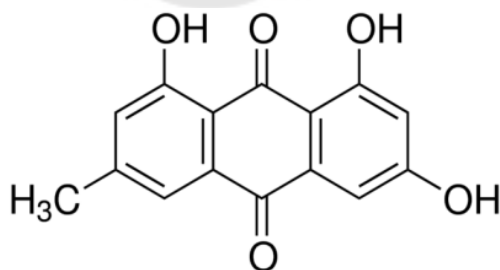
ที่มา: จิราภรณ์ ปาลี. (2559). สมุนไพรวางแดงกับภูมิปัญญาท้องถิ่นบ้านป่าสักงาม ตำบลหลวงเหนือ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่: มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย.

วงศ์	Rhamnaceae
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Ventilago denticulata</i> Willd.
ชื่อไทย	รางแดง, เถารางแดง, เถาวัลย์เหล็ก, ก້องแกบ
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	

เถาวัลย์เหล็ก หรือ รางแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Ventilago denticulata* Willd. จัดอยู่ในวงศ์พุทรา (Rhamnaceae) เป็นสมุนไพรไทยไม้เลื้อยที่มีเนื้อไม้ (woody climber) ใช้ลำต้นเกี่ยวพันกับต้นไม้ใหญ่ เถาหรือลำต้นมีสีเทาถึงดำ เปลือกลำต้นแตกเป็นเส้นมีลายแตกสีแดง ลำต้นอ่อนมีสีเขียว ผิวลำต้นเรียบ ไม่มียาง ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ (Alternate) แผ่นใบรูปรีหรือรูปไข่ ปลายใบแหลมหรือเรียวแหลม ฐานใบทั้งสองข้างไม่เท่ากัน ขอบใบหยักมนไม่มีหูใบ ดอกช่อ ผลแห้งแก่แล้วไม่แตกมีปีกเดียว ในแต่ละผลมี 1 เมล็ด เมล็ดสีน้ำตาล รูปร่างกลม สามารถพบได้ทั่วไปในป่าแต่ละภาคของประเทศไทย มีการนำมาใช้เป็นสมุนไพรช่วยบำรุงกำลัง บรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อ แก้กระษัย ขับปัสสาวะ ในตำรับยาสมุนไพรมีการใช้เถานำมาต้มกินเพื่อรักษาโรคผิวหนัง แก้ปวดหลังปวดเอว (จิราภรณ์ ปาลี, 2559)

จากการศึกษาเมื่อนำเถาวัลย์เหล็กมาสกัดด้วย acetone พบ anthraquinones 11 ชนิด ได้แก่ islandicin , chrysophanol, chrysophanol8-methyl ether, emodin, physcion, emodin-6,8-dimethyl ether, xanthorin, calyculatone, 4,5-dihydroxynordigitolutein, และ 2-hydroxyislandicin (Rao et al., 1983) และจากการสกัดแยกส่วนเถา ของเถาวัลย์เหล็กด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีพบ naphthalene derivatives และสารในกลุ่ม anthraquinones ได้แก่ chrysophanol, physcion และ emodin (Molee et al., 2018)

#### Emodin



ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างของ Emodin

ที่มา: NCBI. PubChem Database. Emodin, CID=3220. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Emodin>

Molecular Weight 270.24 g/mol

Physical Description ของแข็ง เป็นผง ผลึกสีส้ม

Solubility Soluble in alcohol (Budavari, 1989; NCBI)

เป็น secondary metabolites กลุ่ม anthraquinone ในรูป aglycone สร้างผ่าน acetate mevalonate pathway พบมากในพืชวงศ์ Fabaceae, Polygonaceae และ Rhamnaceae ใน ส่วนรากและเปลือกไม้ จากการศึกษา emodin ที่พบใน *Ventilago* spp. ได้แก่ *Ventilago leiocarpa*, *Ventilago bombaiensis* และ *Ventilago denticulata* (Rao et al., 1983) ในการ ทดลองที่ผ่านมามีการสกัด emodin จากพืชชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธีแตกต่างตามตาราง 1

ตาราง 1 การสกัดสาร emodin

ตัวอย่าง	การสกัด	สารที่ ต้องการ	ปริมาณ emodin	ที่มา
<i>Rheum emodi</i>	soxhlet extraction Methanol, one week	aloe- emodin, rhein, emodin	0.43- 73 µg/g	(Tabin, Gupta, Bansal, & Kamili, 2016)
<i>Cassia obtusifolia</i>	reflux extraction 95% ethanol, 1 h.	emodin, aloe- emodin	-	(Xu et al., 2012)
<i>Fagopyrum tataricum</i>	reflux extraction chloroform + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	emodin	3.65 µg/g	(Peng et al., 2013)
Rhubarb ( <i>Rheum palmatum</i> L., <i>Rheum tanguticum</i> Maxim. ex Balf., <i>Rheum officinale</i> Bail.)	sonication 15 min 80% acetone + maceration 2 h	สารทุกตัว	< 2 mg/g	(Wang, Li, Jin, Qu, & Xiao, 2008)

ในตำรับยาสมุนไพรไทยเถาวัลย์เหล็กมีสรรพคุณหลากหลาย และมีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ emodin ดังนี้

ตาราง 2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ emodin

ฤทธิ์ที่ศึกษา	ตัวอย่าง
antimicrobial	ยับยั้ง <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA), <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Vibrio vulnificus</i>
antifungal	ยับยั้งการเกิด spore germination
antiviral	ยับยั้ง herpes simplex virus (HSV)
antitumor	human lung squamous carcinoma cell line CH27 human liver cancer cell line Hep G2 breast cancer MDA-MB-453 cells
anti-inflammatory	ลดการอักเสบของหลอดเลือดในหนูทดลอง ลดการเกิดแผลเป็นนูนที่เกิดจากการบาดเจ็บ

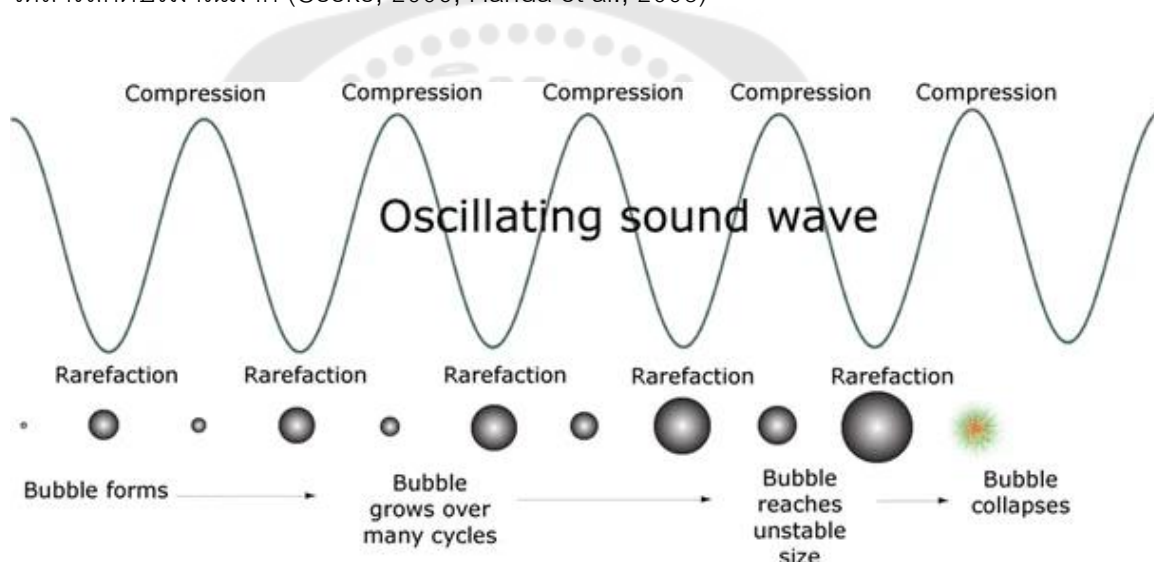
ที่มา: Izhaki, I. (2002). Emodin - A secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist*, 155, 205-217. doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00459.x

### Maceration

เป็นวิธีการสกัดโดยนำผงสมุนไพรหมักกับตัวทำละลายในภาชนะปิด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำมาคนเป็นระยะ เมื่อสกัดสารได้หมดแล้วนำมากรองแยกเอาส่วนสารสกัด เป็นวิธีที่ง่ายและไม่ต้องใช้อุปกรณ์เพิ่มเติม แต่ใช้เวลานานในการสกัด (Handa, Khanuja, Longo, & Rakesh, 2008)

### Ultrasonic-Assisted Extraction

ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยในการสกัดสาร เมื่อคลื่นเสียงผ่านเข้าไปในของเหลวจะทำให้เกิด cavitation เกิดภาวะความดันสูง (compression) และความดันต่ำ (rarefaction) สลับกันไป ตามความถี่ ทำให้เกิดฟองอากาศ (cavitation bubbles) ฟองอากาศจะดูดซับพลังงานจนแตกออก (implosion) จุดที่ฟองอากาศแตกออกจะมีความดันและอุณหภูมิสูงมาก ทำให้ตัวกลางเกิดแรงเฉือน (shear force) และ micro-jetting ช่วยให้การสกัดมีประสิทธิภาพมากขึ้น ลดขนาดอนุภาคของตัวอย่าง เพิ่มพื้นที่ผิว กร่อนพื้นผิวของสมุนไพร เพิ่มการซึมผ่านของตัวทำละลาย ทำให้สารต่าง ๆ หลุดออกมาได้มากขึ้น มีข้อดีคือใช้เวลาสั้น ใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อย ทำได้ง่ายและให้สารสกัดปริมาณมาก (Cseke, 2006; Handa et al., 2008)



ภาพประกอบ 3 การเกิด Ultrasonic Cavitation

ที่มา: Leong, T., Juliano, P., & Knoerzer, K. (2017). Advances in Ultrasonic and Megasonic Processing of Foods. *Food Engineering Reviews*, 9(3), 237-256.

doi:10.1007/s12393-017-9167-5

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัด (Azwanida, 2015; Chemat et al., 2017)

#### 1. พลังงาน (power) และ ความถี่ (frequency)

การใช้พลังงานสูงจะทำให้เกิดแรงเฉือนมากขึ้น และความถี่ที่ใช้จะส่งผลต่อขนาดของฟองอากาศ ยิ่งความถี่สูงจะได้ฟองอากาศขนาดเล็ก การเกิด cavitation ลดลง ปกติแล้วจะใช้ในช่วง 20 – 100 KHz

## 2. ตัวทำละลาย

การเลือกชนิดของตัวทำละลายให้ดูตามคุณสมบัติของสารที่เราจะสกัด แต่สมบัติทางกายภาพบางอย่างของตัวทำละลายก็ส่งผลต่อการเกิด cavitation ได้ เช่น ความหนืด (viscosity) แรงตึงผิว (surface tension) และความดันไอ (vapor pressure) ถ้าตัวทำละลายมีความหนืดและแรงตึงผิวสูงจะทำให้เกิด cavitation ได้ยาก และถ้าตัวทำละลายความดันไอสูงจะทำให้เกิดฟองอากาศจำนวนมากกว่าตัวทำละลายที่มีความดันไอต่ำ แต่เมื่อฟองอากาศแตกจะมีความรุนแรงน้อยกว่าอย่างไรก็ตามความดันไอของตัวทำละลายขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในขณะนั้นด้วย

## 3. อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลมากกับสมบัติของตัวทำละลาย การเพิ่มอุณหภูมิสามารถลดความหนืดกับแรงตึงผิวได้ และทำให้ความดันไอสูงขึ้น

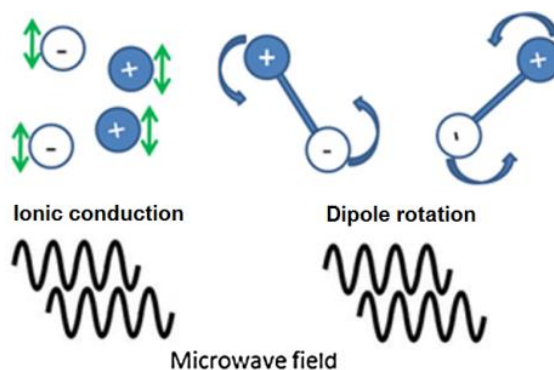
จากการศึกษาการปรับเปลี่ยนตัวแปรที่ส่งผลต่อการสกัดสารในกลุ่ม polyphenols จาก *Thymus serpyllum* L. ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง พบว่าการเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายส่งผลต่อปริมาณสารในกลุ่ม polyphenols ในสารสกัดมากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารในกลุ่ม polyphenols กับเทคนิค maceration พบว่าการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยในการสกัดทำให้ได้สารในกลุ่ม polyphenols มากกว่า ในระยะเวลาการสกัดที่สั้นลง (Jovanovic et al., 2017)

### Microwave-Assisted Extraction

เป็นการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพร คลื่นไมโครเวฟเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ามีความยาวคลื่นในช่วง 1 mm ถึง 1 m มีความถี่ของช่วงคลื่นในช่วง 300 MHz ถึง 300 GHz (เครื่องไมโครเวฟในท้องตลาดใช้ 2450 MHz) ความร้อนที่เกิดขึ้นในวัสดุนั้นเกิดจากการดูดซับคลื่นไมโครเวฟแล้วเปลี่ยนเป็นพลังงานความร้อน เกิดจาก 2 กลไก ได้แก่ dipole rotation และ ionic conduction

Dipole rotation เป็นการเกิดความร้อนกับวัสดุที่มีสารประกอบมีขั้วเป็นองค์ประกอบโมเลกุลมีขั้ว เช่น น้ำ จะจัดเรียงตัวให้เป็นไปในทิศทางเดียวกับสนามแม่เหล็กไฟฟ้า แต่ทิศทางของสนามแม่เหล็กไฟฟ้าเปลี่ยนสลับไปมาหลายล้านครั้งต่อวินาทีทำให้โมเลกุลของน้ำหมุนสลับกันเกิดการเคลื่อนที่ และการเสียดสีระหว่างโมเลกุล จนเกิดพลังงานความร้อนในที่สุด

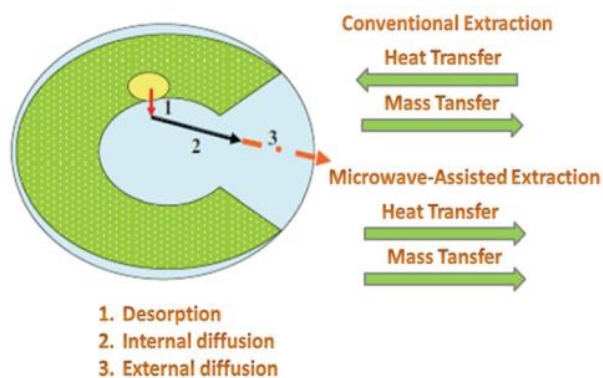
Ionic conduction เป็นการเกิดความร้อนที่เป็นผลมาจากผลของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสารละลาย เมื่อเข้าไปอยู่ในสนามไฟฟ้า แต่ละโมเลกุลซึ่งมีประจุไฟฟ้าจะถูกกระตุ้น และเร่งให้มีการเคลื่อนที่ ทำให้เกิดการเสียดสีกับโมเลกุลอื่น ๆ และเกิดเป็นพลังงานความร้อน จากนั้น เกิดการกระจายความร้อนไปสู่ส่วนอื่น ๆ ต่อไป (Sparr Eskilsson & Björklund, 2000)



ภาพประกอบ 4 การเกิด Ionic conduction และ Dipole polarization

ที่มา: Gude, V. G., Patil, P., Martinez-Guerra, E., Deng, S., & Nirmalakhandan, N. (2013). Microwave energy potential for biodiesel production. *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), 5. doi:10.1186/2043-7129-1-5

ในการสกัดแบบเดิมการถ่ายเทความร้อนจะต้องผ่านพื้นผิวภายนอกของสมุนไพร แต่คลื่นไมโครเวฟจะส่งตรงเข้าสู่โมเลกุล แล้วจึงเกิดการกระจายความร้อนไปสู่ส่วนอื่น ๆ ต่อไป การเกิดความร้อนแบบนี้จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ แล้วค่อยแพร่มายังด้านนอก



ภาพประกอบ 5 ทิศทางของความร้อนและการเคลื่อนที่ของสารสกัด

ที่มา: Tsukui, A., Santos Junior, H. M., Oigman, S. S., de Souza, R. O., Bizzo, H. R., & Rezende, C. M. (2014). Microwave-assisted extraction of green coffee oil and quantification of diterpenes by HPLC. *Food Chem*, 164, 266-271. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.039

การสกัดด้วยไมโครเวฟมีข้อดีคือสามารถให้ความร้อนแก่ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วและทั่วถึง ใช้เวลาน้อย ใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อย ทำได้ง่ายและให้สารสกัดปริมาณมาก แต่ใช้ได้กับตัวทำละลายบางชนิดเท่านั้น และไม่เหมาะกับสารที่ไม่ทนความร้อน

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัด (Chemat & Cravotto, 2013)

#### 1. ตัวทำละลาย

การเลือกชนิดของตัวทำละลายที่จะใช้ ต้องสามารถสกัดสารที่ต้องการออกมาได้ดีและเกิดความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟได้ ตัวทำละลายที่เกิดความร้อนเมื่อได้รับคลื่นไมโครเวฟคือสามารถดูดซับพลังงานและเปลี่ยนแปลงเป็นความร้อนได้ คุณสมบัติดังกล่าวแสดงได้ด้วยค่า Dissipation factor ( $\tan \delta$ )

Dissipation factor ( $\tan \delta$ ) วัดความสามารถในการดูดซับพลังงานไมโครเวฟและกระจายความร้อนไปยังโมเลกุลรอบข้าง โดย

$$\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$$

loss factor ( $\epsilon''$ ) เป็นค่าสมมติแสดงถึงการสูญเสียพลังงานไปในรูปความร้อน

Dielectric constant ( $\epsilon'$ ) เป็นค่าคงที่เฉพาะตัวของสารแต่ละชนิด สามารถบอกได้ถึงควมมีขั้ว

ความเหน็ดส่งผลต่อความสามารถในการดูดซับพลังงานไมโครเวฟ โมเลกุลที่เหน็ดจะมีการเคลื่อนที่ต่ำจัดเรียงตัวได้ยากส่งผลให้ความร้อนที่เกิดจาก dipole rotation ลดลงได้ โดยค่าพารามิเตอร์ทางกายภาพของตัวทำละลายแต่ละชนิด แสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ค่าพารามิเตอร์ทางกายภาพของตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ

ตัวทำละลาย	Dielectric constant <sup>a</sup> ( $\epsilon'$ )	Dissipation factor ( $\tan \delta$ ) ( $\times 10^{-4}$ )	จุดเดือด <sup>b</sup> (°C)	ความเหน็ด <sup>c</sup> (cP)
Acetone	20.7	5,555	56	0.30
Acetonitrile	37.5		82	
Ethanol	24.3	2,500	78	0.69
Hexane	1.89		69	0.30

ตาราง 3 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	Dielectric constant <sup>a</sup> ( $\epsilon'$ )	Dissipation factor ( $\tan \delta$ ) ( $\times 10^{-4}$ )	จุดเดือด <sup>b</sup> (°C)	ความหนืด <sup>c</sup> (cP)
Methanol	32.6	6,400	65	0.54
2-Propanol	19.9	6,700	82	0.30
Water	78.3	1,570	100	0.89
Ethyl acetate	6.02	5,316	77	0.43
Hexane : Acetone (1:1)			52	

<sup>a</sup> Determined at 20°C, <sup>b</sup> Determined at 101.4 kPa, <sup>c</sup> Determined at 25°C

ที่มา: Chemat, F., & Cravotto, G. (2013). *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds theory and practice*. New York; Heidelberg; London: Springer.

## 2. สัดส่วนของตัวทำละลายต่อสมุนไพร

ปริมาณของตัวทำละลายจะต้องมากพอที่สามารถท่วมผงสมุนไพรได้ตลอดเวลาการสกัด เนื่องจากตัวอย่างสมุนไพรบางชนิดมีการพองตัวมากขึ้นเมื่อแช่อยู่ในตัวทำละลาย

## 3. ระยะเวลาการสกัดและจำนวนรอบในการสกัด

ในสมุนไพรบางชนิดการเพิ่มเวลาในการสกัดสามารถเพิ่มปริมาณสารสำคัญได้ แต่ใช้เวลาน้อยก็จะลดการสลายตัวของสารที่ไวต่อความร้อนหรือปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ การเพิ่มจำนวนรอบในการสกัดก็เช่นกัน แต่โดยทั่วไปเมื่อเพิ่มถึงระดับหนึ่งแล้วปริมาณสารสกัดก็จะคงที่

## 4. Microwave power และอุณหภูมิ

กำลังของไมโครเวฟที่เพิ่มขึ้นจะทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น อุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นจะทำให้ตัวทำละลายความหนืดลดลง ละลายสารได้ดีขึ้น แต่อาจทำให้สารบางชนิดสลายตัวได้

จากการทดลองการสกัดสารในกลุ่ม phenolic จากใบของ *Myrtus communis* L. โดยศึกษาที่ตัวแปรต่าง ๆ กัน พบว่าตัวแปรที่ส่งผลต่อปริมาณสารในกลุ่ม phenolic ที่สกัดได้ ได้แก่ Ethanol concentration (% v/v), Microwave power (W), ระยะเวลาที่ใช้สกัด และสัดส่วนของตัวทำละลายต่อสมุนไพร (Dahmoune, Nayak, Moussi, Remini, & Madani, 2015)

### การวิเคราะห์สารกลุ่ม Anthraquinone ด้วยเทคนิค HPLC

HPLC เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับแยกสารประกอบในตัวอย่าง ประกอบด้วย 2 เฟส คือ stationary phase กับ mobile phase การแยกของสารขึ้นอยู่กับความชอบของสารกับทั้ง 2 เฟส โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดด้วย detector และบันทึกเป็น chromatogram โดยสามารถใช้วิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ นิยมใช้ในการวิเคราะห์แยกสารหลากหลายชนิด เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง ใช้งานง่าย ใช้เวลาน้อย ให้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำในการวิเคราะห์สารกลุ่ม anthraquinone มักใช้ column ชนิด C18 ปรับ pH ของเฟสเคลื่อนที่ให้อยู่ในช่วงกรด และตรวจสอบปริมาณสารด้วย UV detector ดังแสดงในตาราง 4 สามารถสรุปออกมาได้ว่าสาร emodin วิเคราะห์โดยใช้ C18 column และ detector ที่ใช้จะอยู่ในช่วง UV ซึ่งสามารถหาความยาวคลื่น ( $\lambda_{max}$ ) ที่จะใช้วิเคราะห์สาร emodin ในสารสกัดได้จากการใช้ PDA detector และ mobile phase ที่ใช้ จะเป็น methanol หรือ acetonitrile เป็นสัดส่วนกับน้ำในสภาวะกรดพวก acetic acid หรือ phosphoric acid และมีการใช้ทั้ง isocratic elution และ gradient elution ซึ่งสภาวะในการวิเคราะห์ต้องมีการปรับปรุงเพื่อให้ได้ system suitability ที่เหมาะสมต่อไป

ตาราง 4 ตัวอย่างการวิเคราะห์สารกลุ่ม Anthraquinones ด้วยเทคนิค HPLC

สารที่วิเคราะห์	Chromatographic conditions	ที่มา
aloe-emodin	Detector 254 nm	(Tabin et al., 2016)
emodin	C18 column (4.6 x 250 mm, Sunfire)	
rhein	Mobile phase: gradient elution methanol: 2% acetic acid Retention time ของ emodin 25 นาที	
obtusifolin-2-glucoside	Detector 278 nm C18 column (4.6 x 250 mm 5 $\mu$ m Lunar)	(Xu et al., 2012)
Aurantioobtusin	Mobile phase : gradient elution acetonitrile : 0.1% aqueous phosphoric acid	
Aloe-emodin		
Rhein, Emodin	Retention time ของ emodin 16 นาที (range 2.6 –	
Obtusifolin	130 $\mu$ g/mL)	
Chrysophanol		
Physcion		

ตาราง 4 (ต่อ)

สารที่วิเคราะห์	Chromatographic conditions	ที่มา
Emodin	Detector 436 nm C18 column (4.6 x 250 mm, 5 $\mu$ m Kromasil-ODS) Mobile phase: methanol : 0.1% aqueous phosphoric acid (85:15) Retention time ของ emodin 11.6 นาที	(Peng et al., 2013)
aloe-emodin rhein emodin chrysophanol physcion	Detector 254 nm C18 UPLC column (2.1 x 50 mm, 1.7 $\mu$ m, Waters BEH) Mobile phase: Methanol : 0.1% aqueous phosphoric acid (31:69) Retention time ของ emodin 1.5 นาที	(Wang et al., 2008)

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

#### อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมี

##### 1. สารเคมี

- 1.1 ผงสมุนไพรเถาวัลย์เหล็ก                      ผลิตภัณฑ์ของ เวชพงศ์ไอศถ
- 1.2 น้ำ Type I
- 1.3 Methanol    ผลิตภัณฑ์ของ Macron fine chemicals, HPLC Grade
- 1.4 Ethanol     ผลิตภัณฑ์ของ Carlo Erba, AR Grade
- 1.5 1-Propanol    ผลิตภัณฑ์ของ Sigma-Aldrich, AR Grade
- 1.6 1-Butanol    ผลิตภัณฑ์ของ Sigma-Aldrich, AR Grade
- 1.7 Acetonitrile                                        ผลิตภัณฑ์ของ Fisher Chemicals, HPLC Grade
- 1.8 Phosphoric acid                                    ผลิตภัณฑ์ของ Merck, AR Grade

##### 2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 2.1 เครื่องชั่งทศนิยม 7 ตำแหน่ง Mettler Toledo, XP2U, USA
- 2.2 เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง Mettler Toledo, XP205DR, USA
- 2.3 High-performance liquid chromatography (HPLC) Acquity UPLC H-Class, Waters, UK
- 2.4 Water bath Toho TTM-004P
- 2.5 Ultrasonic bath Dentsply 104H
- 2.6 Microwave Samsung, ME73MD, Malaysia

#### วิธีการทดลอง

##### พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร emodin ด้วย HPLC

1. การเตรียม Emodin standard stock solution

ซึ่งสารมาตรฐาน emodin 1 mg ใสลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL และปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 0.1 mg/mL)

## 2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง (Sample solution)

ซึ่งผงเถาวัลย์เหล็ก 5 g ใส่ใน glass-stopped flask ขนาด 250 mL เติมน้ำ ethanol 50 mL ตั้งทิ้งไว้ 7 วัน กรองผ่านกระดาษกรองด้วย Buchner funnel เจือจางและปรับปริมาตรด้วย methanol กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45  $\mu\text{m}$

## 3. สภาพที่ใช้ในการวิเคราะห์

อ้างอิงสรุปจากตาราง 4 ตัวอย่างการวิเคราะห์สารกลุ่ม anthraquinone ด้วยเทคนิค HPLC

Column : XSelect CSH C18 (4.6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )

Mobile phase : 0.1% phosphoric acid : Acetonitrile (gradient elution)

ตาราง 5 แสดง mobile phase ระบบ gradient elution

Time (min)	Flow rate (mL/min)	0.1% Phosphoric acid (%)	Acetonitrile (%)
0	1.0	40	60
13	1.0	40	60
14	1.0	5	95
19	1.0	5	95
20	1.0	40	60

Detector : Photo Diode Array, 288 nm

Injection Volume : 20  $\mu\text{L}$

Column temperature : 30  $^{\circ}\text{C}$

## 4. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

(AOAC International, 2013; ICH, 2005)

### 4.1 Linearity

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Emodin ความเข้มข้น 6 ระดับโดยเปิด emodin standard stock solution (ความเข้มข้น 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ปริมาตร 1 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 20 mL และ 1, 2, 3, 4 และ 5 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol (ความเข้มข้น 1, 2, 4, 6, 8, และ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ตามลำดับ) กรองผ่าน membrane

filter ขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  ซีดความเข้มข้นละ 6 ครั้ง นำข้อมูลระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคมาสร้างกราฟเส้นตรง และหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

#### 4.2 Specificity

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานมาวิเคราะห์เทียบ retention time ของ emodin peak และวิเคราะห์ peak purity

#### 4.3 Accuracy

ปิเปต emodin standard stock solution (ความเข้มข้น 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ปริมาตร 1, 2 และ 3 mL ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ที่มีสารสกัดสมุนไพรจากข้อ 2 อยู่ 3 mL และปรับปริมาตรด้วย methanol กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  ซีดความเข้มข้นละ 3 ครั้งคำนวณค่า %recovery จะต้องอยู่ในช่วง 92-105%

#### 4.4 Precision

##### 4.4.1 System Precision

ซิดสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  6 ครั้ง peak area ต้องมีค่า %RSD ไม่เกิน 1.0%

##### 4.4.2 Method Precision

คำนวณค่า %RSD ของ %Recovery ของสารละลายทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นจากการทดสอบในหัวข้อ Accuracy ต้องมีค่า %RSD ไม่เกิน 2.0%

#### 4.5 Robustness

ทดสอบความทนของวิธีวิเคราะห์โดยปรับเปลี่ยนสภาวะของระบบ HPLC ด้วยสารละลายตัวอย่าง โดยสภาวะที่เปลี่ยนแปลงต่าง ๆ มีดังนี้

4.5.1 อุณหภูมิของคอลัมน์ เป็น 29°C 30°C และ 31°C

4.5.2 ปริมาตรของสารละลายที่ซิด เป็น 18, 20 และ 22  $\mu\text{L}$

4.5.3 อัตราการไหลของ mobile phase เป็น 0.95, 1.0 และ 1.05 mL/min

4.5.4 ความเข้มข้นของ phosphoric acid ใน mobile phase เป็น 0.09%, 0.1% และ 0.11%

#### 4.6 Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

##### 4.6.1 Limit of Detection (LOD)

คือปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของ emodin ที่วิเคราะห์ได้ ตรวจวัดจาก signal to noise ratio ที่ 3:1

#### 4.6.2 Limit of Quantitation (LOQ)

คือปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของ emodin ที่วิเคราะห์ปริมาณอย่างถูกต้องได้ ตรวจวัดจาก signal to noise ratio ที่ 10:1

#### การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

1. เปรียบเทียบปริมาณของ emodin ที่ได้จากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ โดยนำผงสมุนไพรเถาวัลย์เหล็ก 5 g หมักด้วยตัวทำละลาย 50 mL เป็นเวลา 7 วัน ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

1.1 น้ำ

1.2 20-100 % Ethanol

1.3 20-100 % Methanol

1.4 1-Propanol

1.5 1-Butanol

2. กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองด้วย Buchner funnel
3. เจือจางและปรับปริมาตรด้วย methanol
4. วิเคราะห์หาปริมาณ emodin ด้วยเทคนิค HPLC

#### การเปรียบเทียบวิธีการสกัด 3 วิธี

##### Maceration

1. ชั่งผงเถาวัลย์เหล็ก 5 g ใส่ใน glass-stopped flask ขนาด 250 mL
2. เติมน้ำ ปริมาตร 50 mL หมักเป็นเวลา 7 วัน
3. กรองสารสกัดผ่านกระดาษกรองด้วย Buchner funnel
4. นำสารสกัดที่ได้ทำให้เข้มข้นด้วย Water bath
5. เจือจางสารสกัดและปรับปริมาตรด้วย methanol
6. วิเคราะห์หาปริมาณ emodin ด้วยเทคนิค HPLC

##### Ultrasonic-Assisted Extraction

1. ชั่งผงเถาวัลย์เหล็ก 5 g ใส่ใน glass-stopped flask ขนาด 250 mL
2. เติมน้ำ ปริมาตร 50 mL นำไป sonicate 30 นาที
3. กรองสารสกัดผ่านกระดาษกรองด้วย Buchner funnel

4. นำสารสกัดที่ได้ทำให้เข้มข้นด้วย Water bath
5. เจือจางสารสกัดและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ
6. วิเคราะห์หาปริมาณ emodin ด้วยเทคนิค HPLC

#### Microwave-Assisted Extraction

1. ชั่งผงเถาวัลย์เหล็ก 5 g ใส่ใน glass-stopped flask ขนาด 250 mL
2. เติมน้ำ ethanol ปริมาตร 50 mL ทำการ microwave เพื่อสกัดตามตาราง 6
3. ถ้ามีการสกัดหลายรอบให้รินเก็บส่วนใสแล้วเติมน้ำ ethanol ปริมาตร 50 mL ทำการ microwave เพื่อสกัดทำการสกัดตามตาราง 6 ต่อไป
4. รวบรวมสารละลายทั้งหมดกรองผ่านกระดาษกรองด้วย Buchner funnel
5. นำสารสกัดที่ได้ทำให้เข้มข้นด้วย Water bath
7. เจือจางและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ
6. วิเคราะห์หาปริมาณ emodin ด้วยเทคนิค HPLC

ตาราง 6 แสดงตัวแปรในการสกัดด้วย microwave

Microwave power (watt)	180			300		
จำนวนรอบการสกัด (รอบ)	1	3	5	1	3	5
เวลาที่ใช้สกัด (วินาที)	30	30	30	30	30	30
	60	60	60	60	60	60
Microwave power (watt)	450			600		
จำนวนรอบการสกัด (รอบ)	1	3	5	1	3	5
เวลาที่ใช้สกัด (วินาที)	30	30	30	30	30	30
	60	60	60	60	60	60

#### การเก็บรวบรวมข้อมูล

ปริมาณสาร emodin วิเคราะห์จาก peak area ที่ได้จากเทคนิค HPLC เทียบกับสารมาตรฐานที่จัดทำเป็น standard curve

### การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ใช้ One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม Excel
  - 1.1 เปรียบเทียบปริมาณสาร emodin จากตัวทำละลายที่ใช้สกัด
  - 1.2 เปรียบเทียบปริมาณสาร emodin จากวิธีที่ใช้สกัด 3 วิธี

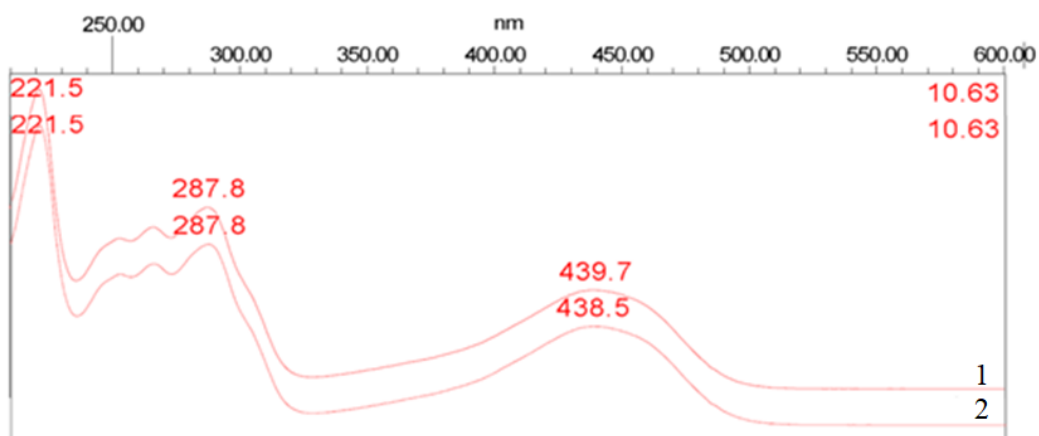


## บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการหาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสาร emodin จากสมุนไพรเถาวัลย์เหล็ก และวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิค HPLC

### พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร emodin ด้วย HPLC

จากการศึกษาทดลองก่อนหน้าในการวิเคราะห์หาปริมาณ emodin ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์อย่างน้อย 25 นาที และยังไม่มียวิธีที่จำเพาะต่อ emodin ในสมุนไพรเถาวัลย์เหล็กมาก่อน (ตาราง 4) การศึกษาครั้งนี้จึงได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้มีความรวดเร็ว และจำเพาะเจาะจงต่อสาร emodin ในสารสกัดสมุนไพรเถาวัลย์เหล็ก โดยใช้ gradient elution ทำให้ลดระยะเวลาการวิเคราะห์โดยสามารถวิเคราะห์พิกัด emodin ได้ที่เวลา 10.6 นาที และปรับเปลี่ยนความยาวคลื่นจากการทดลองก่อนหน้าที่ 254 nm, 278 nm และ 436 nm (ตาราง 4) จากผล UV/VIS Spectrum ที่ 200-600 nm (ภาพประกอบ 6) พบว่าความยาวคลื่นที่ emodin สามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุดคือ 288 nm ทำให้วิธีวิเคราะห์มีความไวต่อ emodin มากขึ้น สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์คือคอลัมน์ชนิด XSelect CSH C18 (4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m), Mobile phase คือ 0.1% phosphoric acid และ acetonitrile ในระบบ gradient elution ตามตารางที่ 5, วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 288 nm, ฉีดสารเข้าเครื่องปริมาตร 20  $\mu$ L ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 30  $^{\circ}$ C



ภาพประกอบ 6 UV/VIS Spectrum ของพิกัด emodin ที่ 200-600 nm จาก 1: สารมาตรฐาน, 2: สารสกัด

### การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

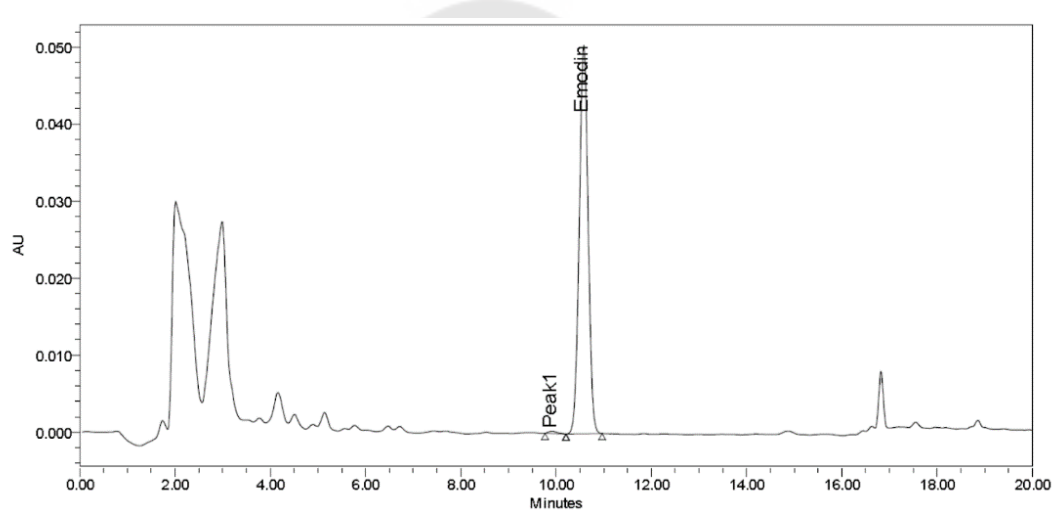
จากการฉีดสารละลายตัวอย่างเพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ พบว่าสามารถแยกพีค emodin จากพีคข้างเคียงได้อย่างชัดเจนโดยมีข้อมูลโครมาโตแกรมดังนี้ (ภาพประกอบ 7)

Retention time ของพีค emodin เท่ากับ 10.6 นาที

Resolution ระหว่างพีค emodin กับพีคข้างเคียง เท่ากับ 1.90

Tailing factor ของพีค emodin เท่ากับ 1.00

Theoretical plate ของพีค emodin เท่ากับ 15000

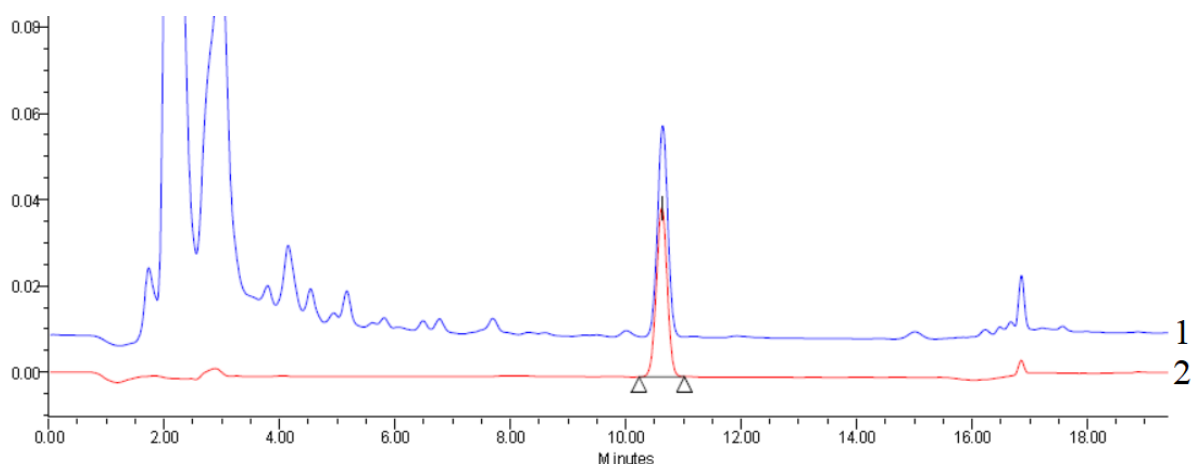


ภาพประกอบ 7 โครมาโตแกรมสำหรับตรวจสอบความเหมาะสมของระบบการวิเคราะห์ emodin ในสารสกัดเถาวัลย์เหล็ก

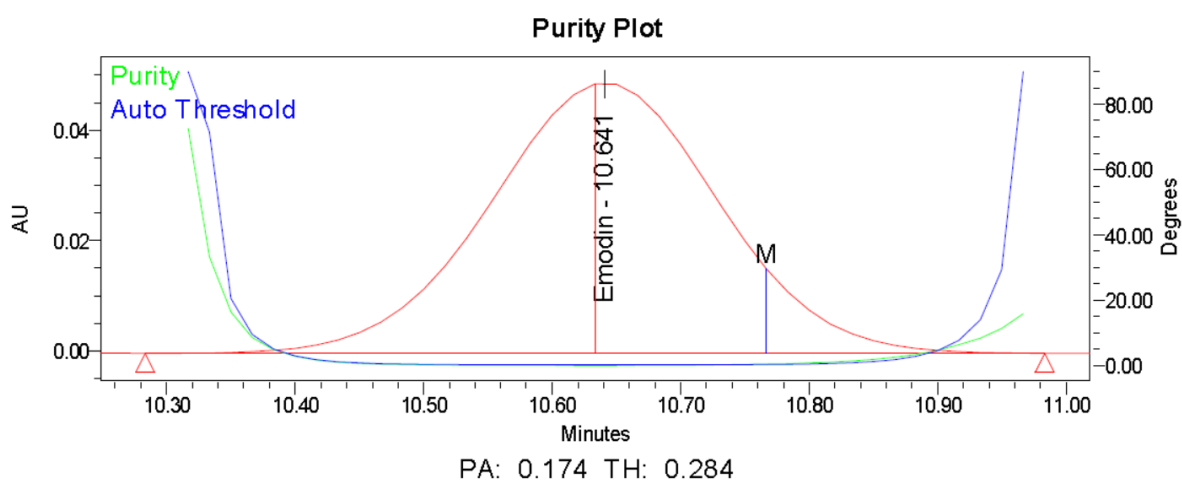
#### 1. Specificity

จากการนำสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานมาวิเคราะห์เทียบ retention time ของ พีค emodin พบว่ามี retention time ตรงกัน โดยสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานมี retention time ของพีค emodin เท่ากันคือที่ 10.6 นาที ดังภาพประกอบ 8 และเมื่อนำสารละลายตัวอย่างมาวิเคราะห์ peak purity จากการใช้เครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิด Photo Diode Array โดยใช้ทฤษฎี Spectral contrast technique ซึ่งเป็นการแปลงผลจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ มาอยู่ในรูปเวกเตอร์ แล้วใช้ค่าของมุมมาเปรียบเทียบและประเมินผล ค่าที่ใช้คือ spectral contrast angles, purity angle และ purity threshold โดย spectral contrast angles คือ การหาค่ามุมในรูปแบบเวกเตอร์ที่กระทำทุกๆ ความยาวคลื่นที่ต้องการและกระทำทุกพื้นที่พีคที่เกิดขึ้น, purity angle คือ ค่าเฉลี่ยถ่วงน้ำหนักของ spectral

contrast angles ทั้งหมด และ purity threshold คือผลรวมของมุมที่เกิดจากปัจจัยต่างๆ เมื่อค่า purity angle น้อยกว่า purity threshold แสดงว่าพีคั้นมีความบริสุทธิ์เป็นเนื้อเดียว ไม่มีพีคอื่นเจือปน และจากผลการทดลองพบว่า purity angle มีค่าเท่ากับ 0.174 ซึ่งน้อยกว่า purity threshold ค่าเท่ากับ 0.284 แปลว่าพีคั้นบริสุทธิ์ ดังภาพประกอบ 9 จากการตรวจสอบทั้ง 2 หัวข้อแสดงว่าสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงกับ emodin



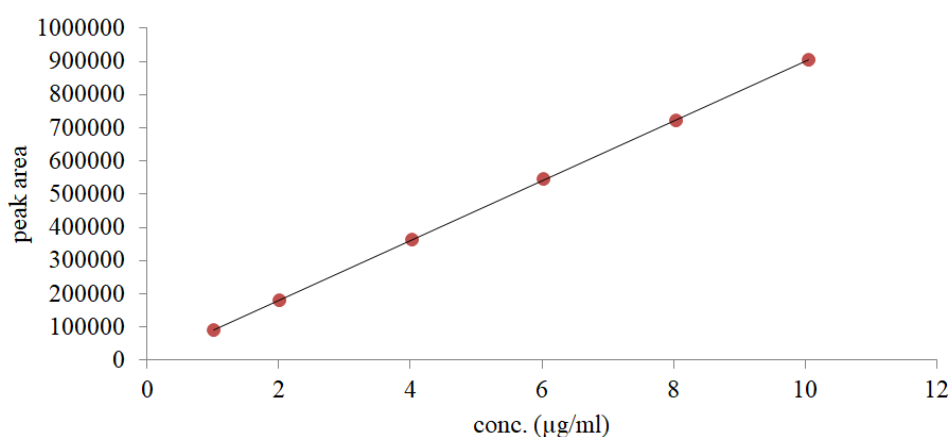
ภาพประกอบ 8 โครมาโตแกรมของ 1: สารสกัดเถาวัลย์เหล็ก, 2: สารละลายมาตรฐาน emodin



ภาพประกอบ 9 peak purity ของพีค emodin จากสารละลายตัวอย่าง

## 2. Linearity

จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน emodin ความเข้มข้น 1, 2, 4, 6, 8, และ 10 µg/mL ความเข้มข้นละ 6 ครั้ง ทำซ้ำ 3 วัน นำข้อมูลระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีคมาสร้างกราฟมาตรฐาน (ภาพประกอบ 10) พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.99985, 0.99998 และ 0.99996 ตามลำดับ ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงทั้ง 3 วันแสดงข้อมูลตามตาราง 7 โครมาโตแกรมของแต่ละความเข้มข้นแสดงดังภาพประกอบ 11



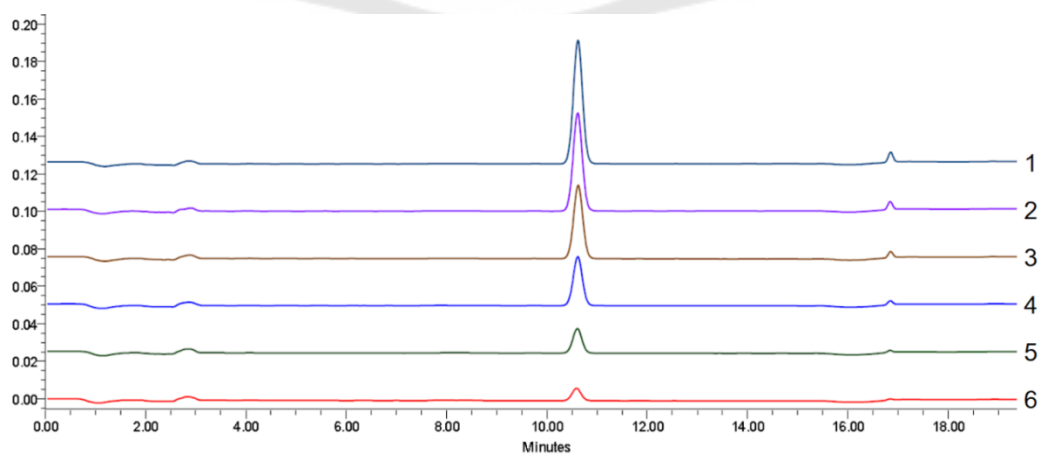
ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ emodin กับพื้นที่ใต้พีค

ตาราง 7 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง

วันที่	ความเข้มข้น (µg/mL)	พื้นที่ใต้พีค	%RSD (%)	สมการเส้นตรง
1	0.92	81347.74	0.96	$y = 88,160.13x + 2,068.70$ $R^2 = 0.99986$
	1.84	162987.13	0.22	
	3.68	326215.67	0.14	
	5.51	492419.56	0.14	
	7.35	653280.30	0.23	
	9.19	807359.36	0.09	

ตาราง 7 (ต่อ)

วันที่	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )	พื้นที่ใต้พีค	%RSD (%)	สมการเส้นตรง
2	1.01	90473.37	0.22	$y = 90,091.33x + 249.56$
	2.01	181277.22	0.21	$R^2 = 0.99998$
	4.02	361965.97	0.28	
	6.03	545820.61	0.09	
	8.04	723070.26	0.06	
	10.05	905769.11	0.40	
3	0.96	85395.73	0.60	$y = 89,485.05x - 1,689.05$
	1.93	170807.43	0.62	$R^2 = 0.99996$
	3.85	343220.44	0.29	
	5.78	513390.44	0.12	
	7.70	685228.30	0.24	
	9.63	862471.43	0.13	



ภาพประกอบ 11 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 6 ความเข้มข้น 1: 10  $\mu\text{g/mL}$ , 2: 8  $\mu\text{g/mL}$ , 3: 6  $\mu\text{g/mL}$ , 4: 4  $\mu\text{g/mL}$ , 5: 2  $\mu\text{g/mL}$ , 6: 1  $\mu\text{g/mL}$

### 3. Accuracy

จากการหา %Recovery ของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไปในการละลายตัวอย่าง ที่ 3 ระดับความเข้มข้น 3.64, 5.48 และ 7.313  $\mu\text{g/mL}$  ซึ่งเตรียมความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง พบว่า %Recovery ในทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ในช่วง 92-105% และ %RSD น้อยกว่า 2.0% (ที่ความเข้มข้น 1.0%) (AOAC International, 2013) แสดงดังตาราง 8

ตาราง 8 ผลการทดสอบหาค่า Accuracy

ปริมาณที่เติม ( $\mu\text{g/mL}$ )	ปริมาณที่ตรวจพบ ( $\mu\text{g/mL}$ )	%Recovery (%)	Average %Recovery (%)	%RSD (%)
1.838	1.873	101.93	101.99	0.05
	1.875	102.01		
	1.875	102.03		
3.675	3.759	102.27	102.44	0.34
	3.757	102.21		
	3.780	102.83		
5.513	5.631	102.15	103.16	0.94
	5.737	104.07		
	5.693	103.26		

### 4. Precision

#### 4.1 System Precision

จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 6  $\mu\text{g/mL}$  จำนวน 3 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างฉีดซ้ำ 6 ครั้ง พบว่า %RSD ของพื้นที่ใต้พีคไม่เกิน 1.0% แสดงดังตาราง 9

ตาราง 9 ผลการทดสอบ System precision

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีค Emodin		
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3
1	493178.27	545024.37	512778.21
2	492659.53	545676.37	513618.16
3	491657.27	545667.63	513019.92
4	491461.21	546340.23	513472.90
5	492836.79	546140.78	514515.55
6	492724.31	546074.30	512937.89
Mean	492419.56	545820.61	513390.44
%RSD	0.14	0.09	0.12

#### 4.2 Method Precision

คำนวณค่า %RSD ของ %Recovery ของสารละลายทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นจากการทดสอบในหัวข้อ Accuracy ได้ค่า %RSD เท่ากับ 0.05, 0.34 และ 0.94 ตามลำดับ (ตาราง 8)

#### 5. Robustness

ทดสอบความทนของวิธีวิเคราะห์โดยปรับเปลี่ยนสภาวะของระบบ HPLC ด้วยสารละลายตัวอย่าง ประเมินโดยการเปรียบเทียบค่า Resolution ระหว่างพีค emodin และพีคข้างเคียง พบว่ามีค่ามากกว่า 1.5 และมีค่า tailing factor และ theoretical plate ไม่แตกต่างกันดังตาราง

ตาราง 10 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงสภาวะในระบบ HPLC

สภาวะ		Area	Resolution	Tailing factor	Theoretical plate
อุณหภูมิของคอลัมน์ (°C)	29	519388.22	1.68	0.98	15011
	30	519815.20	1.63	0.98	14846
	31	518079.30	1.51	0.98	14804
ปริมาตรของสารละลาย ที่ฉีด (µL)	18	467662.61	1.64	0.98	15556
	20	519815.20	1.63	0.98	14846
	22	570244.81	1.60	0.98	14296
อัตราการไหลของ mobile phase (mL/min)	0.95	522261.67	1.66	0.98	15275
	1.0	519815.20	1.63	0.98	14846
	1.05	498650.20	1.61	0.98	14486
ความเข้มข้นของ phosphoric acid ใน mobile phase (%)	0.09	522544.48	1.62	0.98	14956
	0.10	519815.20	1.63	0.98	14846
	0.11	523822.62	1.62	0.98	14932

#### 6. Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

เมื่อคำนวณขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณของ emodin คำนวณได้จาก Slope และ Y-intercept ของสมการเส้นตรง 3 เส้น แสดงรายละเอียดดังตาราง 11 คำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 0.07 µg/mL และ LOQ เท่ากับ 0.21 µg/mL โดยจากการทดสอบขีดสารละลาย emodin พบว่า LOD มีค่าเท่ากับ 0.008 µg/mL (S/N = 3.249) และ LOQ เท่ากับ 0.02 µg/mL (S/N = 10.904)

ตาราง 11 ค่าที่ใช้ในการคำนวณขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณของ emodin

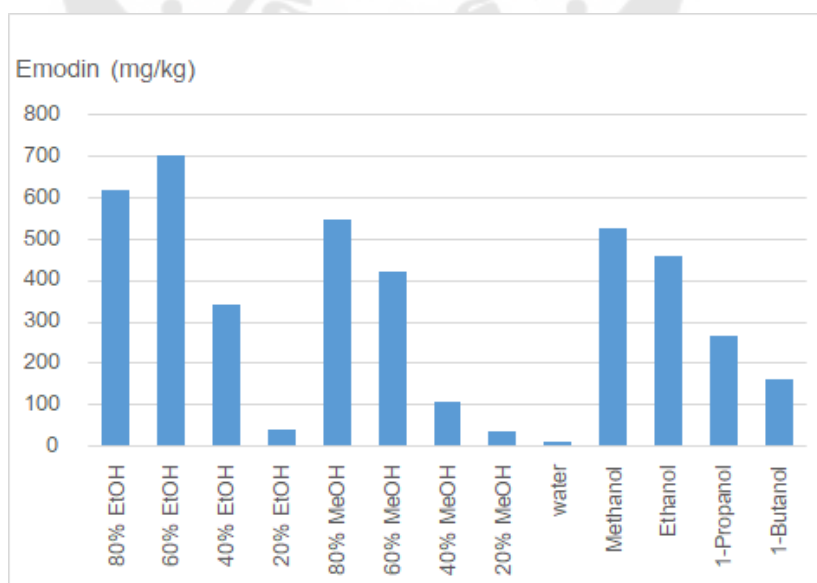
สมการเส้นตรง	R <sup>2</sup>	Slope	Y-intercept
1	0.99986	88160.13	2068.70
2	0.99998	90,091.33	249.56
3	0.99996	89,485.05	- 1,689.05
mean	0.99993	89245.50	209.74
SD			1879.19

#### การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

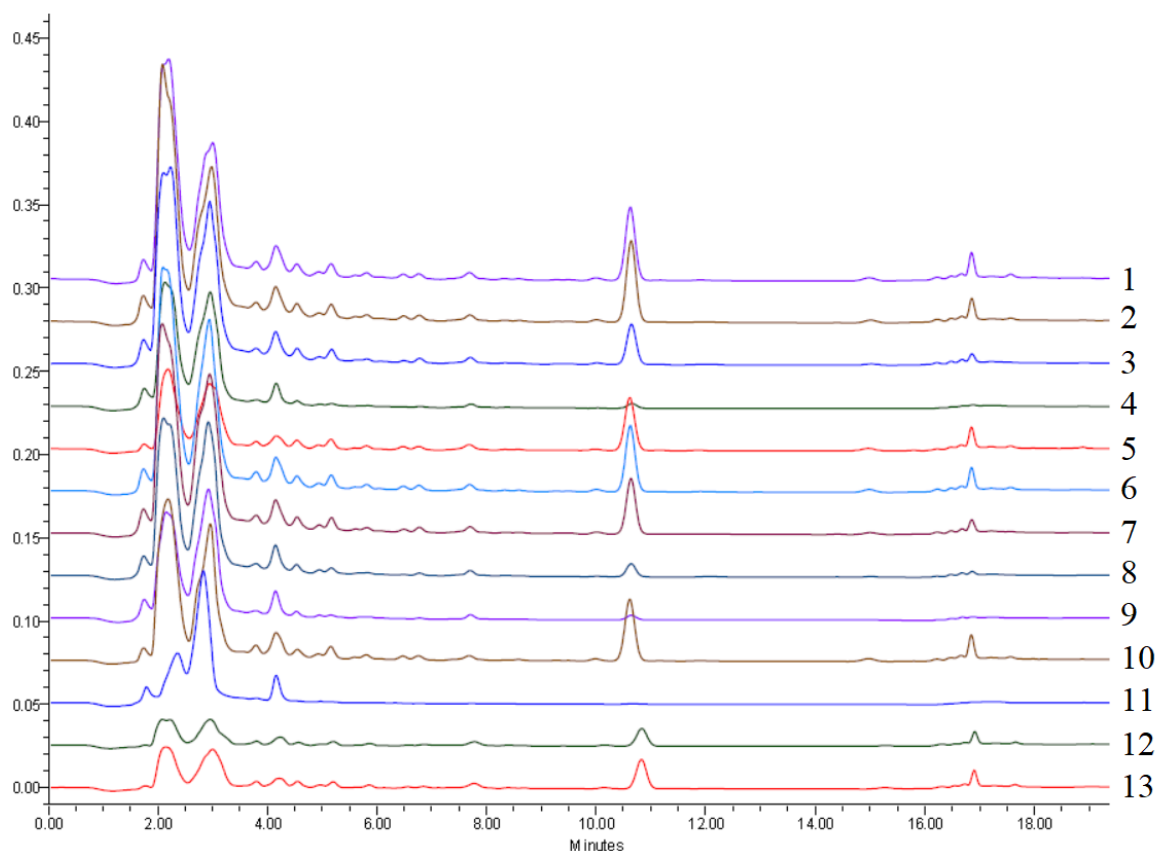
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ emodin ที่ได้จากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ โดยนำผงสมุนไพรเถาว์ลย์เหล็ก 5 g หมักด้วยตัวทำละลาย 50 mL เป็นเวลา 7 วัน ผลที่ได้แสดงดังตาราง 12 และแสดงในรูปกราฟดังภาพประกอบ 12 ซึ่งตัวทำละลายที่สามารถสกัด emodin ได้ดีที่สุดคือ 60% methanol (ค่า Dielectric constant = 49.81 ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โคจรมาโตแกรมของการสกัดแสดงดังภาพประกอบ 13

ตาราง 12 ปริมาณ emodin ที่สกัดโดยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ตัวทำละลาย	ปริมาณ Emodin (mg/kg)	Dielectric constant ( $\epsilon$ )
80% Ethanol	618.13	37.70
60% Ethanol	702.52	49.81
40% Ethanol	343.48	60.80
20% Ethanol	41.52	70.82
80% Methanol	548.50	44.35
60% Methanol	421.26	54.54
40% Methanol	108.89	63.79
20% Methanol	36.60	72.25
Water	10.32	80.00
Methanol	527.87	33.10
Ethanol	460.96	24.30
1-Propanol	264.90	20.10
1-Butanol	161.81	17.80



ภาพประกอบ 12 ปริมาณ emodin ที่สกัดโดยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ



ภาพประกอบ 13 โครมาโตแกรมที่ได้จากการสกัดโดย 1: 80% Ethanol 2: 60% Ethanol 3: 40% Ethanol 4: 20% Ethanol 5: Ethanol 6: 80% Methanol 7: 60% Methanol 8: 40% Methanol 9: 20% Methanol 10: Methanol 11: Water 12: 1-Butanol 13: 1-Propanol

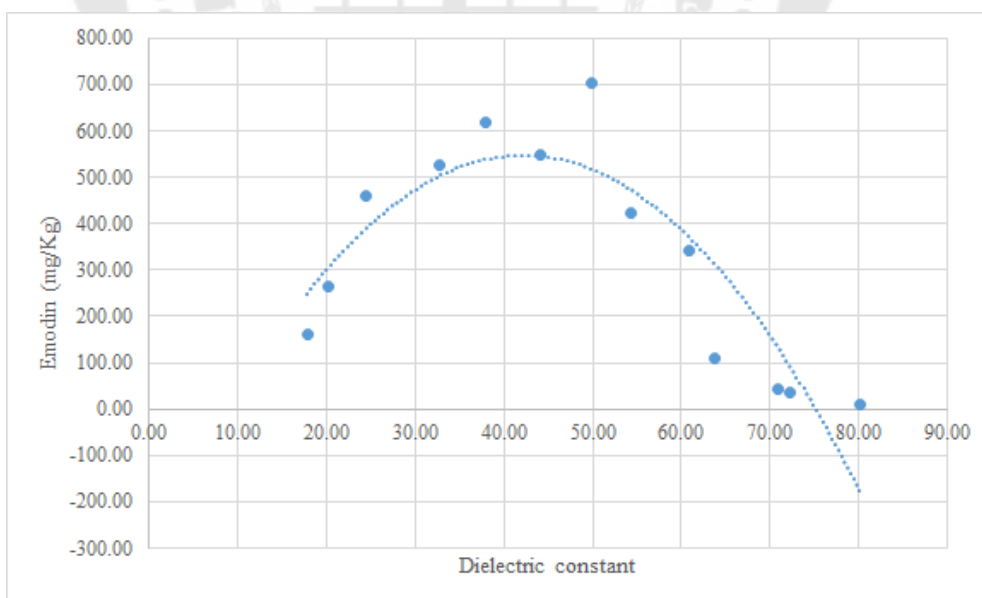
จากข้อมูลคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของ emodin ที่ระบุว่าสามารถละลายได้ดีใน alcohol จึงทำการทดลองโดยเริ่มที่ใช้ตัวทำละลายเป็น alcohol 4 ชนิด ได้แก่ methanol, ethanol, 1-propanol, 1-butanol และน้ำ พบว่าสารสกัดที่ได้จาก methanol มีปริมาณ emodin สูงที่สุด และ ethanol เป็นลำดับถัดมา ซึ่งสูงกว่าสารสกัดที่ได้จาก 1-propanol และ 1-butanol อย่างมาก ซึ่งปริมาณของ emodin ที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับค่า dielectric constant ของตัวทำละลายที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้าตามตาราง 1 ที่มีการสกัดสาร emodin จากพืชชนิดอื่น ๆ ตัวทำละลายที่ให้ปริมาณ emodin สูงคือ methanol แต่จากการทดลองจะเห็นได้ว่าน้ำที่มีขั้วสูงกลับสกัด emodin ออกมาได้ปริมาณต่ำมากแสดงให้เห็นว่าปริมาณ emodin ที่ได้ ไม่ได้เพิ่มขึ้นตามค่า dielectric constant ที่เพิ่มขึ้นเสมอไป จึงทำการทดลองหาตัวทำละลายที่มีค่า dielectric constant ที่เหมาะสม โดยใช้น้ำผสมกับ methanol และ ethanol ในสัดส่วนต่าง ๆ คือ 20-100%

methanol และ 20-100% ethanol ค่า dielectric constant ของตัวทำละลายผสมหาได้จากสูตร (Alizadeh & Shamsipur, 1997)

$$\epsilon = \epsilon_1(100-w_2)/100 + \epsilon_2w_2/100$$

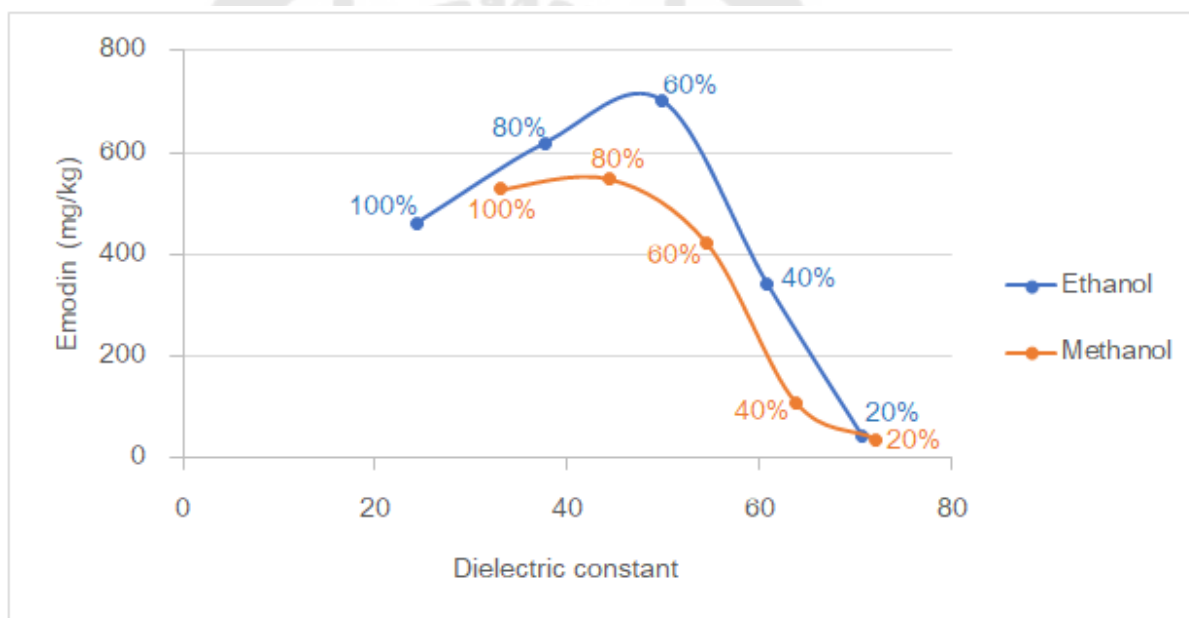
เมื่อ  $\epsilon$ ,  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_2$  คือ ค่า dielectric constant ของตัวทำละลายผสม, ตัวทำละลายชนิดที่ 1 และ ตัวทำละลายชนิดที่ 2 ตามลำดับ,  $w_2$  คือสัดส่วนร้อยละของตัวทำละลายชนิดที่ 2 ในตัวทำละลายผสม

ค่า dielectric constant ของตัวทำละลาย และตัวทำละลายผสม และปริมาณ emodin ที่ได้จากการสกัดแสดงดังตาราง 12 ตัวทำละลายที่สกัดสาร emodin ออกมาได้ดีที่สุดคือ 60% ethanol และเมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ emodin และค่า dielectric constant ของตัวทำละลายต่าง ๆ พบว่าค่า dielectric constant ที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณ emodin จากการสกัด 300-700 mg/Kg อยู่ในช่วง 30-50 (ภาพประกอบ 14)



ภาพประกอบ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ emodin และค่า dielectric constant ของตัวทำละลาย

อย่างไรก็ตามเมื่อนำผลการสกัดจากตัวทำละลายที่มีค่า dielectric constant ใกล้เคียงกันมาเปรียบเทียบกัน (ภาพประกอบ 15) พบว่าตัวทำละลายที่มีส่วนผสมของ ethanol ได้ปริมาณ emodin มากกว่าตัวทำละลายที่มีส่วนผสมของ methanol อาจกล่าวได้ว่า ค่า dielectric constant ยังไม่สามารถอธิบายความสามารถในการสกัดสาร emodin ของตัวทำละลายได้อย่างครอบคลุม จากโครงสร้างของ emodin (ภาพประกอบ 2) จะเห็นได้ว่ามีส่วนของโครงสร้างที่ละลายได้ดีในน้ำที่มีขั้วสูงคือส่วนของหมู่ -OH ส่วน aromatic ring ต้องใช้ตัวทำละลายพวก organic solvent ที่มีขั้วต่ำกว่า ดังนั้นการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดจึงอาจมีปัจจัยหรือแรงอื่น ๆ นอกจากค่า dielectric constant มาเกี่ยวข้อง เช่น แรง van der waal และ hydrophobic interaction



ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ emodin กับตัวทำละลายผสม 20-100% ethanol และ 20-100% methanol

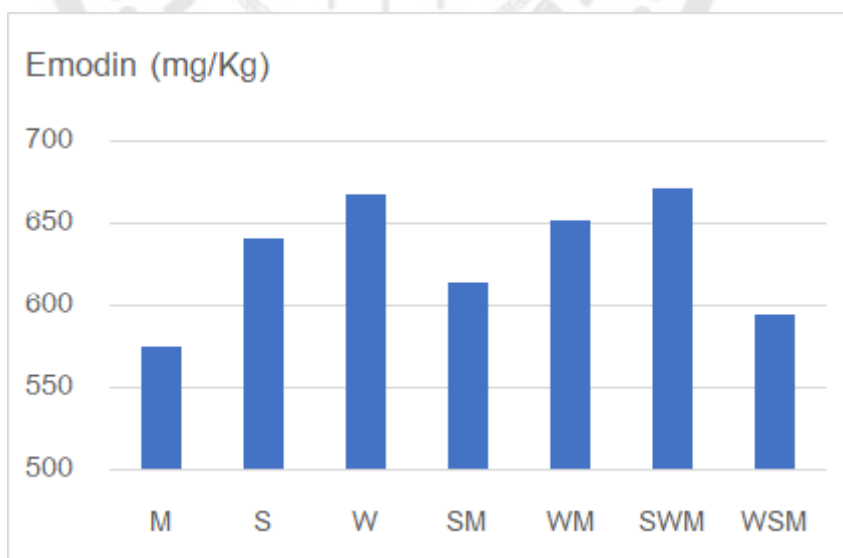
### เปรียบเทียบวิธีการสกัด 3 วิธี

ทำการทดลองสกัดด้วย ethanol โดยใช้วิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ Maceration (M), Ultrasonic-Assisted Extraction (S) และ Microwave-Assisted Extraction (W) พบว่าวิธีที่สามารถสกัด emodin ออกมาได้ดีที่สุดคือนำไปสกัด Ultrasonic-Assisted Extraction ตามด้วย

Microwave-Assisted Extraction แล้ว Maceration (SWM) ผลการสกัดแสดงดังตาราง 13 และภาพประกอบ 16

ตาราง 13 ปริมาณ emodin ที่ได้จากการสกัดด้วย Maceration, Ultrasonic-Assisted Extraction และ Microwave-Assisted Extraction โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย

วิธีการสกัด	ปริมาณ Emodin (mg/kg)
M	575.57
S	641.51
W	667.66
SM	614.56
WM	651.53
SWM	671.89
WSM	595.15



ภาพประกอบ 16 ปริมาณ emodin ที่ได้จากการสกัดด้วย Maceration , Ultrasonic-Assisted Extraction และ Microwave-Assisted Extraction

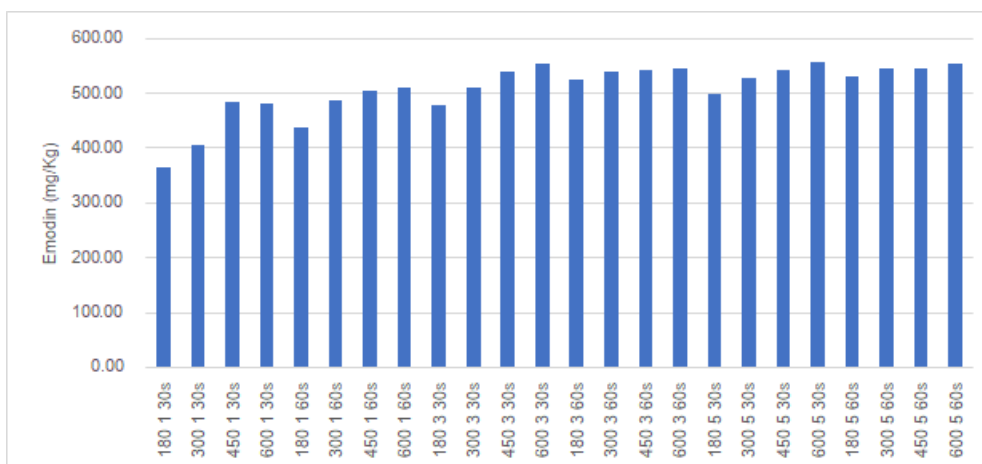
จากวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธีที่มีหลักการแตกต่างกันไป Maceration (M), Ultrasonic-Assisted Extraction (S) และ Microwave-Assisted Extraction (W) วิธี Maceration เป็นวิธีการสกัดโดยนำผงสมุนไพรหมักกับตัวทำละลายในการทดลองนี้ใช้เวลา 7 วัน ตัวทำละลายจะค่อยๆ ทำการสกัด emodin ออกมา Ultrasonic-Assisted Extraction ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงลดขนาดอนุภาคของสมุนไพร และ Microwave-Assisted Extraction โดยสมุนไพรจะดูดซับคลื่นไมโครเวฟแล้วเปลี่ยนเป็นพลังงานความร้อนคลื่นไมโครเวฟจะส่งตรงเข้าสู่โมเลกุล แล้วจึงเกิดการกระจายความร้อนไปสู่ส่วนอื่น ๆ ช่วยในการพาสารออกมาสู่ตัวทำละลาย จากผลการทดลองพบว่า Microwave-Assisted Extraction และ Ultrasonic-Assisted Extraction ทำให้ได้ปริมาณ emodin มากกว่าการทำ Maceration ซึ่งทั้ง 2 วิธีใช้เวลาในการสกัดสั้นกว่ามาก และเมื่อทดลองการสกัดสาร emodin โดยใช้วิธีและลำดับการสกัดต่างกันอีก 5 วิธี ได้แก่ SM, WM, SWM, และ WSM พบว่าวิธีที่สกัดสารออกมาได้มากที่สุดคือ SWM ซึ่งสอดคล้องกับหลักการในการสกัด การใช้ Ultrasonic-Assisted Extraction เป็นลำดับแรกจะช่วยเพิ่มขนาดของพื้นที่ผิวของผงสมุนไพร ทำให้ตัวทำละลายสัมผัสกับผงสมุนไพรมากขึ้น เมื่อสกัดต่อด้วย Microwave-Assisted Extraction ทำให้สามารถสกัดสารออกมาได้มากกว่าลำดับวิธีการสกัดอื่น ๆ แต่เมื่อพิจารณาไปถึงระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดด้วยแล้วพบว่าการใช้ microwave ช่วยในการสกัดก็ได้ปริมาณ emodin ที่สูงเช่นเดียวกัน โดยใช้เวลาในการสกัดทั้งหมดเพียงแค่ 60 วินาที จึงสมควรพัฒนาวิธีสกัดนี้ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น โดยสภาวะการสกัดในการทดลองนี้ใช้ Microwave power 450 watt, จำนวนรอบการสกัด 1 รอบ, และ ใช้เวลา 60 วินาที ซึ่งอาจจะยังไม่ใช่สภาวะของการสกัดที่ดีที่สุด จึงต้องทำการทดลองปรับเปลี่ยนตัวแปรที่ส่งผลต่อการสกัดต่อไป

#### Microwave-Assisted Extraction

เมื่อปรับเปลี่ยนตัวแปรที่ใช้ในการสกัดด้วยไมโครเวฟ ได้แก่ microwave power, จำนวนรอบการสกัด และเวลาที่ใช้สกัด พบว่าสภาวะที่สกัดสาร emodin ออกมาได้มากที่สุดคือ microwave power 600 watt สกัด 5 รอบ รอบละ 30 วินาที ผลการสกัด แสดงดังตาราง 14 และภาพประกอบ 17

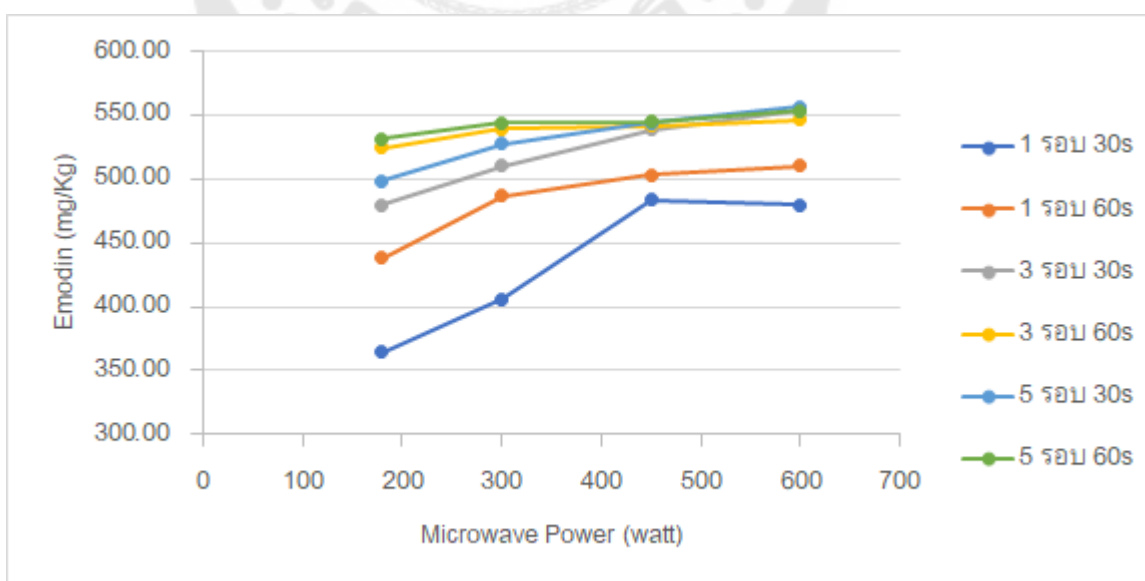
ตาราง 14 ปริมาณ emodin ที่ได้จากการสกัดด้วย Microwave-Assisted Extraction โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย

จำนวนรอบการสกัด (รอบ)	Microwave power (watt)	เวลาที่ใช้สกัด (วินาที)	ปริมาณ Emodin (mg/kg)
1	180	30	364.58
1	300	30	405.69
1	450	30	483.19
1	600	30	479.80
1	180	60	438.24
1	300	60	486.23
1	450	60	503.18
1	600	60	509.70
3	180	30	479.36
3	300	30	510.08
3	450	30	538.60
3	600	30	553.96
3	180	60	523.89
3	300	60	539.10
3	450	60	541.30
3	600	60	546.15
5	180	30	498.33
5	300	30	527.17
5	450	30	543.50
5	600	30	556.22
5	180	60	531.36
5	300	60	543.98
5	450	60	544.51
5	600	60	553.15

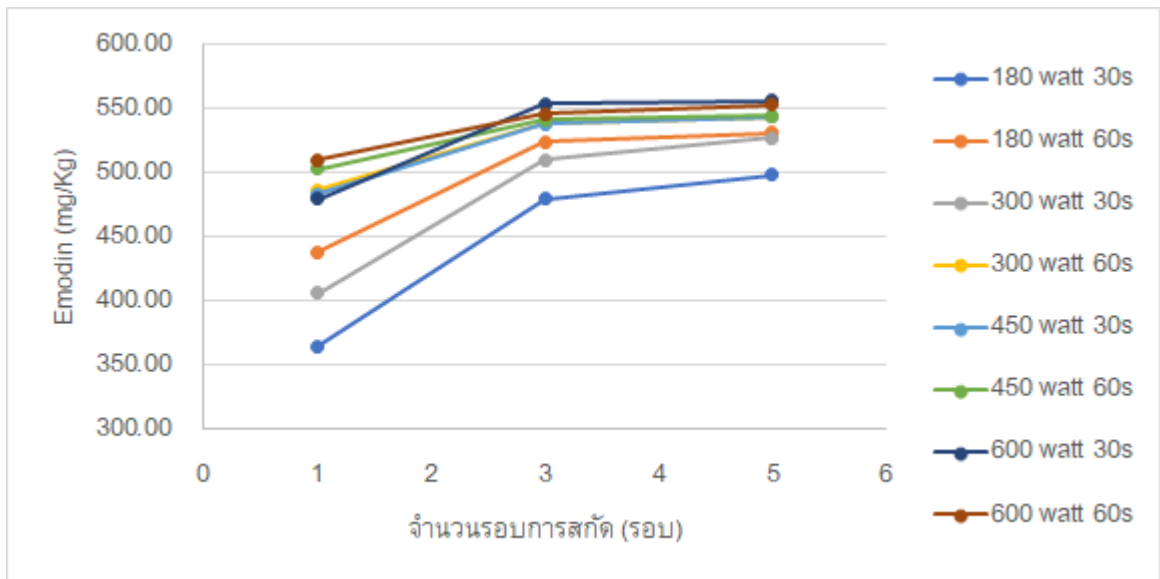


ภาพประกอบ 17 ปริมาณ emodin ที่ได้จากการสกัดด้วย Microwave-Assisted Extraction

เมื่อพิจารณาตัวแปรแต่ละตัวที่ส่งผลต่อการสกัดสาร emodin จากกราฟภาพประกอบ 18 จะเห็นได้ว่าที่จำนวนรอบและเวลาที่ใช้สกัดต่าง ๆ กัน เมื่อเพิ่ม microwave power จะทำให้ได้ปริมาณของ emodin มากขึ้น และจากกราฟภาพประกอบ 19 ยังมีจำนวนรอบการสกัดมากยิ่งขึ้นได้ปริมาณ emodin มากขึ้น และจากกราฟภาพประกอบ 20 เวลาที่ใช้ในการสกัด 60 วินาที ได้ปริมาณ emodin มากกว่า 30 วินาที ที่ microwave power และจำนวนรอบที่เท่ากัน



ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ emodin กับ microwave power



ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ emodin กับ จำนวนรอบการสกัด



ภาพประกอบ 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ emodin กับ เวลาที่ใช้ในการสกัด

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ emodin จากสารสกัดสมุนไพรเถาวัลย์เหล็ก เนื่องจากสารสกัดที่ได้มีสารอยู่หลากหลายชนิด ดังนั้นความเฉพาะเจาะจงต่อ emodin ของวิธีวิเคราะห์จึงมีความสำคัญ จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมของระบบโครมาโตกราฟี สามารถแยกพีค emodin ของจากพีคข้างเคียงได้ดี วิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจง และพีค emodin มีความบริสุทธิ์ซึ่งตรวจสอบได้จากการทำ Spectral contrast technique ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงในช่วง 1-10  $\mu\text{g/mL}$  ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.999 แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของระบบตลอดช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา การทดสอบความถูกต้องที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้ค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 101.99, 102.44 และ 103.16 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ในช่วง 92 - 105% และ %RSD ในแต่ละระดับความเข้มข้นน้อยกว่า 2.0% การทดสอบความเที่ยงพบว่ามี ความเที่ยงของระบบ (system precision) และความเที่ยงของวิธี (method precision) เมื่อคำนวณ %RSD จาก พื้นที่ใต้พีคได้ไม่เกิน 2% และจากการทดลองเปลี่ยนแปลงสภาวะต่าง ๆ ของระบบทั้ง อุณหภูมิของคอลัมน์, ปริมาตรของสารละลายที่ฉีด, อัตราการไหลของ mobile phase, ความเข้มข้นของ phosphoric acid ใน mobile phase พบว่าค่า resolution ระหว่างพีค emodin กับพีคข้างเคียงมีค่ามากกว่า 1.6 และพีค emodin ยังมีความบริสุทธิ์ สามารถแยกจากพีคข้างเคียงได้อย่างชัดเจน เมื่อทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณของ emodin มีค่าเท่ากับ 0.008  $\mu\text{g/mL}$  และ 0.02  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ

จากการทดลองหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสาร emodin จากเถาวัลย์เหล็ก พบว่าค่า dielectric constant ของตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณ emodin จากการสกัด 300-700 mg/Kg อยู่ในช่วง 30-50 โดยตัวทำละลายที่ดีที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้น 0.05 คือ 60 % ethanol มีค่า dielectric constant เท่ากับ 49.81 ได้ปริมาณ emodin เท่ากับ 702.52 mg/kg และเมื่อทดสอบเปรียบเทียบวิธีการสกัด 3 วิธี ได้แก่ Maceration, Ultrasonic-Assisted Extraction และ Microwave-Assisted Extraction โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย พบว่าวิธีที่สามารถสกัด emodin ออกมาได้ดีที่สุดคือ Microwave-Assisted Extraction ได้ปริมาณ emodin เท่ากับ 667.66 mg/Kg และเนื่องด้วยทั้ง 3 วิธี มีหลักการที่ใช้ในการสกัดต่างกัน เมื่อทดลองใช้ทั้ง 3 วิธีรวมกันพบว่าวิธีที่สามารถสกัด emodin ออกมาได้ดีที่สุดคือนำไปสกัด Ultrasonic-Assisted Extraction ตามด้วย Microwave-Assisted Extraction แล้วนำไป

Maceration ได้ปริมาณ emodin เท่ากับ 671.89 mg/Kg จะเห็นได้ว่าปริมาณ emodin ที่ได้ไม่แตกต่างจากการใช้ไมโครเวฟเพียงอย่างเดียวที่ใช้เวลาสกัดเพียง 60 วินาที ดังนั้นเมื่อพิจารณาความคุ้มค่าจึงพัฒนาวิธีสกัดนี้ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นโดยปรับเปลี่ยนตัวแปรที่ใช้ในการสกัดด้วยไมโครเวฟเพื่อให้ได้สภาวะในการสกัดด้วยไมโครเวฟที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ microwave power, จำนวนรอบการสกัด และเวลาที่ใช้สกัด พบว่าสภาวะที่สกัดสาร emodin ออกมาได้มากที่สุดคือ microwave power 600 watt สกัด 5 รอบ รอบละ 30 วินาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 0.05

จากการทดลองทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่า emodin สามารถใช้เป็น marker สำหรับควบคุมคุณภาพของตำรับสมุนไพรที่มีองค์ประกอบของเถาวัลย์เหล็ก โดยจากวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นพบว่าโครมาโตแกรมของสารสกัดจากสมุนไพรเถาวัลย์เหล็กด้วย ethanol พิกัด emodin มีรูปร่างที่ดี ไม่ซ้อนทับกับพิกัดอื่นๆ แยกได้ชัดเจน มีความไว (Sensitivity) ของวิธีวิเคราะห์สูง จึงทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ เพื่อยืนยันว่าวิธีสามารถนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ emodin ได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้ในปัจจุบัน สารมาตรฐาน emodin ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีราคาแพง การพัฒนาหาตัวทำละลายและวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัด เพื่อให้ได้ emodin ปริมาณสูงจะสามารถต่อยอดพัฒนาเพื่อผลิตเป็นสารมาตรฐานมาใช้ในการวิเคราะห์ วิจัย และควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีเถาวัลย์เหล็กเป็นส่วนประกอบต่อไป

### ข้อเสนอแนะ

1. วิธีที่พัฒนาขึ้นมาได้ไปทดสอบวิเคราะห์สาร emodin ในตำรับยาสมุนไพรที่มีส่วนประกอบของเถาวัลย์เหล็ก และพืชสมุนไพรชนิดอื่นๆที่มี emodin
2. พัฒนารูปแบบในการแยกสาร emodin ออกจากสารสกัดของสมุนไพรเถาวัลย์เหล็กให้มีความบริสุทธิ์สูง, มีปริมาณมาก และพิสูจน์เอกลักษณ์, คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ และความคงสภาพของสาร emodin ที่แยกออกมาได้ต่อไป

## บรรณานุกรม

- จิราภรณ์ ปาลี. (2559). สมุนไพรวางแดงกับภูมิปัญญาท้องถิ่นบ้านป่าดงสาม ตำบลลวงเหนือ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่: มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.
- Alizadeh, N., & Shamsipur, M. (1997). A simple model for the estimate of dielectric constant of binary solvent mixtures. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 8(4).
- AOAC International. (2013). Appendix K : Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals. *Journal of AOAC International*. Retrieved from [http://www.eoma.aoac.org/app\\_k.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_k.pdf)
- Azwanida, N. N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal and Aromatic Plants*, 4(3). doi:<https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Budavari, S. (1989). *The Merck Index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. Rahway, N.J., U.S.A.: Merck.
- Chemat, F., & Cravotto, G. (2013). *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds theory and practice*. New York; Heidelberg; London: Springer.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Cseke, L. J. (2006). *Natural products from plants*. Boca Raton, FL: CRC Press
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., & Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry*, 166, 585-595. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.066>
- Duval, J., Pecher, V., Poujol, M., & Lesellier, E. (2016). Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Industrial Crops and Products*, 94, 812-833. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.056>

- Gude, V. G., Patil, P., Martinez-Guerra, E., Deng, S., & Nirmalakhandan, N. (2013). Microwave energy potential for biodiesel production. *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), 5. doi:10.1186/2043-7129-1-5
- Handa, S. S., Khanuja, S., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. Trieste (Italy): Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies.
- ICH. (2005). ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). USA: ICH Steering Committee.
- Izhaki, I. (2002). Emodin - A secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist*, 155, 205-217. doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00459.x
- Jovanovic, A. A., Dordevic, V. B., Zdunic, G. M., Pljevljakusic, D. S., Savikin, K. P., Godevac, D. M., & Bugarski, B. M. (2017). Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Separation and Purification Technology*, 179, 369-380. doi:https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.055
- Leong, T., Juliano, P., & Knoerzer, K. (2017). Advances in Ultrasonic and Megasonic Processing of Foods. *Food Engineering Reviews*, 9(3), 237-256. doi:10.1007/s12393-017-9167-5
- Lu, H.-M., Liang, Y.-Z., Ni, W.-d., & Man, R.-l. (2006). Optimization of extraction and determination of emodin from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. products by HPLC-DAD. *Journal of Central South University of Technology (English Edition)*, 13, 658-662. doi:10.1007/s11771-006-0011-y
- Molee, W., Phanumartwiwath, A., Kesornpun, C., Sureram, S., Ngamrojanavanich, N., Ingkaninan, K., . . . Kittakoop, P. (2018). Naphthalene Derivatives and Quinones from *Ventilago denticulata* and Their Nitric Oxide Radical Scavenging, Antioxidant, Cytotoxic, Antibacterial, and Phosphodiesterase Inhibitory Activities. *Chem Biodivers*, 15(3), e1700537. doi:10.1002/cbdv.20170053

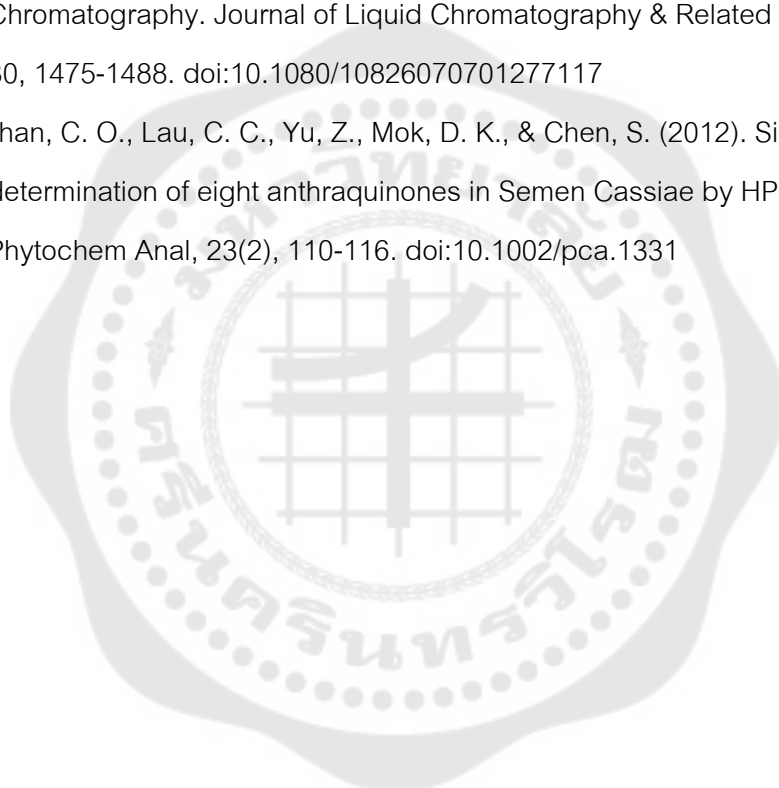
- NCBI. PubChem Database. Emodin, CID=3220. Retrieved from  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Emodin>
- Pdfhall. (2020). Dielectric Constants of Common Materials. Retrieved from  
[https://pdfhall.com/dielectric-constants\\_5b3988f5097c47616e8b4578.html](https://pdfhall.com/dielectric-constants_5b3988f5097c47616e8b4578.html)
- Peng, L. X., Wang, J. B., Hu, L. X., Zhao, J. L., Xiang, D. B., Zou, L., & Zhao, G. (2013). Rapid and simple method for the determination of emodin in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) by high-performance liquid chromatography coupled to a diode array detector. *J Agric Food Chem*, 61(4), 854-857. doi:10.1021/jf304804c
- Pepalla, S. B., Jammula, S. R., Rao, K. V. J., & Thomson, R. H. (1992). Quinones and tetracosanolide in *Ventilago bombaiensis*. *Phytochemistry*, 31(6), 2103-2104. doi:[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80371-K](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80371-K)
- Rao, B. K., Hanumaiah, T., Rao, C. P., Rao, G. S. R., Rao, K. V. J., & Thomson, R. H. (1983). Anthraquinones in *Ventilago* species. *Phytochemistry*, 22(11), 2583-2585. doi:[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)80170-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80170-8)
- Sharma, R., Tikku, A., & Giri, A. (2017). Pharmacological Properties of Emodin – Anthraquinone Derivatives. *Journal of Natural Products and Resources*, 3, 97-101.
- Sparr Eskilsson, C., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00921-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00921-3)
- Tabin, S., Gupta, R. C., Bansal, G., & Kamili, A. (2016). Comparative HPLC analysis of emodin, aloe emodin and rhein in *Rheum emodi* of wild and in vitro raised plants. 121, 121-130.
- Tsukui, A., Santos Junior, H. M., Oigman, S. S., de Souza, R. O., Bizzo, H. R., & Rezende, C. M. (2014). Microwave-assisted extraction of green coffee oil and quantification of diterpenes by HPLC. *Food Chem*, 164, 266-271. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.039

Wang, J., Li, H., Jin, C., Qu, Y., & Xiao, X. (2008). Development and validation of a UPLC method for quality control of rhubarb-based medicine: fast simultaneous determination of five anthraquinone derivatives. *J Pharm Biomed Anal*, 47(4-5), 765-770. doi:10.1016/j.jpba.2008.03.011

Water Corporation. (1994). *PDA Software User's Guide*. USA: Waters Corporation.

Xie, Y., Liang, Y., Chen, H. W., Zhang, T. Y., & Ito, Y. (2007). Preparative Isolation and Purification of Anthraquinones from Cassia Seed by High-Speed Countercurrent Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30, 1475-1488. doi:10.1080/10826070701277117

Xu, L., Chan, C. O., Lau, C. C., Yu, Z., Mok, D. K., & Chen, S. (2012). Simultaneous determination of eight anthraquinones in Semen Cassiae by HPLC-DAD. *Phytochem Anal*, 23(2), 110-116. doi:10.1002/pca.1331

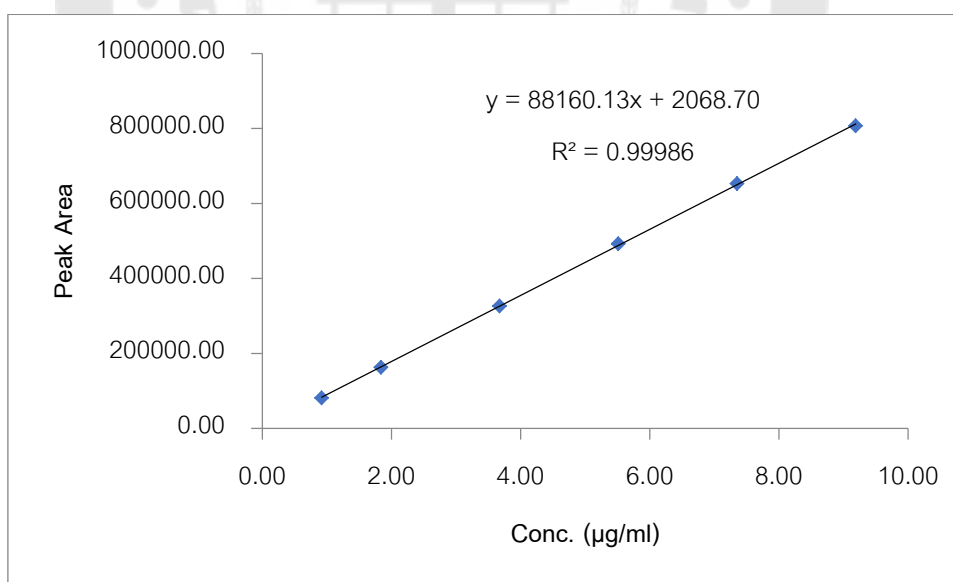




ภาคผนวก

ตาราง 15 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง เส้นที่ 1

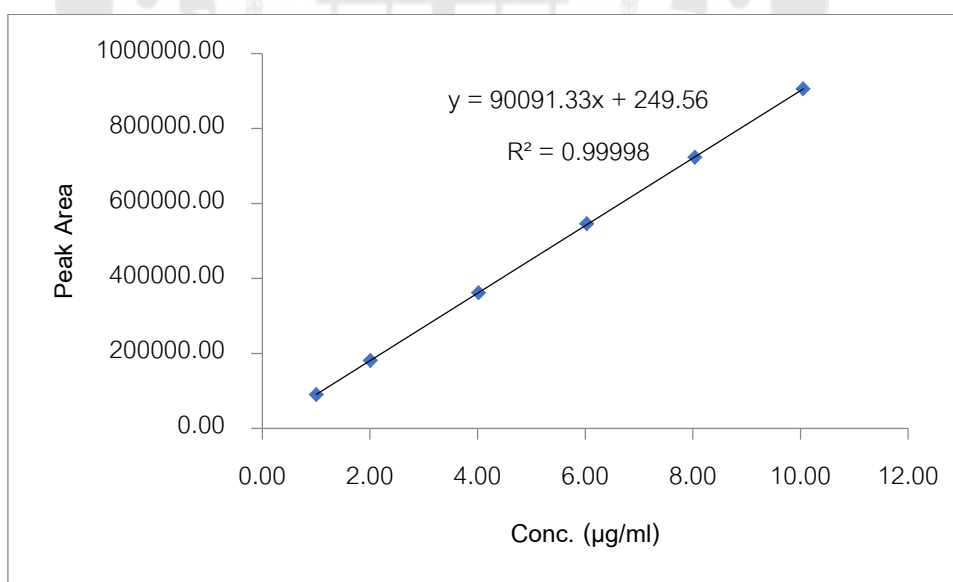
Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.92	1.84	3.68	5.51	7.35	9.19
injection	peak area					
1	82781.42	162879.59	327003.03	493178.27	656247.01	806952.95
2	80908.72	163529.70	325792.51	492659.53	652813.75	807416.84
3	80645.47	163030.94	326314.69	491657.27	652450.39	807676.18
4	81678.53	162558.33	325846.17	491461.21	652501.02	806134.29
5	81058.81	162697.21	325942.33	492836.79	652428.50	807912.08
6	81013.46	163227.02	326395.28	492724.31	653241.15	808063.82
Average	81347.74	162987.13	326215.67	492419.56	653280.30	807359.36
%RSD	0.96	0.22	0.14	0.14	0.23	0.09



ภาพประกอบ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ emodin กับพื้นที่ใต้พีคของ  
สมการเส้นตรง เส้นที่ 1

ตาราง 16 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง เส้นที่ 2

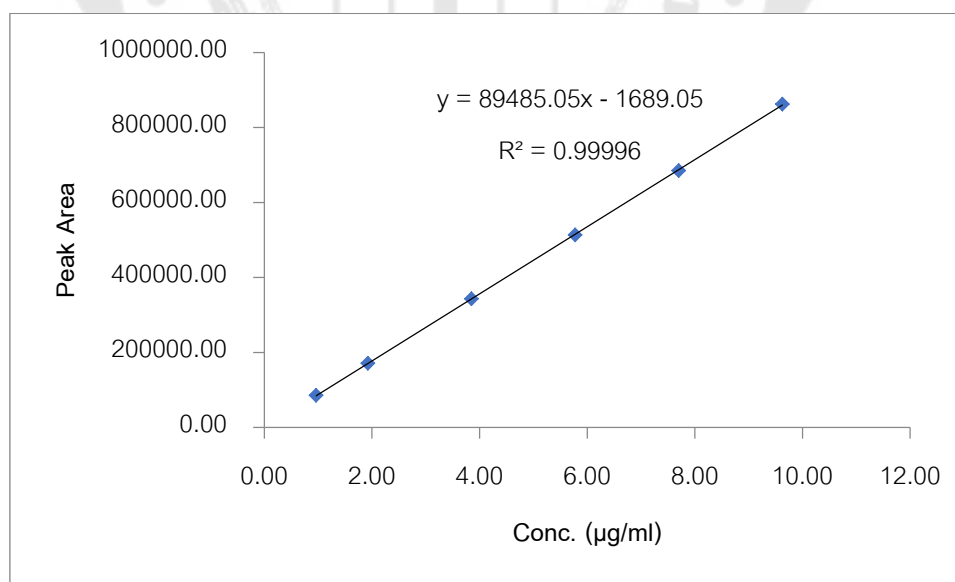
Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	1.01	2.01	4.02	6.03	8.04	10.05
injection	peak area					
1	90389.12	181148.58	360310.18	545024.37	722834.94	901771.52
2	90631.11	181297.42	361776.68	545676.37	722596.02	903625.46
3	90248.39	181439.80	361978.94	545667.63	723009.70	903297.84
4	90249.53	181206.52	362314.64	546340.23	723023.67	907531.47
5	90647.74	180698.35	361944.45	546140.78	723968.74	911585.98
6	90674.31	181872.66	363470.90	546074.30	722988.49	906802.40
Average	90473.37	181277.22	361965.97	545820.61	723070.26	905769.11
%RSD	0.22	0.21	0.28	0.09	0.06	0.40



ภาพประกอบ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ emodin กับพื้นที่ใต้พีคของ  
สมการเส้นตรง เส้นที่ 2

ตาราง 17 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง เส้นที่ 3

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.96	1.93	3.85	5.78	7.70	9.63
injection	peak area					
1	85498.39	170427.20	342668.39	512778.21	683285.07	863403.15
2	85410.91	170830.51	344241.48	513618.16	687639.99	862266.90
3	84843.52	169387.24	341850.48	513019.92	683639.94	860848.25
4	85657.82	171865.88	343711.16	513472.90	685969.59	863943.89
5	86150.98	172162.09	344282.85	514515.55	685001.38	862294.01
6	84812.77	170171.63	342568.25	512937.89	685833.80	862072.38
Average	85395.73	170807.43	343220.44	513390.44	685228.30	862471.43
%RSD	0.60	0.62	0.29	0.12	0.24	0.13



ภาพประกอบ 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ emodin กับพื้นที่ใต้พีคของ  
สมการเส้นตรง เส้นที่ 3

ตาราง 18 ผล peak area จากการศึกษาทดสอบซ้ำ Accuracy

		ปริมาณที่เติม (µg/mL)								
		1.838			3.675			5.513		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Inj.		peak area								
1	155935.93	321584.89	321626.29	320339.56	485771.30	488742.20	487220.27	652464.29	651081.46	653714.01
2	156169.76	319912.79	320677.64	321384.69	489383.91	485561.05	490106.95	651264.91	666425.55	660256.27
3	155583.14	321662.69	321235.55	321897.10	486706.59	486988.78	490032.70	653413.16	667669.06	659353.30
4	155841.94									
5	155848.62									
6	156074.98									
Avg	155909.06	321053.46	321179.83	321207.12	487287.27	487097.34	489119.97	652380.79	661725.36	657774.53
RSD	0.13	0.31	0.15	0.25	0.38	0.33	0.34	0.17	1.40	0.54

ตาราง 19 ผลการทดสอบหัวข้อ Robustness การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของคอลัมน์

30 °C			29 °C			31 °C					
Peak area	Rs	Plate	Tailing	Peak area	Rs	Plate	Tailing	Peak area	Rs	Plate	Tailing
519840.55	1.62	14871.57	0.98	520462.79	1.68	14921.37	0.98	518288.11	1.51	14802.06	0.98
519062.65	1.63	14869.81	0.98	518483.85	1.68	15085.89	0.98	518165.91	1.51	14854.91	0.98
520542.41	1.63	14797.52	0.98	519218.01	1.68	15025.32	0.98	517783.89	1.51	14754.76	0.98

ตาราง 20 ผลการทดสอบหัวข้อ Robustness การเปลี่ยนแปลงปริมาตรของสารละลายที่ฉีด

20 µL			18 µL			22 µL					
Peak area	Rs	Plate	Tailing	Peak area	Rs	Plate	Tailing	Peak area	Rs	Plate	Tailing
519840.55	1.62	14871.57	0.98	467806.22	1.64	15531.44	0.98	569671.10	1.60	14372.49	0.98
519062.65	1.63	14869.81	0.98	467437.41	1.65	15549.58	0.98	570302.59	1.61	14262.92	0.98
520542.41	1.63	14797.52	0.98	467744.19	1.64	15586.55	0.98	570760.73	1.60	14251.70	0.98

ตาราง 21 ผลการทดสอบหัวข้อ Robustness การเปลี่ยนแปลงอัตราไหลของ mobile phase

1.0 mL/min			0.95 mL/min			1.05 mL/min					
Peak area	Rs	Plate	Tailing	Peak area	Rs	Plate	Tailing	Peak area	Rs	Plate	Tailing
519840.55	1.62	14871.57	0.98	552076.61	1.65	15264.33	0.98	498836.49	1.61	14423.25	0.98
519062.65	1.63	14869.81	0.98	552263.24	1.66	15266.20	0.98	499313.72	1.62	14437.33	0.98
520542.41	1.63	14797.52	0.98	552445.16	1.66	15294.77	0.98	497800.38	1.61	14596.77	0.98

ตาราง 22 ผลการทดสอบหัวข้อ Robustness การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ phosphoric acid ใน mobile phase

0.1%			0.09%			0.11%					
Peak area	Rs	Plate	Tailing	Peak area	Rs	Plate	Tailing	Peak area	Rs	Plate	Tailing
519840.55	1.62	14871.57	0.98	521978.22	1.63	15006.59	0.98	523848.24	1.62	14846.15	0.98
519062.65	1.63	14869.81	0.98	522833.17	1.62	14905.43	0.98	523309.93	1.62	15023.81	0.98
520542.41	1.63	14797.52	0.98	522822.06	1.62	14956.50	0.98	524309.70	1.61	14924.76	0.98

ตาราง 23 ผลการทดสอบห้วงข้อ Limit of Quantitation (LOQ)

injection	Peak area
1	1355.72
2	1255.50
3	1276.70
4	1284.03
5	1266.93
6	11191.33
Average	1271.70
RSD	4.16

ตาราง 24 ผล peak area ของ emodin ที่สกัดโดย alcohol 4 ชนิด

Solvent	determination	Wt. (g)	Peak area
Methanol	1	5.102	470422.39
	2	5.023	464034.76
	3	5.091	469816.90
Ethanol	1	5.014	398611.86
	2	5.027	403670.67
	3	5.021	401305.72
1-Propanol	1	5.084	242331.14
	2	5.040	241489.92
	3	5.014	239457.54
1-Butanol	1	5.019	145443.62
	2	5.011	145165.53
	3	5.034	147634.82

ตาราง 25 ผล peak area ของ emodin ที่สกัดโดยตัวทำละลายผสม

Solvent	Determination	Wt. (g)	Peak area
Water	1	5.128	3867.69
	2	5.094	10318.09
	3	5.016	8849.67
Ethanol	1	5.032	416261.84
	2	5.057	413987.26
	3	5.080	416083.40
80% EtOH	1	5.093	560804.80
	2	5.035	555386.83
	3	5.054	558263.36
60% EtOH	1	5.074	612579.07
	2	5.308	666247.93
	3	5.125	666062.55
40% EtOH	1	5.049	300162.88
	2	5.023	306706.84
	3	5.017	315576.81
20% EtOH	1	5.046	34197.05
	2	5.102	36985.70
	3	5.248	38188.38
Methanol	1	5.058	480640.10
	2	5.125	478925.28
	3	5.047	474153.36
80% MeOH	1	5.044	495736.55
	2	5.060	499124.40
	3	5.112	493665.59

ตาราง 25 (ต่อ)

Solvent	Determination	Wt.(g)	Peak area
60% MeOH	1	5.135	410250.82
	2	5.041	361727.52
	3	5.087	374066.79
40% MeOH	1	5.135	97390.07
	2	5.309	99582.85
	3	5.023	99245.43
20% MeOH	1	5.102	33469.45
	2	5.047	29760.66
	3	5.076	31440.34

ตาราง 26 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เปรียบเทียบปริมาณสาร emodin จากตัวทำละลายที่ใช้สกัด

Anova: Single Factor				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
Methanol	3	0.153578	0.051193	2.44E-09
Ethanol	3	0.132963	0.044321	4.95E-08
Propanol	3	0.079469	0.026490	4.88E-09
Butanol	3	0.048354	0.016118	1.29E-08
Water	3	0.003096	0.001032	1.42E-07
EtOH	3	0.138289	0.046096	7.36E-08
80% EtOH	3	0.185438	0.061813	9.58E-09
60% EtOH	3	0.210756	0.070252	6.65E-06
40% EtOH	3	0.103045	0.034348	9.32E-07
20% EtOH	3	0.012455	0.004152	2.38E-08

ตาราง 26 (ต่อ)

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
MeOH	3	0.158362	0.052787	2.04E-07
80% MeOH	3	0.164549	0.054850	3.84E-07
60% MeOH	3	0.126379	0.042126	5.71E-06
40% MeOH	3	0.032667	0.010889	8.98E-08
20% MeOH	3	0.010979	0.003660	3.41E-08

ANOVA						
<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	0.021875	14	0.001563	1636.638	3.01E-39	2.03742
Within Groups	2.86E-05	30	9.55E-07			
Total	0.021904	44				

\*Fcal > Fcrit , significant difference of sample variation

ตาราง 27 ผล peak area ของ emodin ที่ได้จากการสกัดด้วย Maceration, Ultrasonic-Assisted Extraction และ Microwave-Assisted Extraction โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย

<i>Method</i>	<i>Determination</i>	<i>Wt. (g)</i>	<i>Peak area</i>
M	1	5.07	70392
	2	5.06	74435
	3	5.01	73466
SM	1	5.06	71331
	2	5.11	74117
	3	5	87587
WM	1	5.07	87140
	2	5.17	81433
	3	5.03	79915

ตาราง 27 (ต่อ)

Method	Determination	Wt. (g)	Peak area
SWM	1	5.03	76573
	2	5.02	87679
	3	5.14	90654
WSM	1	4.99	79634
	2	5	73390
	3	5.02	70621
S	1	5.12	67737
	2	5	88761
	3	5.01	85761
W	1	5.01	86890
	2	5.05	80840
	3	5.05	84181
M	1	5.07	70392
	2	5.06	74435
	3	5.01	73466

ตาราง 28 ผล peak area ของ emodin ที่ได้จากการสกัดด้วย Microwave-Assisted Extraction โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย

Microwave power (watt)	จำนวนรอบ การสกัด (รอบ)	เวลาที่ใช้สกัด (วินาที)	Determination	Wt. (g)	Peak area
180	1	30	1	5.111	336952.95
			2	5.012	328889.69
			3	5.179	327340.47

ตาราง 28 (ต่อ)

Microwave power (watt)	จำนวนรอบ การสกัด (รอบ)	เวลาที่ใช้สกัด (วินาที)	Determination	Wt. (g)	Peak area
300	1	30	1	5.317	370049.00
			2	5.258	393930.80
			3	5.192	375578.95
450	1	30	1	5.009	461143.42
			2	5.360	438090.66
			3	5.146	435622.08
600	1	30	1	5.203	435272.32
			2	5.233	451872.64
			3	5.091	440978.84
180	1	60	1	5.195	410391.99
			2	5.452	428847.82
			3	5.085	389880.06
300	1	60	1	5.304	466601.53
			2	5.446	474115.09
			3	5.444	463249.11
450	1	60	1	5.033	444323.89
			2	5.341	492211.34
			3	5.309	471189.56
600	1	60	1	5.060	459661.68
			2	5.220	475266.15
			3	5.256	477222.72
180	3	30	1	4.989	421609.52
			2	5.235	451711.52
			3	5.095	436056.53

ตาราง 28 (ต่อ)

Microwave power (watt)	จำนวนรอบ การสกัด (รอบ)	เวลาที่ใช้สกัด (วินาที)	Determination	Wt. (g)	Peak area
300	3	30	1	5.118	463708.15
			2	5.235	478118.78
			3	5.364	487935.36
450	3	30	1	5.028	478539.84
			2	5.196	500088.87
			3	5.269	509936.28
600	3	30	1	5.074	515128.82
			2	5.215	499256.80
			3	4.988	494672.58
180	3	60	1	5.256	487337.71
			2	5.091	481840.61
			3	5.039	468252.22
300	3	60	1	5.304	507231.78
			2	5.421	520386.92
			3	5.044	488539.05
450	3	60	1	5.155	499898.93
			2	5.260	504178.36
			3	5.413	524202.31
600	3	60	1	5.264	510944.67
			2	5.231	511201.90
			3	5.174	504342.18
180	5	30	1	5.025	443615.19
			2	5.233	470092.16
			3	5.004	442600.69

ตาราง 28 (ต่อ)

Microwave power (watt)	จำนวนรอบ การสกัด (รอบ)	เวลาที่ใช้สกัด (วินาที)	Determination	Wt. (g)	Peak area
300	5	30	1	5.001	465346.48
			2	5.066	498821.40
			3	5.453	493763.69
450	5	30	1	5.047	485167.88
			2	5.057	488007.07
			3	5.205	511056.23
600	5	30	1	5.080	504114.54
			2	5.315	528876.40
			3	5.384	532668.61
180	5	60	1	5.177	492056.64
			2	5.261	503952.44
			3	5.324	497758.08
300	5	60	1	5.045	488185.63
			2	5.279	510814.26
			3	5.418	528650.57
450	5	60	1	5.239	511694.16
			2	5.208	509428.22
			3	5.042	483447.98
600	5	60	1	5.014	495185.75
			2	5.084	500623.60
			3	5.083	501996.45

ตาราง 29 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เปรียบเทียบปริมาณสาร emodin ที่ได้จากการสกัดด้วย Microwave-Assisted Extraction โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย

Anova: Single Factor				
<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
180 1 30	3	0.109374	0.036458	6.98E-07
300 1 30	3	0.121707	0.040569	2.22E-06
450 1 30	3	0.144957	0.048319	8.89E-06
600 1 30	3	0.143939	0.047980	8.39E-07
180 1 60	3	0.131472	0.043824	4.87E-07
300 1 60	3	0.145869	0.048623	6.78E-07
450 1 60	3	0.150954	0.050318	1.39E-06
600 1 60	3	0.152910	0.050970	5.50E-09
180 3 30	3	0.143808	0.047936	2.46E-07
300 3 30	3	0.153024	0.051008	4.05E-08
450 3 30	3	0.161581	0.053860	2.05E-07
600 3 30	3	0.166187	0.055396	2.66E-06
180 3 60	3	0.157166	0.052389	3.51E-07
300 3 60	3	0.161729	0.053910	1.27E-07
450 3 60	3	0.162389	0.054130	1.17E-07
600 3 60	3	0.163846	0.054615	3.51E-08
180 5 30	3	0.149500	0.049833	2.22E-07
300 5 30	3	0.158152	0.052717	5.14E-06
450 5 30	3	0.163050	0.054350	3.71E-07
600 5 30	3	0.166866	0.055622	2.59E-08
180 5 60	3	0.159409	0.053136	4.31E-07
300 5 60	3	0.163194	0.054398	6.54E-08
450 5 60	3	0.163353	0.054451	3.57E-07
600 5 60	3	0.165945	0.055315	8.89E-09

ตาราง 29 (ต่อ)

ANOVA						
<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	0.001642	23	7.14E-05	66.94578	5.88E-29	1.756759
Within Groups	5.12E-05	48	1.07E-06			
Total	0.001693	71				

\* $F_{cal} > F_{crit}$  , significant difference of sample variation



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวปภัทรส แซ่มชมดาว
วัน เดือน ปี เกิด	12 ธันวาคม 2532
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	20 ซอยงามวงศ์วาน 23 แยก 21 ตำบลบางกระสอบ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี
ผลงานตีพิมพ์	HPLC Analysis and Solvent Extraction of Emodin from <i>Ventilago denticulata</i> Willd



