



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสกัดสาร Ginkgolide และ Bilobalide จากใบแปะก๊วย *Ginkgo biloba*

Isolation of Ginkgolide and Bilobalide from *Ginkgo biloba* leaf

นายเชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2558

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสกัดสาร Ginkgolide และ Bilobalide จากใบแปะก๊วย *Ginkgo biloba*

Isolation of Ginkgolide and Bilobalide from *Ginkgo biloba* leaf

นายเชตศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2558

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การสกัดสาร Ginkgolide และ Bilobalide จากใบแปะก๊วย *Ginkgo biloba*

แหล่งเงินทุนอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ 2558 ..... จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน ..... 50,000 ..... บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย ..... 1 ..... ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2558

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัยพร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด

นาย เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ สังกัด สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### บทคัดย่อ

แปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) เป็นพืชโบราณที่ทางการแพทย์แผนจีนได้นำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง สารเคมีที่สำคัญในใบแปะก๊วยนั้นประกอบไปด้วย Ginkgolide (A B C และ J) และ Bilobalide การศึกษาครั้งนี้ต้องการพัฒนาต่อยอดวิธีการสกัดสารดังกล่าวออกจากใบแปะก๊วยโดยมุ่งเน้นให้ได้ความบริสุทธิ์ที่สูง HPLC-ELSD เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดโดยการใช้คอลัมน์ชนิด Phenomenex Luna ผลการทดลองโดยแช่ใบแปะก๊วยในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆพบว่าไดคลอโรมีเทน ให้ความบริสุทธิ์ในการสกัด คิดเป็น 87.5 % ตามด้วย เอทิลอะซิเตต อะซิโตน เมทานอล ไอโซโพรพานอล และ เอทานอล คิดเป็น 29.5% 20.2% 12.3% 11.4% และ 11.1% ตามลำดับ การต้มใบแปะก๊วยในบัฟเฟอร์ pH ช่วงเบสจะช่วยให้สารที่ต้องการนั้นสามารถละลายอยู่ในชั้นน้ำได้ดีในรูปแบบ deprotonated form จากนั้นทำการปรับ pH เป็น 5.0 แล้วทำการสกัดด้วย liquid-liquid extraction จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด การรีฟลักซ์หรือการใช้คลื่นเสียง (UAE) ต่างก็เป็นวิธีที่ทำให้ได้ปริมาณสารสกัดในปริมาณสูง แต่หากทำการรีฟลักซ์เป็นเวลา 60 นาที แล้วตามด้วยการใช้คลื่นเสียงอีก 15 นาที จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้ถึง 11.2 เท่า เมื่อเทียบกับการแช่ใบแปะก๊วยลงในตัวทำละลายอินทรีย์เพียงขั้นตอนเดียว การทำบริสุทธิ์นี้ยังได้ทดสอบผ่านการใช้คอลัมน์คาร์บอนชนิดต่างๆ ผลการทดลองพบว่า เหม่าคาร์บอนสามารถทำบริสุทธิ์ได้ถึง 75.7 % เมื่อเทียบกับคอลัมน์มาตรฐาน Amberlite XAD-7HP ในขณะที่ charcoal จากทางการค้า จากการเผาเมล็ดมะขาม และจากถ่านหุงข้าว จะสามารถทำบริสุทธิ์ได้เพียง 6.9 % และ 0.6 % และ 0 % ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ amberlite XAD-7HP การทดลองนี้จึงได้แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารผ่านการรวมขั้นตอนโดยการรีฟลักซ์และการใช้คลื่นเสียง พร้อมทั้งแสดงถึงการใช้คาร์บอนคอลัมน์เพื่อลดต้นทุนการใช้ทำบริสุทธิ์ของสารสกัดต่อไป

**Research Title:** Isolation of Ginkgolide and Bilobalide from *Ginkgo biloba* leaf

**Researcher:** Dr. Cherdasak Maneeruttanarungroj **Faculty:** Science **Department:** Chemistry

## ABSTRACT

*Ginkgo biloba* is an ancient tree that the Chinese medicine widely uses in many advantages. The important chemical in leaf comprises ginkgolide (A, B, C and J) and bilobalide. This study would like to improve the traditional method to extract active ingredients from dry leaf with high purity through liquid-liquid extraction. HPLC-ELSD was chosen as the method to quantify the amount of those ginkgolides and bilobalide using Phenomenex Luna column. The submerging the leaf in organic solvents result shows that dichloromethane resulted in 87.5 % purity, followed by ethylacetate acetone methanol isopropanol and ethanol resulted in 29.5 %, 20.2 %, 12.3%, 11.4% and 11.1%, respectively. Boiling the leaf in basic pH range could improve the solubilization of active compounds in an aqueous phase as the deprotonated form. Adjusting the pH to 5.0 could increase the recovery before liquid-liquid extraction. Refluxing and ultrasonic-assisted extraction (UAE) could individually extract the active compounds in high proportion, but combining these methods, reflux for 60 min followed by UAE for 15 min, could increase the efficiency to 11.2 folds compared to submerging dry leaf in organic solvent. Moreover the carbon column was used to evaluate the efficiency of purification. The results show that black carbon shows 75.7% efficiency compared to the commercial column, amberlite XAD-7HP, whereas activated charcoal, charcoal from tamarine seed and charcoal show the efficiency of 6.9%, 0.6% and 0% compared to standard column amberlite XAD-7HP. This study showed the improvement efficiency in extraction through the combination of reflux and UAE, together with the use of black carbon column to reduce the cost in purification.

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
จากแหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภท เงินอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

นายเชดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรม.....	3
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.2 การทบทวนวรรณกรรม.....	33
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	39
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	40
3.2 สารเคมี.....	41
3.3 วิธีการทดลอง.....	42
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	58
4.1 ผลการวิจัยตอนที่ 1 การสกัดเทอร์ปีนแลคโตนจากใบแปะก๊วย.....	58
4.2 ผลการวิจัยตอนที่ 2 การศึกษาผลของ pH ต่อประสิทธิภาพการสกัดสารจากใบแปะก๊วย.....	71
4.3 ผลการวิจัยตอนที่ 3 การสกัดเทอร์ปีนแลคโตนจากใบแปะก๊วย โดยเทคนิค Ultrasonic assisted.....	88
4.4 ผลวิจัยและอธิบายผลการทดลองตอนที่ 4 การทำบริสุทธิ์บางส่วน of สารสกัด.....	110
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	135
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	135
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	140
บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง.....	142
ประวัตินักวิจัย.....	254

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงสารประกอบหลักของใบแปะก๊วย .....	6
ตารางที่ 2.2 แสดงการเปรียบเทียบการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ควบคุมความดันและอัลตราโซนิก .....	16
ตารางที่ 3.1 แสดงสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC .....	48
ตารางที่ 3.2 แสดงสถานะของแต่ละตัวอย่าง .....	49
ตารางที่ 3.3 แสดงการแบ่งประเภทคอลัมน์ในการหาตัวชี้ที่เหมาะสม .....	55
ตารางที่ 3.4 แสดงการแบ่งประเภทคอลัมน์ในการศึกษาประสิทธิภาพการล้าง impurity ด้วยน้ำ .....	57
ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละวิธี ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC .....	58
ตารางที่ 4.2 แสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram .....	58
ตารางที่ 4.3 แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม .....	62
ตารางที่ 4.3.1 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละวิธีของการทดลองตอนที่ 1.2 .....	64
ตารางที่ 4.4 แสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram .....	66
ตารางที่ 4.5 แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม .....	66
ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบปริมาณของ Terpene lactones จากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ .....	67
ตารางที่ 4.7 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ (g) ของแต่ละ pH ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC .....	71
ตารางที่ 4.8 แสดงข้อมูลดิบพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของตัวอย่างที่ใช้ Buffer type ในการควบคุม pH .....	71
ตารางที่ 4.9 แสดงข้อมูลดิบพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของตัวอย่างที่ใช้ Universal Buffer ในการควบคุม pH .....	72
ตารางที่ 4.10 แสดงปริมาณของสารสกัด Terpene Lactones (g) จากสารละลาย 50 $\mu$ L ที่ทำการฉีด .....	
ตารางที่ 4.11 แสดงน้ำหนักใบแห้งเริ่มต้น (g) ในสารสกัด 50 $\mu$ L ที่ทำการฉีด .....	72
ตารางที่ 4.12 แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม .....	73
ตารางที่ 4.13 แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม .....	74
ตารางที่ 4.14 ตารางแสดงค่าความความบริสุทธิ์จาก % Peak area ของตัวอย่างในข้อที่ 3.3.2.3.1 .....	79
ตารางที่ 4.15 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ (g) ของแต่ละตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC .....	80

ตารางที่ 4.16 แสดงข้อมูลดิบพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของตัวอย่างที่ใช้ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลายอินทรีย์	81
ตารางที่ 4.17 แสดงข้อมูลดิบพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของตัวอย่างที่ใช้ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายอินทรีย์	81
ตารางที่ 4.18 แสดงปริมาณของสารสกัด Terpene Lactones จากสารละลาย 50 $\mu$ L ที่ทำการฉีด	82
ตารางที่ 4.19 แสดงน้ำหนักแห้งเริ่มต้น (g) ในสารสกัด 50 $\mu$ L ที่ทำการฉีด	82
ตารางที่ 4.20 แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม	82
ตารางที่ 4.21 แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม	83
ตารางที่ 4.22 ตารางแสดงค่าความความบริสุทธิ์จาก % Peak area ของตัวอย่าง	86
ตารางที่ 4.22ก แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวทำละลายก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC ของเทคนิค UAE	88
ตารางที่ 4.23 แสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของเทคนิค UAE	89
ตารางที่ 4.24 แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpenoids ของเทคนิค UAE	92
ตารางที่ 4.24ก แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวทำละลาย ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC ของเทคนิค Reflux	94
ตารางที่ 4.25 แสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของการทดลองที่ 2	95
ตารางที่ 4.26 แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ของเทคนิค Reflux	95
ตารางที่ 4.27 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวทำละลาย ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC ของเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ตามด้วยเทคนิค Reflux	98
ตารางที่ 4.28 แสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ตามด้วยเทคนิค Reflux	98
ตารางที่ 4.29 แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones	



ของเทคนิคUltrasonic assisted extraction (UAE) ตามด้วยเทคนิค Reflux	98
ตารางที่ 4.30 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวทำละลาย ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLCของเทคนิค Reflux ตามด้วย Ultrasonic assisted extraction (UAE)	100
ตารางที่ 4.31 แสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ตามด้วยเทคนิค Reflux	101
ตารางที่ 4.32 แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpene lactonesของเทคนิคRefluxตามด้วยเทคนิคUltrasonic assisted extraction (UAE) โดย R แทน Reflux	101
ตารางที่ 4.33 เปรียบเทียบปริมาณของ TTLsและ Purityจากการทดลองตอนที่ 3.1	103
ตารางที่ 4.34 เปรียบเทียบปริมาณของ TTLs และ Purityจากการทดลองตอนที่ 3.2	104
ตารางที่ 4.35 เปรียบเทียบปริมาณของ Total Terpene lactones และ Purity จากการทดลองที่ 3.3 และ 3.4	104
ตารางที่4.36 แสดงการปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) จากปริมาณมากไปหาน้อย	107
ตารางที่4.37 แสดงการปริมาณ Purity (%) ที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆจากปริมาณมากไปหาน้อย	108
ตารางที่ 4.38 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณสารเทอร์ปีนแลคโตนในตัวทำละลายและสารตัวชะ	110
ตารางที่ 4.39 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมด	111
ตารางที่ 4.40 แสดงการเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแลคโตน	112
ตารางที่ 4.41 ปริมาณสารเทอร์ปีนแลคโตนจากการสกัดและผ่านคอลัมน์ด้วยตัวดูดซับต่างชนิดกัน	115
ตารางที่ 4.42 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การคืนกลับเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดในคอลัมน์โครมาโตกราฟี ด้วยตัวดูดซับต่างชนิดกัน	119
ตารางที่ 4.43 การเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแลคโตนจากการสกัดและคอลัมน์โครมาโตกราฟี ด้วยตัวดูดซับต่างชนิดกัน	120
ตารางที่ 4.44 ปริมาณเทอร์ปีนแลคโตนจากการสกัดและการล้าง impurity ด้วยน้ำกลั่นในคอลัมน์	124
ตารางที่ 4.45 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดในคอลัมน์	128
ตารางที่ 4.46 เปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของสารที่ได้จากการสกัดและในคอลัมน์Activated charcoal	129
ตารางที่ 4.47 แสดงอัตราส่วนระหว่างการใช้ล้างน้ำต่อการล้างด้วยน้ำของสารเทอร์ปีนแลคโตนในคอลัมน์ Activated charcoal	133

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะของต้นแปะก๊วย .....	5
ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะใบของแปะก๊วย .....	5
ภาพที่ 2.3 แสดงสูตรโครงสร้างของ Ginkgolide .....	6
ภาพที่ 2.4 แสดงสูตรโครงสร้างของ Bilobalide .....	6
ภาพที่ 2.5 แสดงระบบการ Reflux .....	14
ภาพที่ 2.6 แสดงองค์ประกอบของเครื่องล้างอัลตราโซนิก .....	18
ภาพที่ 2.7 การกระจายตัวของรูพรุนใน Amberlite XAD 7-HP .....	30
ภาพที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของ Amberlite XAD 7-HP .....	30
ภาพที่ 2.9 แสดงเตาเผาถ่านแบบดั้งเดิม .....	31
ภาพที่ 2.10 แสดงเตาเผาถ่านภาชนะโลหะ .....	31
ภาพที่ 2.11 โครงสร้างของถ่านกัมมันต์ .....	33
ภาพที่ 2.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และ %Recovery .....	34
ภาพที่ 3.1 แสดงการหาตัวทำละลายและตัวชะที่เหมาะสม .....	54
ภาพที่ 3.2 แสดงขั้นตอนการศึกษาความสามารถของตัวดูดซับ .....	55
ภาพที่ 4.1 HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ในสารสกัดมาตรฐาน HERBAL ONE .....	59
ภาพที่ 4.2 HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ที่สกัดโดย Ethyl acetate .....	60
ภาพที่ 4.3 ก: HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน Bilobalide และ Ginkgolide A, B, C, J .....	61
ภาพที่ 4.3 ข: HPLC-ELSD chromatogram ของสารตัวอย่าง .....	61
ภาพที่ 4.4 HPLC Chromatogram ของ Terpenoids ในสารสกัดมาตรฐาน .....	61
ภาพที่ 4.5 แผนภูมิแสดงปริมาณของ Terpene lactones ที่สกัดได้ในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด .....	63
ภาพที่ 4.6 แผนภูมิแสดง Purity ของ Terpene lactones ที่สกัดได้ในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด .....	63
ภาพที่ 4.7 แผนภูมิแสดงปริมาณของ Terpene lactones จากการสกัดในสภาวะต่างๆ .....	66
ภาพที่ 4.8 แผนภูมิแสดง Purity ของ Terpene lactones จากการสกัดในสภาวะต่างๆ .....	66
ภาพที่ 4.9 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Total Terpenoids และ Polarity ของตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิดที่ใช้ในการทดลองตอนที่ 1.1 .....	70
ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงปริมาณของ Terpene lactones ที่สกัดได้ที่ pH ต่างๆ และปริมาณ Total Terpene lactones ของตัวอย่างที่ใช้ Buffer type (BT) ในการควบคุม pH .....	75
ภาพที่ 4.11 กราฟแสดงปริมาณของ Terpene lactones ที่สกัดได้ที่ pH ต่างๆ และ	

ปริมาณ Total Terpene lactonesของตัวอย่างที่ใช้ Universal Buffer (UB) ในการควบคุม pH.....	75
ภาพที่ 4.12 แผนภูมิแท่งเปรียบเทียบปริมาณของ Total Terpene Lactones ที่สกัดได้ที่ pH ต่างๆ.....	76
ภาพที่ 4.13 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของ Terpene Lactones ที่ pH 3-8 (BT).....	77
ภาพที่ 4.14 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของ Terpene Lactones ที่ pH 3-8 (UB).....	78
ภาพที่ 4.15 แผนภูมิแสดง % Purityของ Terpene Lactones ที่สกัดได้ ที่ pH ต่างๆ ของตัวอย่างที่ใช้ Buffer type (BT) และ Universal Buffer (UB) ในการควบคุม pH .....	79
ภาพที่ 4.16 แผนภูมิแท่งเปรียบเทียบปริมาณของ Total Terpene Lactones ที่สกัดได้ของแต่ละตัวอย่าง .....	83
ภาพที่ 4.17 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของ Terpene Lactones ของตัวอย่างที่ 1-8.....	85
ภาพที่ 4.18 แผนภูมิแสดง % Purityของ Terpene Lactones ที่สกัดได้ของแต่ละตัวอย่าง .....	86
ภาพที่ 4.19 HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ที่สกัดโดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ด้วยสาร Ethyl acetate .....	89
ภาพที่ 4.20 HPLC Chromatogram ของ Terpene lactonesที่สกัดโดยเทคนิค Reflux ด้วยสาร Ethyl acetate .....	90
ภาพที่ 4.21 HPLC Chromatogram ของ Terpene lactonesที่สกัดโดยเทคนิค Reflux ที่เวลา 60 นาที ตามด้วยเทคนิคการ Ultrasonic assisted extraction (UAE) ด้วย Buffer pH 9 .....	91
ภาพที่ 4.22 แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของ Bufferแต่ละชนิดด้วยเทคนิค UAE .....	93
ภาพที่ 4.23 แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของตัวทำละลายแต่ละชนิดด้วยเทคนิค UAE .....	93
ภาพที่ 4.24 แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของ Bufferแต่ละชนิดของเทคนิค Reflux.....	96
ภาพที่ 4.25 แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของตัวทำละลายแต่ละชนิดของเทคนิค Reflux .....	96
ภาพที่ 4.25ก แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของ Buffer pH 9 และ Ethanol ด้วยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ตามด้วยเทคนิค Reflux.....	99
ภาพที่ 4.26 แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของ Buffer pH 9 ของเทคนิคRefluxตามด้วยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) .....	102
ภาพที่ 4.27 แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของ Ethanol ของเทคนิค Reflux ตามด้วยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) .....	102
ภาพที่ 4.28 แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของสารละลาย Buffer pH 9 และEthanol ของการทดลองทั้ง 4 ตอน .....	105
ภาพที่ 4.29 แผนภูมิแสดงปริมาณของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมด .....	111
ภาพที่ 4.30 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ใน 0.1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	113
ภาพที่ 4.31 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ ใน 70%Ethanol .....	113

ภาพที่ 4.32 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ จากการศึกษาดัชนีค่าและสารตัวชี้ที่ผสม	114
ภาพที่ 4.33 แผนภูมิแสดงปริมาณของ BB ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ	116
ภาพที่ 4.34 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GJ ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ	116
ภาพที่ 4.35 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GC ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ	117
ภาพที่ 4.36 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GA ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ	117
ภาพที่ 4.37 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GB ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ	118
ภาพที่ 4.38 แผนภูมิแสดงปริมาณของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ	118
ภาพที่ 4.39 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การคืนกลับในคอลัมน์ที่ใช้ตัวดูดซับชนิดต่างๆ	119
ภาพที่ 4.40 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ BB ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ	121
ภาพที่ 4.41 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GJ ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ	121
ภาพที่ 4.42 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GC ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ	122
ภาพที่ 4.43 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GA ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ	122
ภาพที่ 4.44 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GB ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ	125
ภาพที่ 4.45 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดก่อนและ หลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ	123
ภาพที่ 4.46 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GJ ในคอลัมน์ Activated charcoal	125
ภาพที่ 4.47 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GC ในคอลัมน์ Activated charcoal	126
ภาพที่ 4.48 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GA ในคอลัมน์ Activated charcoal	126
ภาพที่ 4.49 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GB ในคอลัมน์ Activated charcoal	127
ภาพที่ 4.50 แผนภูมิแสดงปริมาณของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดในคอลัมน์ Activated charcoal	127
ภาพที่ 4.50ก แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของคอลัมน์ที่ล้างด้วยน้ำกลั่น	128
ภาพที่ 4.51 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ BB ในคอลัมน์ Activated charcoal	130
ภาพที่ 4.52 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GJ ในคอลัมน์ Activated charcoal	130
ภาพที่ 4.52ก แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GC ในคอลัมน์ Activated charcoal	131
ภาพที่ 4.53 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GB ในคอลัมน์ Activated charcoal	131
ภาพที่ 4.53ก แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GB ในคอลัมน์ Activated charcoal	132
ภาพที่ 4.54 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดในคอลัมน์	132

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ใบแปะก๊วยเป็นใบพืชจากต้นแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Ginkgoaceae ใบแปะก๊วยนี้ประกอบไปด้วยสารเคมีมากมายหลายชนิด ซึ่งสารเคมีหลักๆคือ สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่มที่ชื่อว่า “เทอร์ปีนแลคโตน (Terpene lactones)” โดยจะพบในใบแปะก๊วยมากกว่าในผลแปะก๊วย ซึ่งสารเทอร์ปีนแลคโตนจะประกอบไปด้วยสารสำคัญอยู่ 2 ชนิด คือ Ginkgolide และ Bilobalide สาร Ginkgolide นั้นสามารถแยกออกได้เป็น Ginkgolide A, B, C และ J ซึ่งชื่อที่แตกต่างกันนี้เนื่องมาจากมีหมู่บางหมู่ที่แตกต่างกันแต่โครงสร้างหลักยังเหมือนเดิม โดยสารเหล่านี้จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radical) ในบริเวณตา ป้องกันการเกิดโรคเบาหวานขึ้นตา เพิ่มการไหลเวียนของโลหิตไปสู่สมอง และปลายมือปลายเท้า ส่งผลต่อการทำงานและประสิทธิภาพของสมอง สามารถช่วยป้องกันโรคสมองเสื่อมหรือที่เรียกว่า อัลไซเมอร์ (Alzheimer disease) ได้ ในปัจจุบันหลายๆ ประเทศได้ให้การยอมรับถึงสรรพคุณของใบแปะก๊วยในการรักษาโรคสมองเสื่อม โดยการนำสารสกัดจากใบแปะก๊วยมารวมกับสารอื่น ๆ ช่วยให้การดูดซับที่ผนังลำไส้เล็กดีขึ้น ทำให้ร่างกายสามารถนำเอาสารสกัดจากใบแปะก๊วยนี้มาใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการนำสารสกัดดังกล่าวมาทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อบำรุงสมองและช่วยให้เลือดไหลเวียนได้ดีขึ้น ใช้รักษาโรคความจำเสื่อมอันเนื่องมาจากเลือดไปเลี้ยงสมองไม่เพียงพอในผู้ป่วยสูงอายุ

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นว่า สารสกัดใบแปะก๊วยนั้นมีสรรพคุณทางยาและจะมีประโยชน์มาก หากเราสามารถพัฒนาวิธีการสกัดสารที่มีประโยชน์นี้ออกมาให้ได้ในปริมาณที่มากทั้งในแง่ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสารสกัดจากใบแปะก๊วย ยา และผลิตภัณฑ์อาหารเสริมได้ ดังนั้นงานวิจัยฉบับนี้จะเป็นการศึกษาถึงวิธีที่ใช้สกัดสารพวก Terpene lactones อันได้แก่ Ginkgolide และ Bilobalide จากใบแปะก๊วยโดยเปรียบเทียบปริมาณของสารสกัดที่ได้ในแต่ละวิธีไม่ว่าจะเป็นการแช่ในตัวทำละลายหรือการต้มในน้ำ การใช้เทคนิค Ultrasonic และการรีฟลักซ์รวมทั้งการใช้คาร์บอนกัมมันต์ในการทำสารสกัดให้บริสุทธิ์

### 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 ศึกษาวิธีที่ใช้สกัดสาร Ginkgolide และ Bilobalide จากใบแปะก๊วย

1.2.2 เปรียบเทียบปริมาณของสารสกัดจากใบแปะก๊วยที่ได้ในแต่ละวิธี

### 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ในส่วนของงานวิจัยนั้นได้มีการเตรียมสารสกัดใบแปะก๊วยออกจากใบแห้งด้วยวิธีต่างๆ เช่น การแช่ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ขำก้น หรือการต้มในน้ำ การใช้เทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) และการรีฟลักซ์ เป็นต้น เพื่อให้สาร Ginkgolide และ Bilobalide ได้สามารถละลายออกมาจากใบแห้ง จากนั้นทำการระเหยเอาตัวทำละลายทิ้งไปเพื่อให้เหลือแต่สารสกัด (กรณีของการแช่ด้วยตัวทำละลาย ขำก้น) หรือจะนำไประเหยเอาน้ำออกบางส่วนภายใต้สภาวะความดันต่ำด้วยเครื่อง Rotary evaporator จากนั้นสารสกัดที่ได้นี้จะถูกลำไปสกัดเอาสารที่ไม่ต้องการชนิดอื่นๆ (impurity) ออกไปด้วยวิธีการต่างๆ กัน เช่น ใช้ตัวทำละลายบางชนิดแยกด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction หรือไม่ว่าจะเป็นการใช้คาร์บอน คอลัมน์ ซึ่งการกำจัดสารที่ไม่ต้องการชนิดอื่นทิ้งออกไป จะเป็นการทำบริสุทธิ์บางส่วน (partial purification) เพื่อให้ได้สาร Ginkgolide และ Bilobalide ที่บริสุทธิ์มากขึ้น ในส่วนของการทดลองนั้นจะได้มีการปรับ สภาวะให้เหมาะสมต่อการแยกเอสารดังกล่าวออกมาให้ได้มากที่สุด

### 1.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

1.4.1 เตรียมสารสกัดแปะก๊วยออกจากใบแห้งด้วยวิธีการสกัด ได้แก่ การแช่ด้วยตัวทำละลายชนิด ต่างๆ ขำก้น หรือการต้มในน้ำรวมทั้งการใช้เทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) และการรีฟลักซ์

1.4.2 นำสารสกัดแปะก๊วยที่ได้มากำจัดสารที่ไม่ต้องการชนิดอื่นๆ ออกไปด้วยวิธีที่แตกต่างกัน เช่น ตัวทำละลายบางชนิดแยกด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction และ การใช้คาร์บอนคอลัมน์

1.4.3 ตรวจสอบและคำนวณปริมาณของสาร Ginkgolide และ Bilobalide โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยมี Evaporative Light Scattering (ELS) เป็น Detector

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถสกัดเอสาร Ginkgolide และ Bilobalide ออกมาจากใบแปะก๊วยได้

1.5.2 เปรียบเทียบได้ว่าวิธีใดที่จะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากที่สุด

1.5.3 สามารถที่จะนำไปเป็นแนวทางเพื่อประยุกต์หรือนำไปต่อยอดใช้ในเชิงอุตสาหกรรมได้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 ข้อมูลเบื้องต้นของใบแปะก๊วย

##### 2.1.1 ประวัติและความเป็นมาของใบแปะก๊วย

แปะก๊วยหรือ *Ginkgo biloba* เป็นพืชในวงศ์ Ginkgoaceae ต้นแปะก๊วยมีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศจีน และเป็นพืชชนิดเดียวในวงศ์ Ginkgoaceae ที่หลงเหลืออยู่จากยุค Cretaceous เมื่อประมาณ 80 ล้านปีมาแล้ว และเชื่อว่าเป็นพืชที่เก่าแก่ที่สุดในโลกชนิดหนึ่ง

จากหลักฐานทางโบราณคดีเข้าใจว่าพืชในตระกูล Ginkgo เริ่มอุบัติขึ้นในโลกเมื่อราว 180 ล้านปี ในยุคจูราสสิกซึ่งเป็นยุคที่ไดโนเสาร์เฟื่องฟู ในยุคนั้นมีพืชตระกูลนี้ถึง 4 ชนิดด้วยกันและมีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางทั้งในซีกโลกตอนเหนือและบางส่วนของซีกโลกทางตอนใต้ แต่การเปลี่ยนแปลงของดินฟ้าอากาศที่หนาวเย็นลงอย่างมากประกอบกับปรากฏการณ์ของธารน้ำแข็งไหล (Glacier) เมื่อประมาณ 2 ล้านปีที่แล้วมาเป็นสาเหตุให้พันธุ์พืชหลายชนิดสูญหายไปจากพื้นโลก รวมทั้งพืชตระกูล Ginkgo อื่นๆด้วย คงเหลือเพียงแปะก๊วยเพียงชนิดเดียวเท่านั้น ซึ่งพบหลงเหลืออยู่ในประเทศจีนแต่ก็ยังเป็นพืชที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ โดยพบอยู่ในธรรมชาติเพียงไม่กี่ต้น ภายหลังจึงได้มีการนำต้นแปะก๊วยไปปลูกในประเทศญี่ปุ่นและเกาหลี อีกทั้งมีการนำไปปลูกในยุโรปเมื่อราวศตวรรษที่ 18 ปัจจุบันต้นแปะก๊วยเป็นไม้ประดับที่นิยมปลูกมากตามแนวถนนและในสวนสาธารณะทั่วไปทั้งในยุโรปและอเมริกา (เชดศักดิ์ 2545)

การนำใบแปะก๊วยมาใช้ทางยาเพิ่งเริ่มมีขึ้นเมื่อ ค.ศ. 1436 ในสมัยราชวงศ์หมิง และต่อมาใบแปะก๊วยก็ถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์อย่างแพร่หลายในแถบยุโรป ส่วนในสหรัฐอเมริกาใบแปะก๊วยคือ 1 ใน 10 สมุนไพรยอดนิยมที่ถูกนิยมนำไปใช้เป็นอาหารเสริมอย่างกว้างขวาง(เชดศักดิ์ 2545)

ในปี ค.ศ. 1980 ประเทศเยอรมันนีมีการนำสารสกัดจากใบแปะก๊วยมาใช้ในการบำรุงรักษาภาวะบกพร่องของสมองในส่วนซีรีบรัม มีการทดลองกับผู้ป่วยที่มีอาการบกพร่องเรื้อรังของสมองส่วนซีรีบรัม และหลอดเลือด พบว่าใบแปะก๊วยช่วยให้มีการพัฒนาทางด้านความจำ ความคิด นอนหลับได้ง่ายขึ้น ส่วนผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์นั้นในสหรัฐอเมริกาใบแปะก๊วยก็ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางเพื่อเป็นยารักษาอาการ

ดังกล่าวโดยมีการทดลองในปี ค.ศ. 1994 ทดลองให้ใบแปะก๊วยกับกลุ่มผู้ป่วยอัลไซเมอร์ พบว่าผู้ป่วยมีความจำและสมาธิได้ดีขึ้น(เชดส์คัลด์ 2545)

ในปี ค.ศ.1996 ได้มีการพบว่า ใบแปะก๊วยมีประสิทธิภาพช่วยป้องกันผู้ที่มีการ AMS (Asthma & Acute Mountain Sickness) หรือภาวะการผิดปกติของการหายใจขณะขึ้นสู่ที่สูง ส่วนคนในกลุ่มที่ประสบปัญหาหุ้ออยู่เป็นประจำ การรับประทานอาหารที่ทำจากใบแปะก๊วยยังช่วยลดภาวะหุ้อได้อีกด้วย (เชดส์คัลด์ 2545)

ในปี ค.ศ.1998 ได้มีการทดลองเกี่ยวกับสรรพคุณทางยาในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของเส้นเลือดดำ โดยให้ผู้ที่มีอาการปวดหลังจากการเดินรับประทานใบแปะก๊วยเข้าไป ทำให้พบว่าใบแปะก๊วยมีส่วนช่วยลดอาการปวดได้จริงทั้งยังทำให้เดินได้ในระยะทางที่ไกลขึ้นอีกด้วย รวมไปถึงยังมีการทดลองพบว่า ใบแปะก๊วยช่วยเพิ่มการไหลเวียนของเลือดเพื่อเข้าไปเลี้ยงแขนขาได้ดีขึ้นอย่างมาก

ในปี ค.ศ.2003 Ahlemeyer และ Kriegstein ได้ทดลองนำสารสกัดใบแปะก๊วยมาใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) พบว่าสารสกัดใบแปะก๊วยสามารถที่จะรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้โดยจะไปยับยั้งการสะสมของอนุโมลิสและยับยั้งการตายของเซลล์

ในปี ค.ศ.2006 ได้มีการพบว่าสารสกัดใบแปะก๊วยมีประสิทธิภาพในการป้องกันความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง (CNS disorders) (Po-Chuen Chan 2007)

และในปัจจุบันสารสกัดมาตรฐานจากใบแปะก๊วยได้ถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์ และกำลังเป็นที่นิยมนำมาใช้เป็นยาและผลิตภัณฑ์อาหารเสริมซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย

### 2.1.2 ข้อมูลทั่วไปของใบแปะก๊วย

แปะก๊วยเป็นพืชวงศ์ Ginkgoaceae จำพวก Gymnospermae กล่าวคืออยู่ในกลุ่มพืชที่แตกต่างจากไม้ดอกทั่วไปโดยดอกตัวเมียจะมีไข่ (Ovule) ที่ปราศจากสิ่งห่อหุ้ม แปะก๊วยมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Ginkgo biloba* และมีชื่อสามัญคือ *Salisburya adiantifolia*, *Maidenhair tree*, *Forty-coin tree*, *Pai Kuo Yeh* (Chinese)

ต้นแปะก๊วยเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ ซึ่งอาจมีความสูงได้ถึง 40 เมตรต้นที่โตเต็มที่อาจมีเส้นรอบวงถึง 7 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยว ลักษณะคล้ายพัด กว้าง 5-10 เซนติเมตร ก้านใบยาว ใบแก่มีรอยหยักเว้าตรง



กลาง ใบออกเวียนสลับกันหรือออกเป็นกระจุกตามปลายกิ่ง เส้นใบขนานกันจำนวนมาก ใบอ่อนมีสีเขียวอ่อน เปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มเมื่อโตเต็มที่ในที่สุดจะเป็นสีเหลืองทองในฤดูใบไม้ร่วง ดอกจะแยกเพศคือดอกตัวผู้และดอกตัวเมียจะอยู่คนละต้น ดอกตัวผู้ออกเป็นช่อยาว ส่วนดอกตัวเมียออกเป็นกระจุกตรงปลายกิ่ง ประกอบด้วยก้านดอกยาวและปลายยอดจะมีไข่ซึ่งปราศจากสิ่งห่อหุ้ม 2 อัน ต้นแปะก๊วยจะออกดอกในฤดูใบไม้ผลิ



ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะของต้นแปะก๊วย



ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะใบของแปะก๊วย

ที่มา: <http://www.ginkgo-biloba.fr/photos.html>, เมื่อวันที่ 2 ตุลาคม 2556

ในต้นที่มีอายุ 20 ปีขึ้นไปผลจะกลมรียาวประมาณ 2-3 เซนติเมตรและมีสีเหลือง เปลือกชั้นนอกห่อหุ้มด้วยเนื้อที่มียางเหนียวในมีเมล็ดรูปกลมรี มีเปลือกแข็งหุ้มเนื้อใน เมล็ดมีสีเหลืองอ่อนรับประทานได้ (เอมอร 2542)

### 2.1.3 สารประกอบเคมีในใบแปะก๊วย

ใบแปะก๊วยประกอบไปด้วยสารเคมีมากมายหลายชนิด โดยสารประกอบเคมีกลุ่มหลักๆ ดังแสดงตามตารางที่ 2.1

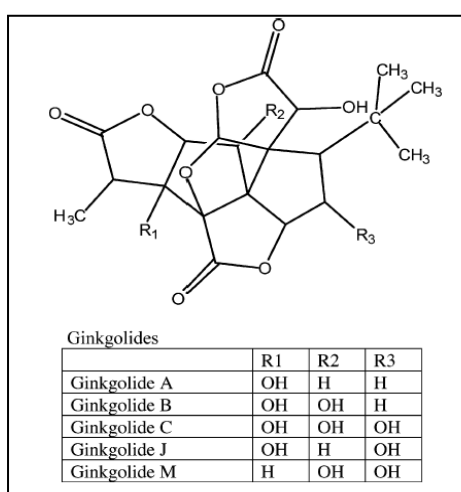
ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงสารประกอบหลักของใบแปะก๊วย (Po-Chuen Chan 2007)

Table 1: The main constituents of *Ginkgo biloba* leaves

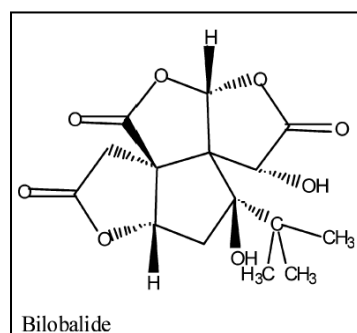
Class	Major chemical constituents
Terpenoids	Diterpenes: ginkgolides A, B, C, J (M is found in the root) Sesquiterpene: bilobalide Triterpenes: sterols
Flavonoids (flavone, flavonol glycosides, and aglycones)	kaempferol, quercetin, isorhamnetin, rutin, luteolin, delphinidin, myricetin
Biflavonoids	Sciadopitysin, ginkgetin, isoginkgetin, amentoflavone, bilobetin, 5'-methoxybilobetin
Organic acids	Benzoic acid derivatives (ginkgolic acid), N-containing acids
Polyprenols	di-trans-poly-cis-octadecaprenol
Others	waxes, steroids, 2-hexenal, cardanols, sugars, catechins, proanthocyanidins, phenols, aliphatic acids, rhamnose

โดยสารประกอบจำพวก Diterpene terpenoids หรือ Diterpene lactones ที่สำคัญคือ Ginkgolide และ Bilobalide สำหรับ Ginkgolide ชื่อและโครงสร้างจะแสดงดังภาพที่ 2.3 สารประกอบประเภท Diterpene lactones จะมีคาร์บอนอะตอมอยู่ 20 อะตอม โดยสาร Ginkgolide นี้สามารถแยกออกได้เป็น Ginkgolide A, B, C, J และ M ซึ่งชื่อที่แตกต่างกันนี้เนื่องมาจากมีจำนวนและตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชัน Hydroxyl ที่แตกต่างกันแต่โครงสร้างหลักยังเหมือนเดิม

ส่วนโครงสร้างของ Bilobalide ดังแสดงในภาพที่ 2.4 ซึ่ง Bilobalide นั้นเป็นสารประเภท Sesquiterpene lactones จะมีอะตอมของคาร์บอนอยู่ 15 อะตอม ทั้ง Ginkgolide และ Bilobalide เป็นสารประกอบเคมีที่สำคัญที่ทำให้ใบแปะก๊วยมีฤทธิ์ทางชีววิทยาและเภสัชวิทยา (Po-Chuen Chan 2007)



ภาพที่ 2.3 แสดงสูตร โครงสร้างของ Ginkgolide



ภาพที่ 2.4 แสดงสูตร โครงสร้างของ Bilobalide

การสกัดสารจากใบแปะก๊วยในทางการค้าจะใช้ water-acetone หรือ water-ethanol ในการสกัดสารจากใบแปะก๊วยและในสารมาตรฐานนี้จะมี Flavonoids เป็นส่วนประกอบหลัก โดยทั่วไปในสารมาตรฐาน สารสกัดใบแปะก๊วยจะมี flavonoid glycosides 22-27% terpene lactones 5-7% (มี Ginkgolide A, B, C 2.8-3.4 % และ Bilobalide 2.6-3.2 %) และ ginkgolic acid น้อยกว่า 5 mg / kg (5 ppm) ซึ่ง ginkgolic acid นี้เป็นสารพิษ ถ้ารับประทานเข้าไปในร่างกายจะทำให้ระคายเคืองต่อกระเพาะอาหารและลำไส้ ปวดหัว วิงเวียนศีรษะ ถ้าหากสัมผัสถูกผิวหนังจะทำให้เกิดอาการระคายเคืองและเกิดอาการแพ้ นอกจากนั้นแล้วในใบแปะก๊วยยังมีอนุพันธ์ของ Alkylphenol และ Alkylbenzoic ซึ่งสารเหล่านี้สามารถที่จะทำให้เกิดอาการแพ้ มีพิษต่อระบบภูมิคุ้มกันโรค และคุณสมบัติอื่นๆที่ไม่เป็นที่ต้องการ ดังนั้นในสารสกัดใบแปะก๊วยโดยทั่วไปจะมีการกำจัดสารนี้ออกไปด้วย (Po-Chuen Chan 2007)

## 2.2 คุณสมบัติของสารสกัดใบแปะก๊วย

### 2.2.1 คุณสมบัติทางชีววิทยา (Biological effects)

สารสกัดใบแปะก๊วย (*Ginkgo biloba* leave extract) จะออกฤทธิ์ผ่านหลายๆกลไก เช่น anti-oxidation effect, anti-PAF (platelet activating factor), Signal transduction และยับยั้งการสังเคราะห์กลูโคคอร์ติคอยด์ การออกฤทธิ์ของสารสกัดใบแปะก๊วยจะเกิดผ่านการรวมกันของกลไก 1 กลไกหรือมากกว่านั้น เช่น สารประกอบฟลาโวนอยด์ที่เชื่อกันว่าจะสามารถป้องกันการเปราะบางของเส้นเลือดฝอยเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยด้านการอักเสบและยังเป็นตัวจับอนุมูลอิสระ (free radical) อีกด้วย (Po-Chuen Chan 2007) ฤทธิ์ทางด้านชีววิทยาอื่นๆมีดังนี้คือ

#### 2.2.1.1 ความผิดปกติและการทำลายของระบบประสาท

ตามรายงานวิชาการหลายฉบับได้มีการกล่าวถึงฤทธิ์ของใบแปะก๊วยว่ามีผลต่อกระบวนการเรียนรู้และความจำ อีกทั้งยังช่วยชะลอความแก่ในมนุษย์ได้อีกด้วย ปริมาณที่ใช้รับประทานโดยทั่วไปคือ 240 mg ของ GBE-761 (*Ginkgo biloba* leave extract-761) สารสกัดใบแปะก๊วยจะมีประสิทธิภาพทั้งในคนที่เริ่มมีอายุและคนที่ชราแล้วซึ่งมีสติปัญญาเริ่มเสื่อมถอยโดยถือว่าเป็นอัลไซเมอร์อีกประเภทหนึ่ง โดยใบแปะก๊วยสามารถที่จะลดการผลิตคอร์ติโคสเตอรอยด์ (Corticosteroid production) ซึ่งจะ

ปรับปรุงการไหลเวียนของเลือดเข้าสู่สมอง เพิ่มการนำกลูโคสไปใช้ประโยชน์ การผลิต ATP (ATP production) และมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial metabolism)

ตามรายงานของ Winter ได้มีการนำสารสกัดใบแปะก๊วยไปทดสอบกับหนูในปริมาณ 100 mg/kg/วัน โดยการให้ทางปากเป็นเวลา 4-8 สัปดาห์ ปรากฏว่าหนูมีความจำและมีการเรียนรู้ที่ดีขึ้น (Winter 1991) ส่วนในรายงานของ Cohen-salmon และคณะก็ได้มีการทดลองใช้สารสกัดใบแปะก๊วยกับหนูเช่นกัน โดยให้สารสกัดใบแปะก๊วยทางปากในปริมาณ 40 mg/kg/วัน เป็นเวลา 1-3 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าหนูมีการเรียนรู้ที่ดีขึ้นในช่วงที่มีอายุน้อยๆ (6 เดือน) และช่วงที่มีอายุมากขึ้น (22 เดือน) ถึงแม้ว่าในรายงานส่วนใหญ่จะ มีการแสดงให้เห็นเสมอว่าใบแปะก๊วยมีฤทธิ์ที่สามารถจะป้องกันผลกระทบจากการที่ระบบประสาทถูกทำลาย ไม่ว่าจะเป็นการป้องกันระบบประสาท ทั้งจากการกระทำโดยตรงกับเซลล์ประสาทและจากผลกระทบทางอ้อมจากการปรับการไหลเวียนของเลือดและสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งข้อมูลนี้ยังไม่แน่ชัด

Kriegelstein และเพื่อนร่วมงาน ระบุว่า Bilobalide และ Ginkgolide A, B ช่วยลดพื้นที่ของเนื้อร้ายจากการที่โลหิตอุดตันบนพื้นผิวสมองในหนู เนื้อร้ายจึงถูกจัดการก่อนที่จะไปอุดตันเส้นเลือดในสมอง เมื่อสารสกัดใบแปะก๊วยถูกฉีดเข้าไปในหนู สมองส่วนหน้าและสมองส่วนกลางที่ขาดเลือดก็จะมีการไหลเวียนของโลหิตที่ดีขึ้น (Kriegelstein J 1990) แต่การป้องกันระบบประสาท (Neuroprotection) ยังไม่ได้ถูกตั้งข้อสังเกต (Houghton 1994)

### 2.2.1.2 การปรับปรุงการไหลเวียนโลหิต (Improvement of blood flow)

สารสกัดใบแปะก๊วยสามารถช่วยปรับปรุงการไหลเวียนของเลือดโดยตรงโดยการไปเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงและลดการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง ดังนั้นจึงสามารถที่จะช่วยปรับปรุงการไหลของเซลล์และความหนืดของเลือด การที่สารสกัดใบแปะก๊วยไปมีผลต่อหลอดเลือดเกิดขึ้นได้จะต้องมีตัวกลางโดยผ่าน Endothelium – derived relaxing factor (EDRF) สันนิษฐานว่าสารตัวกลางนี้น่าจะเป็นไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งไนตริกออกไซด์จะช่วยผ่อนคลายเซลล์ผนังของหลอดเลือด นอกจากนั้นแล้วไนตริกออกไซด์ยังเป็นตัวยับยั้งการปลดปล่อย Prostacyclins จากเซลล์เพาะเลี้ยง Endothelium ของวัวอีกด้วย การกำจัดไนตริกออกไซด์ พบว่าสารสกัดใบแปะก๊วยสามารถที่จะไปมีผลต่อ Prostacyclins อย่างไรก็ตามอนุมูลอิสระของไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปก็อาจจะเป็นปัจจัยที่เป็นอันตรายและสามารถที่จะไปมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system ;CNS) (Dubey AK 2004)

Bastia netto และคณะได้ข้อสรุปว่าสารสกัดใบแปะก๊วยสามารถที่จะป้องกันและช่วยเซลล์ hippocampal ในการต่อต้านพิษของไนตริกออกไซด์และความสามารถในการช่วยต่อต้านพิษของไนตริกออกไซด์ไม่ใช่แค่เพราะคุณสมบัติการต่อต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟลาโวนอยด์เท่านั้นแต่ยังเป็นเพราะความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งไนตริกออกไซด์โดยการกระตุ้นกิจกรรมของ PKC (Protein kinase C activity) (Bastianetto S 2000)

## 2.2.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological effect)

สารสกัดใบแปะก๊วยมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย โดยมีการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลองและในคนไว้เป็นจำนวนมาก แต่ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญและมีการนำมาใช้ทางคลินิก ได้แก่

### 2.2.2.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของออกซิเจนเป็นผลมาจากสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีอยู่กว่า 20 ชนิดในใบแปะก๊วย จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดรูปแบบต่างๆ เช่น สารสกัดแอลกอฮอล์ 100% สารสกัดอะซิโตน 90% พบว่าสารสกัดเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้ง lipid peroxidation ซึ่งเหนี่ยวนำโดย hydrogen peroxide มีการลดปริมาณการผลิตอนุมูลอิสระอีกทั้งยังป้องกัน LDL จาก oxidative damage และป้องกันเม็ดเลือดแดงจาก oxidative damage ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยง สัตว์ทดลองและในคน นอกจากนี้สารสกัด GBE-761 (Ginkgo biloba leave extract) ยังสามารถป้องกันจอตา (retina) จาก lipid peroxidation ได้อีกด้วย (เชิดศักดิ์ 2545)

### 2.2.2.2 ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือด (Antiplatelet aggregating activity)

Ginkgolide B เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง PAF (platelet aggregating factor) ซึ่งสาร PAF มีบทบาทสำคัญในการลดการเกาะตัวของเกร็ดเลือด เมื่อเกิดลิ่มเลือดหรือปฏิกิริยาการบวมและการแพ้ จากการทดลองให้สารสกัดเอทานอล 30% ของใบแปะก๊วยแก่ผู้ป่วย 2 ราย พบว่ามีผลทำให้ bleeding time เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาในคนโดยใช้สาร Ginkgolide B (BN 52021) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์แรงที่สุดในกลุ่มกิงโกไลด์ พบว่าต้องให้ในขนาด 120-240 มก./กก. ในแต่ละวัน จึงจะเห็นผลในการต้าน PAF แต่แปะก๊วยจะไม่มีผลต่อการจับตัวของเกร็ดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วย ADP หรือสารอื่นๆ (เชิดศักดิ์ 2545)

### 2.2.2.3 การเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตไปยังสมอง (Enhancement of cerebral blood flow)

สารสกัดใบแปะก๊วยด้วยเอทานอล 30% และ 100% ในขนาด 120-300 มก./คน/วัน เป็นเวลา 4-12 สัปดาห์ มีผลในการเพิ่มปริมาณโลหิตที่ไปเลี้ยงสมองทำให้อาการต่างๆที่เกิดจากโลหิตไปเลี้ยงสมองไม่พอ (Cerebral insufficiency) ดีขึ้นภายใน 4 สัปดาห์ และหลังจากให้สารเป็นเวลา 12 สัปดาห์ อาการของผู้ป่วยดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอกการศึกษาผลของสารสกัด LI 1370 ในผู้ป่วยที่มีอาการโลหิตไปเลี้ยงสมองไม่เพียงพอจำนวน 90 คน ซึ่งมีอายุเฉลี่ย 62.7 ปี โดยให้สารสกัด 150 มก./วัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่มีความจำดีขึ้น ระยะเวลาของความตั้งใจ (attention span) ในการทำงานเพิ่มขึ้น ความสามารถในการทำงานต่างๆที่ต้องใช้การปรับตัว และการตัดสินใจที่รวดเร็วดีขึ้นแต่การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมบางอย่างจะเห็นผลหลังสัปดาห์ที่ 6 (เชดส์คัลด์ 2545)

### 2.2.2.4 การกระตุ้นระบบไหลเวียนของโลหิต (Circulation stimulation)

สารสกัดด้วยอะซิโตน และเอทานอล 100% ของใบแปะก๊วยมีผลในการกระตุ้นการไหลเวียนของโลหิตเมื่อนิยดสารละลาย 50, 100, 150 และ 200 มก.ของสารสกัด GBE 761 เข้าทางเส้นเลือดดำในคนไข้ 42 คน พบว่าสามารถเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตที่ผิวหนังได้ โดยฤทธิ์จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับปริมาณสารสกัดที่ให้

จากการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นโรคเส้นเลือดแดงส่วนปลายอุดตัน จำนวน 60 คน โดยให้สารสกัด GBE 761 ปริมาณ 40 มก. วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่าสารสกัดดังกล่าวช่วยให้ผู้ป่วยสามารถเดินได้ไกลขึ้น (เชดส์คัลด์ 2545)

### 2.2.2.5 การเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้ (Learning enhancement)

การทดลองให้สารสกัดอะซิโตน-น้ำ (1:1) ของใบแปะก๊วยในขนาด 50 มก./กก. ในหนูขาว พบว่าหนูสามารถเรียนรู้ได้เร็วขึ้นเมื่อให้สารสกัดก่อนการทดสอบ ส่วนสารสกัดเอทานอล 95% ในขนาด 100 มก./กก. ให้แก่หนูถีบจักร พบว่าหนูสามารถเรียนรู้ได้เร็วขึ้นและสามารถจดจำสิ่งที่เรียนรู้ได้ (เชดส์คัลด์ 2545)

#### 2.2.2.6 ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิพิดเพอรอกไซด์ (Lipid peroxide formation inhibition)

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอล 30%ของใบแปะก๊วยกับเซลล์เลี้ยงของเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดงที่ไปยังปอด พบว่าสามารถยับยั้งการสร้างลิพิดเพอรอกไซด์ซึ่งเหนี่ยวนำด้วย tert-butylperoxide ได้ (เชิดศักดิ์, 2545)

#### 2.2.2.7 ฤทธิ์ช่วยเพิ่มความจำดีขึ้น (Memory enhancement effect)

สารสกัด น้ำ-แอลกอฮอล์ในขนาด 40 มก./กก. เมื่อนำเข้าช่องท้องของหนูถีบจักรช่วยเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำของสัตว์ทดลอง นอกจากนี้การให้สารสกัดเอทานอล 100% ในขนาด 120-240 มก./วัน แก่ผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) พบว่าแปะก๊วยมีผลต่อ cognitive function ของผู้ป่วยทำให้การรับรู้ดีขึ้น เมื่อให้สารสกัดเอทานอล 30% ในขนาด 320 มก./คน แก่ผู้ป่วยสูงอายุ 18 คน ซึ่งมีอาการความจำเสื่อมเนื่องจากความชรา พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถช่วยเพิ่มความจำของผู้ป่วยดีขึ้น (เชิดศักดิ์ 2545)

#### 2.2.2.8 ฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดหดตัว (Vasoconstrictor activity)

สารสกัดใบแปะก๊วย 30% เอทานอลเมื่อให้รับประทานในขนาด 320 มก./คน ร่วมกับสารสกัดโสมในอัตราส่วน 3:5 (แปะก๊วย 3 ส่วนต่อโสม 5 ส่วน) พบว่ามีผลทำให้หลอดเลือดหดตัว โดยวัดจากความดันโลหิต 1 ชั่วโมงหลังจากให้ยา (เชิดศักดิ์ 2545)

#### 2.2.2.9 ฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Vasodilator activity)

เมื่อให้สารสกัดใบแปะก๊วยด้วย 30%เอทานอลทางหลอดเลือดดำอย่างช้าๆ ในขนาด 25 มล./คนแก่ผู้ป่วย 15 คนซึ่งมีแผล (lesion) ที่เส้นเลือดแดงนอกกะโหลกศีรษะ แล้วทำการวัดการไหลเวียนของเลือดที่ผิวหนังที่ส่วนมือและเท้า พบว่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (เชิดศักดิ์ 2545)

#### 2.2.2.10 ฤทธิ์เพิ่มการมองเห็น (Visual improvement)

การให้สารสกัด 90%เอทานอล ทางปากแก่ผู้ป่วยที่มีอาการ senile macular degeneration ซึ่งอาจทำให้ตาบอดได้นั้น พบว่าสามารถทำให้การมองเห็นระยะยาว และระยะมองเห็น (visual field) ของผู้ป่วยดีขึ้น นอกจากนี้การให้สารสกัดแปะก๊วยแก่ผู้ป่วยเบาหวานที่มีอาการเสื่อมของจอตาในระยะเริ่มแรกเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าผู้ป่วยสามารถมองเห็นได้ดีขึ้น (เชิดศักดิ์ 2545)

### 2.2.2.11ฤทธิ์ยับยั้งการเสื่อมของสมอง (Antidementia activity)

การให้สารสกัดใบแปะก๊วยด้วย 30%เอทานอล (LI 1370) ทางปากในขนาด 150 มก./วัน ในผู้ป่วยอายุ 57-76 ปี ซึ่งมีอาการทางสมอง จำนวน 50 คน พบว่าอาการทางสมองของผู้ป่วยดีขึ้นหลังจากให้ยา 3 สัปดาห์ และอาการโดยรวมดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนหลังจากให้ยาคัดต่อกัน 6 สัปดาห์

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากใบแปะก๊วยมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย สารสกัดใบแปะก๊วยที่นำมาใช้ในการผลิตยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีจำหน่ายในท้องตลาดส่วนใหญ่ จะเป็นสารสกัดที่มีปริมาณสารสำคัญคือ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ร้อยละ 24 และสารกลุ่มเทอร์ปีนร้อยละ 6 (เชดสคี้ 2545)

สารสกัดใบแปะก๊วยที่อยู่ใน monograph ในเภสัชตำรับของชาวเยอรมัน และได้รับการยอมรับจากคณะกรรมการด้านยาสมุนไพรของประเทศเยอรมนี ได้แก่ สารสกัดอะซีโดน-น้ำจากใบแปะก๊วย เนื่องจากสารสกัดนี้ผ่านการศึกษาวิจัยทางคลินิก ต่อมาในปี 1997 คณะกรรมการฯ ได้กำหนดไว้ใน monograph ของสารสกัดใบแปะก๊วย ให้มีปริมาณของ ginkgolic acid ได้สูงสุด 5 ppm สารสกัดใบแปะก๊วย ใน monograph ดังกล่าว มีชื่อว่า Ginkgo biloba leaf extract มีสัดส่วนของใบต่อสารสกัด 50:1 โดยน้ำหนัก สารสกัดนี้มี glycoside-flavonone 22-27% เทอร์ปีนแอลโคไดโน 5-7% (ได้แก่ ginkgolides A, B และ C ประมาณ 2.8-3.4% และ bilobalide ประมาณ 2.6-3.2%) และ ginkgolic acid ต่ำกว่า 5 ppm สารสกัดดังกล่าว มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยา ดังนี้คือเพิ่มความต้านทานการขาดออกซิเจนโดยเฉพาะในเนื้อเยื่อสมอง ยับยั้งอาการบาดเจ็บที่ทำให้เกิดอาการสมองบวม ลดอาการบวมที่จอตา (retina) เพิ่มความสามารถในการเรียนรู้ เพิ่มความดันโลหิต ยับยั้งกลไกการแข็งตัวของเลือดโดยยับยั้ง PAF (platelet activating factor) ยับยั้งอนุมูลออกซิเจนที่เป็นพิษ (ฟลาโวนอยด์เป็นสารที่แสดงคุณสมบัตินี้) ปกป้องเส้นประสาท (Neuroprotective effect) ค่า LD<sub>50</sub> ในหนู (mouse) เมื่อให้ทางปากเท่ากับ 7,725 มก./กก.น.ตัว และเมื่อนำเข้าหลอดเลือดดำเท่ากับ 1,100 มก./กก.น.ตัว ไม่พบผลที่ทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ (mutagen) หรือทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) และไม่เป็นพิษต่อระบบอวัยวะสืบพันธุ์ (เชดสคี้ 2545)

## 2.3 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร (Extraction of Active Constituents from Medicinal Plants)

การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปการสกัดเบื้องต้นไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีการใดหรือใช้ตัวทำละลายใด ก็จะได้องค์ประกอบเป็นของผสมหรือสารสกัดอย่างหยาบ (Crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกมาโดยใช้น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย (solvent) สารสกัดหยาบนี้ประกอบด้วยสารเคมีหลากหลายชนิด ซึ่งมีทั้งสารสำคัญ (Active constituents) ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacologically active constituents) และองค์ประกอบอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ ซึ่งเรียกว่า สารเฉื่อย (inert substances) ที่ไม่มีฤทธิ์ทาง



เภสัชวิทยา (pharmacologically inactive constituents) โดยน้ำยาสกัดหรือตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการเตรียมสารสกัดได้แก่ น้ำ (water), แอลกอฮอล์ (alcohol) หรือสารละลายผสมของสารละลายทั้ง 2 ชนิดนี้ นอกจากนี้ อาจใช้กรด ค่าง เติมลงในน้ำยาสกัดเพื่อปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาสกัดให้เหมาะสมยิ่งขึ้น

น้ำ (water) จัดเป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่ายและราคาถูก แต่การใช้น้ำอย่างเดียวเป็นตัวทำละลายในการสกัด มีข้อเสียหลายประการ คือ สามารถละลายองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออกมาได้มาก เช่นเดียวกับสารสำคัญที่ต้องการ สารละลายที่ละลายออกมากับน้ำ เช่น น้ำตาล , แป้ง ล้วนแล้วแต่เป็นอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ จึงทำให้เกิดการบูดเสียของสารสกัดเนื่องจากจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้ น้ำยังระเหยได้ที่อุณหภูมิสูง ถ้าต้องการทำให้สารสกัดในน้ำเข้มข้นจะต้องใช้อุณหภูมิสูงในการระเหยไล่น้ำออกไป ซึ่งอาจทำให้เกิดความเสียหายกับสารสำคัญ ดังนั้นจึงไม่ค่อยนิยมนำน้ำเดี่ยวๆ เป็นน้ำยาสกัด แต่ใช้ร่วมกับตัวทำละลายอื่นๆ เช่น แอลกอฮอล์หรือกรด

แอลกอฮอล์ (alcohol) จัดเป็นตัวทำละลายที่ดีมาก เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ แอลกอฮอล์ มีข้อดีกว่าคือ มีความจำเพาะ (selectivity) ในการละลายมากกว่าน้ำ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้สารสกัดเข้มข้นจะระเหยได้ง่าย มีความจำเพาะ (selectivity) และในการละลายมากกว่าน้ำแต่ราคาของแอลกอฮอล์จะแพงกว่าน้ำ

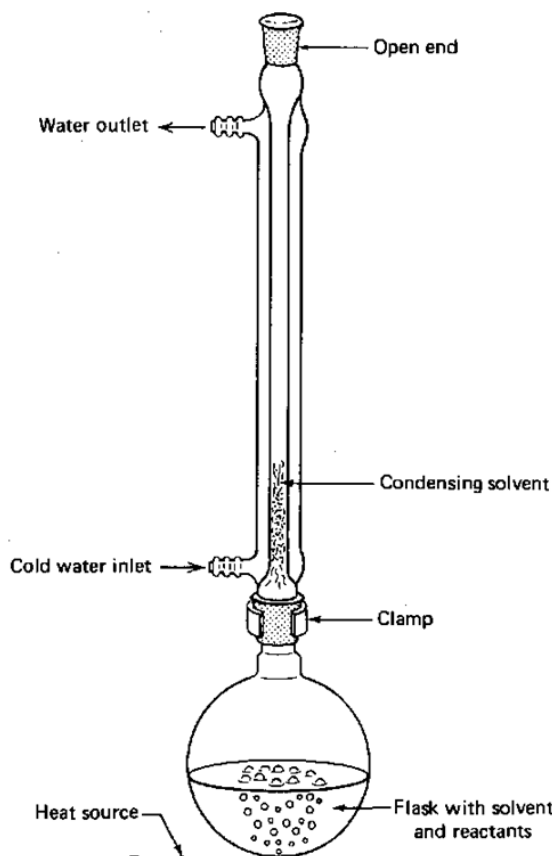
น้ำยาผสมแอลกอฮอล์ (hydroalcoholic mixture) เป็นน้ำยาสกัดที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถละลายสารสำคัญได้ใกล้เคียงกับแอลกอฮอล์ แต่ราคาถูกกว่า และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้อีกด้วย นอกจากนี้การใช้น้ำยาผสมแอลกอฮอล์ ยังช่วยป้องกันการแยกตัวของสารต่างๆ ในสารสกัดเมื่อตั้งทิ้งไว้ ซึ่งมักเกิดขึ้นในกรณีที่ใช้ทำละลายเดียวในการสกัด

การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (Extraction with solvent) ตัวทำละลายที่นิยมใช้มากที่สุดคือ ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) อาจใช้ตัวทำละลายอื่น เช่น อะซีโตน, เมทานอล, แอลกอฮอล์ เป็นต้น วิธีนี้จะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อเทียบกับการกลั่นที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง ทำให้องค์ประกอบทางเคมีเปลี่ยนแปลง และมีกลิ่นแปลกไปจากธรรมชาติได้ จึงนำวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายนี้มาใช้ในทางอุตสาหกรรม

## 2.4 เทคนิคการสกัดสารเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ที่ใช้ในงานวิจัย

### 2.4.1 การสกัดสมุนไพรโดยวิธี REFLUX (การสกัดแบบไหลย้อนกลับ)

การสกัดแบบไหลย้อนกลับ (Reflux extraction) ใช้ในการสกัดสารสำคัญออกจากสมุนไพรที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ เฮกเซน หรือน้ำ โดยสมุนไพรที่แช่ด้วยแอลกอฮอล์ เฮกเซน หรือน้ำ จะถูกต้มให้ความร้อน เพื่อทำการละลายสารสำคัญออกจากสมุนไพร โดยที่แอลกอฮอล์ หรือน้ำจะถูกต้มจนเดือดระเหยขึ้นไปที่ด้านบน แล้วจะถูกควบแน่นด้วยคอนเดนเซอร์ (condenser) กลับลงมาทำละลายต่อเนื่องหมุนเวียนอย่างนี้ไปเรื่อยๆจนสารสกัดละลายเข้มข้น (สายคดี 2552)



ภาพที่ 2.5 แสดงระบบการ Reflux

ซึ่งการสกัดแบบนี้มีหลักการดังนี้ ซึ่งทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายในขวดก้นกลมเมื่อได้รับความร้อนจะกลายเป็นไอลอยขึ้นสู่ Condenser ซึ่งมีการหล่อน้ำไว้ทำให้ตัวทำละลายกลับสู่สถานะของเหลวแล้วไหลกลับสู่ขวดก้นกลมซึ่งจะทำปฏิกิริยากันอย่างน้อย 1 ชั่วโมงเนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารแล้วจะถูกทำให้ระเหยและควบแน่นกลับมาเมื่อเจอรระบบหล่อเย็น ทำให้สกัดได้อีกเป็นลักษณะหมุนเวียนโดยตัวทำละลายที่เราใส่ลงไปในเรื่องมือจะหมุนเวียนผ่านสารที่เราต้องการสกัดหลายๆครั้งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด จนกระทั่งสารที่เราต้องการสกัดออกมามีปริมาณเข้มข้นมากพอ

ตัวแปรที่มีผลต่อการสกัด ได้แก่

1. ชนิดของตัวทำละลายต้องเหมาะสมกับการสกัดสารที่สนใจ โดยอาศัยหลักการ Like dissolve like
2. ปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้สกัด ปริมาตรตัวทำละลายต้องมีมากพอ คือเมื่อตัวทำละลายส่วนหนึ่งเกิดการระเหยขึ้นไปสกัดสารก่อนที่จะเต็ม Reflux sidearm
3. เวลาที่ใช้สกัด เวลาที่ใช้สกัดต้องมีความเหมาะสม ที่จะสามารถสกัดเอาสารที่สนใจออกจากตัวอย่างให้ได้มากที่สุด ซึ่งในเทคนิคนี้ ส่วนใหญ่เวลาที่ใช้สกัดมักยาวนานเป็นชั่วโมง เพื่อให้เกิดการ reflux ของตัวทำละลายหลายๆ ชั่วโมง ทำให้สารที่สนใจถูกสกัดออกจากตัวอย่างได้มากที่สุด

4. ตัวอย่างเทคนิคนี้ตัวอย่างมักจะเป็นของแข็ง ดังนั้นต้องทำตัวอย่างให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสกับสารมากที่สุด คือควรให้ตัวอย่างมีขนาดเล็กที่สุด เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัส

ข้อดีคือเป็นเทคนิคที่มีราคาถูก (เฉพาะราคาตัวทำลาย) ก่อนข้างทำได้ง่ายไม่ยุ่งยากมากนัก ส่วนข้อด้อยใช้เวลาสกัดนานมีตัวทำลายอินทรีย์เหลือเป็น waste หลังจากกระบวนการเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งตัวทำลายอินทรีย์เหล่านี้มักมีความเป็นพิษทั้งต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม (ในกรณีที่ทิ้งแบบที่ไม่มีการจัดการที่ดี) การประยุกต์ใช้สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารที่สนใจที่อยู่ในตัวอย่าง ของแข็ง เช่น ดินผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เป็นต้น (ชุดิมา 2555)

## 2.4.2 เครื่องอัลตราโซนิก (ชุดิมา 2557)

### 2.4.2.1 หลักการของคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic Extraction)

คลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic) หมายถึง คลื่นเสียงที่มีความถี่สูงเกินกว่าที่มนุษย์จะได้ยิน มีความถี่สูงกว่า 20 KHz ขึ้นไป สาเหตุที่มีการนำเอาคลื่นย่านอัลตราโซนิกมาใช้ก็เพราะว่าเป็นคลื่นที่มีทิศทางทำให้เราสามารถเล็งคลื่นเสียงไปยังเป้าหมายที่ต้องการได้โดยเจาะจง เรื่องนี้เป็นคุณสมบัติของคลื่นอย่างหนึ่ง ซึ่งจากสมบัติดังกล่าวเราจึงนำคลื่นอัลตราโซนิกมาใช้ในการสกัดสารที่สนใจออกจากตัวอย่างโดยส่วนมากจะใช้สกัดสารกึ่งระเหย (Semi-volatile) และระเหยยาก (Non-volatile Organic Compounds) จากตัวอย่างของแข็ง เช่น ดิน ตัวอย่างชีวภาพ น้ำ เป็นต้น

คลื่นอัลตราโซนิกสามารถแบ่งการใช้งานออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงความถี่ประมาณ 2-10 MHz เรียกช่วงนี้ว่า ช่วงความถี่สูง (High frequency ultrasound) ซึ่งจะนำคลื่นอัลตราโซนิกช่วงนี้ไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เพื่อสำหรับดูเพศหรือความผิดปกติของทารกในครรภ์ ช่วงที่สองคือ ช่วงความถี่ต่ำ (Low frequency ultrasound) จะมีค่าความถี่ประมาณ 20-100 kHz คลื่นอัลตราโซนิกช่วงนี้นำไปประยุกต์ใช้ในทางเคมีชีววิทยาและชีวเคมี เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ (Sonochemistry) และการทำให้เซลล์แตก เพื่อให้ปลดปล่อยสารสำคัญออกมา

การสกัดโดยคลื่นอัลตราโซนิกเป็นเทคนิคที่สำคัญวิธีหนึ่งที่ใช้สำหรับแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญจากพืชแต่ละชนิด (Dong และคณะ, 2010; Heo และ Kim, 2010; Riera และคณะ, 2010) และเป็นวิธีที่สามารถใช้ได้ในระดับปฏิบัติการวิจัยและระดับอุตสาหกรรม (Vinatoru, 2001) และเมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดอัลตราโซนิกกับวิธีอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าการสกัดด้วยอัลตราโซนิกเป็น

ทางเลือกที่ดีทางหนึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่เปรียบเทียบการสกัดด้วยอัลตราโซนิกกับการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ พบว่าการสกัดโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิกมีราคาถูกและง่ายกว่า (Chen และคณะ, 2008)

ตารางที่ 2.2 แสดงการเปรียบเทียบการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ควบคุมความดันและอัลตราโซนิก

การสกัดด้วยตัวทำละลายที่ควบคุมความดัน	การสกัดด้วยอัลตราโซนิก
- ระยะเวลาของการสกัดสั้น (ภายใน 1 ชั่วโมง)	- ระยะเวลาการสกัดปานกลาง (1-2 ชั่วโมง)
- ผลผลิตจากการสกัดปานกลางถึงสูง	- ผลผลิตจากการสกัดสูง
- ปริมาณตัวทำละลายสูงเพื่อรักษาความดัน	- ปริมาณตัวทำละลายปานกลาง
- อุณหภูมิสูง ความดันสูง	- อุณหภูมิห้อง
- ราคาสูง	- ราคาปานกลาง

ดัดแปลงจาก : Lee และคณะ (2007)

#### 2.4.2.2 หลักการทำงาน

1. คลื่นเสียงอัลตราโซนิกทำให้เกิดและสลายฟองอากาศขนาดเล็กจำนวนมากอย่างรวดเร็ว เรียกกระบวนการนี้ว่า cavitation ฟองอากาศที่เกิดขึ้นมีขนาดแตกต่างกันมีทั้งชนิดที่เกิดขึ้นแล้วแตกทันที (temporary bubble) และชนิดที่เป็นฟองอยู่ระยะเวลาหนึ่งแล้วจึงแตก (stable bubble) การแตกของฟองอากาศจะเกิดแรงดันต่อผิวภาชนะที่สัมผัสทำให้สิ่งสกปรกหลุดออกจากผิวภาชนะปรากฏการณ์ดังกล่าวแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะคือ

ระยะเริ่มต้น (Initial phase) หรือ bubble phase เป็นระยะสร้างฟองอากาศขนาดใหญ่และขนาดเล็กซึ่งเกิดจากคลื่นเสียงอัลตราโซนิกทำให้เกิดความดัน 2 ทิศทาง (dielectric pressure) ที่ตรงกันข้ามทำให้เกิดฟองสุญญากาศ (vacuum bubble) เนื่องจากมีนิวเคลียสซึ่งอาจเป็นไอน้ำที่เกิดจากโครงสร้างโมเลกุลของน้ำถูกทำลายหรือเป็นแก๊สที่เกิดขึ้นเนื่องจากความร้อนหรือเป็นอนุภาคนขนาดเล็ก ( $5 \times 10^{-5}$ - $10^3$  ซม.) อยู่ในตัวกลาง

ระยะทำลายฟองขนาดใหญ่ (catastrophic phase) โดยคลื่นเสียงอัลตราโซนิกทำให้เกิดฟองอากาศขนาดเล็กไม่กี่ไมครอนจนถึงหลายร้อยไมครอนจำนวนนับล้านฟอง

ระยะสุดท้าย(final phase) เป็นระยะสร้างความดันสูงเกิดขึ้นเนื่องจากฟองอากาศเนื่องจากในปัจจุบันเครื่องล้างอัลตราโซนิกถูกนำมาใช้ในห้วงปฏิบัติการอย่างแพร่หลายเพราะยุบตัวแตกออก (collapse) แล้วเกิดแรงดันของของเหลว(hydrostatic pressure) พุ่งออกมาเป็นลำจากฟองอากาศแต่ละฟองที่เรียกว่าเซนทรัลเจต(central jet) ซึ่งมีความดันสูงถึง 1,800 atm ดังนั้นถ้าใช้ความถี่ 40 กิโลเฮิร์ตซ์จะมีแรงดันกระทำต่อผิวภาชนะและสิ่งสกปรกในความเร็วถึง 40,000 ครั้ง/วินาทีและถ้าวัตถุนั้นอยู่ในฟองอากาศแต่ละฟองพบว่ามีความถี่สูงถึง 2,000-5,000 อนุภาควินาทีอย่างไรก็ตามจำนวนฟองอากาศและแรงระเบิดของฟองอากาศซึ่งนอกจากจะขึ้นอยู่กับความถี่และความแรงของคลื่นเสียงอัลตราโซนิกแล้วยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของตัวกลางกล่าวคือถ้าอุณหภูมิสูงกว่าจำนวนฟองอากาศจะเกิดมากแต่แรงดันของของเหลวจะน้อยกว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่านอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความดันและปริมาณแก๊สในตัวกลางซึ่งถ้ามีมากจะทำให้เกิดฟองอากาศได้น้อยลง

2. ความเร่งของของเหลว (acceleration of cleaning fluid) ผลดังกล่าวเกิดจากคลื่นเสียงอัลตราโซนิกและแรงดูดตามรูเล็ก(capillary suction) ทำให้ของเหลวซึ่งเป็นตัวกลางเกิดความเร่งกระทำต่อผิวภาชนะและสิ่งสกปรก

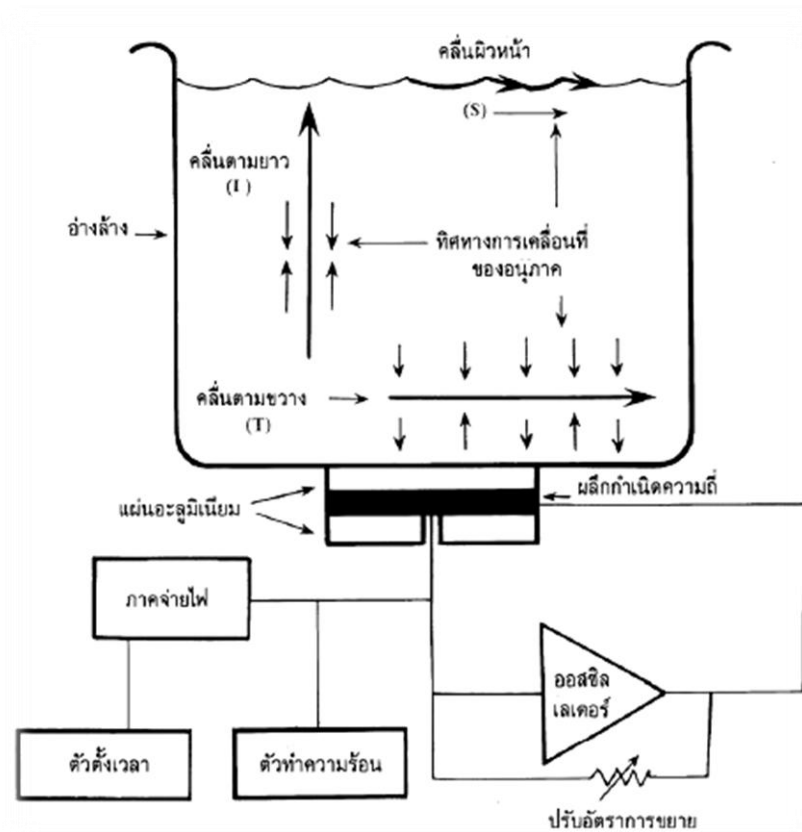
3. ผลจากความร้อน (thermal effect) ความร้อนที่เกิดขึ้นในตัวกลางจะทำให้สิ่งสกปรกซึ่งส่วนใหญ่ละลายได้มากขึ้น

จากการประยุกต์ใช้อัลตราโซนิกในการสกัดพืช (สด) จำเป็นต้องทราบว่าเพราะเหตุใดอัลตราโซนิกจึงช่วยในการสกัดสารสำคัญได้ เนื่องจากเนื้อเยื่อของพืชที่ประกอบเป็นเซลล์นั้นมีผนังเซลล์อยู่ชั้นนอกสุดซึ่งจะเป็นตัวต้านทานการสกัดได้ ซึ่งการสกัดจะประกอบด้วยสองขั้นตอนคือกระบวนการแพร่ผ่านผนังเซลล์ของตัวทำละลายและการชะสารสำคัญออกจากเซลล์เมื่อผนังเซลล์ถูกทำลายลง ส่วนการสกัดพืชแห้งจะเพิ่มอีกหนึ่งกระบวนการคือ กระบวนการดูดน้ำกลับ Hydration and swelling (อัลตราโซนิกทำให้ Swelling index สูงขึ้นดีกว่าการใช้การกวนทางกลธรรมดา) อัลตราโซนิกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการดังกล่าวได้โดยการเกิดปรากฏการณ์ Cavitation เนื่องมาจากคลื่นนั้นจะประกอบด้วยช่วงอัดและช่วงขยาย ในช่วงขยายเมื่อคลื่นเคลื่อนที่ผ่านตัวทำละลายจะทำให้เกิดฟอง (bubble) ของตัวทำละลายขนาดเล็กจำนวนมาก จากนั้นเมื่อฟองได้รับแรงจากคลื่นในช่วงอัดจะทำให้ฟองนั้นแตกออกและเกิด Microjet ที่มีความแรงมาก จนสามารถเจาะทำลายผนังเซลล์ของพืชได้ เมื่อผนังเซลล์ของพืชแตกออกจะทำให้เพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การทำให้ขนาดของตัวอย่างเล็กลงก่อนจะเพิ่มการสัมผัสกับตัวทำละลายและ Cavitation ได้ง่ายขึ้น

### 2.4.2.3 องค์ประกอบและคุณสมบัติ

เครื่องดั่งอัลตราโซนิกมีองค์ประกอบหลักที่สำคัญดังนี้

1. อ่างล้างมักพบในรูปของอ่าง 2 ชั้น โดยชั้นในทำจากเหล็กกล้าไร้สนิมชนิดที่ทนต่อการกัดกร่อนได้ดีนิยมทำให้ผิวเรียบตามมุมมีลักษณะโค้งมนเพื่อความสะดวกในการทำความสะดวกอ่างล้าง การออกแบบคำนึงถึงความแรงของคลื่นเสียงที่จะกระจายอย่างสม่ำเสมอทั่วอ่างล้างอ่างชั้นนอกทำจากเหล็กกล้าไร้สนิมอะลูมิเนียม หรือพลาสติกมีหน้าที่ป้องกันความเสียหายของผลึกกำเนิดความถี่และวงจรอิเล็กทรอนิกส์ภายในตัวอ่างอาจพบท่อระบายน้ำ(drain tap) เพื่อความสะดวกในการถ่ายน้ำในอ่างล้างทิ้ง หรือใช้สำหรับการล้างแบบต่อเนื่องที่ปล่อยให้น้ำไหลผ่านออกตลอดเวลา



ภาพที่ 2.6 แสดงองค์ประกอบของเครื่องดั่งอัลตราโซนิก

2. ตัวกำเนิดคลื่นเสียงอัลตราโซนิก(ultrasonic transducer) ประกอบด้วยแผ่นโลหะประกบกับแผ่นผลึก(crystal) กำเนิดความถี่นิยมใช้แผ่นโลหะที่เป็นส่วนผสมของตะกั่วเซอโคเนียมและไททาเนียม(lead zirconatetitanate compound) เนื่องจากแข็งแรงมีราคาถูกและให้พลังงานเสียงได้สูงมากถึง 100 วัตต์/

ตารางเซนติเมตรในปัจจุบันนิยมใช้ผลึกควอตซ์(quartz crystal) เป็นผลึกกำเนิดความถี่เพราะมีราคาถูกและมีการขยายตัวน้อยเมื่อถูกความร้อนผลึกกำเนิดความถี่มีคุณสมบัติเป็นพิโซอิเล็กทริก(piezoelectric)กล่าวคือเมื่อผลึกถูกบีบอัดจะเกิดกระแสไฟฟ้าและในทางตรงกันข้ามเมื่อผลึกได้รับกระแสไฟฟ้าจะสร้างความถี่ที่คงที่ขึ้น

ดังนั้นจึงเรียกตัวกำเนิดคลื่นเสียงอัลตราโซนิกที่ใช้ผลึกชนิดนี้ว่าพิโซอิเล็กทริกทรานสดิวซ์เซอร์(piezoelectric transducer, PZT)ความถี่ของผลึกขึ้นอยู่กับความหนาของผลึกตัวอย่างเช่นผลึก barium titanate ที่หนา 0.1 นิ้วและ 1 นิ้วจะสร้างความถี่ 1 เมกะเฮิร์ตซ์และ 100 กิโลเฮิร์ตซ์ตามลำดับผลึกของ lithium sulphate สร้างความถี่ 2.25 เมกะเฮิร์ตซ์เมื่อมีความหนา 0.045 นิ้วและสร้างความถี่ 5 เมกะเฮิร์ตซ์เมื่อมีความหนา 0.0214 นิ้วเป็นต้นนอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลทำให้ความถี่ของผลึกเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นหรือลดลงขึ้นอยู่กับระนาบของผลึกกำเนิดความถี่ที่ตัดออกมาจากก้อนผลึกการติดผลึกกำเนิดความถี่กับแผ่นโลหะและการติดแผ่นโลหะกับกันอ่างล่างควรคิดให้สนิทไม่ให้มีฟองอากาศด้วยอีพอกซีเพื่อให้การนำคลื่นเสียงมีประสิทธิภาพสูงสุดแต่เครื่องล่างอัลตราโซนิกบางชนิดอาจติดตั้งแบบไม่ถาวรสามารถถอดออกมาเปลี่ยนได้ซึ่งอาจทำให้การนำคลื่นเสียงเข้าสู่อ่างล่างมีประสิทธิภาพลดลงจำนวนของตัวกำเนิดคลื่นความถี่อาจมีมากกว่า 1 ตัวเพื่อเพิ่มความแรงของคลื่นเสียงหรือเพื่อกระจายคลื่นเสียงให้ทั่วทั้งอ่างล่าง

3. ออสซิลเลเตอร์ (oscillator) เป็นวงจรขยายสัญญาณป้อนกลับแบบบวก (positive feed back) โดยที่สัญญาณออก(output signal) ถูกป้อนกลับเสริมเฟสกับสัญญาณเข้า(input signal) ซึ่งในที่นี้เป็นสัญญาณความถี่ที่เกิดจากผลึกเมื่อได้รับกระแสไฟฟ้าออสซิลเลเตอร์จะขยายความถี่ให้แรงขึ้นด้วยการควบคุมแรงดัน(โวลต์) ที่จ่ายให้กับทรานซิสเตอร์ในกรณีที่ต้องการเปลี่ยนค่าความถี่สามารถทำได้โดยการปรับค่าความจุของตัวเก็บประจุที่ต่อกับผลึกกำเนิดความถี่

4. ตัวกลาง (medium) เครื่องล่างอัลตราโซนิกส่วนใหญ่ใช้น้ำเป็นตัวกลางในการพาคลื่นเสียงไปยังสิ่งสกปรกเมื่อคลื่นเสียงผ่านจากกันอ่างเข้าสู่ตัวกลางการอัด (compression) และการขยาย (expansion) ของคลื่นเสียงก่อให้เกิดคลื่นได้ 4 ลักษณะคือ

4.1 คลื่นตามยาว(longitudinal wave, L) เป็นคลื่นเสียงส่วนใหญ่ของคลื่นเสียงทั้งหมดเคลื่อนที่ได้ดีในตัวกลางเกือบทุกชนิดตัวอย่างเช่นมีความเร็วในน้ำบริสุทธิ์เท่ากับ  $1.43 \times 10^5$  ซม./วินาทีในแก้วเท่ากับ  $3.4 - 5.9 \times 10^5$  ซม./วินาทีในอากาศเท่ากับ  $0.331 \times 10^5$  ซม./วินาทีและในเหล็กเท่ากับ  $5.81 \times 10^5$  ซม./วินาทีเป็นต้นความเร็วในการเคลื่อนที่ (velocity, V) ขึ้นอยู่กับความถี่ (frequency, f) และความยาว

คลื่น (wavelength,  $\lambda$ ) ตามความสัมพันธ์  $V = \lambda f$  แต่ความเร็วของคลื่นเสียงเป็นสัดส่วนผกผันกับความหนาแน่นความกว้างและความยาวของวัตถุที่เป็นของแข็งคลื่นตามยาวทำให้อนุภาคของสิ่งสกปรกเกิดการเคลื่อนที่ในแนวนานกับทิศทางเคลื่อนที่ของคลื่นตามยาวเมื่อคลื่นเสียงไปกระทบกับอนุภาคขนาดใหญ่ (เมื่อเปรียบเทียบกับความยาวคลื่น) จะเกิดแรงผลักและการสะท้อนกลับ(reflection)ของคลื่นเสียงแต่ถ้าคลื่นเสียงไปกระทบกับอนุภาคขนาดเล็ก (เมื่อเปรียบเทียบกับความยาวคลื่น) จำนวนมากจะก่อให้เกิดการกระจาย (scattering) ของคลื่นเสียงทำให้คลื่นเสียงสูญเสียพลังงานไปบางส่วน

4.2 คลื่นตามขวาง(transverse wave, หรือ sheare wave) เป็นคลื่นเสียงที่มีทิศทางการเคลื่อนที่ตัดทิศทางการเคลื่อนที่ของคลื่นตามยาวการตัดกันของคลื่นเสียงทั้งสองอาจทำมุมเท่าใดก็ได้คลื่นตามขวางเกิดเฉพาะในวัตถุที่เป็นของแข็งเท่านั้นตัวอย่างเช่นผิวอ่างล้างและผิวภาชนะที่นำมาล้างเป็นต้นคลื่นตามขวางเคลื่อนที่ในระนาบตั้งฉากด้วยความเร็วประมาณครึ่งหนึ่งของคลื่นตามยาวผลของคลื่นนี้ทำให้อนุภาคเคลื่อนที่ขึ้นลงในแนวตั้งฉากกับทิศทางการเคลื่อนที่ของคลื่นตามขวาง

4.3 คลื่นผิวหน้า (surface wave, S) เป็นคลื่นที่เกิดจากการผสมของคลื่นตามยาวและคลื่นตามขวางเกิดเป็นคลื่นเสียงที่ผิวหน้าตัวกลางมีความเร็วในการเคลื่อนที่ช้ากว่าคลื่นตามขวางประมาณ 10 เท่าคลื่นผิวหน้าทำให้อนุภาคเคลื่อนที่ในแนวนานกับทิศทางการเคลื่อนที่ของคลื่นผิวหน้าในตัวกลางส่วนที่อยู่ต่ำกว่าผิวดังกล่าวคลื่นผิวหน้าจะมีน้อยลงตามระดับความลึกของตัวกลางเมื่อวัดจากผิวหน้า

4.4 คลื่นที่เกิดจากการโค้งงอ (flexural wave) เป็นคลื่นที่เกิดจากคลื่นเสียงอัลตราโซนิกวิ่งชนวัตถุที่อ่อนที่โค้งงอได้คล้ายแผ่นไดอะแฟรม (diaphragm) ในตัวกลาง

5. ตัวตั้งเวลา (timer) ใช้สำหรับตั้งเวลาการทำงานของเครื่องล้างอัลตราโซนิกมีช่วงตั้งเวลาการทำงานได้นานประมาณ 15-30 นาทีซึ่งนานพอสำหรับการล้างแบบปกติซึ่งใช้เวลาเพียง 2-5 นาทีในกรณีของการล้างแบบต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานควรปิดสวิทช์ของตัวตั้งเวลาไปที่ตำแหน่งทำงานต่อเนื่อง

6. ปุ่มควบคุมความร้อน (temperature control knob) ใช้ควบคุมการทำงานของตัวกำเนิดความร้อน (heater) ซึ่งติดอยู่นอกอ่างล้างชั้นในสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ในช่วง 30-85 °C. ถ้าต้องการล้างที่อุณหภูมิไม่สูงมากนักไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องล้างที่มีระบบกำเนิดความร้อนเพราะคลื่นเสียงอัลตราโซนิกสามารถทำให้เกิดความร้อนขึ้นในตัวกลางได้



7. ปุ่มกำจัดแก๊สในตัวกลาง (degassing knob) เป็นปุ่มที่ใช้สำหรับปล่อยกลิ่นความถี่ใดความถี่หนึ่งเข้าไปในตัวกลางเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากตัวกลางก่อนใส่สิ่งของลงไปล้างเครื่องล้างบางแบบสามารถปรับความแรงของปุ่มนี้ได้(ชุดิมา 2555)

### 2.4.3 คอลัมน์โครมาโตกราฟี

#### 2.4.3.1 หลักการ

โครมาโตกราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารผสมให้เป็นสารบริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการกระจาย (Distribution) ของสารในเฟสคงที่ (Stationary Phase) และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) โดยพบว่าสารแต่ละชนิดมีความสามารถในการแยกที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดซับ (Adsorption) ที่แตกต่างกัน โดยพบว่าประสิทธิภาพของการแยกสารขึ้นอยู่กับชนิดของตัวดูดซับ (Adsorbent) และ ตัวชะ (Eluent)

ตัวดูดซับ (Adsorbent) แต่ละชนิดมีความสามารถในการดูดซับสารไว้บนพื้นผิวได้ต่างกัน ตัวดูดซับที่มีขั้วสามารถดูดซับสารที่มีขั้วได้ดีกว่าสารที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นสารไม่มีขั้วจึงถูกชะออกมาก่อนสารมีขั้ว

ตัวชะ (Eluent) ทำหน้าที่ละลายสารออกจาก Stationary Phase ตัวชะมีความสามารถในการชะสารด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน ตัวชะที่มีขั้วสูงจะพาสารเกือบทุกชนิดเคลื่อนที่ไปได้เร็ว ในขณะที่ตัวชะที่มีขั้วต่ำจะพาสารที่ถูกดูดซับน้อยออกมาก่อน ดังนั้นในการเลือกตัวชะที่เหมาะสมกับชนิดของตัวดูดซับ และประเภทของสารที่ต้องการแยกจะทำให้ความสามารถในการแยกสารบริสุทธิ์ มีประสิทธิภาพ โดยพบว่าในการเพิ่มขั้ว (polarity) ของตัวชะนั้นจะต้องค่อยๆเพิ่มหรือมีการเปลี่ยนแปลง polarity อย่างระมัดระวังเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการแยกของ Stationary Phase ในคอลัมน์เกิดขึ้น (www.sci.nu.ac.th 3 สิงหาคม 2557)

#### 2.4.3.2 การแบ่งชนิดของโครมาโครมาโตกราฟี

การแบ่งชนิดของโครมาโตกราฟี อาจทำได้หลายแบบแต่ที่นิยมใช้กันมาก คือ การจำแนกตามกลไกของการแยกซึ่งแบ่งเป็น

1 แอดซอร์พชันโครมาโตกราฟี (Adsorption Chromatography) หรือลิควิด-โซลิดโครมาโตกราฟี (Liquid-Solid Chromatography, LSC) คือ มีเฟสอยู่กับที่หรือแอดซอร์เบนต์ (adsorbent) เป็นของแข็งที่มีรูพรุนและมีพื้นที่ผิวมาก ซึ่งถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) หรือเคลือบอยู่บนเพลต (plate) ส่วนเฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว

หลักการแยกสารของแอดซอร์พชันโครมาโตกราฟี คือ มีการดูดซับที่บริเวณระหว่างของแข็งและของเหลว เพื่อให้เกิดการแยกสารในสารละลายตัวอย่างควรมีแอฟฟินิตี (affinity) ต่อเฟสอยู่กับที่ต่างกันและปฏิกิริยาระหว่างเฟสอยู่กับที่กับสารควรเป็นแบบผันกลับได้ (reversible) ดังนั้นเมื่อชะ (elute)

สารที่จะแยกด้วยสารละลาย สารต่างๆ เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์/เพลต โดยเรียงลำดับตามแอฟฟินิตีต่อเฟสอยู่กับที่/แอดซอร์เบนต์ สารที่มีแอฟฟินิตีต่ำสุดจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์เร็วกว่าสารอื่นๆ และถูกขับเคลื่อนออกมาจากคอลัมน์ ส่วนพวกที่มีแอฟฟินิตีมากกว่าจะถูกชะออกมาทีหลัง ความแรงของการดูดซับขึ้นกับความแตกต่างของสภาพขั้วและตำแหน่ง (polarity and position) ของหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ในโมเลกุลของสารแต่ละชนิด สารที่มีขั้วสูงจะถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่บนเฟสอยู่กับที่นานคือ ถูกชะออกมาช้ากว่าสารที่มีขั้วต่ำ ทำให้มีการแยกเกิดขึ้นและสามารถคาดคะเนรีเทนชันไทม์ (retention time) ซึ่งคือ เวลาที่เฟสอยู่กับที่พาหรืออีลูตสารตัวอย่างให้เคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ได้ โดยดูจากลำดับความแรงของความมีขั้วของหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของสาร ส่วนหมู่ฟังก์ชันที่ไม่มีขั้วในโมเลกุลจะมีอิทธิพลต่อการแยกสารน้อยมาก

ดังนั้น แอดซอร์ชันโครมาโตกราฟีจึงมีความเหมาะสมมากสำหรับการแยกสารประกอบที่มีขั้ว เช่น การแยกการแยกสารประกอบพวกแอลกอฮอล์ออกจากสารประกอบพวกแอโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbon) เป็นต้น

2. พาร์ทิชันโครมาโตกราฟี (Partition Chromatography) หรือลิควิด-ลิควิดโครมาโตกราฟี (Liquid-Liquid Chromatography, LLC) คือ มีเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว โดยเฟสอยู่กับที่จะกระจายเป็นฟิล์มบางๆ บนผิวของตัวพุงที่เฉื่อยต่อปฏิกิริยาเคมี (inert support) และเป็นอนุภาคของแข็งที่มีรูพรุนหรือไม่มีรูพรุนก็ได้ เฟสทั้งสองจะต้องเป็นของเหลวที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันมากๆ

3. ไอออนเอ็กซ์เชนโครมาโตกราฟี (Ion Exchange Chromatography, IEC) เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างทางความแรงของประจุ (charge) ของสารตัวอย่างที่จะจับกับกลุ่มไอออน (ionic group) ที่อยู่บนพื้นผิวของเฟสอยู่กับที่ ซึ่งมีประจุต่างกับสารตัวอย่าง สารใดจับกลุ่มกับไอออนได้ดีหรือแรงกว่าจะถูกชะออกมาทีหลัง วิธีนี้นิยมใช้แยกสารประกอบไอออน (ionic compounds) หรือสารที่สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้ (ionizable compounds) ได้แก่ สารจำพวกกรดต่าง, นิวคลีโอไทด์ (nucleotides) รวมทั้งอนินทรีย์ไอออน (inorganic ions), กรดอะมิโน (amino acids) และสารประกอบชีวภาพ (biological compounds) โดยเฟสอยู่กับที่เป็นเรซิน (resin) ที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์สังเคราะห์เชื่อมกันเป็นร่างแห (synthetic cross-linked polymer) หรือ ซิลิกา (silica) ที่มีกลุ่มไอออนต่ออยู่ด้วยพันธะทางเคมี ปกติเฟสเคลื่อนที่จะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) ซึ่งมีเคาน์เตอร์ไอออน (counter ion) ที่มีประจุตรงข้ามกับประจุไอออนของอนุภาค แต่ประจุเหมือนกับไอออนของสารตัวอย่าง

4. ไซส์เอกซ์คลูชันโครมาโตกราฟี (Size Exclusion Chromatography, SEC) เป็นเทคนิคที่อาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของสาร วัสดุบรรจุในคอลัมน์เป็นพวกพอลิเมอร์ (polymer) ที่มีขนาดรูพรุนสม่ำเสมอ เชื่อมต่อกันเป็นร่างแห โมเลกุลของสารและเฟสเคลื่อนที่จะแพร่กระจายเข้าไปในรูพรุนนี้ได้ การแยกขึ้นกับการแพร่กระจายเข้าและออกจากรูพรุนของโมเลกุลของสาร รีเทนชันไทม์ของสารในคอลัมน์ขึ้นกับขนาดโมเลกุลของสาร สารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเข้าไปในรูพรุนได้ทั้งหมด โมเลกุลขนาดกลางจะผ่านเข้าไปได้บ้าง ส่วนโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านเข้าไปได้เลย ดังนั้น โมเลกุลขนาดใหญ่จึงถูกชะออกมาก่อนตามด้วยโมเลกุลขนาดกลางและขนาดเล็กตามลำดับ

การแยกโดยวิธีไซส์เอกซ์ครุชันโครมาโตกราฟีนี้แตกต่างจากวิธีโครมาโตกราฟีแบบอื่นๆ คือ ไม่เกิดปฏิกิริยาทางเคมีหรือฟิสิกส์ (chemical or physical interaction) ระหว่างสารตัวอย่างกับเฟสอยู่กับที่หรือกับเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นไซส์เอกซ์ครุชันโครมาโตกราฟีจึงมีประโยชน์มากสำหรับการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น พอลิเมอร์และไบโอพอลิเมอร์ (biopolymers) ออกจากโมเลกุลเล็ก นอกจากนี้ยังใช้หาน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของสารโดยเปรียบเทียบรีเทนชันไทม์ของสารที่ต้องการวิเคราะห์กับค่ารีเทนชันไทม์ของสารมาตรฐาน (standard) ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ได้ อีกด้วย วิธีไซส์เอกซ์ครุชันโครมาโตกราฟีแบ่งออกได้ดังนี้

ก. เจลฟิลเทรชันโครมาโตกราฟี (Gel Filtration Chromatography, GFC) โครมาโตกราฟีชนิดนี้จะมีเฟสอยู่กับที่มีขั้วหรือไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) ส่วนเฟสเคลื่อนที่เป็นพวกน้ำ ใช้แยกสารพวกโปรตีน (proteins) ออกจากกรดอะมิโน (amino acid) และพอลิเปปไทด์ (peptides) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

ข. เจลเพอร์มิเอชันโครมาโตกราฟี (Gel Permeation Chromatography, GPC) โครมาโตกราฟีชนิดนี้จะมีเฟสอยู่กับที่ไม่มีขั้วหรือไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ส่วนเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารจำพวกพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ [2]

#### 2.4.3.3 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography, CC)

คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography, CC) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกสารให้ได้ปริมาณมาก โดยเฟสเคลื่อนที่ (ตัวชะ) จะทำหน้าที่พาสารเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ (ตัวดูดซับ) ซึ่งบรรจุในหลอดแก้วปลายเปิด (open column) จึงเกิดการกระจายตัวของสารระหว่างสองเฟสนี้ โดยใช้กลไกแอดซอร์ชันโครมาโตกราฟี

#### 2.4.3.4 เทคนิคการแยกสารผสมโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี

เทคนิคสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการแยกสารผสมโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี คือ

##### 2.4.3.2.1 การบรรจุตัวดูดซับในคอลัมน์

ขนาดของคอลัมน์ที่ใช้ต้องสัมพันธ์กับปริมาณสารที่จะแยกตัวดูดซับที่ใช้ควรมีปริมาณ 25-30 เท่าของปริมาณสารตัวอย่างถ้าเป็นสารผสมที่ซับซ้อนอาจใช้ 50-200 เท่าของปริมาณสารตัวอย่าง อัตราส่วนของความยาวต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ควรเป็น 8:1

ก่อนบรรจุสารตัวอย่างในคอลัมน์ควรล้างคอลัมน์ด้วยไซโทรมหรือสารละลายจากนั้นไล่ทรายที่บริสุทธิ์และละเอียดลงบนลำลิเพื่อปรับระดับให้เรียบขึ้นของทรายใช้เป็นฐานเพื่อรองรับตัวดูดซับ

และป้องกันมิให้ตัวดูดซับไหลลงไปอุดปลายของคอลัมน์ขึ้นไปจึงใส่ตัวดูดซับลงในคอลัมน์โดย 2 วิธีต่อไป

ก. วิธีบรรจุแบบเปียกหรือวิธี Slurry (Wet pack or Slurry method)

บรรจุตัวทำละลายลงในคอลัมน์ประมาณหนึ่งในสามส่วนของคอลัมน์ใส่ตัวทำละลายในตัวดูดซับแล้วคน (ส่วนผสมนี้เรียกว่า slurry) เท slurry ผ่านกรวยลงในคอลัมน์พร้อมกับเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกช้าๆและใช้สายยางเคาะด้านข้างของคอลัมน์การไหลของตัวทำละลายและการเคาะจะช่วยให้ตัวดูดซับอัดแน่นทั้งยังป้องกันการเกิดฟองอากาศเมื่อบรรจุตัวดูดซับทั้งหมดลงในคอลัมน์แล้วใช้แท่งแก้วยาวเกลี่ยผิวของตัวดูดซับให้เรียบใส่ทรายทับด้านบนของตัวดูดซับอีกชั้นหนึ่งคอลัมน์ที่บรรจุตัวดูดซับเรียบร้อยแล้วควรมีตัวทำละลายเหลืออยู่เหนือชั้นทรายเพื่อป้องกันมิให้ตัวดูดซับแห้งถ้าตัวดูดซับแห้งมันจะหลุดจากผนังของคอลัมน์เกิดช่องว่างให้อากาศเข้าไปแทรกได้และทำให้เกิดรอยแตกแยกในชั้นของตัวดูดซับจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการแยกต่ำลง

ข. วิธีบรรจุแบบแห้ง (Dry pack method)

ใส่ตัวทำละลายในคอลัมน์ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของคอลัมน์ค่อยๆเทตัวดูดซับลงไปคอลัมน์ที่ละน้อยอย่างต่อเนื่องพร้อมกับปล่อยตัวทำละลายให้ไหลออกช้าๆใช้สายยางเคาะด้านข้างของคอลัมน์ขณะที่ตัวดูดซับผ่านตัวทำละลายลงไปเพื่อให้ตัวดูดซับอัดแน่นปราศจากฟองอากาศหลังจากใส่ตัวดูดซับลงไปหมดแล้วเกลี่ยผิวบนของตัวดูดซับให้เรียบปิดทับด้วยทรายละเอียดอีกชั้นหนึ่งควรมีตัวทำละลายเหลืออยู่ด้านบนของทรายเพื่อป้องกันมิให้คอลัมน์แห้งก่อนใส่สารตัวอย่าง

#### 2.4.3.2.2 การใส่สารตัวอย่างในคอลัมน์

สารตัวอย่างที่จะนำเข้าสู่คอลัมน์ควรอยู่ในรูปสารละลายเข้มข้นและมีปริมาตรน้อยก่อนใส่สารตัวอย่างในตัวทำละลายที่เหลืออยู่บนชั้นทรายออกจนปริมาตรชั้นทรายใช้เปิดดูดสารตัวอย่างทั้งหมดใส่ที่ด้านบนของคอลัมน์แล้วปล่อยให้ไหลลงไปจนปริมาตรชั้นทรายอีกครั้งหนึ่งใช้ปิเปตที่สะอาดและแห้งดูดตัวทำละลายที่ใช้ชะสาร (eluting solvent) ลงไปที่ละน้อยเพื่อผลักดันให้สารตัวอย่างผ่านเข้าไปในตัวดูดซับเมื่อตัวทำละลาย (ตัวชะ) ไหลลงจนปริมาตรชั้นทรายแล้วจึงใส่ตัวชะเพิ่มเติมอีกทีละน้อยสังเกตสีของตัวทำละลายที่อยู่เหนือทรายจะค่อยๆจางลงทำเช่นนี้จนกระทั่งตัวทำละลายใสไม่มีสีแสดงว่าสารตัวอย่างทั้งหมดได้ถูกนำเข้าสู่ตัวดูดซับแล้วจากนั้นจึงใส่ตัวทำละลาย (ตัวชะ) ปริมาณมากลงไป

#### 2.4.3.2.3 ขบวนการชะสาร (Elution process)

หลักของการเลือกตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวชะ (Eluent) มีดังนี้

1. ตัวทำละลายที่ใช้ในโครมาโตกราฟีควรเป็นตัวทำละลายบริสุทธิ์ (reagent grade) ถ้าเป็นตัวทำละลายแบบ commercial grade ควรทำการกลั่นใหม่ก่อนนำไปใช้
2. เลือกตัวทำละลายที่ให้ผลการแยกที่ดีบนแผ่น TLC

3. ตัวชะสารควรเป็นตัวทำละลายเดี่ยวหรือตัวทำละลายผสมหลักเลี่ยงการเปลี่ยนตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่างกันอย่างกะทันหันเช่นการเปลี่ยนจาก hexane เป็น ether ทันทีในระหว่างชะสารเพราะจะเกิดความร้อนขึ้นและความร้อนที่เกิดเพียงพอที่จะทำให้ ether เดือดและเกิดฟองอากาศขึ้นในคอลัมน์หนึ่ง อัตราการไหลของตัวทำละลายไม่ควรจะเร็วเกินไปจะทำให้สารตัวอย่างไม่มีเวลาเพียงพอที่จะอยู่ในสมดุลกับ (equilibrate with) ตัวดูดซับขณะที่มันผ่านตัวดูดซับ แต่ถ้าอัตราการไหลของตัวทำละลายช้าเกินไปจะเกิดปัญหาการแพร่ (diffusion) ของแถบของสารไปได้ทุกทิศทางดังนั้นไม่ว่าจะเป็นกรณีไหนใน 2 กรณีดังกล่าวจะทำให้การแยกไม่ได้ผลและเพื่อป้องกันการแพร่ของแถบไม่ควรตั้งคอลัมน์ทิ้งไว้ข้ามคืน

#### 2.4.3.2.4 การรองรับสารที่ถูกชะออกและการแยกสาร

การตรวจหาตำแหน่งของแถบสาร (Visualization) เพื่อรองรับสารเมื่อออกจากคอลัมน์ มีวิธีการดังนี้

1. กรณีที่สารประกอบมีสีสามารถรองรับสารได้เมื่อเห็นแถบสีเคลื่อนลงมา
2. กรณีที่สารไม่มีสีหากสารเหล่านั้นเกิดฟลูออเรสเซนส์กับรังสีอัลตราไวโอเลตเราสามารถมองเห็นแถบได้ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตในที่มืด
3. ในกรณีที่สารประกอบไม่มีสีและไม่เกิดฟลูออเรสเซนส์การชะสารเหล่านี้ควรใช้กลุ่มตัวทำละลายหรืออนุกรมของตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วเพิ่มขึ้นทีละน้อยโดยเริ่มต้นจากตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่ำสุด (โดยปกติเป็น hexane หรือ petroleum ether) อาจมีแถบหนึ่งเคลื่อนลงมาก่อนและถูกชะออกจากคอลัมน์จากนั้นให้เปลี่ยนเป็นตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วเพิ่มจากเดิมเล็กน้อยและค่อยๆ เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ สารจะค่อยๆ ถูกชะออกทีละตัววิธีเพิ่มสภาพขั้วของตัวทำละลายที่ได้ผลดีที่สุดคือการใช้ตัวทำละลายผสมเช่น เริ่มต้นจาก hexane แล้วเปลี่ยนเป็น hexane : ether ในอัตราส่วนดังนี้ 9:1 ,8:2 ,7:3 ,6:4 ,5:5,...เป็นเช่นนี้เรื่อยไปจนในที่สุดเป็น ether บริสุทธิ์ถ้าการเปลี่ยนสภาพขั้วของตัวทำละลายเป็นแบบก้าวกระโดดจากต่ำไปสูงทันทีจะทำให้สารทั้งหมดถูกชะออกพร้อมกันการรองรับสารละลายที่ออกมาให้รองรับเป็นส่วนๆ แต่ละส่วนมีปริมาตรเท่ากันนำแต่ละส่วนมาตรวจสอบด้วย Thin layer chromatography (TLC) ส่วนใดที่พิสูจน์ด้วย TLC แล้วว่าเป็นสารตัวเดียวกันให้เทรวมกันและแยกสารออกโดยระเหยตัวทำละลายออกไป (book/c/CM328/CM328-4.pdf 1 สิงหาคม 2557)

#### 2.4.3.5 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (distillation in vacuum) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากสารสกัดอาศัยอุณหภูมิและความดันโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า โรตารีอีวาโปเรเตอร์ (rotary evaporator) ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ 3 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุสารที่จะกลั่น (distillation flask) ส่วนคอนเดนเซอร์หรือส่วนควบแน่นไอสารละลาย (condenser) และภาชนะรองรับสารหลังการกลั่น (receiving flask) โดยสารสกัดซึ่งบรรจุในภาชนะจะแช่อยู่ในหม้ออ่างไอน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้และจะหมุน (rotate) ตลอดเวลาที่ทำงาน เพื่อให้มีการกระจายความร้อนอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ ภาชนะ

บรรจุสารสก็ดจะต่อเข้ากับส่วนควบแน่น ซึ่งมีระบบทำความเย็นหล่ออยู่ตลอดเวลา ปลายของส่วนควบแน่นจะมีภาชนะรองรับ โดยทั้งระบบจะต่อเข้ากับระบบสุญญากาศ สารละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุควบแน่นที่บริเวณคอนเดนเซอร์และหยดลงมาในภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่นซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (อินทรานุปกรณ์ 2550)

## 2.4.4 การดูดซับ (Adsorption)

### 2.4.4.1 ทฤษฎีการดูดซับ

การดูดซับ (Absorption) หมายถึง การเพิ่มความเข้มข้นของสารที่พื้นที่ผิวของตัวดูดซับ (adsorption) หรือในทางกลับกันเป็นการลดความเข้มข้นของตัวดูดซับ (adsorption) บนพื้นที่ผิวของตัวดูดซับ สารที่มีพลังงานอิสระที่ผิวต่ำ (low surface free energy) จะถูกดูดซับได้ดีในขณะที่สารที่มีพลังงานอิสระที่ผิวสูงกว่า (higher surface free energy) จะไม่ถูกดูดซับ ซึ่งพลังงานอิสระที่ผิวของตัวดูดซับจะมีความสัมพันธ์กับแรงตึงผิว (surface tension) และพื้นที่ผิว (surface area) ดังนี้

$G_{sf} = \gamma A$	เมื่อ $G_{sf}$ คือ พลังงานอิสระที่ผิว $\gamma$ คือ แรงตึงผิว $A$ คือ พื้นที่ผิว
---------------------	---

เมื่อแรงตึงผิวหรือพื้นที่ผิวเปลี่ยนแปลงไป จะเป็นผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของพลังงานซึ่งจะเป็น  $\Delta S_{sf}$  แรงตึงผิวของของเหลว คือ แรงตึงผิวต่อหน่วยความยาว (ตั้งฉากกับแรง) ที่ถูกแรงนี้กระทำปกติ แรงตึงผิวจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เช่น ที่ 0 องศาเซลเซียส น้ำจะมีแรงตึงผิวเท่ากับ  $75.6 \times 10^{-3}$  ต่อนิวตันเมตร และที่ 20 องศาเซลเซียส น้ำจะมีแรงตึงผิวเท่ากับ  $72.8 \times 10^{-3}$  ต่อนิวตันเมตร ความตึงผิวของของเหลวจะเป็นค่าเฉพาะ เช่น แรงตึงผิวของปรอทที่ 20 องศาเซลเซียส มีแรงตึงผิวเท่ากับ  $456 \times 10^{-3}$  ต่อนิวตันเมตร ซึ่งแตกต่างจากแรงตึงผิวของน้ำที่อุณหภูมิเดียวกัน การดูดซับจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีการสัมผัสกันโดยตรงระหว่างตัวดูดซับกับตัวถูกดูดซับ ตัวถูกดูดซับที่ใช้ศึกษาอาจเป็นโมเลกุลของแก๊สหรือตัวทำละลายในสารละลาย การดูดซับของแก๊สหรือตัวถูกกละลายในสารละลายจะเกิดขึ้นจนกระทั่งเกิดสมดุลระหว่างโมเลกุลของแก๊สในสถานะแก๊สกับโมเลกุลของแก๊สที่ผิวของของแข็ง หรือ เกิดสมดุลระหว่างโมเลกุลของตัวละลายในสารละลายกับโมเลกุลของตัวถูกกละลายที่ผิวของแข็ง

การดูดซับเป็นความสามารถของสารบางชนิดในการดึงดูดโมเลกุล หรือคอลลอยด์ซึ่งอาจอยู่ในของเหลวหรือแก๊ส ให้มาเกาะและติดบนผิว ถือได้ว่าเป็นการเคลื่อนย้ายระหว่างสถานะต่างๆ ทั้ง 3 สถานะ ซึ่งมีได้ทั้งแบบของเหลว – ของเหลว แก๊ส – ของแข็ง และของเหลว – ของแข็ง ในกรณีการดูดซับได้กำหนดนิยามที่เกี่ยวข้องไว้ดังนี้ Adsorbate หมายถึง โมเลกุลของตัวดูดซับโดยผิวของแข็ง หรือ ผิวของตัวดูดซับ Adsorbent หมายถึง ตัวดูดซับหรือสารที่มีผิวเป็นที่ยึดเกาะของ Adsorbate Adsorption หมายถึง การดูด

ซับ Absorption หมายถึง การดูดซึม Solute หมายถึง โมเลกุลของสารหรือคอลลอยด์ที่อยู่ในของเหลว Sorption หมายถึง การดูดติดทั้งสองชนิด ได้แก่ adsorption และ absorption

สำหรับการดูดซับ หรือ การเคลื่อนย้ายสารจากของเหลวมายังผิวของของแข็งเกิดขึ้นใน 2 ลักษณะด้วยกันคือ

1. การไม่ชอบของเหลวของตัวถูกละลาย (Lyophobicity of solute) ในกรณีนี้ของเหลวเป็นน้ำ สารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะพยายามแทรกตัวอยู่ระหว่างน้ำกับของแข็ง และดูดติดที่ผิวของของแข็งในที่สุด

2. ความชอบของตัวถูกละลายที่จะไปเกาะติดที่ผิวของของแข็ง (high affinity of solute to solid) โดยในการเกาะติดจะมีแรงอยู่ 3 แบบ ดังนี้

แรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrical attraction force) มีลักษณะเป็นการแลกเปลี่ยนไอออนโดยไอออนที่มีประจุจะไปแลกเปลี่ยนติดกับโมเลกุลของสารอื่นได้ พวกไดวาเลนต์ (divalent) จะดูดซับที่ผิวของวัตถุอื่นได้ดีกว่าพวกโมนอวาเลนต์ (monovalent)

แรงดึงดูดแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waal's force) จะมีลักษณะเป็นการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) โดยตัวถูกละลายจะไม่เลือกเกาะติดที่ส่วนใดส่วนหนึ่ง แต่สามารถเกาะติดได้อย่างอิสระและเคลื่อนที่ได้ในระหว่างผิวของสารทั้งสอง บางครั้งเรียกได้ว่าเป็นการดูดซับในอุดมคติ (ideal adsorption) การดูดซับแบบนี้ เกิดขึ้นได้ดีในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ

ธรรมชาติทางเคมี (chemical nature) คือตัวถูกดูดซับจะเกิดปฏิกิริยากับตัวดูดซับการดูดซับจะเกิดขึ้นได้ดีในที่ที่มีอุณหภูมิสูง ซึ่งเรียกชื่อปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ว่า chemical adsorption, activated adsorption หรือ chemisorptions ซึ่งการดูดซับในลักษณะนี้ ตัวถูกดูดซับจะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระในระหว่างผิวของสารทั้งสอง และเป็นได้เฉพาะการดูดซับแบบชั้นเดียวเท่านั้น

การดูดซับเป็นกระบวนการแยกสารที่ต้องการออกจากสารละลายของเหลวหรือแก๊ส โดยให้สารละลายหรือแก๊สผสมไหลสัมผัสกับตัวดูดซับ สารแต่ละชนิดในสารละลายมีความสามารถในการกระจายบนผิว และเกิดแรงดึงดูดกับตัวดูดซับได้ต่างกัน ปรากฏการณ์ดูดซับขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างของตัวดูดซับ สมบัติทางเคมีที่ผิวของตัวดูดซับ และสารที่เป็นตัวดูดซับ โดยกลไกการดูดซับมี 2 ประเภท

1. การดูดซับทางเคมี (Chemical adsorption หรือ Chemisorption) เป็นผลที่เกิดจากแรงกระทำระหว่างโมเลกุลที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การจัดเรียงตัวของสารประกอบทางเคมี การดูดซับแบบนี้ จะอาศัยการสร้างพันธะทางเคมีระหว่างตัวดูดซับกับตัวถูกดูดซับ โดยมีการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนของทั้งสองฝ่าย

2. การดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption หรือ Physisorption) เป็นการดูดซับที่มีแรงกระทำอย่างน้อยๆ ระหว่างตัวดูดซับกับตัวถูกดูดซับ โมเลกุลของตัวดูดซับจะอยู่ที่ผิวของตัวดูดซับ โดยอาศัยแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) ความร้อนของการดูดซับมีค่าน้อยกว่า 50 กิโลจูลต่อโมล การดูดซับทางกายภาพนี้ โมเลกุลของตัวถูกดูดซับไว้เป็นแบบชั้นเดียวที่ความดันต่ำ และเป็นแบบหลายๆชั้น (multi

molecular layer) ที่ความดันสูง หรือ ตัวถูกดูดซับ อาจเกิดการดูดซับในลักษณะของการดูดซับแบบหลายชั้นซ้อนกัน (superimpose layer) บนผิวของตัวถูกดูดซับ ซึ่งการดูดซับแบบนี้ไม่สามารถเกิดขึ้นได้อย่างถาวร จะเกิดการผันกลับได้ง่าย (reversible) การดูดซับทางกายภาพจะเกิดขึ้นได้เร็วกว่าการดูดซับทางเคมี หรือถึงสภาวะสมดุลได้เร็วกว่า เพราะไม่จำเป็นต้องใช้พลังงานกระตุ้น (activation energy) เหมือนการดูดซับทางเคมี ยกเว้นในกรณีที่รูพรุนของตัวดูดซับมีขนาดเล็กมากจะทำให้อัตราการดูดซับช้าลง การดูดซับแบบนี้เป็นการดูดซับที่เกิดขึ้นอย่างไม่จำเพาะเจาะจง กล่าวคือ สารต่างๆ สามารถดูดซับบนผิวได้ และการแยกสารที่ถูกดูดซับออกจากตัวดูดซับทำได้โดยง่าย เช่น อาจทำได้โดยการเพิ่มอุณหภูมิ หรือลดความดัน ซึ่งจะเกิดการปล่อยหรือคายสารที่ดูดซับออกมา (desorption) การปลดปล่อยดังกล่าวจะไม่มีผลทำให้ตัวดูดซับ และตัวถูกดูดซับเปลี่ยนแปลงแต่ประการใด การดูดซับจะไม่ทำให้ตำแหน่งเฉพาะที่ทำหน้าที่ดูดซับหมดไป ซึ่งเป็นจากแรงดึงดูดประเภทแรงแวนเดอร์วาลส์ และแรงดึงดูดระหว่างขั้วมากกว่าการเกิดพันธะ

#### 2.4.4.2 ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการดูดซับ

ขณะที่มีการดูดซับเกิดขึ้น โมเลกุลของสารที่ต้องการกำจัดออกจากน้ำ จะไปเกาะติดอยู่บนผิวของตัวดูดซับ โมเลกุลส่วนใหญ่จะเกาะอยู่ภายในโพรงของตัวดูดซับมีเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่เกาะติดอยู่ที่ผิวภายนอก การถ่ายเทโมเลกุลสารจากน้ำไปยังสารดูดซับเกิดขึ้นได้จนถึงจุดสมดุลและหยุด ณ จุดสมดุลซึ่งปัจจัยมีผลต่ออัตราเร็ว และขีดความสามารถในการดูดซับ มีดังต่อไปนี้

##### 2.4.4.2.1 การถูกรบกวนจากน้ำ

อัตราเร็วของการดูดซับอาจขึ้นกับการส่งผ่าน โมเลกุลของสารดูดซับผ่านฟิล์มที่ล้อมรอบตัวดูดซับ หรือการแทรกตัวเข้าสู่ช่องว่างซึ่งแล้วแต่ความปั่นป่วนของระบบ ถ้าน้ำมีความปั่นป่วนต่ำ ฟิล์มที่ล้อมรอบสารดูดซับจะมีความหนาแน่นมาก และเป็นอุปสรรคต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลเข้าไปหาตัวดูดซับ

##### 2.4.4.2.2 ขนาดและพื้นที่ผิวของสารดูดซับ

ขนาดของตัวดูดซับจะเป็นสัดส่วนที่ผกผันกับอัตราเร็วของการดูดซับ ส่วนพื้นที่ผิวจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับขีดความสามารถในการดูดซับ หมายความว่า สารที่มีพื้นที่ผิวมากย่อมมีความสามารถในการดูดซับโมเลกุลได้มากกว่าสารที่มีพื้นที่ในการดูดซับน้อย

##### 2.4.4.2.3 ขนาดของตัวถูกดูดซับ

ขนาดของโมเลกุลของตัวถูกดูดซับมีความสำคัญต่อการดูดซับ จากการศึกษาพบว่า การดูดซับจะเกิดขึ้นได้ดีที่สุดเมื่อโมเลกุลของสารที่ถูกดูดซับมีขนาดเล็กกว่าโพรงของตัวดูดซับเล็กน้อย หรือขนาดของโมเลกุลเข้าโพรงได้พอดี ทั้งนี้เพราะแรงดึงดูดระหว่างตัวดูดซับและตัวถูกดูดซับจะมีค่ามากที่สุด โมเลกุลขนาดเล็กจะหลุดเข้าไปในโพรงก่อน จากนั้นโมเลกุลขนาดใหญ่จึงหลุดเข้าตามไป

##### 2.4.4.2.4 ความสามารถในการละลายน้ำของตัวถูกดูดซับ



เมื่อมีการดูดซับโมเลกุลของสารจะถูกดึงออกจากน้ำ และไปติดอยู่บนผิวของของแข็ง สารที่ละลายน้ำหรือแตกตัวเป็นไอออนย่อมมีแรงยึดเหนี่ยวกับน้ำได้อย่างหนาแน่นยากต่อการดูดซับ ส่วนสารที่ไม่ละลายน้ำหรือสารที่ละลายน้ำได้น้อยมักเกาะติดได้ดีกว่า

#### 2.4.4.2.5 อุณหภูมิของระบบ

ในการดูดซับทางกายภาพ ความสามารถในการดูดซับจะเปลี่ยนไปตามค่าอุณหภูมิ เนื่องจาก 1. กระบวนการดูดซับเป็นกระบวนการคายพลังงานความร้อน (exothermic) ดังนั้นความสามารถในการดูดซับจึงลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น 2. อุณหภูมิมีผลต่อค่าการละลายของตัวดูดซับ สำหรับตัวดูดซับบางชนิดจะมีค่าการละลายเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ ความสามารถในการดูดซับของตัวถูกดูดซับประเภทนี้จะไม่เปลี่ยนแปลงตามค่าอุณหภูมิ

#### 2.4.4.2.6 ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ของสารละลาย

ค่าความเป็นกรด – ด่างของสารละลายมีผลต่อความเป็นขั้วของผิวตัวดูดซับและ โมเลกุลของตัวถูกละลายซึ่งจะมีผลต่อความสามารถในการดูดซับของโมเลกุลต่างๆ

#### 2.4.4.2.7 ระยะเวลาที่สามารถสัมผัสกับตัวดูดซับ

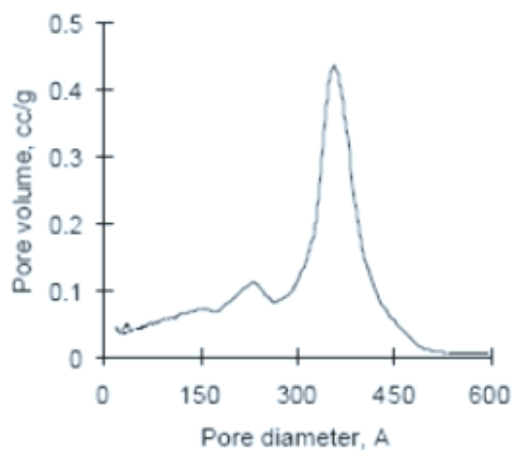
ความสามารถในการดูดซับจะเพิ่มขึ้นตามเวลา จนกระทั่งถึงเวลาที่ระบบเข้าสู่สมดุลซึ่งเป็นเวลาที่อัตราการดูดซับ (rate of adsorption) เท่ากับอัตราการคาย (rate of desorption) ความสามารถในการดูดซับจะมีค่ามากที่สุด จากนั้นจะมีค่าคงที่เมื่อเวลาที่ใช้เพิ่มขึ้น

#### 2.4.4.2.8 ตัวทำละลาย

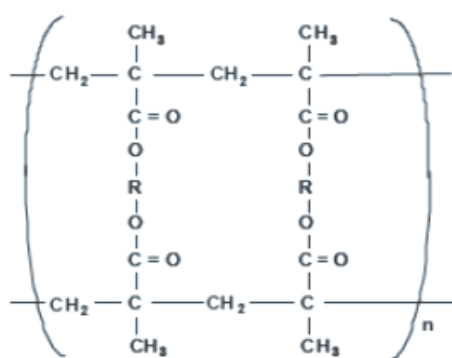
อิทธิพลของตัวทำละลายมีผลต่อการดูดซับ อาจเกิดขึ้นมาจาก แรงกระทำระหว่างตัวทำละลายกับตัวถูกละลายในสารละลาย แรงกระทำระหว่างตัวทำละลายกับตัวดูดซับ ซึ่งเป็นแบบใด ขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของตัวทำละลาย และตัวดูดซับ และ แรงกระทำระหว่างตัวทำละลายกับผิวของตัวดูดซับ (จุติพร อรุณโชติ 2554)

### 2.4.5 AMBERLITE XAD 7-HP

Amberlite XAD 7-HP คือ ตัวดูดซับแบบ Polymer ลักษณะเป็นเม็ดสีขาวไม่ละลายน้ำ เป็น acrylic polymer แบบ nonionic aliphatic ซึ่งคุณสมบัติการดูดซับเกิดจากโครงสร้างแบบ macroreticular (การผสมกันอย่างต่อเนื่องของทั้งสองเฟสคือเฟสของ Polymer และเฟสของรูพรุน) มีพื้นที่ผิวสูง ธรรมชาติของพื้นที่ผิวแบบอะลิฟาติกแสดงในรูปภาพที่ 2.12 โครงสร้างแบบ macroreticular นี้เองที่ส่งผลให้ Amberlite XAD 7-HP ดูดซับทางกายภาพได้ดีและอุณหภูมิเสถียร และเนื่องด้วยธรรมชาติของอะลิฟาติกทำให้ Amberlite XAD 7-HP สามารถดูดซับสารประกอบที่ไม่มีขั้วจากระบบที่เป็นน้ำ และยังสามารถดูดซับสารประกอบที่มีขั้วจากตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วได้อีกด้วย



ภาพที่ 2.7 การกระจายตัวของรูพรุนใน Amberlite XAD 7-HP



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของ Amberlite XAD 7-HP

#### 2.4.5.1 การเตรียม Amberlite XAD 7-HP

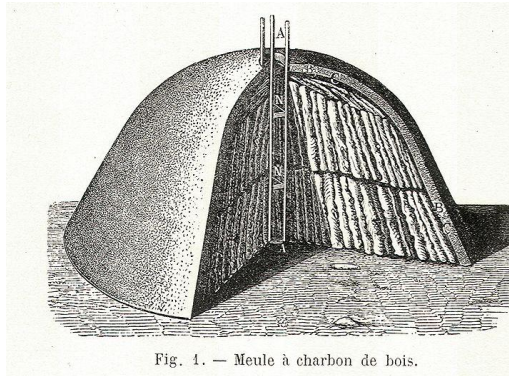
Amberlite XAD 7-HP ขนส่งมาแบบเปียกกับเกลือ sodium chloride (NaCl) และ sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) เพื่อชะลอการเติบโตของแบคทีเรีย ดังนั้นจำเป็นต้องล้างเกลือออกจากตัวดูดซับก่อนใช้ โดยล้างกับน้ำเป็นแนวตั้งอัตราไหลที่ 5 – 10 m/h จนถึงระดับที่ต้องการ สำหรับงานที่มีความละเอียดอ่อน อย่างการหาปริมาณสารประกอบ monomeric หรือ oligomeric อาจต้องล้างออกจากตัวดูดซับให้หมด การปรับสภาพเรซินกับสารปรับสภาพ (regenerant) ที่เสนอ และคำแนะนำก่อนการเริ่มกระบวนการ ถ้าสารปรับสภาพคือ alcohol ต้องไล่ด้วยน้ำก่อนเริ่ม loading

#### 2.4.5.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดลอง

สารตัวอย่างที่ใช้กับ Amberlite XAD 7-HP ต้องมีการปรับสภาพก่อนการทำการทดลอง เพื่อให้แน่ใจว่าได้ผลออกมาเหมาะสม

#### 2.4.6 Charcoal

ถ่าน (Charcoal) มีน้ำหนักเบา สีดำ ประกอบด้วยคาร์บอนและเถ้าต่างๆ ที่เหลืออยู่ ซึ่งได้มาจากการไล่น้ำและสารประกอบที่ระเหยง่าย (volatile) ต่างๆ ออกจากวัสดุที่มาจากสัตว์และพืช ถ่านมักจะผลิตด้วยวิธีไพโรไลซิสอย่างช้า โดยให้ความร้อนกับไม้หรือวัสดุอื่นๆ ในสภาพขาดออกซิเจน ส่วนใหญ่จะไม่ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นคาร์บอนบริสุทธิ์เนื่องจากมีเถ้าปนอยู่ โดยในอดีตการผลิตจะทำโดยใช้ดินเหนียวและฟางเป็นวัสดุคลุมเพื่อให้บรรยากาศและพัฒนาเป็นโลหะ ในปัจจุบันก็มีการนำเทคโนโลยีต่างๆ เข้ามาร่วมด้วย



ภาพที่ 2.9 แสดงเตาเผาถ่านแบบดั้งเดิม



ภาพที่ 2.10 แสดงเตาเผาถ่านภาชนะโลหะ

ถ่านถูกใช้มาตั้งแต่สมัยก่อนในหลากหลายวัตถุประสงค์ทั้งด้านศิลปะและการเป็นยารักษาโรค แต่ใช้มากและสำคัญที่สุดคือเป็นเชื้อเพลิงในงานโลหะ ถ่านเป็นเชื้อเพลิงแบบดั้งเดิมในเตาสูบของช่างตีเหล็ก และงานประยุกต์อื่นที่จำเป็นต้องใช้ความร้อนในอดีตถ่านยังถูกใช้เป็นแหล่งของ Carbon black โดยการบดถ่านในรูปแบบนี้เป็นสิ่งสำคัญมากของนักเคมียุคก่อนและเป็นส่วนประกอบของสูตรผสมเช่น Black Powder เนื่องจากพื้นผิวที่สูง ถ่านยังสามารถนำมาใช้เป็นตัวกรองและเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาหรือเป็นตัวดูดซับได้อีกด้วย โดยถ่านสามารถนำมาใช้งานได้หลากหลายไม่ว่าจะเป็นใช้เป็นเชื้อเพลิงในงานโลหะ งานอุตสาหกรรม เชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์และเชื้อเพลิงสำหรับหุงต้ม อีกทั้งยังใช้ผลิต Black Powder และที่สำคัญจะใช้ในการทำบริสุทธิ์และการกรอง

ถ่านอาจจะ Activated ก่อนใช้งานเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของมันในการเป็นตัวกรอง ถ่านกัมมันต์ง่ายต่อการดูดซับที่หลากหลายของสารละลายอินทรีย์ที่แขวนลอยในแก๊สหรือของเหลว ในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมบางอย่างเช่นการทำบริสุทธิ์น้ำตาลจากอ้อยสิ่งสกปรกทำให้เกิดสีที่ไม่พึงประสงค์ซึ่งสามารถไล่ออกได้ด้วยถ่านกัมมันต์ นอกจากนี้ยังใช้ในการดูดซับกลิ่นและสารพิษในแก๊สเช่นอากาศ นอกจากนี้ Charcoal filters ยังใช้ในหน้ากากกันแก๊สบางประเภทอีกด้วย การใช้งานทางการแพทย์ของถ่านกัมมันต์ส่วนใหญ่ใช้สำหรับการดูดซึมของสารพิษโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของการพยายามฆ่าตัวตาย ในหมู่ผู้ป่วยที่กินยาเกินขนาด ผงถ่านสามารถใช้ได้โดยไม่ต้องมีใบสั่งยาจึงถูกนำมาใช้งานได้หลากหลายใน

ด้านสุขภาพ ยกตัวอย่างเช่นมักจะถูกนำมาใช้เพื่อลดความรู้สึกไม่สบายเนื่องจากแก๊สในทางเดินอาหารมากเกินไป (ท้องอืด)

#### 2.4.7 Activated charcoal

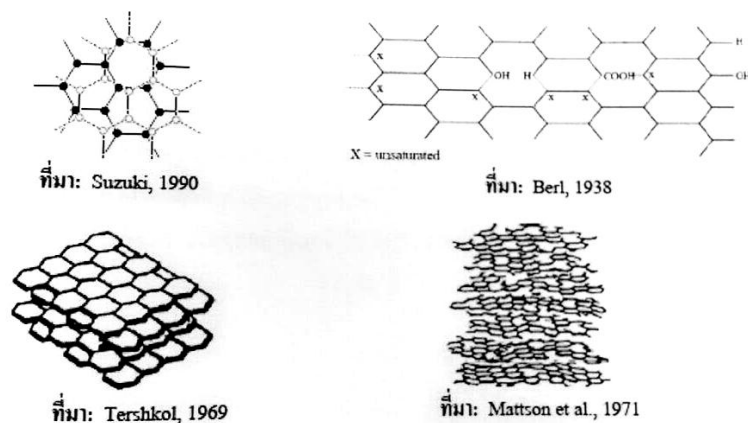
Activated charcoal หรือ Activated carbon เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ถ่านกัมมันต์คือรูปแบบหนึ่งของธาตุคาร์บอนที่อยู่ในรูปคาร์บอนอสัณฐาน (amorphous carbon) ชนิดหนึ่ง แต่ถูกผลิตขึ้นมาเป็นพิเศษโดยกระบวนการก่อกัมมันต์ (activation) ซึ่งทำให้พื้นที่ผิวภายใน (internal surface area) เพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากโครงสร้างที่เป็นรูพรุนจำนวนมาก แต่หากศึกษาด้วยเอ็กซเรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray diffraction) หรือศึกษาโครงสร้างจากการสะท้อนและการเบี่ยงเบนของรังสีเอ็กซ์เมื่อตกกระทบวัตถุ โครงสร้างของถ่านกัมมันต์จะมีความเป็นผลึกอยู่บ้าง แต่ไม่สมบูรณ์เหมือนกับแกรไฟต์ จากคุณสมบัติเหล่านี้จึงทำให้ถ่านกัมมันต์แตกต่างจากถ่านชนิดอื่นๆ เช่น ถ่านลิกไนต์ ถ่านโค้ก ถ่านไม้ หรือ แกรไฟต์ เป็นต้น ถ่านกัมมันต์มีความสามารถในการดูดซับสูง อันเนื่องมาจากมีพื้นที่ผิวมาก มีความจุในการดูดซับสูง ผิวโครงสร้างเป็นแบบรูพรุนขนาดเล็กจำนวนมาก (microporous structure) และมีความว่องไวในการดูดซับสูง โดยทั่วไปแล้วผิวหน้าของถ่านกัมมันต์นั้นไม่มีขั้ว แต่เนื่องจากมีสารประกอบออกไซด์เกิดขึ้นเสมอที่ผิวหน้า และการจัดเรียงตัวของอะตอมอยู่ในลักษณะเฮกซะโกนอล (hexagonal) ทำให้ผิวหน้าของถ่านกัมมันต์มีพื้นที่ผิวสูงกว่าตัวดูดซับอื่น ๆ เช่น ซิลิกาเจล (silica gel) จึงทำให้ดูดซับสารได้มากกว่า

ประมาณ ค.ศ. 1900 มีนักวิทยาศาสตร์ที่ชื่อ Ostreyko ชาวโปแลนด์คิดค้นวิธีผลิตถ่านกัมมันต์ขึ้นใหม่โดยเผาถ่านในบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ และอีกวิธีหนึ่งใช้คลอไรด์ของโลหะผสมกับถ่านและนำไปเผา ซึ่งนับเป็นผู้ริเริ่มที่ทำให้เกิดอุตสาหกรรมการผลิตถ่านกัมมันต์

##### 2.4.7.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของถ่านกัมมันต์

ถ่านกัมมันต์นั้นมีโครงสร้างเช่นเดียวกับแกรไฟต์ แต่มีการจัดเรียงตัวเป็นระเบียบน้อยกว่า ผลึกแกรไฟต์ประกอบด้วยชั้นคาร์บอนในรูปของวงเบนซีน (benzene ring) หรือกลุ่มของคาร์บอนอะตอมที่มีโครงสร้างคล้ายรูปหกเหลี่ยม

เมื่อศึกษาด้วยเอ็กซเรย์ดิฟแฟกชันพบว่า ถ่านกัมมันต์ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นผลึกเล็กๆ จะมีทิศทางไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของการคาร์บอนไนซ์เซชัน ผลึกเล็กๆ นี้มักมีความสูง 9 – 12 อังสตรอม กว้าง (เส้นผ่าศูนย์กลางหน้าตัด) ประมาณ 20 – 30 อังสตรอม ประกอบด้วยแผ่นรายชื่อของชั้นระนาบแกรไฟต์ และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9 เท่า ของความกว้างของอะตอมคาร์บอนรูปหกเหลี่ยม ตามรูปที่ 2.17



ภาพที่ 2.11 โครงสร้างของถ่านกัมมันต์

เมื่อพิจารณาลักษณะผิวของถ่านกัมมันต์ จะพบว่ามีลักษณะเป็นรูพรุนจำนวนมากมีเส้นผ่าศูนย์กลางแตกต่างกัน รูพรุนเหล่านี้จะเข้าไปในเนื้อถ่านกัมมันต์อย่างไม่เป็นระเบียบและความลึกไม่สม่ำเสมอ ลักษณะของรูปร่างของรูนั้นไม่สามารถบอกได้แน่นอน

โดยทั่วไปถ่านกัมมันต์เกรดการค้าจะมีขนาดกลางประมาณ 200 – 300 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกรัม สำหรับรูพรุนขนาดเล็กซึ่งมีผลต่อการดูดซับ จะมีประมาณร้อยละ 90 – 95 ของพื้นที่ทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าความจุในการดูดซับยังขึ้นกับลักษณะและธรรมชาติของผิวอื่นๆ การดูดซับจะเกิดแรงแวนเดอร์วาลส์ ซึ่งเป็นแรงยึดเหนี่ยวที่ค่อนข้างอ่อน แม้ว่าจะดูดซับได้แต่ก็มีโอกาสที่จะหลุดออกได้ง่าย แต่ถ้าเป็นผิวบริเวณที่มีหมู่ฟังก์ชันนัล การดูดซับจะเกิดจากแรงที่แข็งแรง โอกาสที่โมเลกุลของสารถูกดูดซับจะหลุดออกจึงมีน้อยกว่า หมู่ฟังก์ชันนัลบริเวณผิวถ่านกัมมันต์มี 2 ชนิด คือ พวกออกไซด์ของกรด ซึ่งพบมากในถ่านที่ผลิตที่อุณหภูมิประมาณ 800 – 1000 องศาเซลเซียส ถ่านกัมมันต์จะดูดซับได้ดีหรือไม่ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวดูดซับ ได้แก่ พื้นที่ผิว ขนาดรูพรุนและส่วนประกอบทางเคมี เป็นต้น คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวถูกดูดซับ ได้แก่ ขนาดของโมเลกุล ประจุไฟฟ้าของโมเลกุล และส่วนประกอบทางเคมี เป็นต้น ความเข้มข้นของตัวถูกดูดซับในสารละลาย ลักษณะของสารละลาย เช่น ค่าความเป็นกรด – ด่าง อุณหภูมิ เป็นต้น และ ระยะเวลาในการดูดซับ (จุติพร อรุณโชติ 2554)

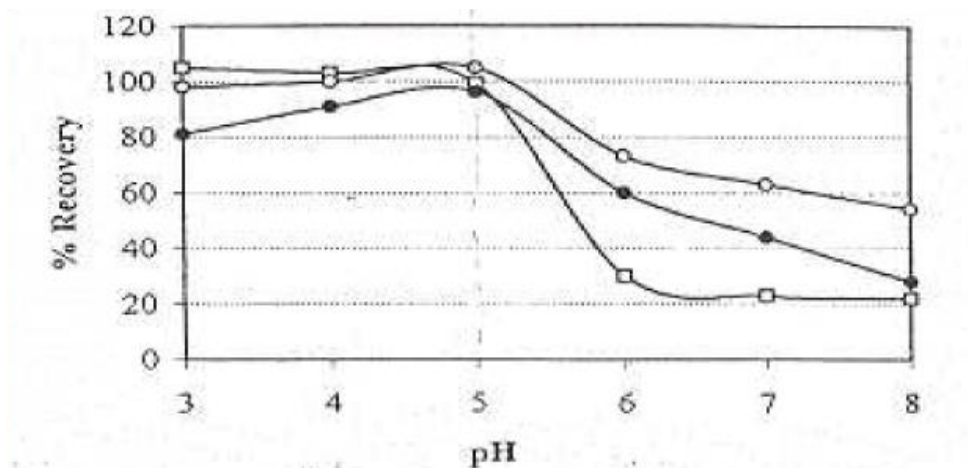
## 2.8 การทบทวนวรรณกรรม

เชิดศักดิ์ (2545) ศึกษาการสกัดสารเทอร์ปีนแลคโตนในใบแปะก๊วยโดยการรีฟลักซ์ (Reflux) ใบแปะก๊วยใน 50% Ethanol นำสารสกัดที่ได้ผสมกับซิลิกาเจล 60 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 20% Ethanol นำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Bondapak C18

และ Water / Methanol (7/3v/v) เป็นสารตัวชะมี RI เป็น Detector โดยสารสกัดก่อนดูดซับด้วยซิลิกาเจลและ สารสกัดหลังดูดซับด้วยซิลิกาเจลจะให้พื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งแสดงถึงปริมาณสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดเป็น 2,004,839 และ 500,312 ต่อน้ำหนักใบแห้ง 1 กรัม ตามลำดับซึ่งได้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับประมาณ 24.96 % (เชิดศักดิ์ 2545)

Amanlou, Mesgarpour and Farsam (1999) ศึกษาการสกัดสาร Ginkgolides A และ B โดยการต้มผง ใบแปะก๊วยกับน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที นำของเหลวที่กรองได้ผสมกับ Activated charcoal ที่ขี้มกึน นำมา บั่นเหวี่ยง ล้างตะกอนด้วย Acetone นำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์  $\mu$ -Bondapak ODS (C18) และ Water / Methanol (67/33v/v) เป็นสารตัวชะ อัตราการไหล 1.0 ml/min มี UV เป็น Detector ตรวจวัดที่ 220 nm โดยได้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของ Ginkgolides A และ B เท่ากับ 97 % และ 98.4 % ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Ginkgolides A และ B เท่ากับ 7.15 % และ 6.82 % ตามลำดับ (Amanlou 2002)

Qing Lang และ C.M. Wai (1999) ได้ศึกษาถึงผลของ pH ที่มีต่อปริมาณของสารสกัด Ginkgolide และ Bilobalide ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction พบว่า pH 5 เป็น pH ที่ให้ปริมาณสารสกัด หรือ %Recover สูงที่สุดเมื่อเทียบกับ pH อื่นๆ



**Figure 2.** pH effects on liquid/liquid extraction recoveries of (○) ginkgolide A (100  $\mu$ g), (●) ginkgolide B (100  $\mu$ g), and (□) bilobalide (150  $\mu$ g).

ภาพที่ 2.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และ %Recovery (Wai 1999)

Teris A. van Beek (2002) ได้ทำการวิเคราะห์ทางเคมีและการควบคุมคุณภาพของสารสกัดใบแปะก๊วย โดยสารประกอบที่สำคัญในใบแปะก๊วยคือ Terpene trilactones ซึ่งได้แก่ ginkgolides A, B, C, J และ bilobalide โดย Teris A. van Beek ได้ทำการวิเคราะห์ Terpene trilactones ด้วย Thin-layer Chromatography (TLC) และ HPLC โดย detector ที่ใช้ได้แก่ RI, ELSD, MS และ GC-FID (Beek 2008)

Cui Tang, Xiuli Wei และ Chunhua Yin (2003) ได้ศึกษาวิธีการวิเคราะห์ Ginkgolide และ Bilobalide ในสารสกัดใบแปะก๊วย (Ginkgo biloba leave extract) ด้วย RP-HPLC (ELS Detection) โดยสารตัวอย่างที่ใช้ฉีดเตรียมได้โดยการสกัดด้วย Ethyl acetate แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย Aluminum Oxide Column แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ C-18 และใช้ Methanol-Water (33:67 v/v) เป็นสารละลายชะ (Mobile phase) ส่วน ELSD Condition จะใช้อุณหภูมิของ nebulizer เป็น 40°C และใช้ nebulizer gas ที่ความดัน 3.5 bar ซึ่งวิธีนี้จะให้ % recovery ระหว่าง 98.3-102.1%

Tim Herring (2004) ได้ทำการทดลองหาปริมาณ Terpene trilactone ในสารสกัดจากใบแปะก๊วยในยี่ห้อที่ต่างกัน ทำการวิเคราะห์ผลด้วย HPLC-ELSD โดยใช้ 3- $\mu$ m dp Alltima C18 column ขนาด 100 mm x 4.6 mm อุณหภูมิของ drift tube ตั้งไว้ที่ 110°C และ Nitrogen flow rate ตั้งไว้ที่ 3.1 L/min

Riera และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาพบว่าการใช้คลื่นอัลตราโซนิกที่ระดับความถี่สูงช่วยเพิ่มการถ่ายเทมวลในขั้นตอนการสกัดอัลมอนต์ด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดยิ่งทำให้น้ำมันที่ได้จากการสกัดเพิ่มขึ้น 20 – 30% เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Cravotto และคณะ (2008) โดยรายงานว่าการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิกให้ผลการทดลองดีกว่าการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ ซึ่งการสกัดด้วยอัลตราโซนิกจะทำให้สารสกัดน้ำมันจากสาหร่ายเพิ่มสูงขึ้นจาก 4.8% เป็น 25.9%

Lai, Chen and Tsai (2005) ศึกษาการสกัดและเปรียบเทียบเทคนิคที่ใช้แยกสารเทอร์ปีนแอลกอฮอล์จากสารสกัดใบแปะก๊วยให้มีความบริสุทธิ์และปริมาณมากที่สุด โดยสกัดสารด้วยการรีฟลักซ์ใบแปะก๊วยกับ 70% Ethanol ได้สารเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ประมาณ 20 % และความบริสุทธิ์ประมาณ 1 % นำสารสกัดที่ได้มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวดูดซับต่างชนิดกัน ได้แก่ Amberlite XAD-7HP Amberlite XAD-4 และ Octadecyl bonded silica gel (C-18) โดยไล่ระดับความเข้มข้นของ Ethanol ในการชะสาร นำสารที่ผ่านการชะมาทำการวิเคราะห์ด้วย RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ Hypersil-100 C<sub>18</sub> และ H<sub>2</sub>O-acetonitrile-THF (23:4:2 v/v/v) เป็นสารละลายชะอัตราการไหล 1.0 ml/min มี RI เป็น Detector โดยได้ปริมาณสารเทอร์ปีนแอลกอฮอล์และความบริสุทธิ์ ดังนี้ XAD-7HP เท่ากับ 80 % และ 20% ตามลำดับ ส่วน XAD-4 เท่ากับ 80 % และ 12 % ตามลำดับ และ C-18 เท่ากับ 95 % และ 10 % ตามลำดับ โดยในคอลัมน์ที่ใช้ XAD-7HP เป็นตัวดูดซับ ซึ่ง

ความเข้มข้นของ Ethanol ที่เหมาะสมในการชะ คือ 50% Ethanol จะให้ปริมาณสารเทอร์ปีนแลคมากที่สุด แต่ 60 % Ethanol จะให้ความบริสุทธิ์มากที่สุด ส่วนคอลัมน์ที่ใช้ XAD-4 และ C-18 เป็นตัวดูดซับ ความเข้มข้นของ Ethanol ที่เหมาะสมในการชะ คือ 20% Ethanol จะให้ปริมาณสารเทอร์ปีนแลคและความบริสุทธิ์มากที่สุด (Lai 2005)

M.-J. Dubber, I. Kanfer (2006) ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์ Terpene trilactone ใน *Ginkgo biloba* โดยใช้เทคนิค HPLC-ELSD โดยใช้ Phenomenex Luna Column (5 $\mu$ m) C18 column และใช้ขนาดเป็น 250 mm x 2.00 mm อุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 45°C ส่วน Mobile phase ใช้ Methanol/Water สัดส่วน 70:30 ใน 6 นาทีแรก หลังจากนั้นใช้สัดส่วน 30:70 ตลอดการวิเคราะห์โดยใช้อัตราการไหล (Flow rate) เป็น 350  $\mu$ l/min ซึ่งวิธีนี้จะมีขีดจำกัดของการวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์อยู่ที่ 31.25 และ 62.50 ng (M.-J. Dubber 2006)

Beek and Montoro (2009) ได้ทำการรวบรวมงานวิจัยต่างๆเกี่ยวกับสารสกัดใบแปะก๊วย โดยสาร Ginkgolides และ Bilobalide สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขี้และมีขี้ปานกลาง เช่น Lower alcohols, THF, Acetone, Ethyl acetate และละลายได้พอประมาณใน Diethyl ether, น้ำ และไม่ละลายใน Chloroform, Toluene, Hexane โดยสามารถละลายในน้ำได้มากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดย Bilobalide มีความเสถียรน้อยกว่า Ginkgolides ในสถานะที่เป็นเบส ถ้าสกัดในสถานะที่เป็นกรดเล็กน้อย จะช่วยยับยั้งการสลายตัวของ BB โดย pH ที่เหมาะสมในการสกัด BB คือ pH 3.5 – 5.0 (Teris A. van Beeka 2009)

Pushpinder Kaur (2009) ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์ Terpene trilactones ด้วย Rapid Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographic method โดยใช้ Evaporative Light Scattering Detection เป็น Detector (RP-HPLC-ELSD) วิธีนี้จะหาปริมาณของ ginkgolide A (GA), ginkgolide B (GB), ginkgolide C (GC), ginkgolide J (GJ) และ bilobalide (BB) ได้ภายในเวลา 8 นาที โดยใช้ Zorbax RP-C18 เป็นคอลัมน์ และ Mobile phase ที่ใช้คือ methanol-water-tetrahydrofuran ส่วนอุณหภูมิของ drift tube ตั้งไว้ที่ 90 °C และ nitrogen flow rate ตั้งไว้ที่ 1.5 standard liter/min (SLM) (Kaur 2009)

Teris A. van Beek และ Paola Montoro (2009) ได้ศึกษาการละลายของสาร Ginkgolides และ Bilobalides พบว่าจะละลายได้ดีในสารละลายและสารอินทรีย์ที่มีขี้ เช่น Alcohol, Acetone และ Ethyl acetate และได้ทำการสกัดแบบ Soxhlet เป็นเวลา 5 นาที แล้ว Sonicate 30 นาที โดยใช้ตัวทำละลายคือ น้ำ และ Methanol และจากการศึกษาจากการทดลองของกลุ่มนักศึกษาชาวจีน โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร Flavonol glycoside ด้วยเทคนิค Reflux โดยอัตราส่วนใบแปะก๊วยต่อตัวทำละลายเป็น 1:10 ตัวทำละลายที่ใช้คือ น้ำ และ Methanol 70% เป็นตัวทำละลาย (Teris A. van Beeka 2009)



PushpinderKaur(2009) ได้ศึกษาเทคนิคการสกัดสาร ginkgolides และ bilobalide โดยใช้เทคนิค Ultrasonic assisted extraction เทคนิค Reflux เทคนิค Accelerated solvent extraction ที่ 1200 psi เทคนิค Soxhlet เทคนิค Percolation และเทคนิค Orbital shaker ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดังกล่าวพบว่าวิธีที่ได้ปริมาณสาร ginkgolides และ bilobalide มากที่สุดคือ เทคนิค Reflux และเทคนิค Ultrasonic assisted extraction ตามลำดับ โดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) เป็นเทคนิคที่พิสูจน์ได้ว่าเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็ว พบว่าให้ปริมาณสารสกัดที่ดีคือใช้ Methanol เป็นตัวทำละลาย และทำการ Sonicate 15 นาทีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และใช้ RP-HPLC-ELSD วิเคราะห์สารสกัดและใช้ Zorbax RP-C18 column มี Methanol-Water-Tetrahydrofuran เป็น Mobile phase และอุณหภูมิ drift tube ของ ELSD ตั้งที่ 90 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของไนโตรเจน 1.5 standard liter/min (SLM) การศึกษาของ Yu และคณะ (2009) ยังช่วยสนับสนุนการสกัดด้วยอัลตราโซนิกโดยรายงานไว้ในสารสกัด cyanuric acid ด้วยเมทานอล ที่เวลา 60 นาที สามารถสกัด cyanuric acid ได้เพียง 55% และต้องใช้เวลาสูงถึง 240 นาที จึงจะสามารถสกัดได้อย่างสมบูรณ์ และเมื่อเปรียบเทียบกับ การสกัดด้วยอัลตราโซนิก พบว่าการสกัดด้วยอัลตราโซนิกเพียง 30 นาที ก็ได้สารสกัดสูงถึง 97% เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sharma และ Gupta (2006) ที่ใช้อัลตราโซนิกสกัดน้ำมันจากเมล็ดอัลมอนด์และแอปพลิคอตก่อนการฉายรังสีนั้น แสดงถึงผลของการศึกษาที่ดำเนินไปในทิศทางเดียวกันคือ การสกัดด้วยอัลตราโซนิกที่กำลัง 70 วัตต์ เพียง 2 นาที สามารถเพิ่มปริมาณน้ำมันของเมล็ดอัลมอนด์และแอปพลิคอตจากเดิม 75 – 77% และ 63% ตามลำดับ ให้เพิ่มสูงขึ้น 19 – 22% และลดระยะเวลาในการสกัดจาก 18 ชั่วโมงเหลือเพียง 6 ชั่วโมง นอกจากนี้การทำตัวอย่างให้มีขนาดเล็กลงก่อนการสกัดจะเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างตัวอย่างกับตัวทำละลายจึงทำให้เกิดการสัมผัสกับตัวทำละลายและเกิด Cavitation ได้ง่ายขึ้น (Hua และคณะ, 2009)

การศึกษาของ Claver และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาผลของอัลตราโซนิกต่อการสกัดโพลีแซคคาไรด์จากข้าวฟ่างจีนที่สภาวะกำลังของคลื่น 500-700 วัตต์ เวลาในการสกัด 3-5 นาที และอัตราส่วนของน้ำและวัตถุบดเท่ากับ 25-35 มิลลิลิตรต่อกรัม พบว่าเวลาและอัตราส่วนของน้ำและวัตถุบดมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกัน ในขณะที่กำลังของคลื่นเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณของโพลีแซคคาไรด์

Linda Lloyd (2011) ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์ Ginkgolides และ Bilobalide ในสารสกัดจากใบแปะก๊วย ด้วย RP-HPLC (ELS Detection) โดยสารตัวอย่างที่ใช้ฉีดเตรียมได้โดยนำสารสกัดใบแปะก๊วยไปแช่แข็งแล้วทำการสกัด จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ PLRP-S 100Å 5µm, 250 x 4.6 mm

อุณหภูมิของ nebulizer เป็น  $100^{\circ}\text{C}$  ที่ความดัน 1.0 SLM ใช้อัตราการไหลเป็น 1.0 mL/min วิธีนี้จะได้ปริมาณ Total Terpene Lactones สูงที่สุด

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

ในรายงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ตอนโดยการทดลองตอนที่ 1 จะเป็น 2 ตอนคือการทดลองที่ 1.1 จะเป็นการแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งในสารละลายอินทรีย์ 19 ชั่วโมง ส่วนการทดลองตอนที่ 1.2 จะเป็นการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในสารละลายบัฟเฟอร์ น้ำ และ Ethanol 85.4 % ส่วนการทดลองที่ 2 จะเป็นการศึกษาผลของ pH ต่อประสิทธิภาพการสกัดสารเทอร์ปีนแลคโตนจากใบแปะก๊วย การทดลองตอนที่ 3 จะเป็นการนำผงแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) และการ Reflux และการทดลองตอนที่ 4 จะเป็นการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยคาร์บอนคอลัมน์ โดยสารสกัดที่ได้ทั้งหมดจากแต่ละตอนจะนำไปวิเคราะห์ผลต่อโดยใช้เทคนิค HPLC (ELS Detector)

### 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

#### 3.1.1 เครื่องมือ

1. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Evaporative Light Scattering Detectors ยี่ห้อ Varian รุ่น Prostar และ Alltech และ เครื่องดูดสุญญากาศ (Vacuum Pump)
2. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) บริษัท Metrohm swiss made รุ่น 827 pH Lab ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ และ Hot Plate ยี่ห้อ Fisher Scientific รุ่น Fisher Stirring Hotplate
3. ปั่นลมยี่ห้อ ALEAS รุ่น AP-10000 Freq = 50 Hz Pressure 0.013 MPa Max Output = 3.3Lx2/min และ เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม (Analytical Balance) 4 ตำแหน่งยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น ML204/01 ชนิด New Classic MF
4. เตาอบ (Hot Air Oven) และ เดซิเคเตออร์ (Desiccators) และ เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) ยี่ห้อ EYELA รุ่น N-N SERIES และ เครื่อง Ultrasonic ยี่ห้อ ULTRAsonic รุ่น 136H และ เครื่องควบแน่น (Condenser) และชุดรีฟลักซ์
5. เครื่องคนสาร (Magnetic Stirrer) และ Heating Mantle ยี่ห้อ Electrothermal และ เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity Meter) ยี่ห้อ Consort รุ่น C860 ชนิด multi-parameter analyzer

### 3.1.2 อุปกรณ์

1. บีกเกอร์ (Beaker)
2. ช้อนตักสาร (Plastic spatula)
3. กระบอกตวง (Cylinder)
4. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
5. กระจกนาฬิกา (Watch glass)
6. กรวยกรองบุชเนอร์เซรามิก (Buchner funnels)
7. ขวดกรองสาร (Suction flask)
8. แหวนยางค้ำรองกรวยบุชเนอร์
9. กระดาษกรอง (Filter paper) ยี่ห้อ MACHERY-NAGEL รุ่น MN 615 Ø 70 mm No.1
10. ช้อนตักสารเคมีสเตนเลส (Spatula, Stainless)
11. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 ml
12. หลอดแก้วข้ออ (Gas leader tube)
13. ฐานตั้งเหล็ก (Stand and Base)
14. บรอสเฮด (Bros head)
15. ที่จับคอนเดนเซอร์ (Condensor clamp)
16. คอลัมน์แก้ว (Column) เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.7 cm ความยาว 24 cm
17. สำลี
18. พาราฟิล์ม
19. สายยาง
20. ลูกยางดำ
21. กรวยกรองแก้ว (Funnel angle)
22. หลอดหยดสาร (Dropper)
23. หลอดเซนติฟิว (Centrifuge tube)
24. จาระบี (Grease)
25. ขวดใส่สารเคมีสีชา (Amber reagent bottle)
26. ขวดก้นกลมรองรับสารหลังการกลั่น (Receiving flask) ขนาด
27. ขวดก้นกลมใส่สารสกัดที่จะกลั่น (Distillation flask)
28. ชามระเหย (Evaporating dishes)
29. ที่คีบถ้วยเบ้าเคลือบ (Crucible tong)
30. ขวดปริมาตร (Volumetric flask)
31. ปิเปตแบบมีขีดบอกปริมาตร (Graduated pipette)

32. ลูกยางดูดปิเปต (Pipettebulb)
33. ขวดใส่สารเคมีขนาดเล็ก (Vial)
34. ไซริงพลาสติก (Syringe irrigate) และ ไซริงฟิลเตอร์ (Syringe filter)
35. โกร่งบดยาเซรามิก (Mortar and Pestle porcelain)
36. ขวดฉีดสารตัวอย่างอัตโนมัติ (Vial & Caps) และ Cellulose membrane filter 0.45  $\mu\text{m}$
37. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)

### 3.2 ตัวอย่างและสารเคมี

1. ผงใบแปะก๊วยแห้ง	7/3/13 ครั้งที่ 002080 เวชพงศ์ โอสธ จำกัด	
2. Ethanol	Absolute	CARLPO ERBA
3. Dichloromethane	Commercial Grade	CARLPO ERBA
4. Methanol	HPLC Grade	CARLPO ERBA
5. Ethyl acetate	Commercial Grade	CARLPO ERBA
6. Hydrochloric acid	Absolute	CARLPO ERBA
7. Sodium hydroxide	Analytical reagent Grade	CARLPO ERBA
8. Amberlite XAD-7HP	For laboratory	Acros Organics
9. Activated charcoal MW = 12.00 C	For laboratory	Acros Organics
10. Carbon black For analysis	Riedel-De Haen	
11. Activated charcoal from tamarind seeds		
12. Charcoal (ถ่านไม้ที่ใช้ในการหุงต้ม)		
13. Boric acid	Analytical reagent Grade LOBAL Chemie.	
14. Sodium carbonate and sodium chloride	Analytical reagent Grade LOBAL Chemie	
15. Disodium monohydrogen phosphate	Analytical reagent Grade LOBAL Chemie	
16. Sodium hydrogen carbonate	Analytical reagent Grade LOBAL Chemie	
17. Monosodium dihydrogen phosphate	Analytical reagent Grade LOBAL Chemie	
18. Isopropanol	Analytical reagent Grade LOBAL Chemie	
19. Acetic acid and Sodium acetate	Analytical reagent Grade LOBAL Chemie	
20. DI Water (Deionized water)		

### 3.3 วิธีการทดลอง

#### 3.3.1 การเตรียมสารเคมี

##### 3.3.1.1 การเตรียมสารละลาย Ethanol 85.4 % (คำนวณโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ )

1. ตวง Absolute Ethanol (AR Grade) โดยใช้กระบอกตวงมา 215 mL และเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 mL จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2. ตวง Absolute Ethanol (AR Grade) โดยใช้ขวดวัดปริมาตรมา 86 mL แล้วเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

##### 3.3.1.2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

###### ก. เตรียมสารละลาย 1 M Phosphate buffer pH 3

ตวงน้ำกลั่น 30 mL ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 mL ปิเปต conc.  $H_3PO_4$  3.4 mL ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นอยู่ ใช้แท่งแก้วคนให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 3 ด้วย 10 M NaOH (วัดค่า pH ด้วย pH meter) ปรับปริมาตรให้ได้ 50 mL ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเก็บใส่หลอดพลาสติกและนำไปแช่ตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน

###### ข. เตรียมสารละลาย 1 M Acetate buffer pH 4

ชั่งผง  $CH_3COONa$  1.007 g ละลายในน้ำ 30 mL จากนั้นเติม conc.  $CH_3COOH$  2.5632 mL ใช้แท่งแก้วคนให้สารละลายเข้ากัน วัดค่า pH ด้วย pH meter (ปรับ pH เพิ่มเติมหากยังไม่ได้ pH 4 ด้วย 37 % HCl หรือ 10 M NaOH) ปรับปริมาตรให้ได้ 50 mL ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเก็บใส่หลอดพลาสติกและนำไปแช่ตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน

###### ค. สารละลาย Acetate buffer pH 5 ( $CH_3COOH / CH_3COONa$ )

ชั่งผง  $CH_3COONa$  1.296 g ละลายในน้ำ 250 mL จากนั้นเติมกรด  $CH_3COOH$  0.31 mL ละลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นวัดค่า pH ด้วย pH meter (ปรับ pH เพิ่มเติมหากยังไม่ได้ pH 5 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH) แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 300 mL ด้วยน้ำกลั่น

ง. เตรียมสารละลาย Citrate buffer pH 6

ชั่งผง Trisodium citrate ( $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ ) 4.412 g ละลายในน้ำ 270 mL ละลายอย่างสมบูรณ์จากนั้นวัดค่า pH ด้วย pH meter แล้วปรับ pH ให้เป็น 6 ด้วย 1 M HCl หรือ 1M NaOH แล้วจึงปรับปริมาตรให้เป็น 300 mL ด้วยน้ำกลั่น

จ. เตรียมสารละลาย Phosphate buffer pH 7 ( $KH_2PO_4 / K_2HPO_4$ )

ชั่งผง  $KH_2PO_4$  0.858 g และ  $K_2HPO_4$  1.516 g ละลายในน้ำ 250 mL ละลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นวัดค่า pH ด้วย pH meter แล้วปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย 1M HCl หรือ 1 M KOH แล้วค่อยปรับปริมาตรให้เป็น 300 mL ด้วยน้ำกลั่น

ฉ. การเตรียมสารละลาย 1 M NaOH

ชั่งผง NaOH 10 g ละลายในน้ำกลั่น 200 mL เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ช. การเตรียมสารละลาย 1 M KOH

ชั่งผง KOH 5.61 g ละลายในน้ำกลั่น 80 mL เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ซ. การเตรียมสารละลาย 1 M HCl

ปิเปต 37% HCl (conc.HCl) มา 20.8 mL ลงน้ำ 200 mL เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ณ. เตรียมสารละลาย 50 mM Phosphate buffer pH 7 ( $NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4$ )

ชั่ง  $Na_2HPO_4$  1.9435 g และ  $NaH_2PO_4$  0.7250 g ละลายในน้ำ 200 mL ละลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นวัดค่า pH ด้วย pH meter แล้วปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย 37% HCl หรือ 1M NaOH แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 mL ด้วยน้ำกลั่น

ญ. เตรียมสารละลาย 1 M Tris buffer pH 8

ชั่งผง Trizma base 6.057 g ละลายในน้ำกลั่น 30 mL จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8 ด้วย 37 % HCl (วัดค่า pH ด้วย pH meter) ปรับปริมาตรให้ได้ 50 mL ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเก็บใส่หลอดพลาสติกและนำไปแช่ตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน

ฎ. เตรียมสารละลาย 50 mM Borate buffer pH 9 ( $H_3BO_3$ )

ชั่ง  $H_3BO_3$  0.7730 g ละลายในน้ำ 150 mL แล้วนำไปละลายในน้ำ 150 mL จากนั้นนำไปวางบนเครื่องกวนสาร วัดค่า pH ด้วย pH meter แล้วปรับ pH โดยทำการไทเทรตด้วย 1 M NaOH จนมี pH เป็น 9 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 mL ด้วยน้ำกลั่น

ฏ. เตรียมสารละลาย 50 mM Carbonate buffer pH 11 ( $NaHCO_3/Na_2CO_3$ )

ชั่ง  $NaHCO_3$  1.0915 g และ  $Na_2CO_3$  0.1850 g ละลายในน้ำ 200 mL ละลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นวัดค่า pH ด้วย pH meter แล้วปรับ pH ให้เป็น 11 ด้วย 37% HCl หรือ 1M NaOH แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 mL ด้วยน้ำกลั่น

ฐ. การเตรียมสารละลาย 0.1%  $Na_2HPO_4$

ตวงน้ำกลั่น 900 mL เทลงในบีกเกอร์ขนาด 1 L ชั่งผง  $Na_2HPO_4$  1 g ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นแล้วใช้แท่งแก้วคนให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นถ่ายสารละลายลงในขวดปรับปริมาตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 L ด้วยน้ำกลั่น

ฑ. เตรียม 0.8 M Universal Buffer pH 3, 4, 5, 6, 7 และ 8

1. ตวงน้ำกลั่น 700 mL เทลงในบีกเกอร์ขนาด 1 L
2. ชั่งผง  $H_3BO_3$  49.6 g ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น จากนั้นนำไปอุ่นให้  $H_3BO_3$  ละลาย ด้วย Hot Plate (ทำใน Hood)
3. จากนั้นเติม conc.  $CH_3COOH$  45.75 mL และ conc.  $H_3PO_4$  54.2 mL ใช้ magnetic stirrer คนให้สารละลายเข้ากัน ถ่ายสารละลายลงในกระบอกตวงขนาด 1 L จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 900 mL ด้วยน้ำกลั่น
4. แบ่งเป็น 10 ส่วน ส่วนละ 90 mL ปรับ pH เป็น 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ด้วย 10 M NaOH ตามลำดับ ในแต่ละส่วนให้ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเก็บใส่หลอดพลาสติกและนำไปแช่ตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน

### 3.3.1.3 การเตรียมสารเพื่อฉีด HPLC (ใช้เตรียมทั้งสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง)

1. ชั่งสารสกัดมา 0.15 g ละลายใน 2 mL Ethanol 50% (เตรียมจาก Absolute Ethanol)
2. ใช้แท่งแก้วคนสารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน



### 3. ค่อยๆกรองแล้วถ่ายสารที่กรองแล้วลงในขวด Vial สำหรับฉีด HPLC

\* หมายเหตุ ขวด Vial จะต้องกลั้วด้วย Methanol (HPLC Grade) แล้วทิ้งไว้ให้แห้งก่อนที่จะเตรียมสารเพื่อฉีด HPLC

#### ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC

Column	Mobile phase	Detector
Phenomenex Luna (5 $\mu$ m) C18 Dimensions 250 mm x 4.6 mm และ Temperature 45 °C	Methanol/Water30:70 (v/v)สำหรับ 6 นาทีแรก หลังจากนั้นใช้สัดส่วน 70:30 ตลอดการวิเคราะห์	ELS Detector Gas flow และ Drift tube temperature ตั้งที่ 1.5 l/min และ 117.5°Cตามลำดับ

### 3.3.2. วิธีการทดลอง

#### 3.3.2.1 การทดลองตอนที่ 1.1 การแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งในสารละลายอินทรีย์ 19 ชั่วโมง

1. ชั่งผงใบแปะก๊วยแห้ง 30g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 mL จำนวน 6 ใบ
2. ตวงสารละลายอินทรีย์ Ethanol, Methanol (AR Grade), Isopropanol, Dichloromethane, Ethyl acetate และ Acetone อย่างละ 300 mL โดยใช้กระบอกตวงขนาด 500 mL เทสารละลายอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดลงในบีกเกอร์ใบที่ 1-6 ที่มีผงใบแปะก๊วยตามลำดับ
3. ใช้แท่งแก้วคนสารคนให้สารให้เข้ากันจากนั้นใช้กระจกนาฟิกาปิดไว้แล้วแช่ทิ้งไว้ 19 ชั่วโมง นำมากรองลดความดันโดยใช้กระดาษกรอง What man เบอร์ 2 เพื่อกำจัดผงใบแปะก๊วยแห้ง
4. นำสารที่กรองได้ (Filtrate) มาทำการระเหยสารละลายอินทรีย์ในตู้ดูดควัน (Hood) ที่ 60 องศาเซลเซียสจนไม่มีสารละลายอินทรีย์เหลืออยู่ จะได้สารสกัดที่มีลักษณะเหมือนน้ำมัน มีสีเขียวเข้ม จนเกือบดำจากนั้นรอให้บีกเกอร์เย็นแล้วนำไปชั่ง จดบันทึกน้ำหนักที่ได้ (น้ำหนักที่ได้นี้เป็นน้ำหนักของสารสกัดรวมกับน้ำหนักของบีกเกอร์ ต้องนำน้ำหนักของบีกเกอร์เปล่ามาหักลบออก ก็จะได้น้ำหนักสารสกัด)

5. นำสารตัวอย่างที่ได้ในบีกเกอร์ถ่ายลงในขวด Vial แล้วนำมาเก็บไว้ในแชลลenger จนวนกว่าจะใช้งาน จากนั้นนำสารตัวอย่างจากขวด Vial มาทำการเตรียมเป็นสารละลายเพื่อนำไปฉีด HPLC ตามวิธีในข้อ 3.3.1.3

### 3.3.2.2 การทดลองตอนที่ 1.2 การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในบัฟเฟอร์ น้ำ และ Ethanol 85.4%

1. ชั่งใบแปะก๊วย 30 g ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 mL 5 ใบ จากนั้นตวงบัฟเฟอร์ pH 5, pH 6, pH 7, Ethanol 85.4 % ที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3.3.3/3.3.4 และน้ำอย่างละ 300mL โดยใช้กระบอกลงขนาด 500 mL

2. เทสารจากกระบอกลงในบีกเกอร์ที่ซึ่งผงใบแปะก๊วยแห้งมาแล้ว จากนั้นใช้แท่งแก้วคนสารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มโดยใช้ Hot Plate นาน 10 นาที (ทำใน Hood) รอให้เย็นแล้วนำไปกรองแบบลดความดัน

3. นำส่วนที่กรองได้ (Filtrate) มาปรับ pH เป็น 5 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH เติม NaCl จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% (v/v) ใช้แท่งแก้วคนสารให้เข้ากัน

4. นำไปสกัดในกรวยแยกด้วย Dichloromethane ไซชั่นล่าง(ชั้นของ Dichloromethane) เก็บชั้นนี้ไว้ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกรอบ เทชั้นของ Dichloromethane รวมกันแล้วเติม  $\text{anh.Na}_2\text{SO}_4$  เพื่อดูดน้ำออกจนแห้ง

5. กรองผ่านกระดาษกรอง what man เบอร์ 2 เพื่อเอา  $\text{anh.Na}_2\text{SO}_4$  ออก

6. ระเหย Dichloromethane ที่ใช้ Hot Plate และ Water bath (ทำใน Hood ) ระเหยจนได้สารสกัดที่แห้ง

7. นำบีกเกอร์ไปชั่งน้ำหนักแล้วจดบันทึกน้ำหนักที่ได้ (น้ำหนักที่ได้นี้เป็นน้ำหนักของสารสกัดรวมกับน้ำหนักของบีกเกอร์ ต้องนำน้ำหนักของบีกเกอร์เปล่ามาหักลบออก ก็จะได้น้ำหนักสารสกัด) ถ่ายสารสกัดจากบีกเกอร์ลงในขวด Vial แล้วนำไปเก็บไว้ในแชลลenger ใช้งาน

8. นำสารตัวอย่างจากขวด Vial มาทำการเตรียมเป็นสารละลายเพื่อนำไปฉีด HPLC ตามวิธีในข้อ 3.3.1.3

### 3.3.2.3 การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของ pH ต่อประสิทธิภาพการสกัดสารจากใบแปะก๊วย

#### 3.3.2.3.1 การทดลองที่ 2.1 การต้มผงใบแปะก๊วยและสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ pH 3, 4, 5, 6, 7 และ 8

1. ชั่งผงใบแปะก๊วยแห้ง 80 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 2,000 mL
2. ตวงสารละลาย 0.1%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  800 mL โดยใช้กระบอกตวงขนาด 1 L เทสารละลายลงในบีกเกอร์ที่มีผงใบแปะก๊วยแห้ง ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มโดยใช้ Hot Plate เป็นเวลา 10 นาที (ทำใน Hood)
3. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปกรองแบบลดความดัน โดยใช้กระดาษกรอง whatman no. 2 นำส่วนที่กรองได้ (Filtrate) มาแบ่งเป็น 12 ส่วน ส่วนละ 50 mL ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 mL
4. ตวง Universal Buffer pH 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 มา 7.14 mL และตวง Buffer Type pH 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 มา 5.5 mL โดยใช้กระบอกตวงขนาด 10 mL
5. นำส่วนที่กรองได้ 12 ส่วน มาเติม Universal Buffer และ Buffer Type ที่ตวงไว้ (ปรับ pH ให้เพิ่มเติมหากยังไม่ได้ pH ที่ต้องการ ด้วย 37% HCl หรือ 10 M NaOH)
6. เติม NaCl ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% (w/v) แล้วใช้แท่งแก้วคนให้สารเข้ากัน จากนั้นนำไปสกัดในกรวยแยกด้วย Ethyl Acetate ไขชั้นล่าง (ชั้นน้ำ) ไว้ทำขั้นตอนนี้อีกรอบ
7. เทชั้นของ Ethyl acetate รวมกัน แล้วเติม  $\text{anh. Na}_2\text{SO}_4$  เพื่อดูดน้ำออก จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง whatman no. 2 เพื่อเอา  $\text{anh. Na}_2\text{SO}_4$  ออก
8. นำสารสกัดใส่ขวดระเหยที่ชั่งน้ำหนักแล้ว ระเหย Ethyl acetate ที่ง โดย ใช้ Hot Plate และ Water bath (ทำใน Hood) ระเหยจนได้สารสกัดที่แห้ง
9. นำขามระเหยไปชั่งน้ำหนักแล้วจดบันทึกน้ำหนักที่ได้ จากนั้นนำฟิล์มถนอมอาหารมาปิดขามระเหย และนำไปแช่ตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน ทำการเตรียมเป็นสารละลายเพื่อนำไปฉีด HPLC ตามวิธีในข้อ 3.3.1.3

### 3.3.2.3.2 การทดลองที่ 2.2 การสกัดผงใบแปะก๊วยด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ pH 4 และ pH 5

#### วิธีการรีฟลักซ์และ Ultrasonic Assisted Extraction (UAE)

1. ชั่งผงใบแปะก๊วยแห้ง 50 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 mL ตวงสารละลาย Buffer pH 9 มา 500 mL โดยใช้กระบอกตวงขนาด 1 L
2. เทสารละลายลงในบีกเกอร์ที่มีผงใบแปะก๊วยแห้ง แล้วใช้แท่งแก้วคนให้สารเข้ากัน จากนั้นเทสารละลายลงในขวดก้นกลมเพื่อทำการรีฟลักซ์ เป็นเวลา 60 นาทีที่อุณหภูมิ 60 °C
3. เข้าเครื่อง Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 60 °C
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปกรองแบบลดความดัน โดยใช้กระดาษกรอง Whatman no. 2 นำส่วนที่กรองได้ (Filtrate) มาแบ่งเป็น 8 ส่วนๆละ 50 mL ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 mL โดยทำการปรับ pH ตามตารางที่ 3.2 แล้วทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ Dichloromethane และ Ethyl acetate
5. ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ครั้ง เทชั้นของสารละลายอินทรีย์รวมกัน จากนั้นเติม  $\text{anh.Na}_2\text{SO}_4$  เพื่อดูดน้ำออกกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.2 เพื่อเอา  $\text{anh.Na}_2\text{SO}_4$  ออก
6. นำสารสกัดใส่ชามระเหยที่ชั่งน้ำหนักแล้ว ระเหยสารละลายอินทรีย์ทิ้ง โดยใช้ Hot Plate และ Water bath (ทำใน Hood) ระเหยจนได้สารสกัดที่แห้ง
7. นำชามระเหยไปชั่งน้ำหนักแล้วจดบันทึกน้ำหนักที่ได้ จากนั้นนำฟิล์มถนอมอาหารมาปิดชามระเหย และนำไปแช่ตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน
8. ทำการเตรียมเป็นสารละลายเพื่อนำไปฉีด HPLC ตามวิธีในข้อ 3.3.1.3

ตารางที่ 3.2 แสดงสภาวะของแต่ละตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	pH ที่ต้องการ	ปรับ pH โดย	NaCl		ตัวทำละลายอินทรีย์
			ใส่	ไม่ใส่	
1	pH 5	1M NaOH หรือ 37 % HCl		✓	Ethyl acetate
2	pH 5	1M NaOH หรือ 37 % HCl	✓		Ethyl acetate
3	pH 4	เติม Acetate buffer 1M pH 4 และปรับด้วย 1M NaOH หรือ 37 % HCl		✓	Ethyl acetate
4	pH 5	เติม Universal Buffer pH 5 และปรับด้วย 1M NaOH หรือ 37 % HCl		✓	Ethyl acetate
5	pH 5	1M NaOH หรือ 37 % HCl		✓	Dichloromethane
6	pH 5	1M NaOH หรือ 37 % HCl	✓		Dichloromethane
7	pH 4	เติม Acetate buffer 1M pH 4 และปรับด้วย 1M NaOH หรือ 37 % HCl		✓	Dichloromethane
8	pH 5	เติม Universal Buffer pH 5 และปรับด้วย 1M NaOH หรือ 37 % HCl		✓	Dichloromethane

### 3.3.2.4 การทดลองตอนที่ 3 การสกัดผงใบแปะก๊วยด้วยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) และ เทคนิคการ Reflux

#### 3.3.2.4.1 การทดลองตอนที่ 3.1 การนำผงแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค UAE

1. ชั่งใบแปะก๊วยบดแห้ง 5 g ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 mL จำนวน 6 ใบ
2. ปิเปตสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7, 9, 11, Ethanol, Ethyl acetate, น้ำกลั่นอย่างละ 50 mL โดยใช้ปิเปตขนาด 25 mL ใส่บีกเกอร์ทั้ง 6 ใบตามลำดับ
3. ใช้แท่งแก้วคนสารคนให้เข้ากัน จากนั้น นำไปสกัดโดยใช้เครื่อง Ultrasonic และให้ความร้อน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมารองลดความดัน โดยใช้กระดวยกรองเบอร์ 2 เพื่อแยกผงใบแปะก๊วยแห้งออกจากสารละลาย

4. นำสารละลายบัฟเฟอร์ pH7, 9 และ 11 มาปรับ pH ให้เท่ากับ 5 ด้วย 1 M NaOH หรือ 37% HCl เติสารละลายใส่กรวยแยกแล้วเติม Dichloromethane ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่กรองได้ จากนั้นเขย่า ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไขชั้นล่างหรือชั้น Dichloromethane ออก แล้วนำสารละลายชั้นบนมาสกัดซ้ำอีกครั้ง เทชั้น Dichloromethane รวมกัน

5. ในกรณี Ethanol Ethyl acetate และ น้ำกลั่น หลังจากผ่านการกรองแล้วสามารถระเหยได้เลย ซึ่งข้มระเหย 100 mL ทั้ง 6 ใบ และจดบันทึกน้ำหนักไว้

6. เติสารละลายที่ได้จากข้อ 5 และ 6 ลงในข้มระเหยขนาด 100 mL นำสารละลายมาระเหย โดยใช้ Hot Plate และ บีกเกอร์ ขนาด 250 mL เติ น้ำครึ่ง บีกเกอร์ โดยระเหยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส วางข้มระเหยไว้ข้างบน (ทำใน Hood) ระเหยจนได้สารสกัดที่แห้ง

7. ซึ่งข้มระเหยซ้ำอีกรอบแล้วจดบันทึกน้ำหนักที่ได้ (น้ำหนักที่ได้นี้เป็นน้ำหนักของสารสกัดรวมกับน้ำหนักของข้มระเหย ต้องนำน้ำหนักข้มระเหยเปล่าในข้อ 7 มาหักลบออก ก็จะได้ น้ำหนักของสารสกัด)

8. นำข้มระเหยมาปิดด้วยแผ่นฟิล์มถนอมอาหารเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อรอวิเคราะห์ HPLC

#### 3.3.2.4.2 การทดลองตอนที่ 3.2 การนำผงแปะก๊วยมาทำการสกัดด้วยเทคนิค Reflux

1. ซึ่งใบแปะก๊วยบดแห้ง 5g ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 mL 6 ใบ

2. บีบเปิดสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7, 9, 11, Ethanol, Ethyl acetate, น้ำกลั่น อย่างละ 50 mL โดยใช้บีบเปิดขนาด 25 mL ใส่ในขวดก้นกลมทั้ง 6 ใบตามลำดับ

3. เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นติดตั้งเข้ากับ condenser ทำการ Reflux 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำมากรองลดความดัน โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 2 เพื่อแยกผงใบแปะก๊วยแห้งออกจากสารละลาย

4. นำสารละลายบัฟเฟอร์ pH7, 9 และ 11 มาปรับ pH ให้เท่ากับ 5 ด้วย 1 M NaOH หรือ 37% HCl จากนั้น เติสารละลายใส่กรวยแยกแล้วเติม Dichloromethane ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่กรองได้ จากนั้นเขย่า ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไขชั้นล่างหรือชั้น Dichloromethane ออก แล้วนำสารละลายชั้นบนมาสกัดซ้ำอีกครั้ง เทชั้น Dichloromethane รวมกัน

5. ในกรณี Ethanol, Ethyl acetate, น้ำกลั่น หลังจากผ่านการกรองแล้วสามารถระเหยได้เลย จากนั้นซึ่งข้มระเหย 100 mL ทั้ง 6 ใบ และจดบันทึกน้ำหนักไว้

6. เทสารละลายที่ได้จากข้อ 5 และ 6 ลงในชามระเหย 100 mL นำสารละลายมาระเหย โดยใช้ Hot Plate และบีกเกอร์ขนาด 250 mL เติมน้ำครึ่งบีกเกอร์ โดยระเหยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส วางชามระเหยไว้ข้างบน (ทำใน Hood) ระเหยจนได้สารสกัดที่แห้ง

7. ชั่งชามระเหยซ้ำอีกรอบแล้วจดบันทึกน้ำหนักที่ได้ (น้ำหนักที่ได้นี้เป็นน้ำหนักของสารสกัดรวมกับน้ำหนักของชามระเหย ต้องนำน้ำหนักชามระเหยเปล่าในข้อ 7 มาหักลบออก ก็จะได้น้ำหนักของสารสกัด)

8. นำชามระเหยมาปิดด้วยแผ่นฟิล์มถนอมอาหารเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อรอวิเคราะห์ HPLC

### 3.3.2.4.3 การทดลองตอนที่ 3.3 การนำผงแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ตามด้วยเทคนิคการ Reflux

1. ชั่งใบแปะก๊วยสดแห้ง 5 g ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 mL จำนวน 2 ใบ

2. ปิ่เปิดสารละลายบัฟเฟอร์ pH 9, Ethanol อย่างละ 50 mL โดยใช้ปิ่เปิดขนาด 25 mL ใส่บีกเกอร์ทั้ง 2 ใบตามลำดับ ใช้แท่งแก้วคนสารคนให้เข้ากัน จากนั้น นำไปสกัดโดยใช้เครื่อง Ultrasonic และให้ความร้อน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

3. เทใส่ขวดก้นกลมจากนั้นติดตั้งเข้ากับ condenser ทำการ Reflux 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสแล้วนำมากรองลดความดัน โดยใช้กระดาศกรองเบอร์ 2 เพื่อแยกผงใบแปะก๊วยแห้งออกจากสารละลาย

4. นำสารละลายบัฟเฟอร์ pH 9 มาปรับ pH ให้เท่ากับ 5 ด้วย 1 M NaOH หรือ 37% HCl เทสารละลายใส่กรวยแยกแล้วเติม Dichloromethane ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่กรองได้ จากนั้นเขย่า ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นไขชั้นล่างหรือชั้น Dichloromethane ออก แล้วนำสารละลายชั้นบนมาสกัดซ้ำอีกครั้งเทชั้น Dichloromethane รวมกัน

5. ในกรณี Ethanol, Ethyl acetate, น้ำกลั่น หลังจากผ่านการกรองแล้วสามารถระเหยได้เลย จากนั้นชั่งชามระเหยขนาด 100 mL ทั้ง 2 ใบ และจดบันทึกน้ำหนักไว้

6. เทสารละลายทั้ง 2 ลงในชามระเหย 100 mL นำสารละลายมาระเหย โดยใช้ Hot Plate และบีกเกอร์ขนาด 250 mL เติมน้ำครึ่งบีกเกอร์ โดยระเหยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส วางชามระเหยไว้ข้างบน (ทำใน Hood) ระเหยจนได้สารสกัดที่แห้ง

7. ชั่งชามระเหยซ้ำอีกรอบแล้วจดบันทึกน้ำหนักที่ได้ (น้ำหนักที่ได้นี้เป็นน้ำหนักของสารสกัดรวมกับน้ำหนักของชามระเหย ต้องนำน้ำหนักชามระเหยเปล่าในข้อ 8 มาหักลบออก ก็จะได้น้ำหนักของสารสกัด)

8. นำชามระเหยมาปิดด้วยแผ่นฟิล์มถนอมอาหารเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อรอวิเคราะห์ HPLC

#### 3.3.2.4.4 การทดลองตอนที่ 3.4 การนำผงแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Reflux ที่เวลา 15, 30, และ 60 นาที ตามด้วยเทคนิคการ Ultrasonic assisted extraction (UAE)

1. ชั่งใบแปะก๊วยสดแห้ง 5 g ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 mL6 ใบ ปิเปิดสารละลายบัฟเฟอร์ pH 9 50 ml ใส่ในขวดก้นกลมใบที่ 1-3 และปิเปิด Ethanol ใส่ขวดก้นกลมที่เหลือใบที่ 4-6

2. เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นติดตั้งเข้ากับ condenser ทำการ Reflux ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดย Reflux ขวดที่ 1 และ 4 เป็นเวลา 15 นาที ขวดที่ 2 และ 5 เป็นเวลา 30 นาที ขวดที่ 3 และ 6 เป็นเวลา 60 นาที

3. เทสารละลายจากขวดก้นกลมใส่บีกเกอร์ขนาด 250 mL6 ใบ จากนั้นไปสกัดโดยใช้เครื่อง Ultrasonic และให้ความร้อน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมากรองลดความดันโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 2 เพื่อแยกผงใบแปะก๊วยแห้งออกจากสารละลาย

4. นำสารละลายบัฟเฟอร์ pH 9 มาปรับ pH ให้เท่ากับ 5 ด้วย 1 M NaOH หรือ 37% HCl

4.1. เทสารละลายใส่กรวยแยกแล้วเติม Dichloromethane ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่กรองได้ จากนั้นเขย่า ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

4.2. โขยชั้นล่างหรือชั้น Dichloromethane ออก แล้วนำสารละลายชั้นบนมาสกัดซ้ำอีกครั้งเทชั้น Dichloromethane รวมกัน

5. ในกรณี Ethanol, Ethyl acetate, น้ำกลั่น หลังจากผ่านการกรองแล้วสามารถระเหยได้เลย จากนั้นชั่งชามระเหยขนาด 100 mL ทั้ง 6 ใบ และจดบันทึกน้ำหนักไว้

6. เทสารละลายจากข้อ 6 และ 7 ลงในชามระเหย 100 mL นำสารละลายมาระเหย โดยใช้ Hot Plate และบีกเกอร์ขนาด 250 mL เติมน้ำครึ่งบีกเกอร์ โดยระเหยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส วางชามระเหยไว้ข้างบน (ทำใน Hood) ระเหยจนได้สารสกัดที่แห้ง

7. ชั่งชามระเหยซ้ำอีกรอบแล้วจดบันทึกน้ำหนักที่ได้ (น้ำหนักที่ได้นี้เป็นน้ำหนักของสารสกัดรวมกับน้ำหนักของชามระเหย ต้องนำน้ำหนักชามระเหยเปล่าในข้อ 8 มาหักลบออก ก็จะได้น้ำหนักของสารสกัด)



8. นำซามระเหมาปิดด้วยแผ่นฟิล์มถนอมอาหารเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อรอวิเคราะห์ HPLC

### 3.3.2.5 การทดลองตอนที่ 4 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยคาร์บอนคอลัมน์

#### 3.3.2.5.1 การเตรียมคอลัมน์

##### 3.3.2.5.1.1 การเตรียม Charcoal

ถ่านไม้ที่ซื้อตามร้านค้าทั่วไป นำบดด้วยโถรงบคยาเซรามิกจนเป็นผงละเอียด หลังจากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นโดยผ่านการกรองด้วยวิธีกรองแบบลดความดันแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ  $105^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์

##### 3.3.2.5.1.2 การเตรียมคาร์บอนคอลัมน์

1. ใส่น้ำกลั่นลงในคอลัมน์ที่ถูกยึดให้ตั้งตรงทำมุม  $90^{\circ}$
2. ใช้สำลีอุดที่ด้านล่างของคอลัมน์ พยายามไม่ให้มีฟองอากาศ และไม่แน่นเกินไป (ทดสอบโดยเปิดก๊อกปล่อยให้น้ำกลั่นไหลผ่าน ถ้าไหลสะดวกดีไม่ต้องทำใหม่)
3. เตรียมบรรจุแบบ slurry ทำโดยผสมสารสกัดใบแปะก๊วยกับตัวดูดซับที่เป็นคาร์บอนคนผสมให้เข้ากัน ดูดอากาศออกโดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศ เพื่อทำให้ฟองอากาศที่เกิดจากการผสมของสารหมดไป
4. เทสารที่ได้ลงคอลัมน์ที่มีสำลีอุดไว้ เคาะด้านข้างของคอลัมน์เพื่อให้ตัวดูดซับอัดแน่นสม่ำเสมอและป้องกันการเกิดฟองอากาศ
5. รอให้ stationary phase นอนกัน ปล่อยสารละลายออกเล็กน้อยเพื่อทดสอบการไหล

##### 3.3.2.5.1.3 การเตรียม Amberlite XAD-7HP

1. เตรียมคอลัมน์โดยใช้สำลีอุดที่ด้านล่างของคอลัมน์และมีน้ำกลั่นอยู่เหนือคอลัมน์ 1 cm โดยทำการบรรจุแบบ slurry ด้วยการผสม Amberlite XAD-7HP กับน้ำกลั่น
2. เทลงในคอลัมน์
3. ทำการล้างเกลือออกจาก Amberlite XAD-7HP ด้วยน้ำกลั่น (Haas 2006)
4. สังเกตค่าการนำไฟฟ้าหลังผ่านคอลัมน์จะมีค่าใกล้เคียงกับค่าการนำไฟฟ้าของน้ำกลั่น

### 3.3.2.5.2 วิธีการทดลองตอนที่ 4 การทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยคาร์บอนคอลัมน์

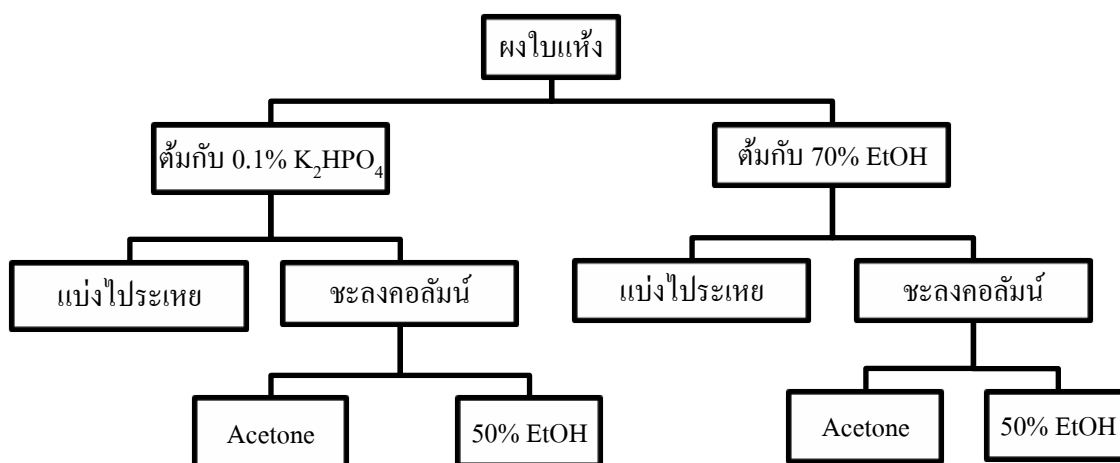
#### 3.3.2.5.2.1 การทดลองตอนที่ 4.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

##### ก. การสกัดด้วยตัวทำละลาย 0.1% $K_2HPO_4$

ชั่งผงใบแปะก๊วยแห้ง 20g ใส่ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำละลาย 0.1%  $K_2HPO_4$  ลงไป 300 ml คนให้เข้ากัน ต้มบน Hot plate ปิดด้วยกระดาษฟิวส์พร้อมหลอดน้ำบนกระดาษฟิวส์เป็นเวลา 30 นาที ที่ให้เย็น นำไปกรองแบบลดความดันโดยใช้กระดาษกรอง MACHERY-NAGEL No.1 แบ่งมาระเหย 30 ml เพื่อดูปริมาณและความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ทั้งหมด เปรียบเทียบกับหลังลงคอลัมน์

##### ข. การสกัดด้วยตัวทำละลาย 70% Ethanol

ชั่งผงใบแปะก๊วยแห้ง 20g ใส่ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำละลาย 70% Ethanol ลงไป 300 ml คนให้เข้ากัน ต้มบน Hot plate ปิดด้วยกระดาษฟิวส์พร้อมหลอดน้ำบนกระดาษฟิวส์เป็นเวลา 30 นาที ที่ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 300 ml เพื่อตกตะกอนสารที่ไม่ละลายน้ำ นำไปกรองแบบลดความดันโดยใช้กระดาษกรอง MACHERY-NAGEL No.1 แบ่งมาระเหย 30 ml เพื่อดูปริมาณและความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ทั้งหมดเปรียบเทียบกับหลังลงคอลัมน์



ภาพที่ 3.1 แสดงการหาตัวทำละลายและตัวชะที่เหมาะสม

#### 3.3.2.5.2.2 การทดลองตอนที่ 4.2 การหาสารตัวชะที่เหมาะสม

1. เตรียมคอลัมน์แบบข้อ 3.3.2.5.1.2 จากนั้นใช้ Activated charcoal 10 g ใส่ลงใน flask 4 ใบ ผสมกับสารสกัดที่ได้จากการต้มด้วย 0.1%  $K_2HPO_4$  ลงใน flask 2 ใบ และ 70% Ethanol ลงใน flask อีก 2 ใบ ใบละ 50 ml

2. บรรจุสารละลายลงในคอลัมน์ โดยแบ่งเป็น 4 คอลัมน์ โดยคอลัมน์จะแบ่งออกเป็นที่จะด้วย 50% Ethanol และ Acetone จะได้ดังนี้

ตารางที่ 3.3 การแบ่งประเภทคอลัมน์ในการหาตัวชะที่เหมาะสม

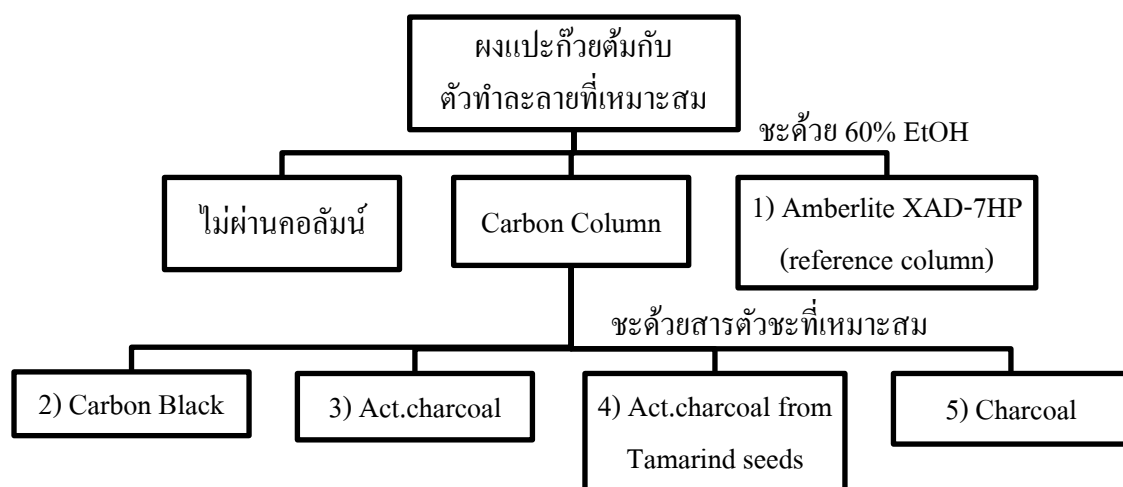
คอลัมน์	สารสกัด	ตัวชะ
1	0.1% $K_2HPO_4$	Acetone
2	0.1% $K_2HPO_4$	50% Ethanol
3	70% Ethanol	Acetone
4	70% Ethanol	50% Ethanol

3. ชะด้วยสารดังกล่าวปริมาณรวม 100 ml เมื่อใส่สารดังกล่าวให้เริ่มเก็บสารที่หลุดจากคอลัมน์ทันที สารที่ชะได้มีสีเหลืองอ่อน

4. นำสารที่ผ่านการระเหยด้วยเครื่อง Rotary vacuum evaporator ไปกรองผ่านโซร่งฟิวเตอร์เมมเบรนเพื่อกันสารดูดซับที่อาจหลุดลงไปในการสกัด เก็บสารที่ผ่านการชะ นำไประเหยใน حمامระเหย

5. นำ حمامระเหยไปใส่ไว้ในเครื่องเคเตอร์ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนักสารที่ได้เตรียมนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตามข้อ 3.3.1.3

### 3.3.2.5.2.3 การทดลองตอนที่ 4.3 การศึกษาความสามารถของตัวดูดซับ



ภาพที่ 3.2 แสดงขั้นตอนการศึกษาความสามารถของตัวดูดซับ

## ก. Carbon Column

- 1.เตรียมสารสกัดตามข้อ 3.3.2.5.2.1 (ข) การสกัดใบแปะก๊วยกับ 70% Ethanol
2. แบ่งออกมาระเหย 20 ml นำมาระเหยไปใส่ไว้ในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 45 นาที ซึ่งน้ำหนักสารที่ได้เตรียมนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC
- 3.เตรียมคอลัมน์แบบ 3.3.2.5.1.2 โดยใช้ตัวดูดซับเป็น Carbon black Activated charcoal Activated charcoal from tamarind seeds และ Charcoal ซึ่งมา 9.5539 g 9.8308 g 13.9276 g และ 10.8489 g ตามลำดับ และปริมาตรสารสกัดเป็น 50 ml (อัตราส่วนความสูงของตัวดูดซับต่อปริมาตรสารสกัด เป็น 1:5)
4. ทำการล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัด impurity ที่อาจหลงเหลืออยู่ในตัวดูดซับ ปริมาตร 30 ml จำนวน 3 ครั้ง
5. ชะด้วย Acetone ปริมาตรรวม 600 ml เมื่อใส่ Acetone ให้เริ่มเก็บสารที่หลุดจากคอลัมน์ทันที จากนั้นเก็บสารที่ผ่านการชะไว้ในขวดแก้วสีชา แล้วนำไปเข้าเครื่อง Rotary vacuum evaporator เพื่อนำ Acetone กลับมาใช้ใหม่
6. นำสารที่ผ่านการระเหยด้วยเครื่อง Rotary vacuum evaporator ไปกรองผ่านโซริงฟิวเตอร์เมมเบรนเพื่อกันสารดูดซับที่อาจหลุดลงไปในการสกัด
7. สารที่ผ่านการกรองนำไประเหยใน حمامระเหย ด้วยวิธีการอังไอน้ำ
8. นำมาระเหยไปใส่ไว้ในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 45 นาที
9. ชั่งน้ำหนักสารที่ได้ เตรียมนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ข้อ 3.3.1.3

## ข. Amberlite XAD-7HP

1. เตรียม Amberlite XAD-7HP แบบข้อ 3.3.2.5.1.3 โดยใช้ Amberlite XAD-7HP 18.9508 g จากนั้น ปรับสภาพ Amberlite XAD-7HP ก่อนใส่สารสกัดด้วย 35% Ethanol
2. นำสารสกัดที่เตรียมแบบข้อ 3.3.2.5.2.1 (ข) ปริมาตร 50 ml ลงในคอลัมน์ แล้วปล่อยให้ไหลจนสารสกัดเหลืออยู่เหนือตัวดูดซับ ประมาณ 1 cm
3. ทำการล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัด impurity ที่อาจหลงเหลืออยู่ในตัวดูดซับ ปริมาตร 30 mL จำนวน 3 ครั้ง แล้วชะด้วย 60% Ethanol ปริมาตรรวม 150 ml เมื่อใส่ 60% Ethanol ให้เริ่มเก็บสารทันที
4. เก็บสารที่ผ่านการชะไว้ในขวดแก้วสีชา แล้วนำไปเข้าเครื่อง Rotary vacuum evaporator ตามข้อ 3.4.3 เพื่อนำ Ethanol กลับมาใช้ใหม่
5. นำสารที่ผ่านการระเหยด้วยเครื่อง Rotary vacuum evaporator ไปกรองผ่านโซริงฟิวเตอร์เมมเบรนเพื่อกันสารดูดซับที่อาจหลุดลงไปในการสกัด
6. สารที่ผ่านการกรองนำไประเหยใน حمامระเหย ด้วยวิธีการอังไอน้ำ
7. นำมาระเหยไปใส่ไว้ในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 45 นาที
8. ชั่งน้ำหนักสารที่ได้ เตรียมนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตามข้อ 3.3.1.3

#### 3.3.2.5.2.4 การทดลองตอนที่ 4.4 การศึกษาประสิทธิภาพการล้าง impurity ด้วยน้ำ

- 1.เตรียมสารสกัดแบบข้อที่ 3.3.2.5.2.1 (ข) การสกัดใบแปะก๊วยกับ 70% Ethanol
2. แบ่งสารที่เตรียมได้จากข้อ 1. มา 20 mL ระเหย นำขามาระเหยไปใส่ไว้ในเดซิกเคเตอร์เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนักแล้วตรวจวัดเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง HPLC
3. เตรียมคอลัมน์แบบข้อ 3.3.2.5.1.2 โดยใช้ตัวดูดซับเป็น Activated charcoal 5 g และปริมาตรสารสกัดเป็น 25 mL จากนั้นทำการบรรจุสารละลายลงในคอลัมน์ โดยแบ่งเป็น 4 คอลัมน์ซึ่งใช้น้ำครั้งละ 15 mL แบ่งได้ดังนี้

#### ตารางที่ 3.4 แสดงการแบ่งประเภทคอลัมน์ในการศึกษาประสิทธิภาพการล้าง impurity ด้วยน้ำ

คอลัมน์ที่	1	2	3	4
ปริมาตรน้ำกลั่นที่ล้าง (ml)	0	15	30	45

5. สะด้วย Acetone ปริมาตรรวม 300 mL (เก็บเมื่อน้ำออกจากคอลัมน์หมด)
6. เก็บสารที่ผ่านการชะไว้ในขวดแก้ว แล้วนำไปเข้าเครื่อง Rotary vacuum evaporator เพื่อนำ Acetone กลับมาใช้ใหม่ จากนั้นนำสารที่ผ่านการระเหยด้วยเครื่อง Rotary vacuum evaporator ไปกรองผ่านไซริงฟิวเตอร์เมมเบรนเพื่อกันสารดูดซับที่อาจหลุดลงไปในสารสกัด
7. ระเหยสารที่ผ่านการกรอง ด้วยวิธีการอังไอน้ำ
8. นำขามาระเหยไปใส่ไว้ในเดซิกเคเตอร์ เป็นเวลา 45 นาที
9. ชั่งน้ำหนักสารที่ได้ เตรียมนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตามข้อ 3.3.1.3

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 ผลการวิจัยตอนที่ 1 การสกัดเทอร์ปีนแอลกอฮอล์จากใบแปะก๊วย

##### 4.1.1 ผลการวิจัยตอนที่ 1.1 การแช่ผงใบแปะก๊วยในสารละลายอินทรีย์ 19 ชั่วโมง

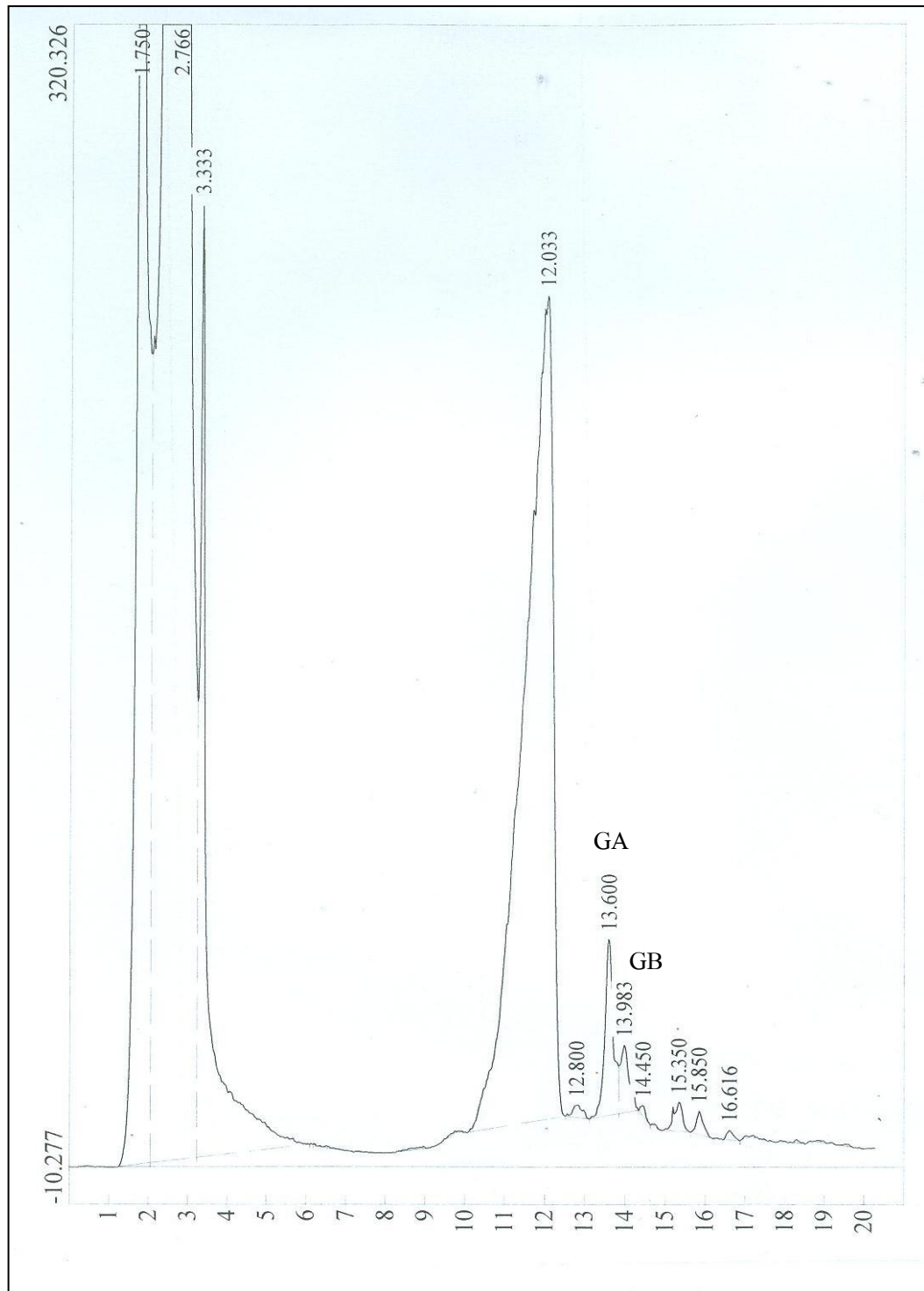
จากวิธีการทดลองโดยการแช่ผงใบแปะก๊วย ในสารละลายอินทรีย์ 6 ชนิดเป็นเวลา 19 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้

ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละวิธี ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC

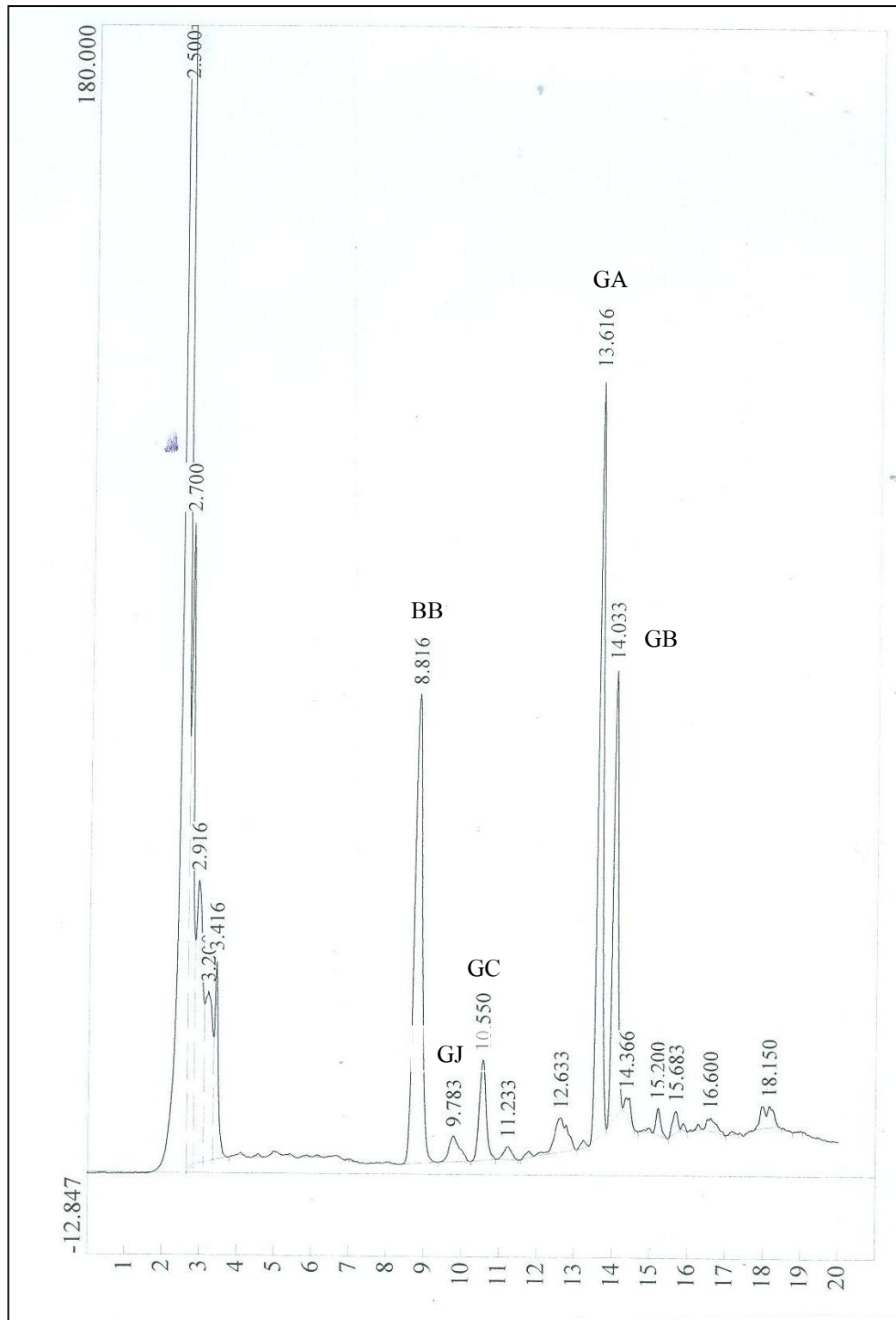
วิธีการสกัด	น้ำหนักใบแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)
1. Methanol	30.0	6.8986
2. Ethanol	30.0	5.4240
3. Isopropanol	30.0	2.9685
4. Dichloromethane	30.0	2.4046
5. Ethyl acetate	30.0	2.5598
6. Acetone	30.0	2.8456

ตารางที่ 4.2 แสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram

วิธีการสกัด	BB	GJ	GC	GA	GB
1. Methanol	3812.15	823.4135	1566.076	6683.658	5571.355
2. Ethanol	3082.894	721.929	985.181	3310.121	4596.899
3. Isopropanol	1224.402	56.794	245.243	1040.245	1387.713
4. Dichloromethane	402.527	13.762	10.768	570.4435	232.56
5. Ethyl acetate	1077.193	80.488	201.87	1015.269	645.1405
6. Acetone	704.968	14.431	110.4415	594.043	447.526

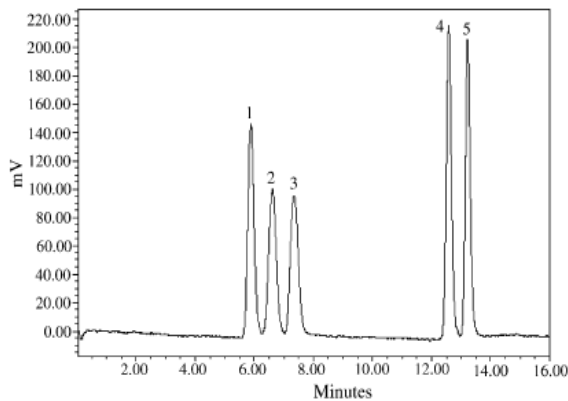


ภาพที่ 4.1 HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ในสารสกัดมาตรฐาน HERBAL ONE  
(Phenomenex Luna Column ขนาด 250 mm x 4.6 mm, flow rate of 1.5 l/min, ELS Detector)

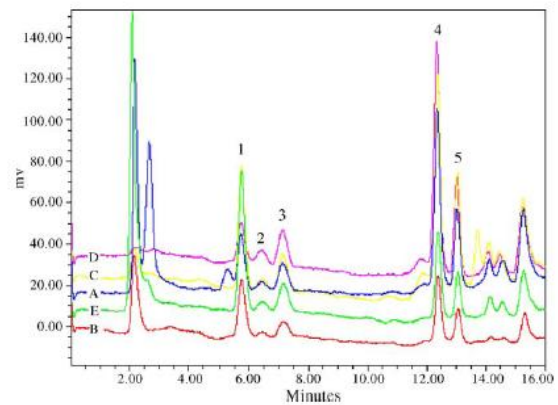


ภาพที่ 4.2 HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ที่สกัด โดย Ethyl acetate (Phenomenex Luna Column ขนาด 250 mm x 4.6 mm, flow rate of 1.5 l/min, ELS Detector)



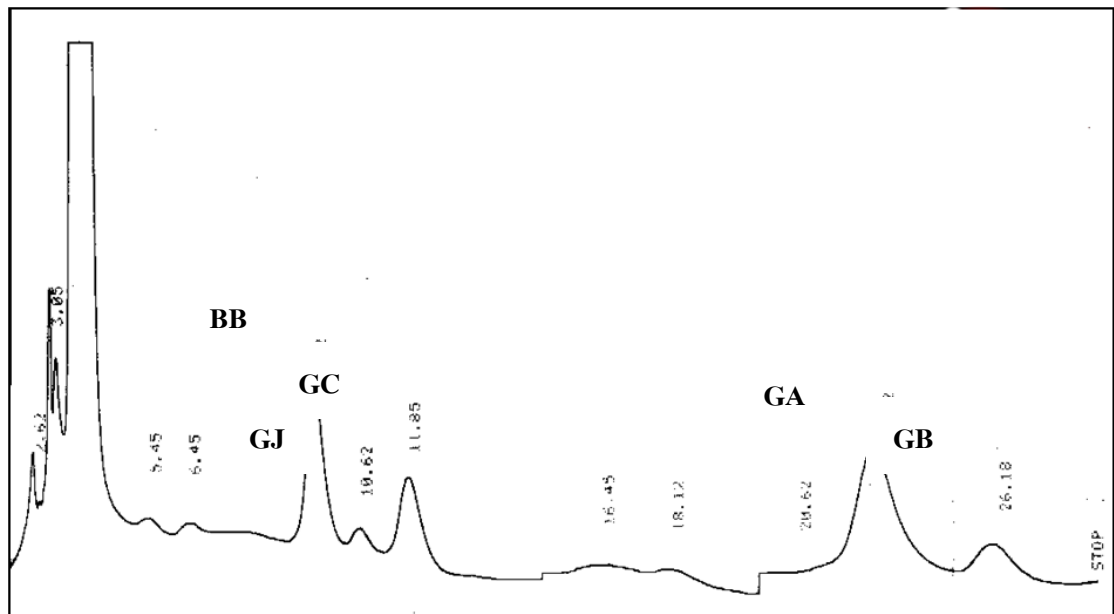


ก



ข

ภาพที่ 4.3 ก: HPLC chromatogramของสารมาตรฐาน Bilobalide และ Ginkgolide A, B, C, J ข: HPLC-ELSD chromatogram ของสารตัวอย่าง peak 1: BB, peak 2: GJ, peak 3: GC, peak 4: GA, peak 5: GB (M.-J. Dubber and I. Kanfer, 2006) (Phenomenex Luna Column ขนาด 250 mm x 2.0 mm, flowrate of 0.35 ml/min, ELS Detector)



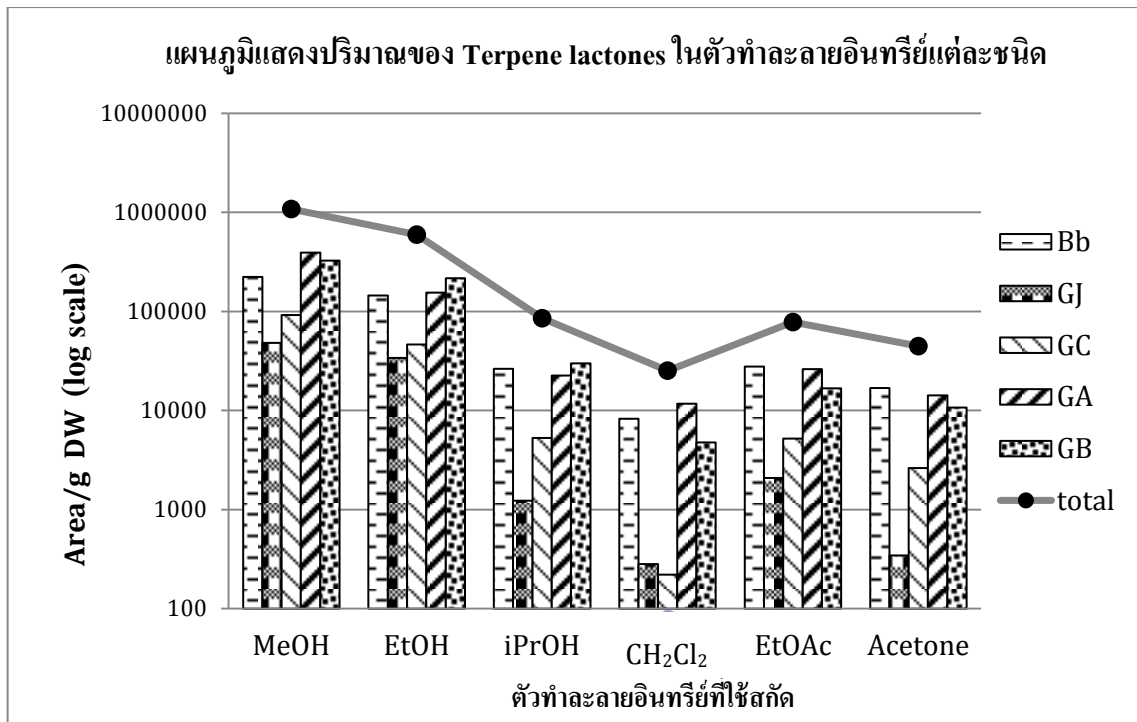
ภาพที่ 4.4 HPLC Chromatogram ของ Terpenoidsในสารสกัดมาตรฐาน ( $\mu$ Bondapack C18 (Waters asocc.) column, flow rate of 1 ml/min, RI Detector) ที่มา: รายงานวิทยานิพนธ์, เชิดศักดิ์. 2545

จากภาพ HPLC Chromatogram (ภาพที่ 4.2-4.4) แสดงให้เห็นถึง Retention time (RT) ของ Terpene lactones ซึ่งได้แก่ BB 8.8 min, GJ 9.7 min, GC 10.5 min, GA 13.6 min และ GB 14 min จาก HPLC Chromatogram ของสารตัวอย่าง จะได้พื้นที่ใต้กราฟตามตารางที่ 4 นำพื้นที่ใต้กราฟ (Area) และข้อมูลในตารางที่ 4.1 มาคำนวณ Area/g DW (วิธีการคำนวณดูในภาคผนวก) ได้ค่าดังตารางที่ 4.3

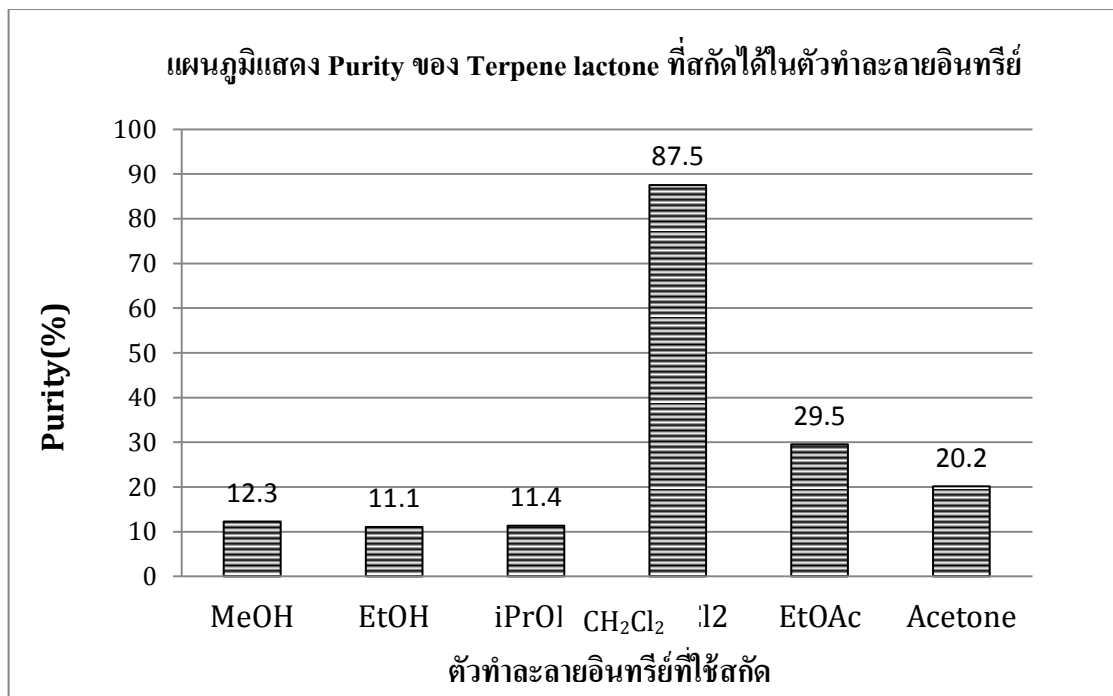
**ตารางที่ 4.3** แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpenoids

วิธีการสกัด	BB	GJ	GC	GA	GB	Total Terpenoids
1. Methanol (MeOH)	223341.8	48241.19	91751.41	391574.4	326408.1	1,081,316.85
2. Ethanol (EtOH)	144775.9	33902.54	46265.12	155446.7	215875.2	596,265.44
3. Isopropanol (iPrOH)	26449.15	1226.846	5297.663	22471.05	29976.94	85,421.65
4. Dichloromethane (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	8272.79	282.8385	221.3054	11723.83	4779.605	25,280.37
5. Ethyl acetate (EtOAc)	27866.21	2082.167	5222.232	26264.28	16689.32	78,124.21
6. Acetone	16822.28	344.3594	2635.407	14175.34	10679.08	44,656.46

จากตารางที่ 4.3 นำมาสร้างแผนภูมิรูปแท่งแสดงปริมาณของ Total Terpenoids ที่สกัดได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยให้ Area/g DW เป็นแกน Y และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดเป็นแกน X ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และนำค่า %Area (แสดงในภาคผนวก) มาสร้างเป็นแผนภูมิรูปแท่งดังภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.5 แผนภูมิแสดงปริมาณของ Terpene lactones ที่สกัดได้ในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด



ภาพที่ 4.6 แผนภูมิแสดง Purity ของ Terpene lactones ที่สกัดได้ในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด

จากภาพที่ 4.5 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ Total Terpenoids ที่ได้จากการแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด จะเห็นว่า ปริมาณของ Total Terpenoids เป็นดังนี้ การแช่ใน Methanol > แช่ใน Ethanol > แช่ใน Isopropanol > แช่ใน Ethyl acetate > แช่ใน Acetone > แช่ใน Dichloromethane และเมื่อมองภาพรวมของ Ginkgolide และ Bilobalide พบว่า ในตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดสามารถสกัด BB, GA และ GB ออกมาได้ปริมาณที่สูง ส่วน GJ และ GC ถูกสกัดออกมาในปริมาณที่น้อย แต่ถ้าพิจารณาเพียงแค่ปริมาณของ GA และ GB เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีววิทยาและเภสัชวิทยาดีที่สุด จะเห็นว่า Methanol เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สกัด GA และ GB ออกมาได้ปริมาณที่มากที่สุดจึงเป็นตัวทำละลายที่สกัด GA และ GB ได้ดีที่สุด ส่วนเรื่องของ Purity สามารถพิจารณาได้จากภาพที่ 4.6 จากแผนภูมิจะเห็นว่า Dichloromethane จะมี Purity สูงที่สุด รองลงมาคือ Ethyl acetate, Acetone, Methanol, Ethanol และ Isopropanol ตามลำดับ เพราะฉะนั้นจากที่กล่าวมาทั้งหมดจึงสรุปได้ว่า Methanol จะสามารถสกัด Terpene lactones ออกมาได้ปริมาณที่มากที่สุดและ Ethanol ก็สามารถสกัด Terpene lactones ได้มากเป็นลำดับสองรองลงมา แต่เมื่อคำนึงถึงปัจจัยเรื่องความเป็นพิษของ Methanol เข้ามาร่วมด้วยรวมถึงเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิในภาพที่ 4.6 จะเห็นว่า Methanol และ Ethanol มีความบริสุทธิ์ (Purity) เพียง 12.3% และ 11.1% ตามลำดับ ในขณะที่ Dichloromethane มีค่าความ Purity สูงที่สุดถึง 87.5% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Dichloromethane สามารถที่จะกำจัด impurity ออกไปได้ดีที่สุด ดังนั้นในการทดลองตอนที่ 1.2 จึงใช้ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในขั้นตอนการทำ liquid-liquid extraction

#### 4.1.2 ผลการวิจัยตอนที่ 1.2 การต้มผงใบแปะก๊วยในสารละลายบัฟเฟอร์, น้ำ และ Ethanol 85.4 %

จากวิธีการทดลองโดยการต้มผงใบแปะก๊วยในน้ำ, Ethanol 85.4% และบัฟเฟอร์ (pH 5, pH 6 และ pH 7) ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้

##### ตารางที่ 4.3.1 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละวิธีของการทดลองตอนที่ 1.2

วิธีการสกัด	น้ำหนักใบแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)
7. น้ำ	30.0	0.0945
8. Ethanol 85.4%	30.0	1.1814
9. Buffer pH 5	30.0	0.0790

10. Buffer pH 6	30.0	0.0836
11. Buffer pH 7	30.0	0.0745

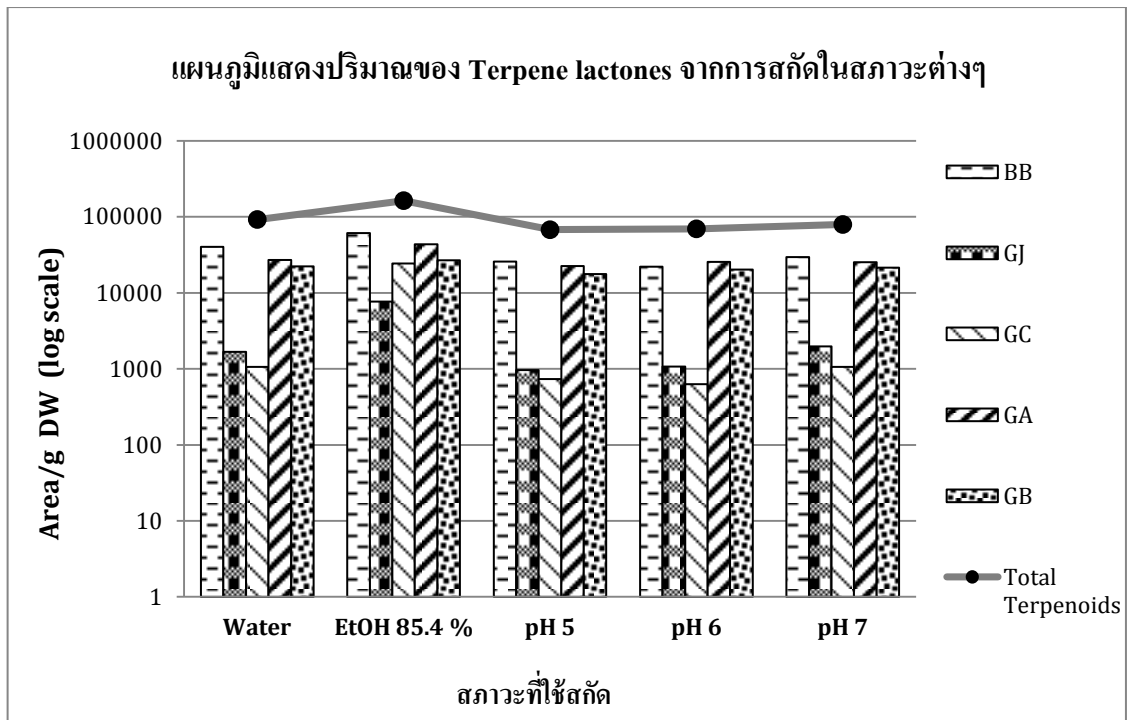
**ตารางที่ 4.4** แสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram

วิธีการสกัด	BB	GJ	GC	GA	GB
7.น้ำ	60244.0225	2512.407	1599.363	40595.108	33546.307
8.Ethanol 85.4%	5897.3085	741.167	2339.988	4198.8855	2595.967
9. Buffer pH 5	38733.746	1444.725	1095.968	33833.493	26497.7965
10. Buffer pH 6	32976.7535	1601.916	939.377	38381.012	30372.89
11.Buffer pH 7	44351.429	2967.466	1588.166	37920.011	32205.495

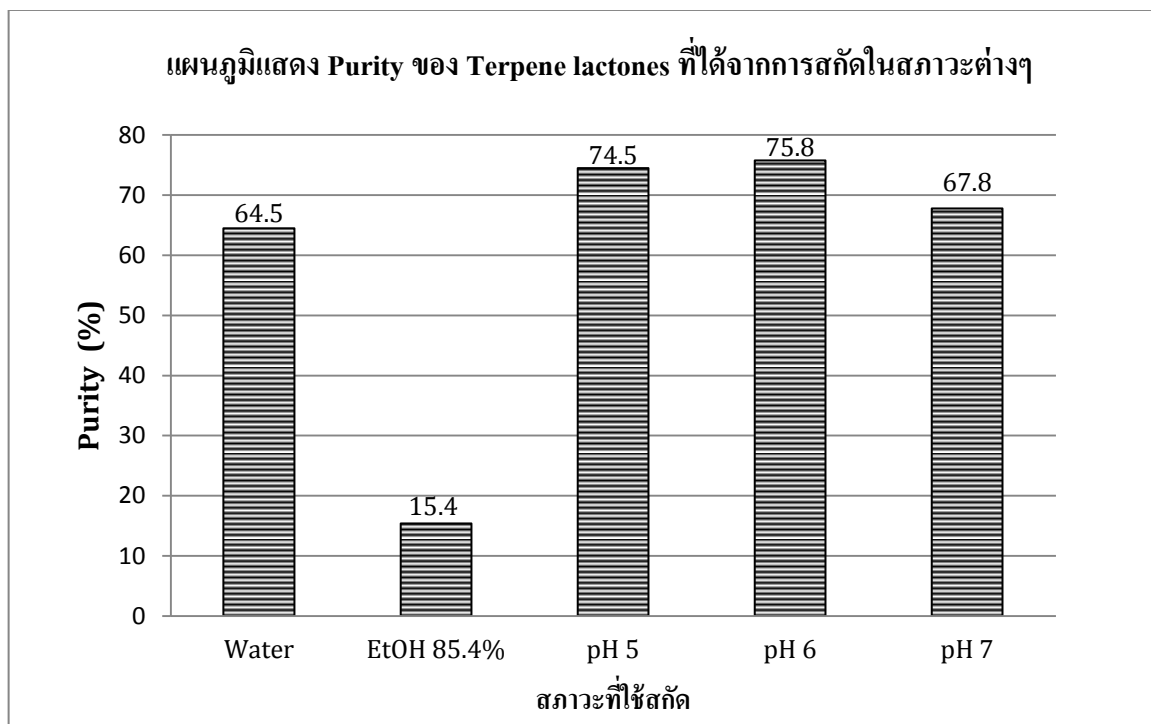
เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วย HPLC จะได้ HPLC Chromatogram (แสดงไว้ในภาคผนวก) และได้พื้นที่ใต้กราฟ (Area) ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.4 จากนั้นนำข้อมูลจากตารางที่ 4.3.1 และ 4.4 ไปคำนวณค่า Area/g DW ส่วนการคำนวณค่าความบริสุทธิ์ (Purity) จะคำนวณจากค่า %Area จากนั้นนำค่า Area/g DW ในตารางที่ 4.5 และค่าความบริสุทธิ์ (Purity) ไปสร้างเป็นแผนภูมิรูปแท่งจะได้แผนภูมิดังแสดงในภาพที่ 4.7 และ 4.8 ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.5** แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpenoids

วิธีการสกัด	BB	GJ	GC	GA	GB	Total Terpenoids
7.น้ำ	40162.6816	1674.9400	1066.2420	27063.4053	22364.2047	92,331.47
8.EtOH 85.4 %	61114.7391	7680.8306	24249.6651	43513.7134	26902.4159	163,461.36
9. Buffer pH 5	25822.4973	963.1500	730.6453	22555.6620	17665.1977	67,737.15
10. Buffer pH 6	21984.5023	1067.9440	626.2513	25587.3413	20248.5933	69,514.63
11. Buffer pH 7	29567.6193	1978.3107	1058.7773	25280.0073	21470.3300	79,355.04



ภาพที่ 4.7 แผนภูมิแสดงปริมาณของ Terpene lactones จากการสกัดในสภาวะต่างๆ



ภาพที่ 4.8 แผนภูมิแสดง Purity ของ Terpene lactones จากการสกัดในสภาวะต่างๆ

#### 4.1.3 อภิปรายผลการวิจัยตอนที่ 1

##### ประเด็นที่ 1 ปริมาณของ Terpene lactones ที่สกัดได้

จากผลการทดลองตอนที่ 1 การแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งในตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเวลา 19 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 4.5 จะเห็นว่า การสกัดด้วยการแช่ใน Methanol จะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากที่สุด รวมถึงเมื่อพิจารณาปริมาณของ Terpene lactones แต่ละชนิดที่สกัดได้ยังพบว่า การแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Methanol เป็นวิธีการสกัดที่ให้ปริมาณ BB, GJ, GC, GA และ GB มากที่สุด

จากผลการทดลองตอนที่ 1.2 การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในน้ำ, Ethanol 85.4%, Buffer pH 5, Buffer pH 6 และ Buffer pH 7 เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 4.8 จะเห็นว่า การสกัดด้วยการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งใน Ethanol 85.4% จะให้ปริมาณ Terpene lactones มากที่สุด รวมถึงเมื่อพิจารณาเพียงแค่ปริมาณของ Terpene lactones แต่ละชนิด พบว่า วิธีการสกัดด้วยการต้มใน Ethanol 85.4% เป็นวิธีที่ให้ปริมาณของ BB, GJ, GC, GA และ GB ในปริมาณที่มากที่สุด แต่ถ้าหากพิจารณาเพียงแค่วิธีการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในบัฟเฟอร์ pH 5 – pH 7 จะพบว่า การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในบัฟเฟอร์ pH 7 (Phosphate buffer) จะให้ปริมาณ Terpene lactones มากที่สุด

จากวิธีการสกัดทั้งหมดทั้ง 11 วิธี (การทดลองตอนที่ 1.1 มี 6 วิธี และการทดลองตอนที่ 1.2 มี 5 วิธี) เมื่อนำค่า Total Terpenoids จากวิธีการสกัดทั้งหมดมาเปรียบเทียบกันจะได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบปริมาณของ Terpene lactones จากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ

ตอนที่	ลำดับที่	วิธีการสกัด	Total terpenoids (Area/gDW)	Purity (%)
1	1	แช่ใน Methanol	1,081,316.85	12.3
	2	แช่ใน Ethanol	596,265.44	11.1
	3	แช่ใน Isopropanol	85,421.65	11.4
	4	แช่ใน dichloromethane	25,280.37	87.5
	5	แช่ใน Ethyl acetate	78,124.21	29.5
	6	แช่ใน Acetone	44,656.46	20.2

2	7	ต้มในน้ำ	92,331.47	64.5
	8	ต้มใน Ethanol 85.4%	163,461.36	15.4
	9	ต้มใน Buffer pH 5	67,737.15	74.5
	10	ต้มใน Buffer pH 6	69,514.63	75.8
	11	ต้มใน Buffer pH 7	79,355.04	67.8

จากตารางที่ 4.6 จึงสามารถสรุปได้ว่า ในการทดลองตอนที่ 1.1 การแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Methanol เป็นวิธีการสกัดที่ให้ปริมาณของ Terpene lactones ออกมามากที่สุดจากวิธีการสกัดทั้งหมด 6 วิธี และในการทดลองตอนที่ 1.2 การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งด้วย Ethanol 85.4% จะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากที่สุดจากวิธีการสกัดทั้งหมด 5 วิธี

## ประเด็นที่ 2 ความบริสุทธิ์ (Purity)

เมื่อพิจารณาตารางที่ 4.6 จะเห็นว่า วิธีการสกัดด้วยการแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Methanol แม้จะให้ปริมาณของ Total Terpenoids มากที่สุดแต่มีความบริสุทธิ์ (Purity) เพียง 12.3% และในทำนองเดียวกัน วิธีการสกัดด้วยการแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Ethanol แม้จะให้ปริมาณของ Total Terpenoids มากเป็นอันดับสองรองลงมาแต่ก็มีความบริสุทธิ์ (Purity) เพียง 11.1% เท่านั้น

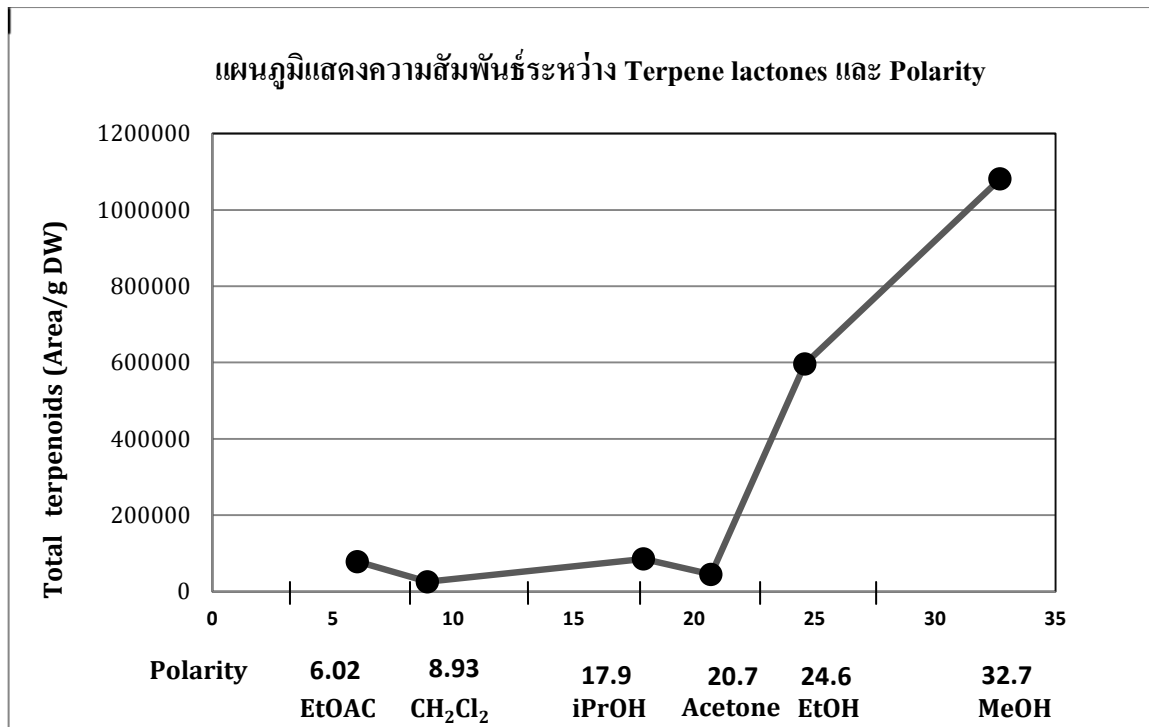
นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาตารางที่ 4.6 ยังพบอีกว่า วิธีการสกัดจากตอนที่ 1.1 ด้วยการแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Dichloromethane นั้นแม้จะให้ปริมาณของ Terpene lactones ออกมาในปริมาณที่น้อยที่สุดแต่จะเห็นว่ามีความบริสุทธิ์ (Purity) มากที่สุดถึง 87.5% ดังนั้นในการทดลองตอนที่ 1.2 จึงได้มีการนำเอา Dichloromethane มาใช้ในการทำ liquid-liquid extraction เพื่อกำจัด impurity โดยจะเห็นได้ว่าการทดลองตอนที่ 1.2 Terpene lactones ที่สกัดได้จะมีความบริสุทธิ์ที่สูงขึ้น เช่น การต้มใน Buffer pH 6 มีความบริสุทธิ์ (Purity) 75.8% หรือ การต้มใน Buffer pH 5 มีความบริสุทธิ์ (purity) 74.5% เป็นต้น



### ประเด็นที่ 3 ความมีขั้ว (Polarity)

ในการทดลองตอนที่ 1.2 การสกัดด้วยการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งใน Ethanol 85.4% วิธีการสกัดนี้เกิดขึ้นเนื่องจากการทดลองตอนที่ 1.1 การสกัดด้วยการแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Methanol จะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากที่สุดแต่เนื่องจากว่า Methanol เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษ โดยเฉพาะไอของ Methanol และเพราะต้องการที่จะทราบว่าการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งใน Methanol จะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากขึ้นจากวิธีการแช่หรือไม่ ดังนั้นจึงทำการต้มใน Ethanol 85.4% แทนเนื่องจากความมีขั้ว (Polarity) ใกล้เคียงกันกับความมีขั้วของ Methanol (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก) และจากผลการทดลองพบว่า การแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Methanol จะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากกว่าวิธีการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งใน Ethanol 85.4%

จากการทดลองตอนที่ 1.1 ได้ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิดในการสกัดสารจากใบแปะก๊วย ได้แก่ Methanol, Ethanol, Isopropanol, Dichloromethane, Ethyl acetate และ Acetone ตามหลักการของการสกัดคือสารที่เราต้องการสกัด (ในที่นี้คือ Terpene lactones) จะละลายออกมาอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นก็นำไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกก็จะได้สารสกัดที่ต้องการออกมา โดยสารสกัดที่ต้องการจะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์มากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับความมีขั้ว (Polarity) ของสารสกัดและตัวทำละลายอินทรีย์ สารสกัดจะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีก็ต่อเมื่อมีความมีขั้ว (Polarity) ใกล้เคียงกันกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดนั้นๆ ซึ่งจากผลการทดลองสามารถที่จะวิเคราะห์ความมีขั้ว (Polarity) ของ Terpene lactones ได้โดยนำค่าความมีขั้ว (Polarity) และ Total Terpenoids มาสร้างเป็นแผนภูมิ X-Y ดังภาพที่ 4.9



**ภาพที่ 4.9** แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Total Terpenoids และ Polarity  
ของตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิดที่ใช้ในการทดลองตอนที่ 1.1

จากภาพที่ 4.9 จะเห็นว่า Methanol จะให้ปริมาณของ Total Terpenoids มากที่สุด รองลงมาคือ Ethanol ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Terpene lactones จะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้วสูง (High Polarity) เพราะฉะนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า Terpene lactones จะละลายได้น้อยใน Ethyl acetate, Dichloromethane และ Isopropanol ละลายได้ปานกลางใน Ethanol แต่จะละลายได้ดีที่สุดใน Methanol

ดังนั้นจากทั้ง 3 ประเด็นที่กล่าวมา จะเห็นว่า แม้ว่าการแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Methanol จะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากที่สุดแต่เพราะมีความบริสุทธิ์ต่ำเพียง 12.3% เท่านั้นดังนั้นจากการทดลองตอนที่ 1 จึงเลือก Dichloromethane ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงถึง 87.5% ไปทำ liquid-liquid extraction ในการทดลองตอนที่ 2 และเมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองในตอนที่ 2 ก็พบว่าวิธีการสกัดด้วยการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในน้ำจะให้ปริมาณของ Terpene lactones มาก รองลงมาจากการสกัดด้วยการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งใน Ethanol 85.4% และสารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงถึง 64.5% ซึ่งมีความบริสุทธิ์มากกว่าการสกัดด้วยการต้มใน Ethanol 85.4% ถึง 49.1% (การสกัดด้วยการต้มใน Ethanol 85.4% ให้สารสกัดที่มีความ

บริสุทธิ์เพียง 15.4%) ดังนั้นจึงสามารถที่จะสรุปได้ว่า การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในน้ำเป็นวิธีการสกัด Terpene lactones จากใบแปะก๊วยที่เหมาะสมที่สุด

## 4.2 ผลการวิจัยตอนที่ 2 การศึกษาผลของ pH ต่อประสิทธิภาพการสกัดสารจากใบแปะก๊วย

### 4.2.1 ผลการวิจัยตอนที่ 2.1 ต้มผงใบแปะก๊วยและสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ pH 3, 4, 5, 6, 7 และ 8

จากวิธีการทดลองด้วยการทำการสกัดโดยการต้มผงใบแปะก๊วยใน 0.1 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  จากนั้นกรอง แล้วนำส่วนที่กรองได้ มาทำการแบ่งเป็น 12 ส่วน แล้วปรับ pH ของน้ำต้มใบแปะก๊วยด้วยการเติม Buffer pH 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 (Buffer type และ Universal Buffer) จากนั้นเติม NaCl แล้วทำการสกัดในกรวยแยกด้วย Ethyl acetate ทำการสกัด 2 ครั้ง จากนั้นเทชั้น Ethyl acetate รวมกัน และเติม  $\text{anh. Na}_2\text{SO}_4$  เพื่อดูดน้ำออกนำไประเหยแห้ง แล้วชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ ได้ผลการทดลองเป็นไปดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ (g) ของแต่ละ pH ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC

pH	3	4	5	6	7	8
Terpene Lactone (Buffer type: BT)	0.0647	0.0589	0.0495	0.0505	0.0268	0.0249
Terpene Lactone (Universal Buffer: UB)	0.0759	0.0717	0.0683	0.0571	0.0224	0.0085

นำสารสกัดที่ได้มาละลายใน 50% Ethanol จากนั้นนำไปกรองผ่านเมมเบรน แล้วทำการฉีดสารเข้าเครื่อง HPLC จะได้พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างที่ใช้ Buffer type และ Universal Buffer ในการควบคุม pH เป็นไปดังตารางที่ 4.8 และ 4.9 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.8 แสดงข้อมูลดิบพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของตัวอย่างที่ใช้ Buffer type ในการควบคุม pH

BT	BB	GJ	GC	GA	GB
3	22,078.5580	2,613.7860	8,818.6325	15,954.5030	10,166.1910

4	26,845.2720	1,845.3590	10,168.6375	20,044.9100	12,830.4085
5	24,839.4415	2,321.5720	9,145.9375	19,425.5790	11,866.2350
6	26,755.6195	3,169.6010	9,735.5790	18,750.7940	12,214.4935
7	10,140.4370	2,311.8935	4,821.4005	11,150.6870	6,381.6960
8	3,808.4410	1,098.7790	1,142.7650	8,642.0980	1,873.2080

ตารางที่ 4.9 แสดงข้อมูลดิบพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของตัวอย่างที่ใช้ Universal Buffer ในการควบคุม pH

UB	BB	GJ	GC	GA	GB
3	33,522.6320	4,684.1265	11,908.9030	19,779.7645	14,016.8295
4	32,103.1570	4,988.3735	13,225.0730	20,200.0215	13,651.0490
5	32,285.6790	4,912.5090	12,602.3755	21,015.1160	13,540.1670
6	27,402.8000	5,067.9770	9,732.4405	19,933.8070	12,161.9450
7	5,615.9700	1,106.7410	1,498.9705	8,956.4485	3,471.3955
8	-	175.9470	-	751.5570	102.4350

นำน้ำหนักดิบของสารสกัดที่ได้ มาคำนวณหาปริมาณสารสกัดในสารละลาย 50  $\mu$ L ที่ทำการฉีด เป็นไปดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 แสดงปริมาณของสารสกัด Terpene Lactones (g) จากสารละลาย 50  $\mu$ L ที่ทำการฉีด

pH	3	4	5	6	7	8
Terpene Lactone (Buffer type)	0.0016	0.0015	0.0012	0.0013	0.0007	0.0006
Terpene Lactone (Universal Buffer)	0.0019	0.0018	0.0017	0.0014	0.0006	0.0002

จากนั้นเมื่อได้ปริมาณของสารสกัด Terpene Lactones (g) จากสารละลาย 50  $\mu$ L ที่ทำการฉีด จึงทำการคำนวณหาน้ำหนักใบแห้งเริ่มต้น เป็นไปดังตารางที่ 4.11

**ตารางที่ 4.11** แสดงน้ำหนักใบแห้งเริ่มต้น (g) ในสารสกัด 50  $\mu$ L ที่ทำการฉีด (เทียบกับน้ำหนักผงแปะก๊วยเริ่มต้น 6.4516 g)

pH	3	4	5	6	7	8
Terpene Lactone (Buffer type)	0.1613	0.1613	0.1614	0.1614	0.1613	0.1614
Terpene Lactone (Universal Buffer)	0.1613	0.1613	0.1613	0.1613	0.1613	0.1617

เมื่อทำการฉีดสารเข้าเครื่อง HPLC จะได้ HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones จากนั้นนำ Retention time ที่ได้มาเปรียบเทียบกับ HPLC Chromatogram ของงานวิจัยอื่นๆ (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) ที่ได้ทำการศึกษามาแล้ว

จาก HPLC Chromatogram (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) จะแสดงให้เห็นถึง Retention Time (RT) ของสาร Terpene Lactones ดังนี้คือ 8.8, 9.7, 10.5, 13.6 และ 14 min ซึ่งเป็น RT ของ Bilobalide(BB), Ginkgolide J (GJ), Ginkgolide C (GC), Ginkgolide A (GA) และ Ginkgolide B (GB) ตามลำดับ

จาก HPLC Chromatogram ของสารตัวอย่าง จะได้พื้นที่ใต้กราฟตามตารางที่ 7 (BT) และ 8 (UB) นำพื้นที่ใต้กราฟนี้ และข้อมูลน้ำหนักแห้งเริ่มต้นในตารางที่ 6 มาคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) ได้ค่าดังตารางที่ 4.12 และ 4.13

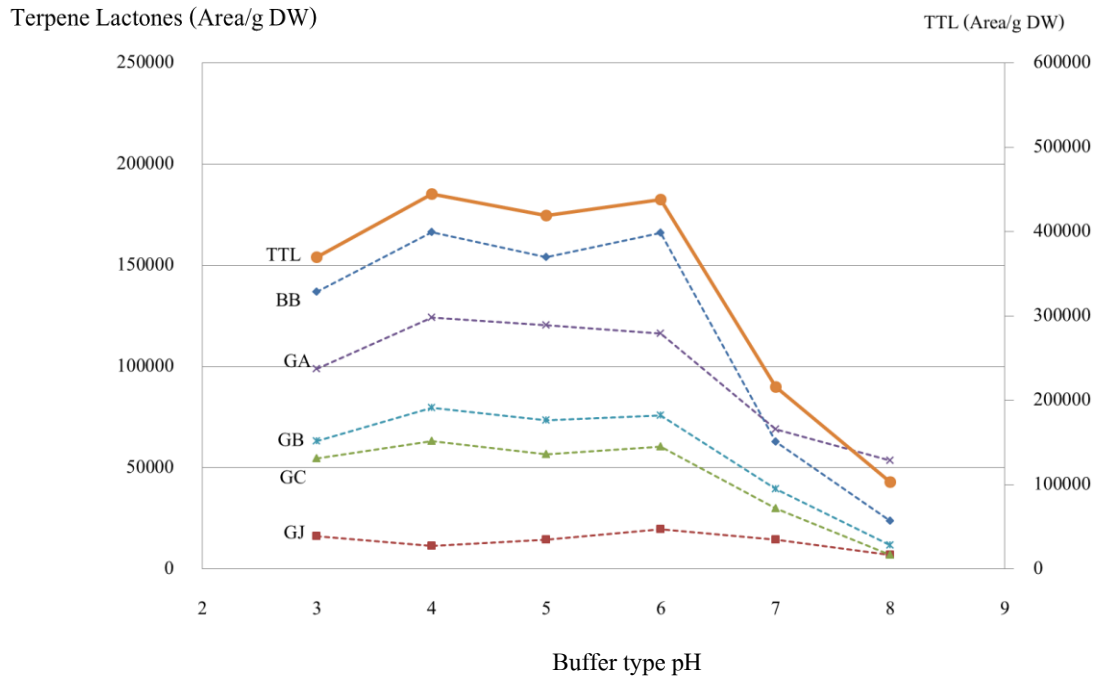
**ตารางที่ 4.12** แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW)  
จาก HPLC Chromatogram ของ Terpene Lactones ของตัวอย่างที่ใช้ Buffer type (BT) ในการควบคุม pH

BT	BB	GJ	GC	GA	GB	Total
3	136,878.8469	16,204.5009	54,672.2412	98,911.9839	63,026.6026	369,694.1755
4	166,430.7006	11,440.5394	63,041.7700	124,270.9857	79,543.7601	444,727.7558
5	153,995.2976	14,392.8828	56,701.4104	120,431.3639	73,566.2430	419,087.1977
6	165,874.8884	19,650.3503	60,356.9684	116,247.9479	75,725.3162	437,855.4712
7	62,866.9374	14,332.8797	29,890.8897	69,130.1116	39,564.1414	215,784.9598
8	23,610.9175	6,812.0211	7,084.7179	53,577.7993	11,613.1928	102,698.6486

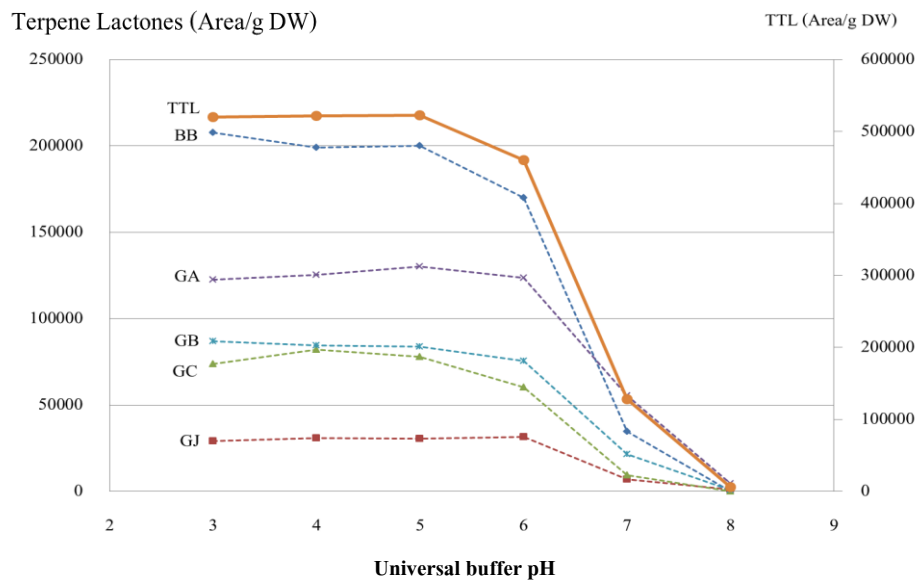
**ตารางที่ 4.13** แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW)  
จาก HPLC Chromatogram ของ Terpene Lactones ของตัวอย่างที่ใช้ Universal Buffer (UB) ในการควบคุม pH

UB	BB	GJ	GC	GA	GB	Total
3	207,827.8487	29,039.8419	73,830.7688	122,627.1823	86,899.1290	520,224.7707
4	199,027.6317	30,926.0601	81,990.5332	125,232.6193	84,631.4259	521,808.2702
5	200,159.2002	30,455.7285	78,130.0403	130,285.9020	83,943.9988	522,974.8698
6	169,887.1668	31,419.5722	60,337.5109	123,582.1885	75,399.5350	460,625.9734
7	34,816.9250	6,861.3825	9,293.0595	55,526.6491	21,521.3608	128,019.3769
8	-	1,090.8060	-	4,659.3738	635.0590	6,385.2388

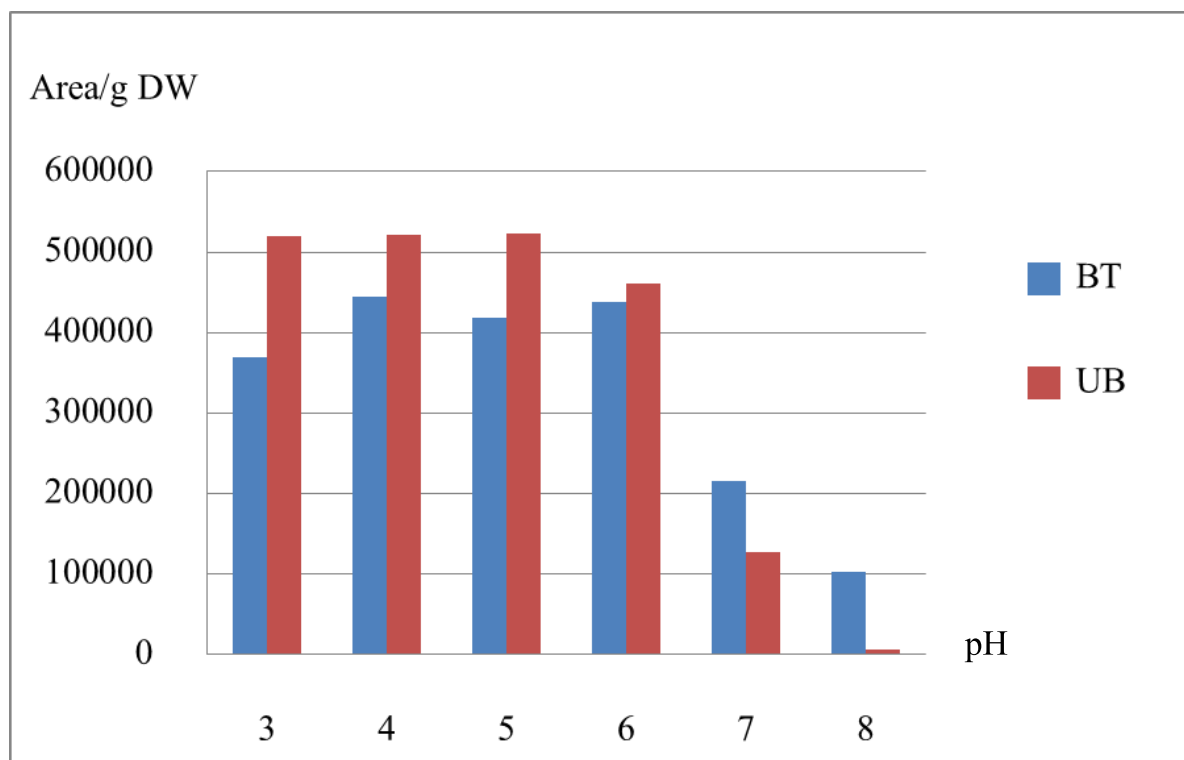
จากตารางที่ 4.12 และ 4.13 นำมาสร้างกราฟและแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของ Terpene Lactones ที่สกัดได้ที่ pH ต่างๆ ด้วย BT และ UB ตามลำดับ ดังภาพต่อไปนี้



ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงปริมาณของ Terpene lactones ที่สกัดได้ที่ pH ต่างๆ และปริมาณ Total Terpene lactones ของตัวอย่างที่ใช้ Buffer type (BT) ในการควบคุม pH



ภาพที่ 4.11 กราฟแสดงปริมาณของ Terpene lactones ที่สกัดได้ที่ pH ต่างๆ และปริมาณ Total Terpene lactones ของตัวอย่างที่ใช้ Universal Buffer (UB) ในการควบคุม pH

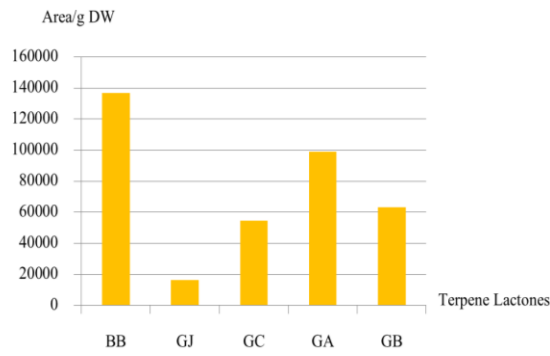


ภาพที่ 4.12 แผนภูมิแท่งเปรียบเทียบปริมาณของ Total Terpene Lactones ที่สกัดได้ที่ pH ต่างๆ

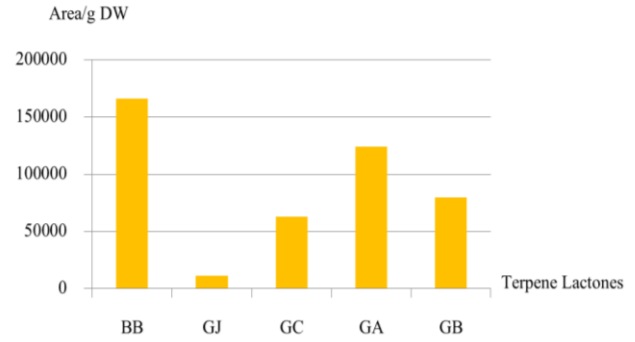
จากภาพ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ Total Terpene Lactones (TTLs) ที่สกัดได้ที่ pH ต่าง ๆ ของตัวอย่างที่ใช้ Buffer type (BT) ในการควบคุม pH พบว่าสามารถเรียงลำดับปริมาณของ Terpene Lactones จากมากไปหาน้อย ได้ดังนี้ คือ ที่ pH 4 > pH 6 > pH 5 > pH 3 > pH 7 > pH 8 และของตัวอย่างที่ใช้ Universal Buffer (UB) ในการควบคุม pH สามารถเรียงลำดับปริมาณของ Terpene Lactones จากมากไปหาน้อย ได้ดังนี้ คือ ที่ pH 5 > pH 4 > pH 3 > pH 6 > pH 7 > pH 8 และหากเปรียบเทียบปริมาณ TTLs ที่ BT pH 4 และ UB pH 5 จะพบว่าที่ UB5 > BT 4

จากข้อมูลในตารางที่ 4.12 และ 4.13 นำมาสร้างแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ Terpene Lactones แต่ละชนิด ได้ดังรูปภาพที่ 4.13 และ 4.14 ดังนี้

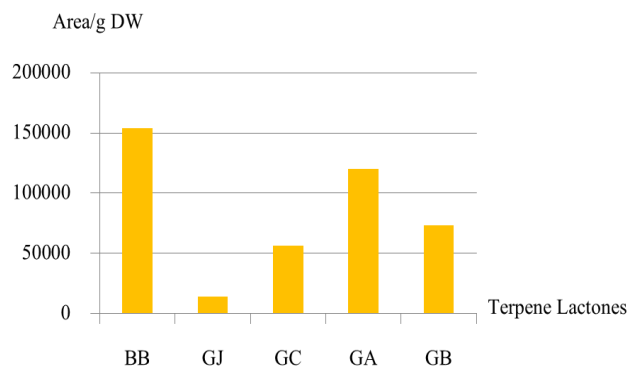




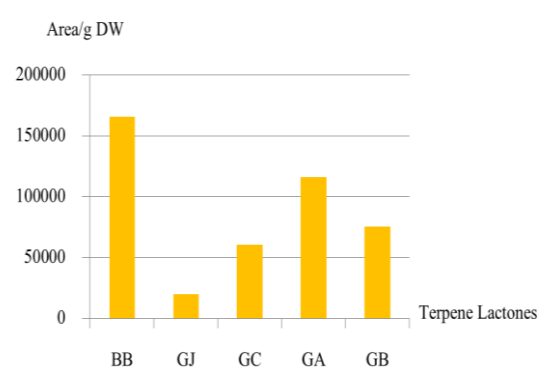
pH 3 (BT)



pH 4 (BT)



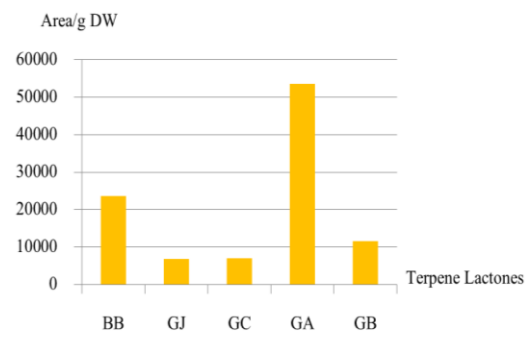
pH 5 (BT)



pH 6 (BT)



pH 7 (BT)



pH 8 (BT)

ภาพที่ 4.13 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของ Terpene Lactones ที่ pH 3-8 (BT)



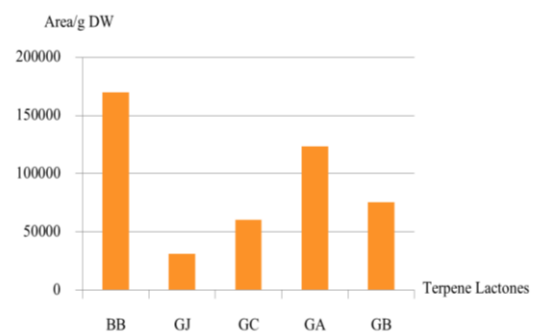
pH 3 (UB)



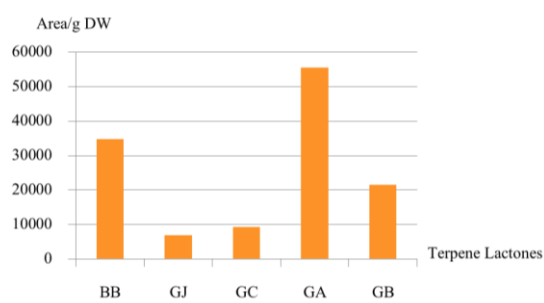
pH 4 (UB)



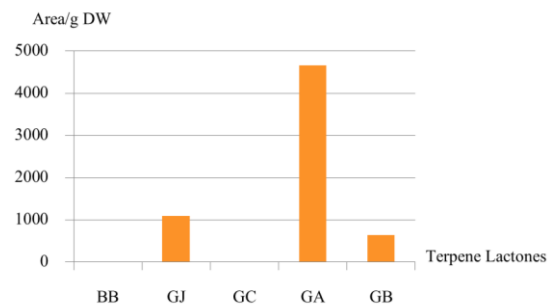
pH 5 (UB)



pH 6 (UB)



pH 7 (UB)



pH 8 (UB)

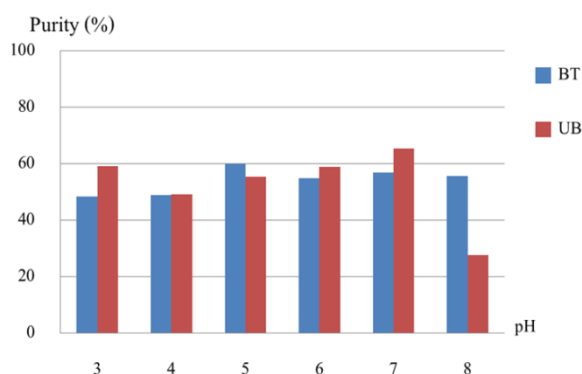
ภาพที่ 4.14 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของ Terpene Lactones ที่ pH 3-8 (UB)

จาก HPLC Chromatogram ของแต่ละตัวอย่าง เราให้ Area ของทุก Peak ในการฉีดทั้งหมดเป็น 100 % จึงคำนวณหาค่าความบริสุทธิ์ (% Purity) ได้จากผลรวม % Peak Area ของสาร Terpene lactones แต่ละชนิด

ตารางที่ 4.14 ตารางแสดงค่าความความบริสุทธิ์จาก % Peak area ของตัวอย่างในข้อที่ 3.3.2.3.1

ตัวอย่าง	% Peak area					Total
	BB	GJ	GC	GA	GB	% Peak area
BT 3	17.8969	2.1187	7.1484	12.9327	8.2407	48.3374
BT 4	18.3172	1.2591	6.9383	13.6772	8.7545	48.9463
BT 5	21.991	2.0553	8.0971	17.1979	10.5055	59.8468
BT 6	20.8062	2.4648	7.5708	14.5814	9.4985	54.9217
BT 7	16.6014	3.7849	7.8933	18.2553	10.4478	56.9827
BT 8	12.7974	3.6922	3.84	29.0399	6.2945	55.6640
UB 3	23.6072	3.2986	8.3865	13.9292	9.8709	59.0924
UB 4	18.7893	2.9196	7.7403	11.8226	7.9897	49.2615
UB 5	21.251	3.2335	8.2951	13.8325	8.9124	55.5245
UB 6	21.7387	4.0204	7.7208	15.8136	9.6481	58.9416
UB 7	17.7989	3.5076	4.7507	28.386	11.002	65.4452
UB 8	0	4.7467	0	20.2755	2.7635	27.7857

จาก HPLC Chromatogram นำ % Peak Area มาสร้างเป็นแผนภูมิแท่ง แสดง %Purity ได้ดังนี้



ภาพที่ 4.15 แผนภูมิแสดง % Purity ของ Terpene Lactones ที่สกัดได้ ที่ pH ต่างๆ ของตัวอย่างที่ใช้

Buffer type (BT) และ Universal Buffer (UB) ในการควบคุม pH

จากภาพ เมื่อเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของสารสกัด Terpene Lactones ที่สกัดได้ที่ pH ต่าง ๆ ของตัวอย่างที่ใช้ Buffer type (BT) ในการควบคุม pH พบว่าที่ pH 5 มีความบริสุทธิ์มากที่สุด ตามด้วย ที่ pH 7 > pH 8 > pH 6 > pH 4 > pH 3 และของตัวอย่างที่ใช้ Universal Buffer (UB) ในการควบคุม pH ที่ pH 7 มีความบริสุทธิ์มากที่สุด ตามด้วย ที่ pH 3 > pH 6 > pH 5 > pH 4 > pH 8

#### 4.2.2 ผลการวิจัยตอนที่ 2.2 การสกัดผงใบแปะก๊วยด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ pH 4 และ pH 5 ด้วยวิธีการรีฟลักซ์และUltrasonic Assisted Extraction (UAE)

จากวิธีการทดลองในข้อที่ 3.3.2.3.2 ทำการสกัดโดยการรีฟลักซ์ผงใบแปะก๊วยใน Buffer pH 9 ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 60 นาที และใช้คลื่นเสียงอัลตราโซนิกแทนการต้มใน 0.1% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นกรอง แล้วนำส่วนที่กรองได้มาแบ่งเป็น 8 ส่วน และทำการปรับ pH ดังนี้ ส่วนที่ 1 pH 5 ปรับด้วย HCl) ส่วนที่ 2 pH 5 + NaCl ปรับด้วย HCl ส่วนที่ 3 BT 4 ส่วนที่ 4 UB 5 ส่วนที่ 5 pH 5 ปรับด้วย HCl ส่วนที่ 6 pH 5 + NaCl ปรับด้วย HCl ส่วนที่ 7 BT 4 และส่วนที่ 8 UB 5 ตามตารางที่ 3.2

จากนั้นทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์โดยตัวอย่างที่ 1-4 สกัดด้วย Ethyl acetate และตัวอย่างที่ 5-8 สกัดด้วย Dichloromethane ทำการสกัด 2 ครั้ง จากนั้นเทชั้นสารละลายอินทรีย์รวมกัน แล้วเติม anh.Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> เพื่อดูดน้ำออก นำไประเหยแห้ง แล้วชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ ได้ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ (g) ของแต่ละตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC

ตัวอย่าง	1	2	3	4	5	6	7	8
น้ำหนักสารสกัด(g)	0.0463	0.0467	0.0524	0.0555	0.0173	0.0163	0.0171	0.0168

นำสารสกัดที่ได้มาละลายใน 50% Ethanol จากนั้นนำไปกรองผ่านเมมเบรน แล้วทำการฉีดสารเข้าเครื่อง HPLC จะได้พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างที่ใช้ Ethyl acetate และ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายอินทรีย์เป็นไปดังตารางที่ 4.16 และ 4.17 ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.16** แสดงข้อมูลคิพพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของตัวอย่างที่ใช้ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวอย่าง	BB	GJ	GC	GA	GB
1	4,115.5205	2,957.3510	6,716.9115	16,548.8670	10,092.9480
2	4,525.9710	3,788.9140	7,805.6230	17,174.5880	11,486.7580
3	4,278.9190	2,768.6940	8,905.6550	16,680.4540	11,145.4110
4	4,767.4375	3,330.8980	8,429.3180	18,614.2505	11,538.0140

**ตารางที่ 4.17** แสดงข้อมูลคิพพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของตัวอย่างที่ใช้ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวอย่าง	BB	GJ	GC	GA	GB
5	1,204.7250	412.7580	76.2985	16,406.2950	7,293.6490
6	979.3240	385.7490	125.9855	13,616.0140	6,031.8335
7	1,191.1265	389.3880	126.9905	16,022.0935	7,171.9650
8	728.4745	292.2545	106.1510	11,544.4520	4,995.4095

นำน้ำหนักคิพของสารสกัดที่ได้ มาคำนวณหาปริมาณสารสกัดในสารละลาย 50  $\mu$ L ที่ทำการฉีด เป็นไปดังตารางที่ 4.18

**ตารางที่ 4.18** แสดงปริมาณของสารสกัด Terpene Lactones จากสารละลาย 50 $\mu$ L ที่ทำการฉีด

ตัวอย่าง	1	2	3	4	5	6	7	8
น้ำหนักสารสกัด (g)	0.0012	0.0012	0.0013	0.0014	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004

จากนั้นเมื่อได้ปริมาณของสารสกัด Terpene Lactones (g) จากสารละลาย 50 $\mu$ L ที่ทำการฉีด จึงทำการคำนวณหาน้ำหนักใบแห้งเริ่มต้น เป็นไปดังตารางที่ 4.19

**ตารางที่ 4.19** แสดงน้ำหนักแห้งเริ่มต้น (g) ในสารสกัด 50  $\mu$ L ที่ทำการฉีด (เทียบกับน้ำหนักผงแปะก๊วย เริ่มต้น 6.2500 g)

ตัวอย่าง	1	2	3	4	5	6	7	8
น้ำหนักสารสกัด (g)	0.1563	0.1563	0.1563	0.1563	0.1564	0.1564	0.1564	0.1563

จาก HPLC Chromatogram ของสารตัวอย่าง จะได้พื้นที่ใต้กราฟตามตารางที่ 15 (Ethyl acetate) และ 16 (Dichloromethane) นำพื้นที่ใต้กราฟนี้ และข้อมูลน้ำหนักแห้งเริ่มต้นในตารางที่ 14 มาคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) (วิธีคำนวณดูในภาคผนวก) ได้ค่าดังตารางที่ 4.20 และ 4.21

**ตารางที่ 4.20** แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpene Lactones ของตัวอย่างที่ใช้ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลายอินทรีย์

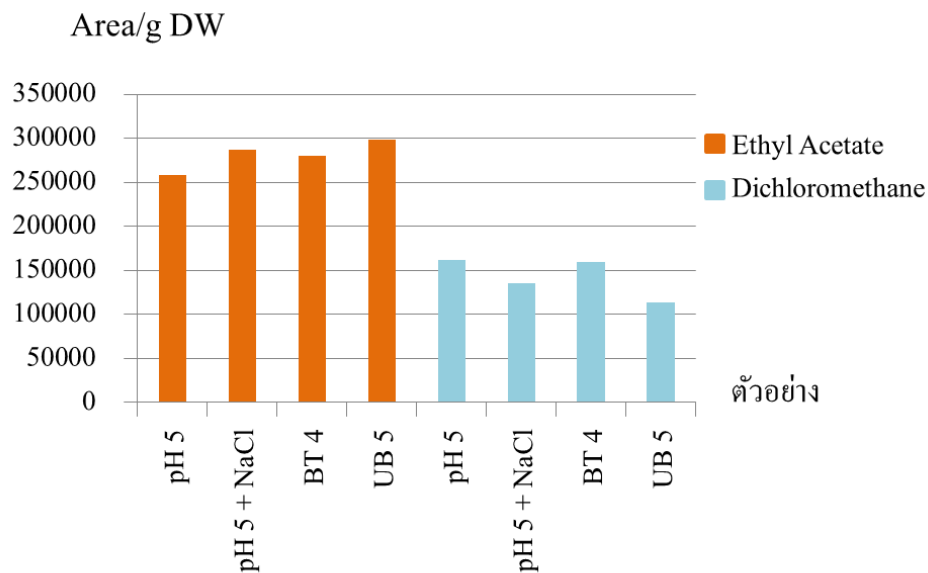
ตัวอย่าง	BB	GJ	GC	GA	GB	TTL
1	26,328.0417	18,918.9340	42,969.8082	105,867.3529	64,567.1808	258,651.3176
2	28,953.7990	24,238.6561	49,934.5753	109,870.2508	73,483.7414	286,481.0226

3	27,385.0816	17,719.6416	56,996.1920	106,754.9056	71,330.6304	280,186.4512
4	30,500.6686	21,310.1097	53,928.3073	119,088.5219	73,816.8337	298,644.4412

**ตารางที่ 4.21** แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpene Lactones ของตัวอย่างที่ใช้ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวอย่าง	BB	GJ	GC	GA	GB	TTL
5	7,701.3188	2,638.5947	487.7454	104,878.7964	46,625.3428	162,331.7981
6	6,259.9813	2,465.7637	805.3176	87,035.5403	38,556.3564	135,122.9593
7	7,614.2917	2,489.1679	811.7884	102,421.4424	45,846.8801	159,183.5705
8	4,662.2368	1,870.4288	679.3664	73,884.4928	31,970.6208	113,067.1456

จากตารางที่ 4.20 และ 4.21 นำมาสร้างกราฟและแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของ Terpene Lactones ได้ดังภาพต่อไปนี้

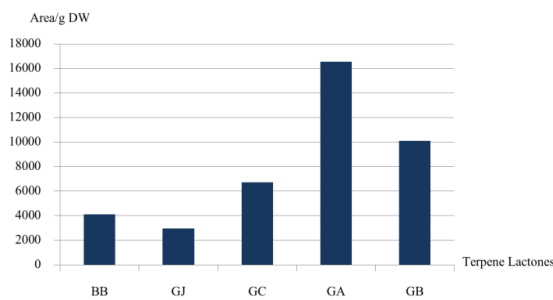


**ภาพที่ 4.16** แผนภูมิแท่งเปรียบเทียบปริมาณของ Total Terpene Lactones ที่สกัดได้ของแต่ละตัวอย่าง

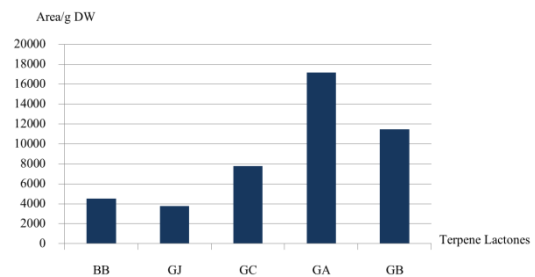
จากภาพ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ Total Terpene Lactones (TTLs) ที่สกัดได้ ที่ pH และตัวทำละลายต่าง ๆ กันของตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างที่ใช้ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ จะสามารถสกัดสารได้มากกว่าตัวอย่างที่ใช้ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ในทุกๆสถานะ โดยตัวอย่างที่ทำการสกัดสารได้มากที่สุดคือ UB 5: Ethyl acetate

ส่วนการเติมเกลือ NaCl นั้น ในการทดลองที่ใช้ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า NaCl ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด แต่สำหรับ การทดลองที่ใช้ Dichloromethane นั้นกลับทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดนั้นลดลง

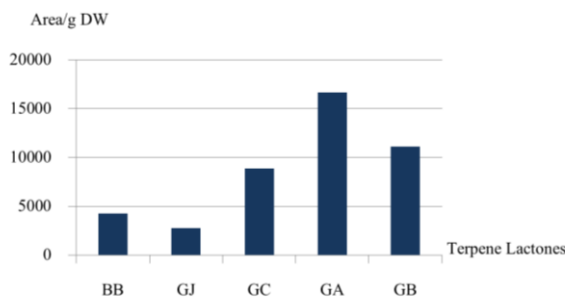
จากข้อมูลในตารางที่ 4.20 และ 4.21 นำมาสร้างแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณ Terpene Lactones แต่ละชนิด ได้ดังรูปภาพที่ 4.17 ดังนี้



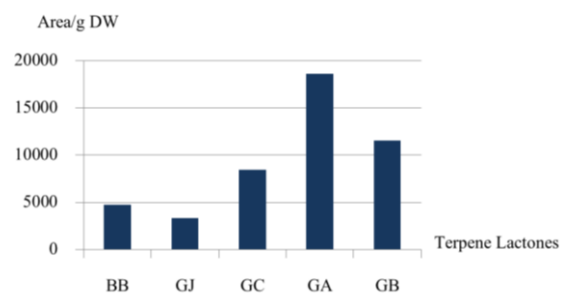
ตัวอย่างที่ 1 (pH 5: Ethyl acetate)



ตัวอย่างที่ 2 (pH 5 + NaCl: Ethyl acetate)

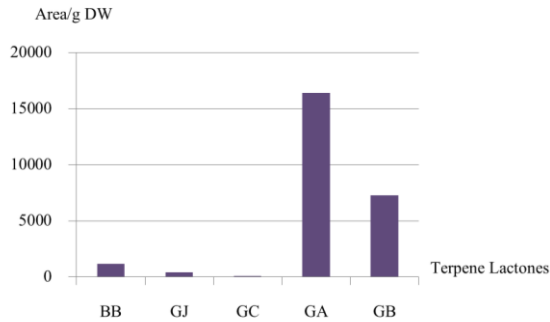


ตัวอย่างที่ 3 (BT 4: Ethyl acetate)

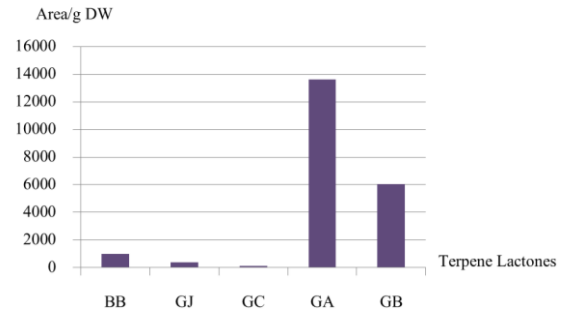


ตัวอย่างที่ 4 (UB 5: Ethyl acetate)

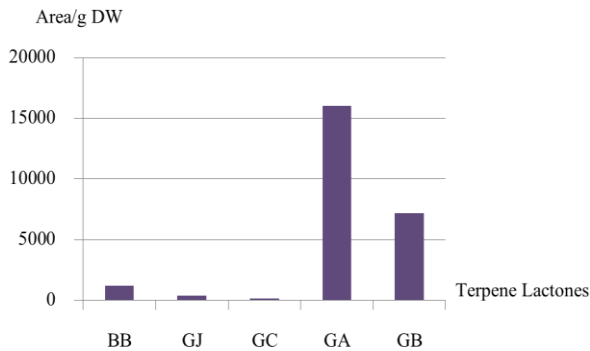




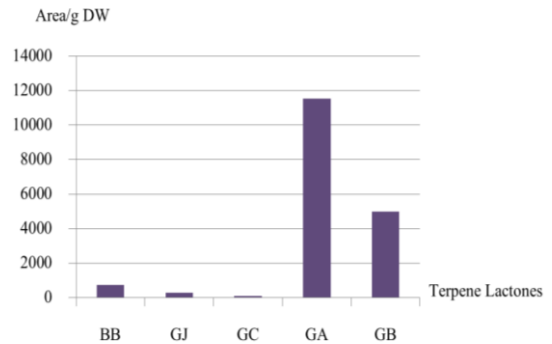
ตัวอย่างที่ 5 (pH 5: Dichloromethane)



ตัวอย่างที่ 6 (pH 5 + NaCl: Dichloromethane)



ตัวอย่างที่ 7 (BT 4: Dichloromethane)



ตัวอย่างที่ 8 (UB 5: Dichloromethane)

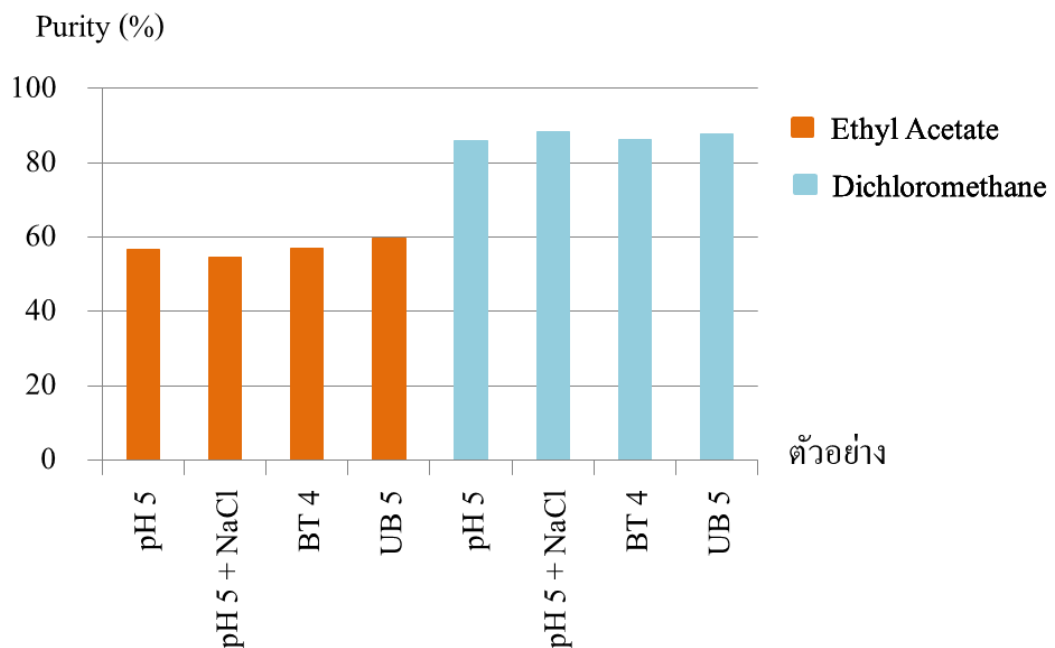
ภาพที่ 4.17 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของ Terpene Lactones ของตัวอย่างที่ 1-8

เมื่อพิจารณาส่วนของ Ginkgolides และ Bilobalide พบว่า ในตัวทำละลายแต่ละตัวอย่าง จะพบ GA และ GB ปริมาณสูงกว่า BB, GJ และ GC และ จาก HPLC Chromatogram ของแต่ละตัวอย่าง เราให้ Area ของทุก Peak ในการนับทั้งหมดเป็น 100 % จึงคำนวณหาความบริสุทธิ์ (% Purity) ได้จากผลรวม % Peak Area ของสาร Terpene Lactones แต่ละชนิด

ตารางที่ 4.22 ตารางแสดงค่าความบริสุทธิ์จาก % Peak area ของตัวอย่าง

ตัวอย่าง	% Peak area					Total % Peak area
	BB	GJ	GC	GA	GB	
1	5.7718	4.1476	9.4202	23.209	14.1549	56.7035
2	5.5226	4.6232	9.5245	20.9565	14.0162	54.6430
3	5.5667	3.602	11.586	21.7007	14.4998	56.9552
4	6.0933	4.2572	10.7735	23.791	14.7468	59.6618
5	4.0846	1.3995	0.2587	55.6255	24.7291	86.0974
6	4.0884	1.6104	0.5259	56.8424	25.1809	88.2480
7	4.1297	1.35	0.4403	55.5498	24.8658	86.3356
8	3.6247	1.4542	0.5282	57.4424	24.856	87.9055

จาก HPLC Chromatogram นำ % Peak Area มาสร้างเป็นแผนภูมิแท่ง แสดง %Purity ได้ดังนี้



ภาพที่ 4.18 แผนภูมิแสดง % Purity ของ Terpene Lactones ที่สกัดได้ของแต่ละตัวอย่าง

#### 4.2.3 อภิปรายผลการวิจัยตอนที่ 2

จากผลการทดลองที่ได้กล่าวมาข้างต้น จะสรุปผลในประเด็นต่างๆ ได้ดังนี้ ตอนที่ 2.1 เราต้องการที่จะให้ Terpene lactones ละลายออกมาอยู่ในชั้นน้ำ ดังนั้นจึงทำการต้มใบแปะก๊วยในสารละลายที่เป็นเบส ซึ่ง 0.1 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ที่เรานำมาใช้ จะให้ pH ประมาณ 9 โดย Terpene Lactones จะอยู่ในรูป Deprotonated form ทำให้ละลายออกมาอยู่ในชั้นน้ำได้มาก จากนั้นปรับ pH เมื่อปรับ pH แล้ว จะทำให้โครงสร้างของ Terpene Lactones อยู่ในรูป Protonated form สภาพขี้จึงน้อยลง ทำให้เมื่อสกัดโดย Ethyl acetate จึงได้สารที่เราต้องการออกมาละลายอยู่ในชั้นสารละลายอินทรีย์ได้มากในช่วงที่ pH เป็นกรด สำหรับตัวอย่างที่ใช้ Buffer type (BT) ในการควบคุม pH จะเห็นว่า ที่ BT pH 4 จะให้ปริมาณของ Total Terpene Lactones (TTLs) มากที่สุด รองลงมาได้แก่ pH 6, pH 5, pH 3, pH 7 และ pH 8 ส่วนตัวอย่างที่ใช้ Universal Buffer (UB) ในการควบคุม pH จะเห็นว่า ที่ UB pH 5 จะให้ปริมาณของ Total Terpene Lactones (TTLs) มากที่สุด รองลงมาได้แก่ pH 4, pH 3, pH 6, pH 7 และ pH 8 อีกทั้งเมื่อพิจารณาในภาพรวมของปริมาณ Terpene Lactones แต่ละชนิด ยังพบว่า ในช่วง pH 3 – 7 จะพบ BB และ GA ในปริมาณค่อนข้างสูง กว่า GJ, GC และ GB แต่ที่ UB pH 8 กลับไม่พบ BB และ GJ พบเพียงแต่ GC, GA และ GB เท่านั้น

เมื่อพิจารณาในเรื่องของความสำเร็จ สำหรับตัวอย่างที่ใช้ Buffer type (BT) ในการควบคุม pH จะเห็นว่า ที่ BT pH 5 มีความบริสุทธิ์สูงที่สุด ตามด้วยที่ pH 7, pH 8, pH 6, pH 4 และ pH 3 ส่วนตัวอย่างที่ใช้ Universal Buffer (UB) ในการควบคุม pH จะเห็นว่า ที่ UB pH 7 มีความบริสุทธิ์สูงที่สุด ตามด้วย ที่ pH 3, pH 6, pH 5, pH 4 และ pH 8

ตอนที่ 2.2 ทำการสกัดโดยการรีฟลักซ์ผงใบแปะก๊วยใน Buffer pH 9 และใช้คลื่นเสียงอัลตราโซนิก จากนั้นปรับ pH ให้เป็น pH 4 และ pH 5 ด้วยวิธีต่าง ๆ ดังตารางที่ 4 แล้วทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ Ethyl acetate และ Dichloromethane จะเห็นว่าปริมาณของ Total Terpene Lactones (TTLs) ที่สกัดได้ ของตัวอย่างที่ใช้ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ จะสามารถสกัดสารได้มากกว่าตัวอย่างที่ใช้ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ในทุกๆสถานะแต่ตัวอย่างที่ใช้ Dichloromethane นั้น จะมีความบริสุทธิ์ของสาร Terpene Lactones มากกว่าค่อนข้างมาก ในทุกๆสถานะเช่นกัน โดยในแต่ละสถานะที่ใช้ตัวทำละลายเดียวกันจะมีค่าความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกัน

เมื่อพิจารณาตัวอย่างที่ใช้ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวอย่างที่ให้ปริมาณของ TTLs มากที่สุด คือ ตัวอย่างที่ใช้ Universal Buffer pH 5 (UB 5) ตามด้วย pH 5 + NaCl, Buffer Type pH 4 (BT 4)

และ pH 5 จะเห็นว่า ที่ UB 5 จะให้ปริมาณ TTLsมากกว่าที่ BT 4 เช่นเดียวกับตอนที่ 1 และจากการที่เติม NaCl เพื่อลดการเกิดอิมัลชันระหว่างชั้นน้ำกับชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า NaCl ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดให้ดียิ่งขึ้นอีกด้วย

### 4.3 ผลการวิจัยตอนที่ 3

#### 4.3.1 ผลการวิจัยตอนที่ 3.1 การนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE)

จากวิธีการทดลองโดยการนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 15 นาที โดยสกัดด้วยตัวทำละลายที่ 1-3 ต้องนำมาปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5 แล้วนำมาสกัดด้วย Dichloromethane ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่กรองได้โดยทำการไขชั้น Dichloromethane หรือชั้นล่างแล้วนำชั้นบนมาสกัดซ้ำอีกรอบแล้วเทรวมกัน ก่อนนำมาระเหยจนแห้ง ส่วนสกัดด้วยตัวทำละลายที่ 4-6 หลังจากกรองนำมาระเหยได้เลยได้ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.22ก

ตารางที่ 4.22ก แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวทำละลายก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC ของเทคนิค UAE

ตัวทำละลาย	น้ำหนักใบแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)
1. Buffer pH 7	5.0825	0.0265
2. Buffer pH 9	5.0552	0.0240
3. Buffer pH 11	5.0158	0.0201
4. Ethyl acetate	5.0356	0.5220
5. Ethanol	5.0635	0.9702
6. น้ำกลั่น	5.0248	1.3082

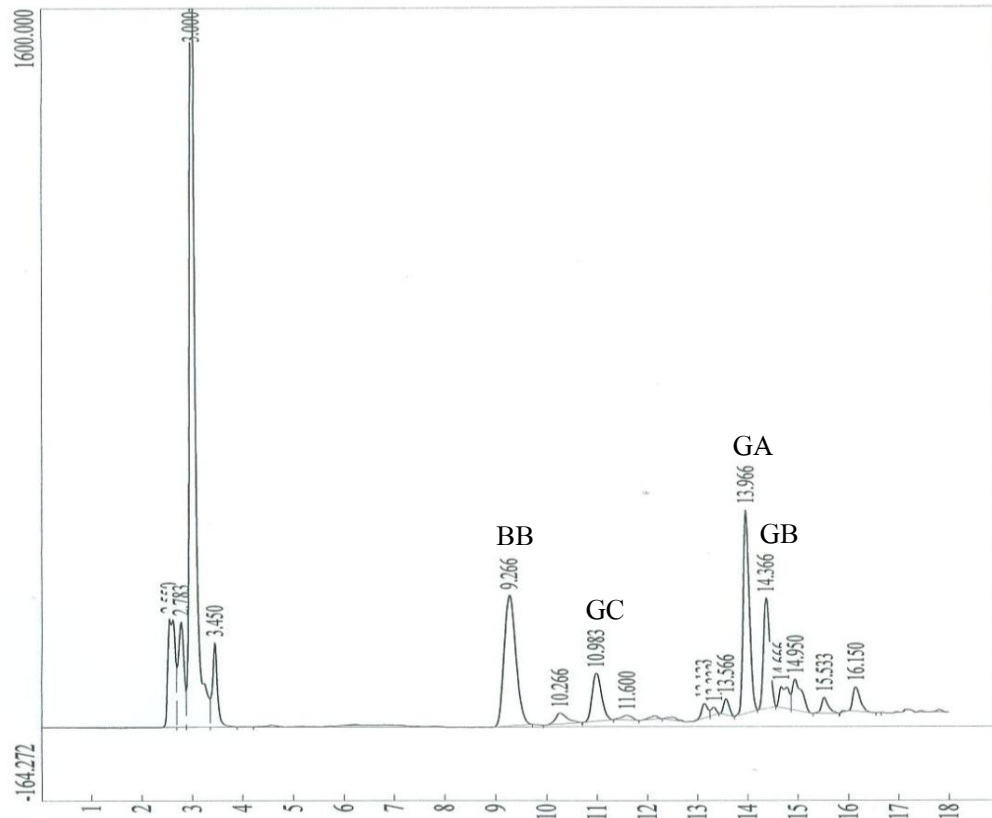
เมื่อนำสารละลายมาระเหยจนแห้งแล้วนำสารละลาย 50% Ethanol ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.23

ตารางที่ 4.23 แสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของเทคนิค UAE

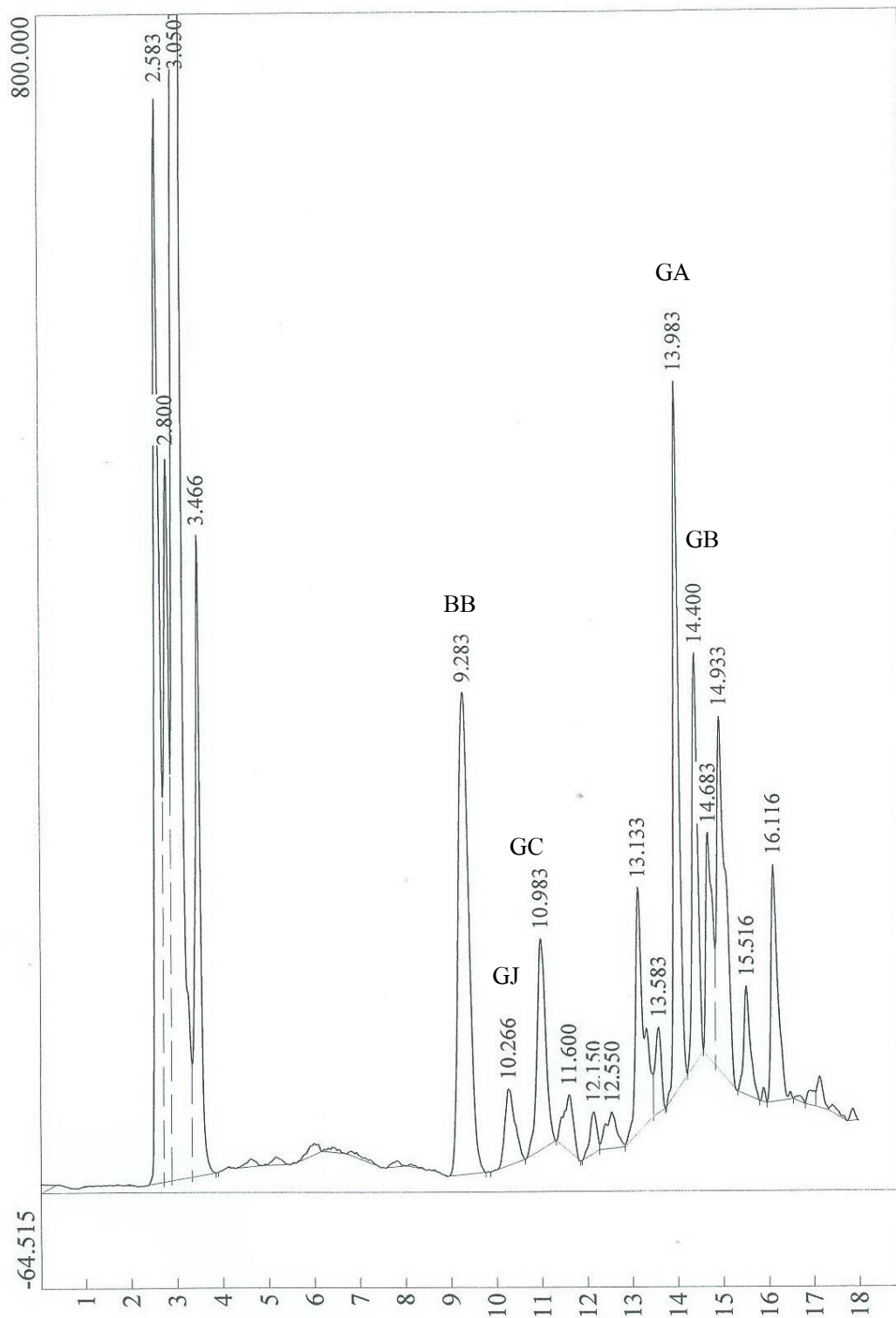
ตัวทำละลาย	BB	GJ	GC	GA	GB
1. Buffer pH 7	3,628.7520	96.0545	219.0210	9,154.8090	4,005.9570
2. Buffer pH 9	3,684.2010	113.3390	173.1830	9,048.9865	4,058.3080
3. Buffer pH 11	127.4140	14.5340	27.4180	2,189.3230	1,210.4110
4. Ethyl acetate	4,640.3300	406.1030	1,390.1250	3,834.4140	2,159.4100
5. Ethanol	3,529.4465	564.6425	2,429.4150	2,941.5660	2,274.8030
6. น้ำกลั่น	1,091.3550	213.3215	683.6210	1,159.6320	531.6620

จาก HPLC Chromatogram นำมาเทียบ Retention time ของ Terpene lactones ของแต่ละตัวจากภาพที่ 4.3ก และภาพที่ 4.3ข

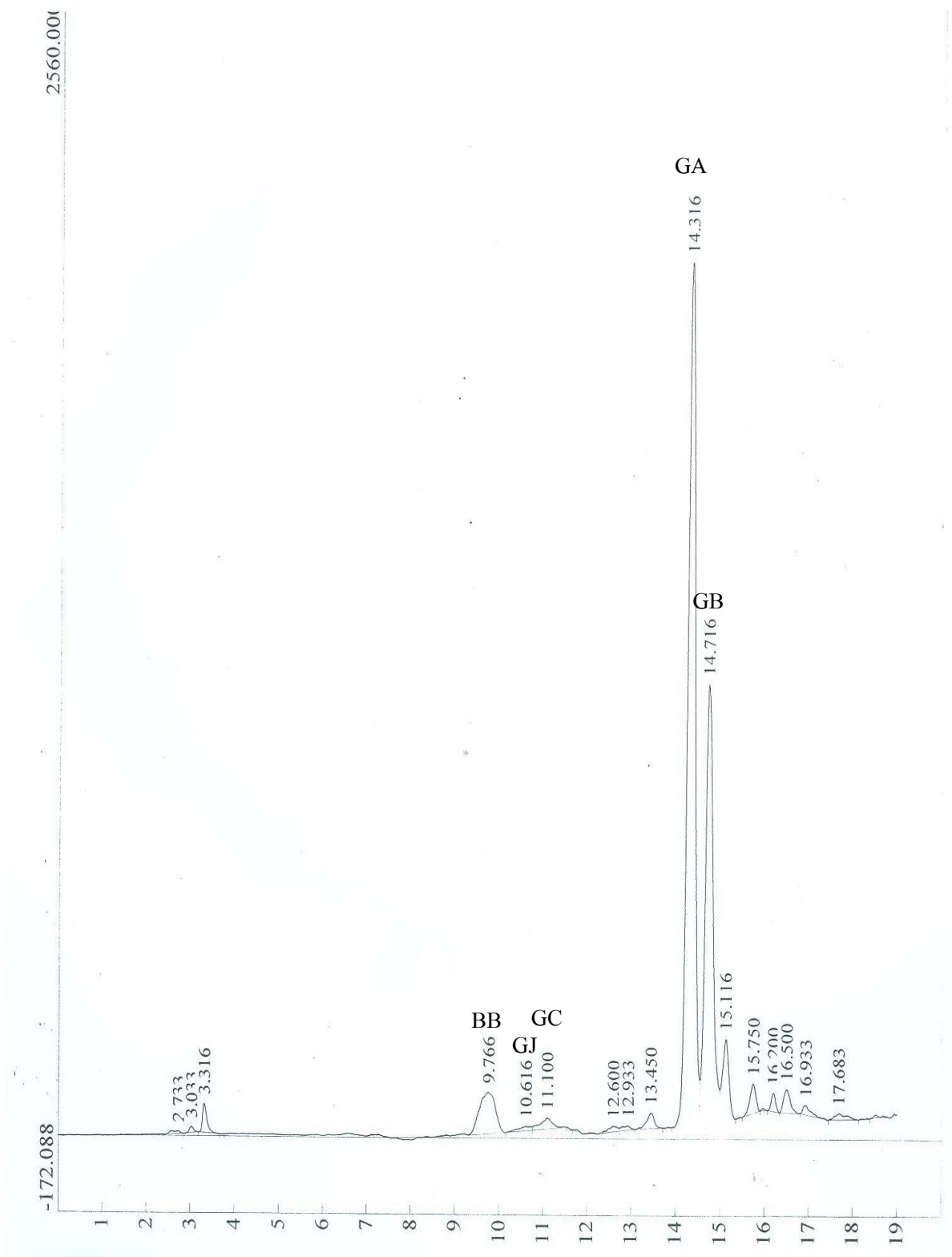
จากงานวิจัยได้วิเคราะห์ด้วย HPLC เป็นจำนวนหลายตัวอย่าง จึงแสดง HPLC Chromatogram มาแสดงพอสังเขปดังภาพที่ 4.19-4.21



ภาพที่ 4.19 HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ที่สกัดโดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ด้วยสาร Ethyl acetate (Phenomenex Luna Column ขนาด 250 mm × 4.6mm, flow rate of 1.51 ml/min,



ภาพที่ 4.20 HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ที่สกัดโดยเทคนิค Reflux ด้วยสาร Ethyl acetate  
(Phenomenex Luna Column ขนาด 250 mm × 4.6 mm, flow rate of 1.51 ml/min, ELS detector)



ภาพที่ 4.21 HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ที่สกัดโดยเทคนิค Reflux ที่เวลา 60 นาที ตามด้วยเทคนิคการ Ultrasonic assisted extraction (UAE) ด้วย Buffer pH 9 (Phenomenex Luna Column ขนาด 250 mm × 4.6 mm, flow rate of 1.51 ml/min, ELS detector)

จากภาพ HPLC Chromatogram แสดงให้เห็นถึง Retention time (RT) ของ Terpene lactones ซึ่งประกอบด้วย BB 9.2min, GJ 10.2 min, GC 10.9 min, GA 13.9 min และ GB 14.3 min จาก HPLC Chromatogram ของสารตัวอย่าง จะได้พื้นที่ใต้กราฟตามตารางที่ นำพื้นที่ใต้กราฟ (Area) และข้อมูลในตารางที่ มาคำนวณ Area/g DW (วิธีการคำนวณดูในภาคผนวก) ได้ค่าดังตารางที่ 4.24

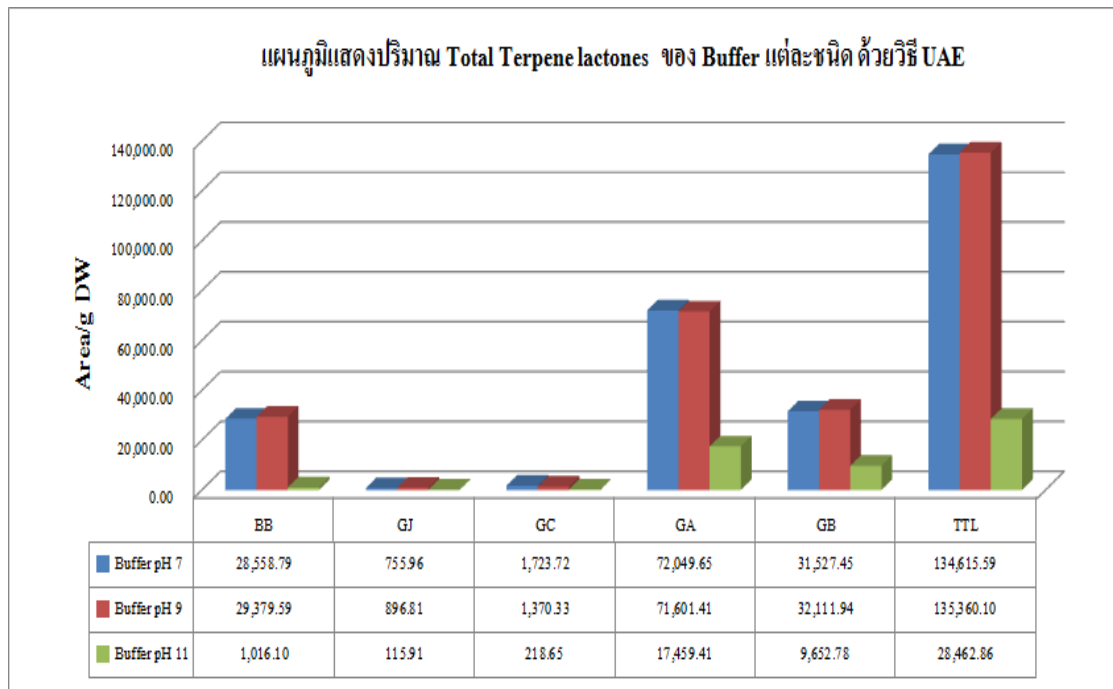
**ตารางที่ 4.24** แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW)

จาก HPLC Chromatogram ของ Terpenoids ของเทคนิค UAE

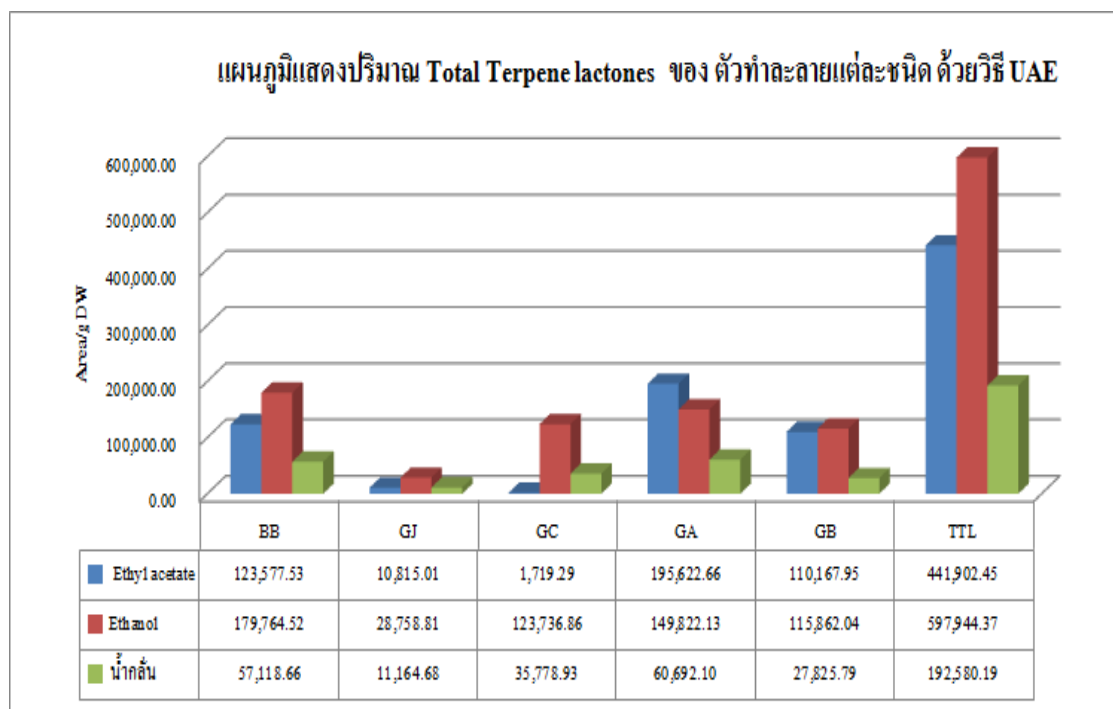
ตัวทำละลาย	BB	GJ	GC	GA	GB	TTLs
1.Buffer pH 7	28,558.7959	755.9626	1.723.7265	72,049.6527	31,527.4530	134,615.5907
2.Buffer pH 9	29,379.5933	896.8112	1.370.3355	71,601.4124	32,111.9481	135,360.1005
3.Buffer pH 11	1,016.1011	115.9057	218.6530	17,459.4123	9,652.7852	28,462.8573
4.Ethyl acetate	123,577.5337	10,815.0082	1.719.2983	195,622.6580	110,167.9485	441,902.4467
5. Ethanol	179,764.5212	28,758.8121	123,736.8591	149,822.1332	115,862.0402	597,944.3658
6. น้ำกลั่น	57,118.6638	11,164.6889	35,778.9336	60,692.1033	27,825.7973	192,580.1869

จากตารางที่ 4.24 นำมาสร้างแผนภูมิรูปแท่งแสดงปริมาณของ Total Terpene lactones (TTLs) ที่สกัดได้ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยให้ Area/g DW เป็นแกน Y และ ชนิดของสารสกัด Terpene lactones และ Total Terpene lactones (TTLs) ในแต่ละตัวทำละลาย เป็นแกน X ดังแสดงในภาพที่ 4.22 และภาพที่ 4.23





ภาพที่ 4.22 แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของ Buffer แต่ละชนิดด้วยเทคนิค UAE



ภาพที่ 4.23 แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของตัวทำละลายแต่ละชนิดด้วยเทคนิค UAE

จากภาพที่ 4.22 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ TTLs ที่ได้จากการนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆพบว่า Buffer pH 9 ให้ปริมาณ TTLs มากที่สุด ตามด้วย Buffer pH 7 และ Buffer pH 11 ตามลำดับและเมื่อพิจารณา Ginkgolide และ Bilobalide ในสารละลาย Buffer pH ข้างต้นได้ปริมาณสารสกัด GA มากที่สุด ตามด้วย BB, GB, GC และ GJ จากการทดลองจึงเลือกสารละลาย Buffer pH 9 มาทำการทดลองต่อในตอนๆที่ 3.3 และ 3.4 เนื่องจากให้ปริมาณ TTLs มากที่สุดและ จากภาพที่ 4.23 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ TTLs ที่ได้จากการนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ในตัวทำละลายต่างๆ พบว่า Ethanol ให้ปริมาณ TTLs มากที่สุด ตามด้วย Ethyl acetate และน้ำกลั่น ตามลำดับ และเมื่อพิจารณา Ginkgolide และ Bilobalide ในตัวทำละลายข้างต้น พบว่าได้ปริมาณสารสกัด GA มากที่สุด ตามด้วย GB, BB, GC และ GJ จากการทดลองจึงเลือกสารละลาย Ethanol มาทำการทดลองต่อในตอนๆที่ 3.3 และ 3.4 เนื่องจากให้ปริมาณ TTLs มากที่สุด

#### 4.3.2 ผลการวิจัยตอนที่ 3.2 การนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Reflux

จากวิธีการทดลองในข้อ 3.3.2 โดยการนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Reflux ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที โดยสกัดด้วยตัวทำละลายที่ 1-3 ต้องนำมาปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5 แล้วนำมาสกัดด้วย Dichloromethane ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่กรองได้โดยทำการไขชั้น Dichloromethane หรือชั้นล่างแล้วนำชั้นบนมาสกัดซ้ำอีกรอบแล้วเทรวมกัน ก่อนนำมาระเหยจนแห้ง ส่วนสกัดด้วยตัวทำละลายที่ 4-6 หลังจากกรองนำมาระเหยได้เลยได้ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.24ก

ตารางที่ 4.24ก แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวทำละลาย ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC ของเทคนิค Reflux

ตัวทำละลาย	น้ำหนักใบแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)
1. Buffer pH 7	5.0042	0.0071
2. Buffer pH 9	5.0160	0.0229
3. Buffer pH 11	5.0126	0.9117
4. Ethyl acetate	5.0038	0.5506
5. Ethanol	5.0007	1.0772
6. น้ำกลั่น	5.0035	1.7575

เมื่อนำสารละลายมาระเหยจนแห้งแล้วนำสารละลาย 50% Ethanol ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.25

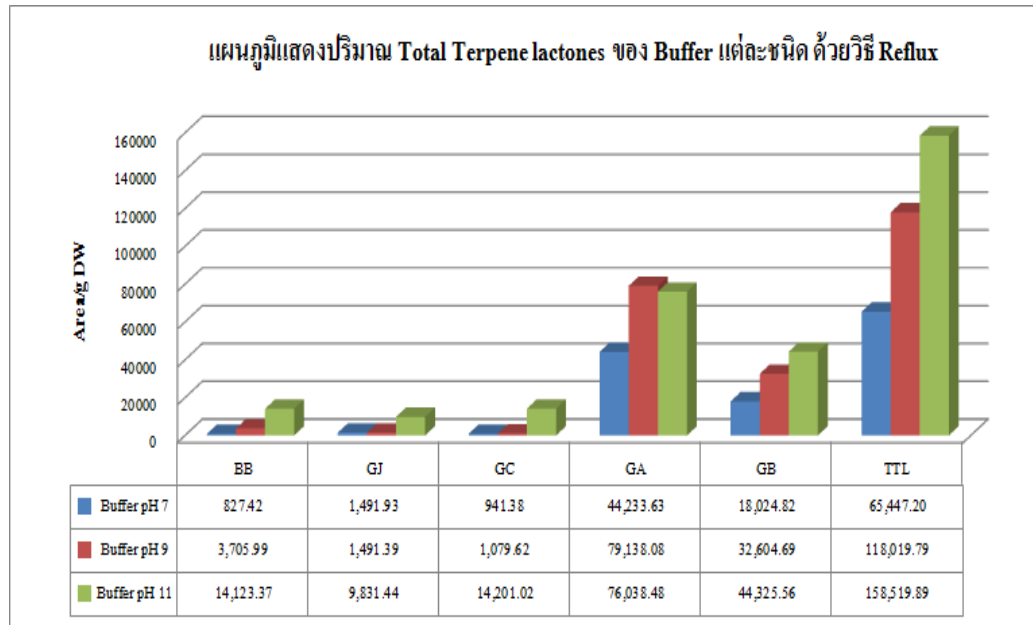
ตารางที่ 4.25 แสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogramของการทดลองที่ 2

ตัวทำละลาย	BB	GJ	GC	GA	GB
1. Buffer pH 7	103.5155	186.6480	117.7720	5,533.8490	2,254.9955
2. Buffer pH 9	464.7320	187.0205	135.3845	9,923.9160	4,088.6290
3. Buffer pH 11	2942990	204.8650	295.9170	1,584.4690	923.6440
4. Ethyl acetate	5,284.6490	804.2630	1,889.2875	3,947.4310	2,334.8845
5. Ethanol	3,139.1085	426.9610	2,558.9680	2,448.6805	1,844.6500
6. น้ำกลั่น	576.7000	431.5220	708.4885	976.7810	460.3750

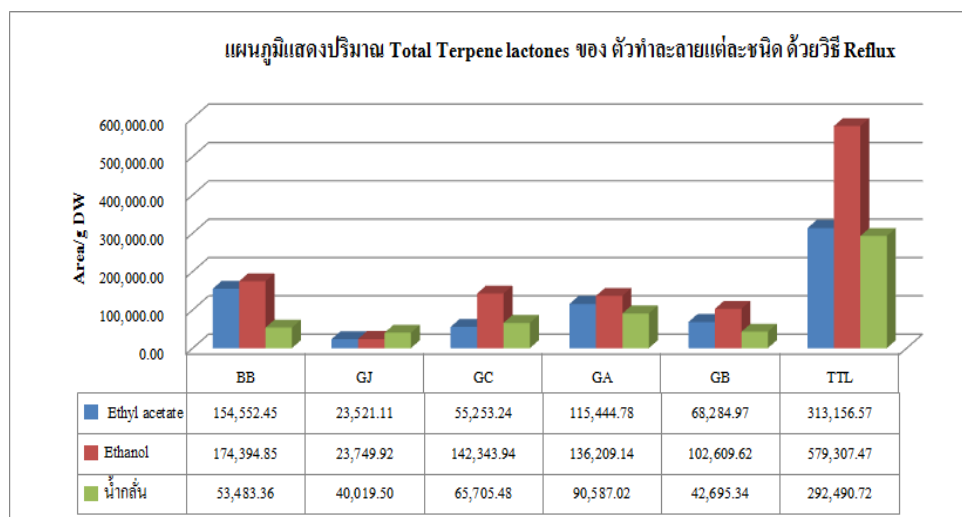
ตารางที่ 4.26 แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบเปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ของเทคนิค Reflux

ตัวทำละลาย	BB	GJ	GC	GA	GB	TTLs
1. Buffer pH 7	827.4289	1,491.9308	941.3852	44,233.6358	18,024.8232	65,447.2039
2. Buffer pH 9	3,705.9968	1,491.3916	1,079.6212	79,138.0861	32,604.6970	118,019.7927
3. Buffer pH 11	14,123.3747	9,831.4475	14,201.0224	76,038.4826	44,325.5680	158,519.8950
4. Ethyl acetate	154,552.4532	23,521.1117	55,253.2472	115,444.7807	68,284.9754	313,156.5682
5. Ethanol	174,394.8492	23,749.9294	142,343.9365	136,209.1365	102,609.6233	579,307.4749
6. น้ำกลั่น	53,483.3669	40,019.5066	65,705.4801	90,587.0238	42,695.3442	292,490.7216

จากตารางที่ 4.26 นำมาสร้างแผนภูมิรูปแท่งแสดงปริมาณของ Total Terpene lactones (TTLs) ที่สกัดได้ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยให้ Area/g DW เป็นแกน Y และ ชนิดของสารสกัด Terpene lactones และ Total Terpene lactones (TTLs) ในแต่ละตัวทำละลาย เป็นแกน X ดังแสดงในภาพที่ 4.24 และ 4.25



ภาพที่ 4.24 แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของ Buffer แต่ละชนิดของเทคนิค Reflux



ภาพที่ 4.25 แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของตัวทำละลายแต่ละชนิดของเทคนิค Reflux

จากภาพที่ 4.24 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ TTLs ที่ได้จากการนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Reflux ด้วยตัวทำละลายสารละลาย Buffer pH ต่างๆพบว่า Buffer pH 11 ให้ปริมาณ TTLs มากที่สุดตามด้วย Buffer pH 9 และ Buffer pH 7 ตามลำดับและเมื่อพิจารณา Ginkgolide และ Bilobalide ในสารละลาย Buffer pH ข้างต้น ได้ปริมาณสารสกัด GA มากที่สุดตามด้วย GB, BB, GC และ GJ จากการทดลองจึงเลือกสารละลาย Buffer pH 9 มาทำการทดลองต่อในตอน ที่ 3.3 และ 3.4 เนื่องจากให้ปริมาณ TTLs ใกล้เคียงกับ Buffer pH 11 ซึ่งในการทดลองตอนที่ 3.1 Buffer pH 11 ให้ปริมาณ TTLs น้อยที่สุด

จากภาพที่ 4.25 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ TTLs ที่ได้จากการนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Reflux ในตัวทำละลายต่างๆ พบว่า Ethanol ให้ปริมาณ TTLs มากที่สุดตามด้วย Ethyl acetate และ น้ำกลั่น ตามลำดับ และเมื่อพิจารณา Ginkgolide และ Bilobalide ในตัวทำละลายข้างต้น พบว่าได้ปริมาณสารสกัด BB มากที่สุดตามด้วย GA, GC, GB และ GJ จากการทดลองจึงเลือกสารละลาย Ethanol มาทำการทดลองต่อในตอน ที่ 3.3 และ 3.4 เนื่องจากให้ปริมาณ TTLs มากที่สุด

#### 4.3.3 ผลการวิจัยตอนที่ 3.3 การนำผงแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ตามด้วยเทคนิคการ Reflux

จากวิธีการทดลองการนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตามด้วยเทคนิคการ Reflux ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย Buffer โดยต้องนำมาปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5 แล้วนำมาสกัดด้วย Dichloromethane ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่กรองได้โดยทำการไขชั้น Dichloromethane หรือชั้นล่างแล้วนำชั้นบนมาสกัดซ้ำอีกรอบแล้วรวมกัน ก่อนนำมาระเหยจนแห้ง ส่วนสกัดด้วยตัวทำละลาย Ethanol หลังจากกรองนำมาระเหยได้เลยได้ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.27 ซึ่งในการทดลองนี้ เลือกใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ Buffer pH 9 และ Ethanol ที่พิจารณาจากปริมาณ TTLs จากการทดลองตอนที่ 3.1 และ ตอนที่ 3.2

ตารางที่ 4.27 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวทำละลาย ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC ของเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ตามด้วยเทคนิค Reflux

ตัวทำละลาย	น้ำหนักใบแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)
1. Buffer pH 9	5.0028	0.0130
2. Ethanol	5.0093	1.1287

เมื่อนำสารละลายมาระเหยจนแห้งแล้วนำสารละลาย 50% Ethanol ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.28

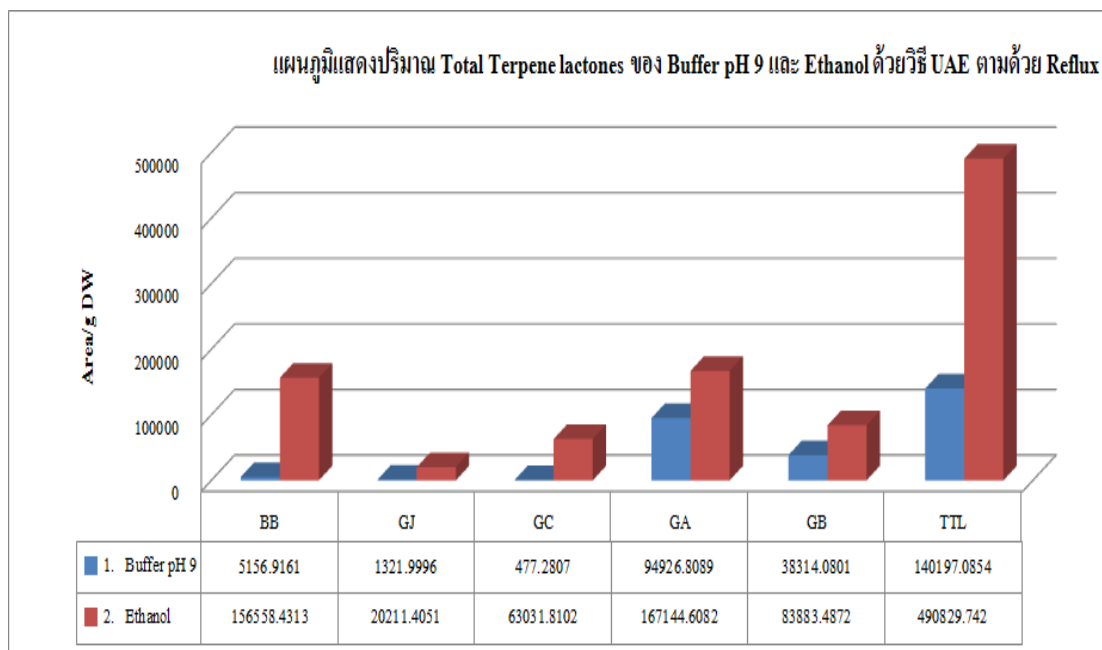
ตารางที่ 4.28 แสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ตามด้วยเทคนิค Reflux

ตัวทำละลาย	BB	GJ	GC	GA	GB
1. Buffer pH 9	644.9755	165.3425	59.6935	11,872.4960	4,791.9420
2. Ethanol	2,605.5910	336.3770	1,049.0340	2,781.7760	1,396.0670

ตารางที่ 4.29 แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ของเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ตามด้วยเทคนิค Reflux

ตัวทำละลาย	BB	GJ	GC	GA	GB	TTLs
1. Buffer pH 9	5,156.9161	1,321.9996	477.2807	94,926.8089	38,314.0801	140,197.0854
2. Ethanol	156,558.4313	20,211.4051	63,031.8102	167,144.6082	83,883.4872	490,829.7420

จากตารางที่ 4.29 นำมาสร้างแผนภูมิรูปแท่งแสดงปริมาณของ Total Terpene lactones (TTLs) ที่สกัดได้ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยให้ Area/g DW เป็นแกน Y และ ชนิดของสารสกัด Terpene lactones และ Total Terpene lactones (TTLs) ในแต่ละตัวทำละลาย เป็นแกน X ดังแสดงในภาพที่ 4.25



ภาพที่ 4.25ก แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของ Buffer pH 9 และ Ethanol ด้วยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ตามด้วยเทคนิค Reflux

จากภาพที่ 4.25ก เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ TTLs ที่ได้จากการนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดด้วยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ตามด้วยเทคนิคการ Reflux ด้วยตัวทำละลายสารละลาย Buffer pH 9 และ Ethanol พบว่า Ethanol ให้ปริมาณ TTLs มากกว่า สารละลาย Buffer pH 9 และเมื่อพิจารณา Ginkgolide และ Bilobalide ในสารละลายข้างต้น ได้ปริมาณสารสกัด GA มากที่สุด ตามด้วย BB, GB, GC และ GJ จากการทดลองนี้พบว่าปริมาณสาร TTLs ที่สกัดด้วยตัวทำละลายสารละลาย Buffer pH 9 ได้ปริมาณเพิ่มขึ้นแต่ในทางกลับกันเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายสารละลาย Ethanol ได้ปริมาณ TTLs น้อยลงคือ 490,829 Area/g DW เมื่อเทียบกับการทดลองตอนที่ 1 และ ตอนที่ 2 คือ 597,944.37 Area/g DW และ 579,307.48 Area/g DW ตามลำดับ

#### 4.3.4 ผลการวิจัยตอนที่ 3.4 การนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Reflux ที่เวลา 15, 30, และ 60 นาที ตามด้วยเทคนิคการ Ultrasonic assisted extraction (UAE)

จากวิธีการทดลองโดยการพัฒนาเทคนิคการสกัดจากการทดลองตอนที่ 3.1 และตอนที่ 3.2 เนื่องจากทำการทดลองตอนที่ 3.3 ผลที่ได้ไม่เป็นไปตามการคาดการณ์จึงต้องพัฒนาเทคนิคโดยนำการผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Reflux ที่เวลา 15, 30, และ 60 นาที ตามด้วยเทคนิคการ Ultrasonic assisted extraction (UAE) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย Buffer โดยต้องนำมาปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5 แล้วนำมาสกัดด้วย Dichloromethane ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่กรองได้ โดยทำการไขชั้น Dichloromethane หรือชั้นล่างแล้วนำชั้นบนมาสกัดซ้ำอีกรอบแล้วเทรวมกัน ก่อนนำมาระเหยจนแห้ง ส่วนสกัดด้วยตัวทำละลาย Ethanol หลังจากกรองนำมาระเหยได้เลยได้ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.30

**ตารางที่ 4.30** แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวทำละลาย ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC ของเทคนิค Reflux ตามด้วย Ultrasonic assisted extraction (UAE)

ตัวทำละลาย	น้ำหนักใบแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)
1. Buffer pH 9 Reflux 15 นาที	5.0024	0.0200
2. Buffer pH 9 Reflux 30 นาที	5.0173	0.0127
3. Buffer pH 9 Reflux 60 นาที	5.0208	0.0248
4. Ethanol Reflux 15 นาที	5.0039	1.0609
5. Ethanol Reflux 30 นาที	5.0069	1.0550
6. Ethanol Reflux 60 นาที	5.0012	0.9658

เมื่อนำสารละลายมาระเหยจนแห้งแล้วนำสารละลาย 50% Ethanol ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.31



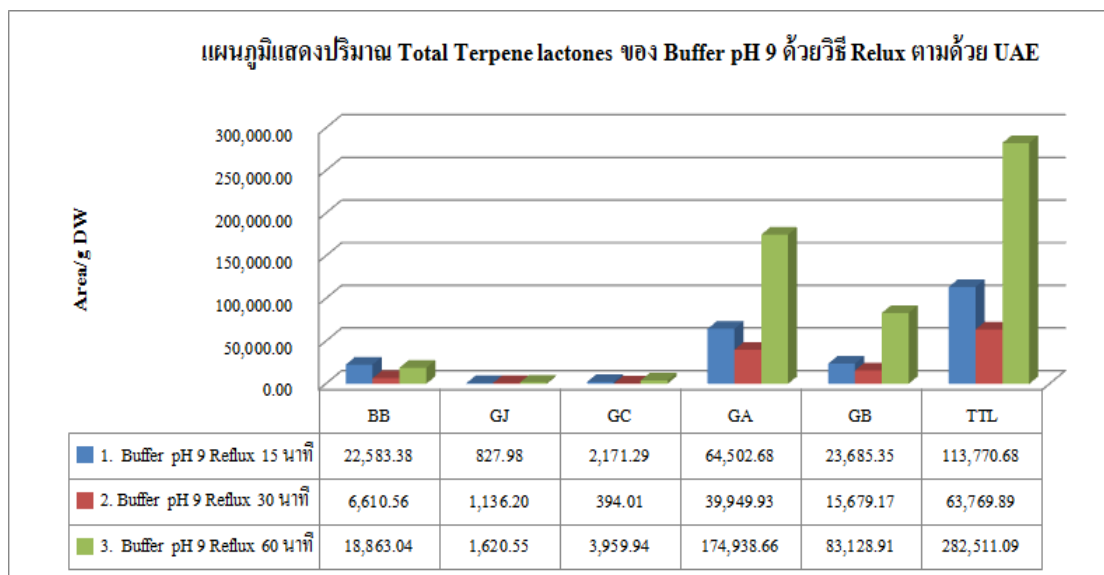
**ตารางที่ 4.31** แสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram ของเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ตามด้วยเทคนิค Reflux

ตัวทำละลาย	BB	GJ	GC	GA	GB
1. Buffer pH 9 Reflux 15 นาที	2,824.2770	103.5470	271.5420	8,066.7050	2,962.0900
2. Buffer pH 9 Reflux 30 นาที	829.1810	142.5160	49.4220	5,011.0195	1,966.6780
3. Buffer pH 9 Reflux 60 นาที	2,367.6890	203.4110	497.0515	21,958.3220	10,434.3405
4. Ethanol Reflux 15 นาที	3,066.9780	298.3590	828.5390	3,795.0545	2,051.8440
5. Ethanol Reflux 30 นาที	3,520.0255	368.2530	1,043.1370	4,122.2510	2,353.4600
6. Ethanol Reflux 60 นาที	3,714.5025	452.6530	1,156.2365	4,287.0920	2,410.4440

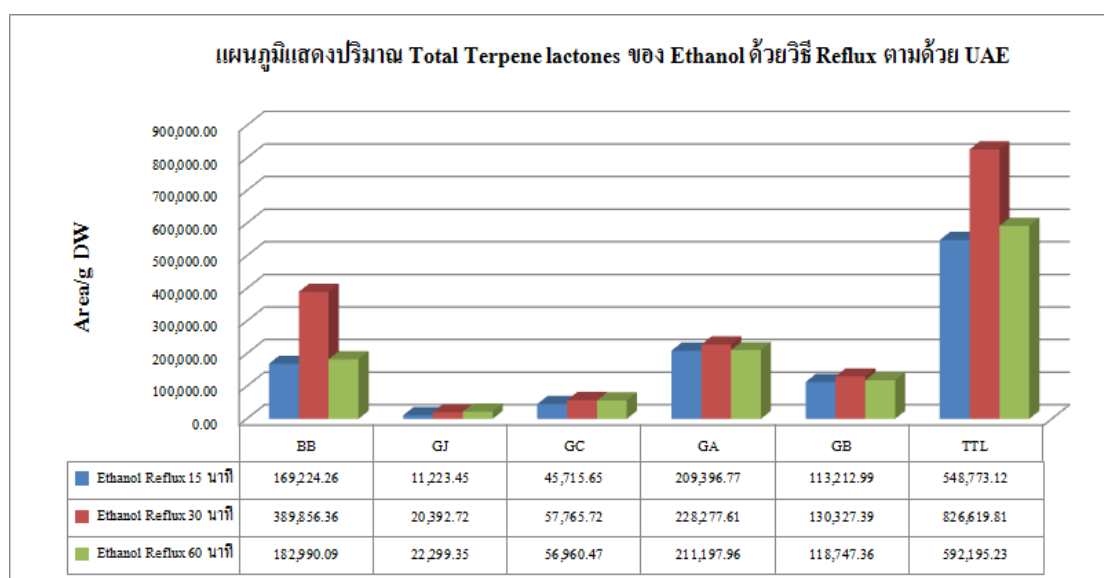
**ตารางที่ 4.32** แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ของเทคนิค Reflux ตามด้วยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) โดย R แทน Reflux

ตัวทำละลาย	BB	GJ	GC	GA	GB	TTLs
1. Buffer pH 9 R15min	22,583.3760	827.9785	2,171.2938	64,502.6790	23,685.3510	113,770.6783
2. Buffer pH 9 R30min	6,610.5754	1,136.1967	394.0127	39,949.9290	15,679.1741	63,769.8879
3. Buffer pH 9 R60min	18,863.0420	1,620.5465	3,959.9387	174,938.6552	83,128.9077	282,511.0899
4. Ethanol R15 min	169,224.2554	11,223.4502	45,715.6508	209,396.7652	113,212.9977	548,773.1194
5. Ethanol R 30 min	389,856.3609	20,392.7208	57,765.7253	228,277.6079	130,327.3913	826,619.8063
6. Ethanol R 30 min	182,990.0882	22,299.3556	56,960.4729	211,197.9581	118,747.3586	592,195.2335

จากตารางที่ 4.32 นำมาสร้างแผนภูมิรูปแท่งแสดงปริมาณของ Total Terpene lactones (TTLs) ที่สกัดได้ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยให้ Area/g DW เป็นแกน Y และ ชนิดของสารสกัด Terpene lactones และ Total Terpene lactones (TTLs) ในแต่ละตัวทำละลาย เป็นแกน X ดังแสดงในภาพที่ 4.26 และ 4.27



ภาพที่ 4.26 แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของ Buffer pH 9 ของเทคนิค Reflux ตามด้วยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE)



ภาพที่ 4.27 แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของ Ethanol ของเทคนิค Reflux ตามด้วยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE)

จากภาพที่ 4.26 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ TTLs ที่ได้จากการนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Reflux ที่เวลา 15, 30, และ 60 นาที ตามด้วยเทคนิคการ Ultrasonic assisted extraction(UAE) ด้วยตัวทำละลายสารละลาย Buffer pH 9 พบว่า Reflux ที่ 60 นาทีให้ปริมาณ TTLs มากที่สุดตามด้วย 15 และ 30 นาที ตามลำดับ และเมื่อพิจารณา Ginkgolide และ Bilobalide ในสารละลายข้างต้น ได้ปริมาณสารสกัด GA มากที่สุด ตามด้วย GB , BB, GC และ GJ ตามลำดับ

จากภาพที่ 4.27 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ TTLs ที่ได้จากการนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Reflux ที่เวลา 15, 30, และ 60 นาที ตามด้วยเทคนิคการ Ultrasonic assisted extraction(UAE) ด้วยตัวทำละลายสารละลาย Ethanol พบว่า Reflux ที่ 30 นาทีให้ปริมาณ TTLs มากที่สุดตามด้วย 60 และ 15 นาที ตามลำดับ และเมื่อพิจารณา Ginkgolide และ Bilobalide ในสารละลายข้างต้น ได้ปริมาณสารสกัด BB มากที่สุด ตามด้วย GA , GB, GC และ GJ ตามลำดับ

การคำนวณค่าความบริสุทธิ์ (Purity) จะคำนวณได้จาก % Area จากนั้นนำปริมาณของ TTLs และความบริสุทธิ์ไปสร้างเป็นตารางที่ 4.33 และ ตารางที่ 4.34

**ตารางที่ 4.33** เปรียบเทียบปริมาณของ TTLs และ Purity จากการทดลองตอนที่ 3.1 และตอนที่ 3.2

การทดลองที่	ลำดับที่	ตัวทำละลาย	TTLs (Area/g DW)	Purity (%)
3.1	1	Buffer pH 7	134,615.5907	94.1077
	2	Buffer pH 9	135,360.1005	93.3062
	3	Buffer PH 11	29,542.3741	80.9531
	4	Ethyl acetate	441,902.4467	34.6263
	5	Ethanol	597,944.3658	10.4881
	6	น้ำกลั่น	192,580. 1869	3.1094

ตารางที่ 4.34 เปรียบเทียบปริมาณของ TTLs และ Purityจากการทดลองตอนที่ 3.2

การทดลองที่	ลำดับที่	ตัวทำละลาย	TTLs (Area/g DW)	Purity (%)
3.2	7	Buffer pH 7	65,447.2039	90.8339
	8	Buffer pH 9	118,019.7927	90.397
	9	Buffer pH 11	158,519.8950	2.7874
	10	Ethyl acetate	313,156.5682	23.4026
	11	Ethanol	579,307.4749	8.6417
	12	น้ำกลั่น	292,490.7216	2.5923

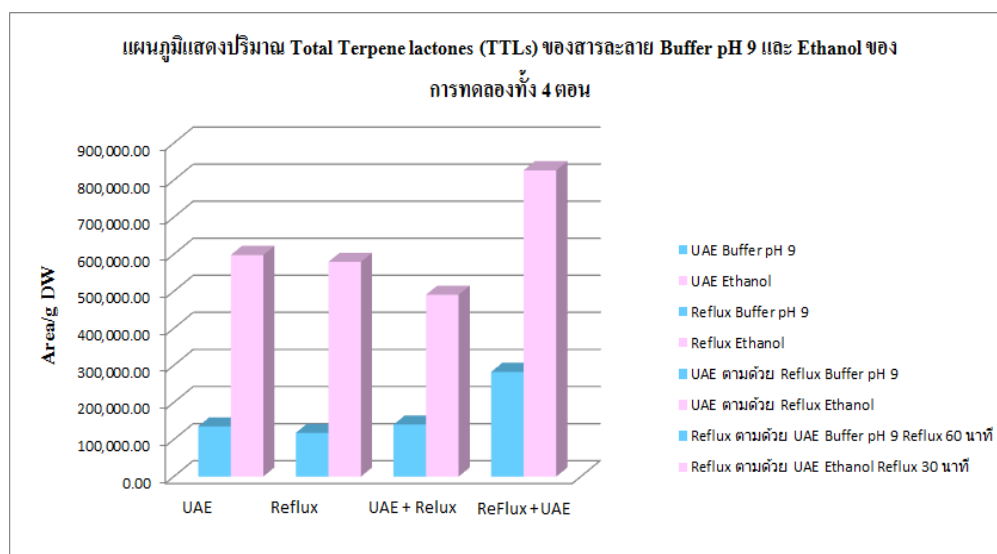
จากตารางที่ 4.34 เมื่อพิจารณา Total Terpene lactones (TTLs) พบว่าจากการทดลองตอนที่ 3.1 สกัดด้วยตัวทำละลายสารละลาย Ethanol โดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction(UAE) ได้ปริมาณ TTLs มากที่สุด ตามด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายสารละลาย Ethanol โดยเทคนิค Reflux และการสกัดด้วยตัวทำละลายสารละลาย Ethyl acetate โดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction(UAE) ตามลำดับและเมื่อพิจารณาความบริสุทธิ์พบว่าจากการทดลองตอนที่ 3.1 และ 3.2 สกัดด้วย Buffer pH 7 มีความบริสุทธิ์มากที่สุด ตามด้วย Buffer pH 9 รองลงมา

ตารางที่ 4.35 เปรียบเทียบปริมาณของ Total Terpene lactones และ Purity จากการทดลองที่ 3.3 และ 3.4

การทดลองที่	ลำดับที่	ตัวทำละลาย	TTLs (Area/g DW)	Purity (%)
3	1	Buffer pH 9	138,397.8051	92.6116
	2	Ethanol	490,746.5179	7.4606

4	3	Buffer pH 9 Reflux 15 นาที	112,942.6998	86.6817
	4	Buffer pH 9 Reflux 30 นาที	47,211.1379	87.0655
	5	Buffer pH 9 Reflux 60 นาที	282,511.0899	88.3332
	6	Ethanol Reflux 15 นาที	548,773.1194	8.1326
	7	Ethanol Reflux 30 นาที	826,619.8063	8.4879
	8	Ethanol Reflux 60 นาที	592,195.2335	9.2899

จากตารางที่ 4.35 เมื่อพิจารณา Total Terpene lactones (TTLs) พบว่าจากการทดลองตอนที่ 3.4 สกัดด้วยตัวทำละลายสารละลาย Ethanol โดยเทคนิค Reflux ตามด้วย Ultrasonic assisted extraction (UAE) พบว่าเทคนิค Reflux ที่ 30 นาที 60 นาที และ 15 นาที ได้ปริมาณ TTLs มากที่สุดตามลำดับ เมื่อพิจารณาความบริสุทธิ์พบว่าในการทดลองที่ 3.3 พบว่าเมื่อสกัดโดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ตามด้วยเทคนิคการ Reflux ด้วยตัวทำละลาย Buffer pH 9 มีความบริสุทธิ์มากที่สุด ตามด้วยในการทดลองที่ 3.4 สกัดด้วย Buffer pH 9 โดยเทคนิค Reflux 60 นาที แล้วตามด้วย เทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) มีความบริสุทธิ์รองลงมา



ภาพที่ 4.28 แสดงปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของสารละลาย Buffer pH 9 และ Ethanol ของการทดลองทั้ง 4 ตอน

จากภาพที่ 4.28 แสดงแผนภูมิถึงการเปรียบเทียบปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) ของสารละลาย Buffer pH 9 และ Ethanol ของการทดลองทั้ง 4 ตอนพบว่า ในการทดลองตอนที่ 3.4 การสกัดด้วยสารละลาย Buffer pH 9 โดยเทคนิค Reflux 60 นาที ตามด้วยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) 15 นาที ให้ปริมาณ TTLs มากที่สุด และเมื่อสกัดด้วยสารละลาย Ethanol โดยเทคนิค Reflux 30 นาที ตามด้วยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) 15 นาที ให้ปริมาณ TTLs มากที่สุด เมื่อเทียบกับการทดลองอื่นๆ

#### 4.3.5 อภิปรายผลการวิจัยตอนที่ 3

##### ประเด็นที่ 1 ปริมาณสารสกัด Terpene lactones ที่สกัดได้ในแต่ละวิธี

จากการทดลองตอนที่ 1 การนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) ด้วยตัวทำละลาย Ethyl acetate, Ethanol, น้ำกลั่น และสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7, 9, 11 เมื่อใช้วิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย Ethanol พบว่าให้ปริมาณสารสกัด TTLs ออกมาในปริมาณมากที่สุด เนื่องจาก Ethanol มีค่าความมีขั้ว (Dielectric constant) เท่ากับ 24.3 ตามหลักการละลายของสารในตัวทำละลาย สารละลายจะละลายได้ดี ก็ต่อเมื่อ สารทั้ง 2 มีค่าความมีขั้วใกล้เคียงกัน จึงกล่าวได้ว่า Ethanol และสาร Terpene lactones มีค่าความมีขั้วใกล้เคียงกัน จึงทำให้สารสกัด TTLs ละลายออกมาในปริมาณมากที่สุด ตามด้วยสกัดด้วยสารละลาย Ethyl acetate และ น้ำกลั่น ตามลำดับ น่าจะเป็นไปได้ว่าสารละลายทั้ง 2 ชนิดนี้มีขั้วต่างจากสาร Terpene lactones จึงทำให้ปริมาณ TTLs ที่ได้น้อยลง ถ้าใช้ตัวทำละลายสารละลายกลุ่มบัฟเฟอร์ พบว่าสารละลาย Buffer pH 9 ให้ปริมาณสารสกัด TTLs มากที่สุด เนื่องจากสารละลาย Buffer pH 9 อยู่ในรูป Deprotonated form ที่เหมาะสม จึงทำให้สาร Terpene lactones สกัดออกมาได้ปริมาณมาก ตามด้วยสารละลาย Buffer pH 7 เนื่องจากมีความเป็นกลาง จึงทำให้ไม่อยู่ในรูป Deprotonated form ที่เหมาะสมในการสกัด TTLs ออกมาได้ปริมาณที่ลดลง และสารละลาย Buffer pH 11 อยู่ในรูปของ Deprotonated form ซึ่งมีสภาวะความเป็นเบสสูงจึงทำให้สารสกัด TTLs ได้ปริมาณน้อย

จากการทดลองตอนที่ 3.2 การนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Reflux พบว่าการ Reflux ในเวลา 60 นาทีด้วย Ethanol ให้ปริมาณ TTLs ออกมาในปริมาณมากที่สุด เป็นไปตามหลักการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1

จากการทดลองตอนที่ 3.3 การนำผงแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction(UAE) ตามด้วยเทคนิคการ Reflux พบว่าเมื่อทำการ Sonicate เป็นเวลา 15 นาทีแล้วนำมาทำการ Reflux ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพบว่าการสกัดโดยใช้ Ethanol ให้ปริมาณ TTLs ออกมาในปริมาณที่ลดลงเมื่อเทียบกับการทดลองตอนที่ 3.1 และ 3.2 คาดว่าเป็นผลเนื่องมาจากความร้อนที่มาจากการ Reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อาจทำให้โมเลกุลของสารสกัด TTLs เกิดการแตกตัว จึงทำให้ปริมาณสารสกัด TTLs ที่ได้ลดลง ในขณะที่การสกัดโดยใช้บัฟเฟอร์ pH 9 แม้จะได้ปริมาณ TTLs มากกว่าการทดลองตอนที่ 3.1 และ 3.2 แต่เป็นการเพิ่มขึ้นในปริมาณเพียงเล็กน้อย จึงได้ทำการพัฒนาการสกัดต่อไปในการทดลองตอนที่ 3.4

จากการทดลองตอนที่ 3.4 การนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Reflux เป็นช่วงเวลาที่ต่างกันคือ 15 นาที 30 นาที และ 1 ชั่วโมง ตามด้วยการ Sonicate เป็นเวลา 15 นาที พบว่า Ethanol ที่ผ่านการ Reflux เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไป Sonicate 15 นาทีให้ปริมาณ TTLs ออกมาในปริมาณมากที่สุด เมื่อเทียบทั้งการทดลองที่ 3.1, 3.2 และ 3.3 เนื่องจากการ Sonicate ในเวลาที่เหมาะสมและนำมาผ่านการให้ความร้อนจากการ Reflux ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที จึงทำให้ TTLs ละลายออกมาในชั้นน้ำได้ดีขึ้น จึงทำให้ปริมาณ TTLs ที่สกัดได้มีปริมาณมากถึง 826,619.81Area/g DW ซึ่งเป็นปริมาณที่มากที่สุด

**ตารางที่ 4.36** แสดงการปริมาณ Total Terpene lactones (TTLs) จากปริมาณมากไปหาน้อย

ลำดับที่	ปริมาณ Terpene lactones (Area/g DW)	ตัวทำละลายที่ใช้	วิธีการสกัด
1	826,619.8063	Ethanol Reflux 30 นาที	ตอนที่ 4 (Reflux ตามด้วย UAE)
2	597,944.3658	Ethanol	ตอนที่ 1(UAE)
3	592,195.2335	Ethanol Reflux 60 นาที	ตอนที่ 4 (Reflux ตามด้วย UAE)
4	579,307.4749	Ethanol	ตอนที่ 2 (Reflux)
5	548,773.1194	Ethanol Reflux 15 นาที	ตอนที่ 4 (Reflux ตามด้วย UAE)
6	490,746.5179	Ethanol	ตอนที่ 3 (UAE ตามด้วย Reflux)
7	441,902.4467	Ethyl acetate	ตอนที่ 1 (UAE)
8	313,156.5682	Ethyl acetate	ตอนที่ 2 (Reflux)
9	292,490.7216	น้ำกลั่น	ตอนที่ 2 (Reflux)
10	282,511.0899	Buffer pH 9 Reflux 60 นาที	ตอนที่ 4 (Reflux ตามด้วย UAE)

11	192,580.1869	น้ำกลั่น	ตอนที่ 1 (UAE)
12	158,519.8950	Buffer PH 11	ตอนที่ 2 (Reflux)
13	138,397.8051	Buffer pH 9	ตอนที่ 3 (UAE ตามด้วย Reflux)
14	135,360.1005	Buffer pH 9	ตอนที่ 1 (UAE)
15	134,615.5907	Buffer pH 7	ตอนที่ 1 (UAE)
16	118,019.7927	Buffer pH 9	ตอนที่ 2 (Reflux)
17	112,942.6998	Buffer pH 9 Reflux 15 นาที	ตอนที่ 4 (Reflux ตามด้วย UAE)
18	65,447.2039	Buffer pH 7	ตอนที่ 2 (Reflux)
19	47,211.1379	Buffer pH 9 Reflux 30 นาที	ตอนที่ 4 (Reflux ตามด้วย UAE)
20	29,542.3741	Buffer pH 11	ตอนที่ 1 (UAE)

จากตารางแสดงให้เห็นว่า Ethanol เป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุด เพราะให้ปริมาณสารสกัด TTLs ออกมาในปริมาณมากที่สุดของตาราง โดยลำดับที่ 1–6 นั้นจะเป็นการสกัดโดยใช้ Ethanol ในขณะที่สารละลายบัฟเฟอร์กลับให้ปริมาณสารสกัด TTLs ออกมาในปริมาณที่ต่างออกไปคือ กล่าวคือสารละลายบัฟเฟอร์ที่ให้ปริมาณ TTLs ดีที่สุดคือ Buffer pH 9 โดยเทคนิค Reflux 60 นาที ให้ผลออกมาในลำดับที่ 10 ของตาราง ในขณะที่บัฟเฟอร์ที่เหลือ ให้ปริมาณ TTLs ออกมาในลำดับที่ 12 ของตารางไปจนถึงลำดับท้ายสุดคือ ลำดับที่ 20

## ประเด็นที่ 2 ความบริสุทธิ์ (Purity)

จากการทดลองต่างๆ พบว่าการเลือกใช้เทคนิคการสกัดที่ต่างกันและชนิดของตัวทำละลาย หรือสารละลายบัฟเฟอร์ pH ที่ต่างกันมีผลต่อความบริสุทธิ์ของสารสกัดที่ได้แตกต่างกันออกไปดังตารางที่ 4.37 ดังนี้

ตารางที่ 4.37 แสดงการปริมาณ Purity (%) ที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ จากปริมาณมากไปหาน้อย

ลำดับที่	Purity (%)	ตัวทำละลายที่ใช้	วิธีการสกัด
1	94.1077	Buffer pH 7	ตอนที่ 1 (UAE)
2	93.3062	Buffer pH 9	ตอนที่ 1 (UAE)
3	92.6116	Buffer pH 9	ตอนที่ 3 (UAE ตามด้วย Reflux)



4	90.8339	Buffer pH 7	ตอนที่ 2 (Reflux)
5	90.3970	Buffer pH 9	ตอนที่ 2 (Reflux)
6	88.3332	Buffer pH 9 Reflux 60 นาที	ตอนที่ 4 (Reflux ตามด้วย UAE)
7	87.0655	Buffer pH 9 Reflux 30 นาที	ตอนที่ 4 (Reflux ตามด้วย UAE)
8	86.6817	Buffer pH 9 Reflux 15 นาที	ตอนที่ 4 (Reflux ตามด้วย UAE)
9	80.9531	Buffer PH 11	ตอนที่ 1 (UAE)
10	34.6263	Ethyl acetate	ตอนที่ 1 (UAE)
11	23.4026	Ethyl acetate	ตอนที่ 2 (Reflux)
12	10.4881	Ethanol	ตอนที่ 1 (UAE)
13	9.2899	Ethanol Reflux 60 นาที	ตอนที่ 4 (Reflux ตามด้วย UAE)
14	8.6417	Ethanol	ตอนที่ 2 (Reflux)
15	8.4879	Ethanol Reflux 30 นาที	ตอนที่ 4 (Reflux ตามด้วย UAE)
16	8.1326	Ethanol Reflux 15 นาที	ตอนที่ 4 (Reflux ตามด้วย UAE)
17	7.4606	Ethanol	ตอนที่ 3 (UAE ตามด้วย Reflux)
18	3.1094	น้ำกลั่น	ตอนที่ 1 (UAE)
19	2.7874	Buffer PH 11	ตอนที่ 2 (Reflux)
20	2.5923	น้ำกลั่น	ตอนที่ 2 (Reflux)

จากตารางแสดงให้เห็นว่า สารละลายกลุ่มบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในแง่ของการให้ความบริสุทธิ์แก่การสกัด TTLs ออกจากผงแปะก๊วยโดยลำดับที่ 1- 9 ของตารางแสดงให้เห็นว่าสารละลายบัฟเฟอร์ให้ปริมาณความบริสุทธิ์ของการสกัดมากที่สุด ในขณะที่สารละลายจำพวก Ethanol, Ethyl acetate และน้ำกลั่นให้ผลในลำดับที่ต่างออกไป โดยแสดงลำดับความบริสุทธิ์ที่ได้ตามตารางข้างต้น

#### 4.4 ผลวิจัยและอธิบายผลการทดลองตอนที่ 4 การทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารสกัดใบแปะก๊วยด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

##### 4.4.1 ผลวิจัยตอนที่ 4.1 การศึกษาตัวทำละลายและสารตัวชะที่เหมาะสม

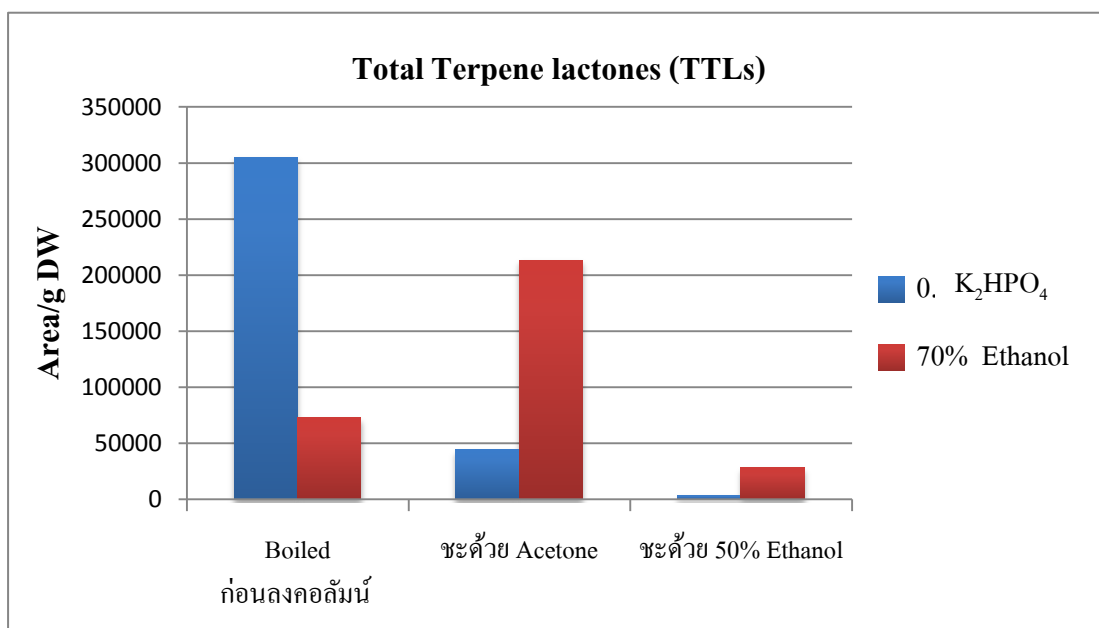
ผลการศึกษาตัวทำละลายและสารตัวชะของคอลัมน์ที่เหมาะสม โดยเริ่มจากการต้มใบแปะก๊วย 20 กรัม ในตัวทำละลายระหว่าง 0.1 %  $K_2HPO_4$  กับ 70% Ethanol อย่างละ 300 ml เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำ

การบรรจุลงคอลัมน์แบบเปียก(Slurry) เมื่อเข้าสู่การชะจะใช้สารระหว่าง50% Ethanol กับ Acetone เป็นตัวชะ สารที่หลุดจากคอลัมน์ จะนำมาทำการระเหยแห้ง สารที่ระเหยแห้งแล้วนำมาละลายใน 50%Ethanol ปริมาตร 2 mL แบ่งฉีด HPLC เทียบผลการทดลองตามตัวอย่าง Chromatogramในภาพที่ 4.3 หมายเลข 1 2 3 และ 4 คือ BB GJ GC GA และ GB ตามลำดับ ซึ่งก็พื้นที่ใต้กราฟที่สนใจ นำมาคำนวณเป็นพื้นที่ต่อ 1 กรัมใบแห้งและแสดงดังตารางที่ 4.38

**ตารางที่ 4.38** แสดงการเปรียบเทียบปริมาณสารเทอร์ปีนแลคโตนในตัวทำละลายและสารตัวชะ

TTLs	ปริมาณสารสกัดเทอร์ปีนแลคโตน (Area/g DW)					
	ใบแปะก๊วยต้มใน 0.1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			ใบแปะก๊วยต้มใน 70%Ethanol		
	Boiled ก่อนลง คอลัมน์	ชะด้วย Acetone	ชะด้วย 50%Ethanol	Boiled ก่อนลง คอลัมน์	ชะด้วย Acetone	ชะด้วย 50%Ethanol
BB	65,793.0807	17,734.4556	1,285.1031	23,951.6018	54,942.2836	8,352.6015
GJ	25.6470	2,718.3309	364.3933	3,367.0837	12,508.9869	3,961.2144
GC	61,630.9750	3,668.1296	918.1247	8,847.0232	22,907.9419	6,527.8737
GA	108,234.3406	14,927.2710	786.8633	21,936.9174	90,807.6999	7,417.9518
GB	67,539.1024	5,182.3213	347.4149	14,859.8653	32,129.4357	1,896.4360
Total	305,354.1265	44,230.5084	3,701.8993	72,962.4914	213,296.3480	28,156.0774

จากตารางที่ 4.38 นำมาสร้างแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมด (TTLs) ที่สกัดได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยให้ Area/g DWเป็นแกน Y และวิธีการเป็นแกน X แสดงดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.29 แผนภูมิแสดงปริมาณของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมด

จากการศึกษาตัวทำละลายและสารตัวชะในภาพที่ 4.29 จะเห็นได้ว่าการสกัดใบแปะก๊วยโดยต้มในตัวทำละลายระหว่าง 0.1%  $K_2HPO_4$  กับ 70% Ethanol ปริมาณสารเทอร์ปีนแลคโตนที่ต้มด้วย 0.1%  $K_2HPO_4$  มีปริมาณมากกว่าที่ต้มด้วย 70% Ethanol เมื่อนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ Activated charcoal สารสกัดที่ชะด้วย Acetone ให้ปริมาณสารเทอร์ปีนแลคโตนมากกว่าการชะด้วย 50% Ethanol ถึงแม้ว่าในตัวทำละลาย 70 % Ethanol ที่ใช้ต้มจะให้ปริมาณสารเทอร์ปีนแลคโตนน้อยกว่า 0.1%  $K_2HPO_4$  แต่เมื่อบรรจุลงคอลัมน์โครมาโตกราฟี ปริมาณสารเทอร์ปีนแลคโตนที่ได้มีมากกว่าที่ต้มใน 0.1%  $K_2HPO_4$

ในส่วนของการฟื้นคืนการคืนกลับ (% recovery) จะสามารถคำนวณได้จากพื้นที่ใต้กราฟของเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดต่อน้ำหนักใบแห้ง 1 กรัม หลังลงคอลัมน์ หาดด้วย ก่อนลงคอลัมน์ แสดงดังตารางที่ 4.39

ตารางที่ 4.39 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมด

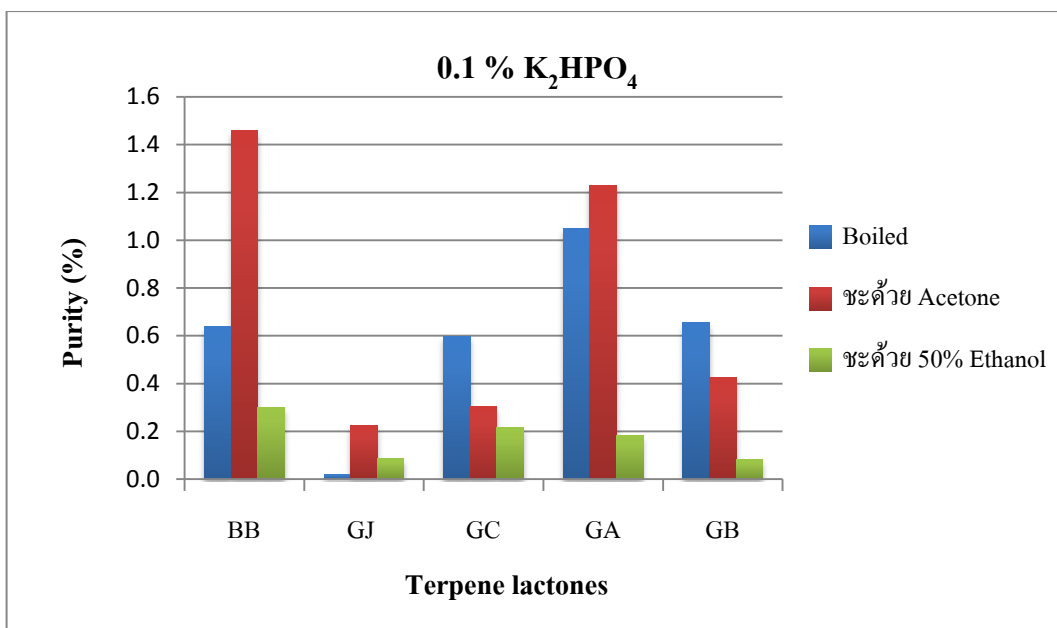
วิธีการ	แปะก๊วยต้มใน 0.1 % $K_2HPO_4$		แปะก๊วยต้มใน 70 %Ethanol	
	ชะด้วย Acetone	ชะด้วย 50%Ethanol	ชะด้วย Acetone	ชะด้วย 50%Ethanol
%recovery	14.5880	1.2210	292.3370	38.5898

ความบริสุทธิ์ (Purity) คือ อัตราส่วนระหว่างArea สารที่สนใจ และArea ทั้งหมดในการฉีด HPLC คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ จากคำนิยามข้างต้นจึงนำมาสู่การหาความบริสุทธิ์ เพื่อเปรียบเทียบระหว่างสารตัวทำละลายและสารตัวชะแสดงดังตารางที่ 4.39

ตารางที่ 4.40 แสดงการเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแลคโตน

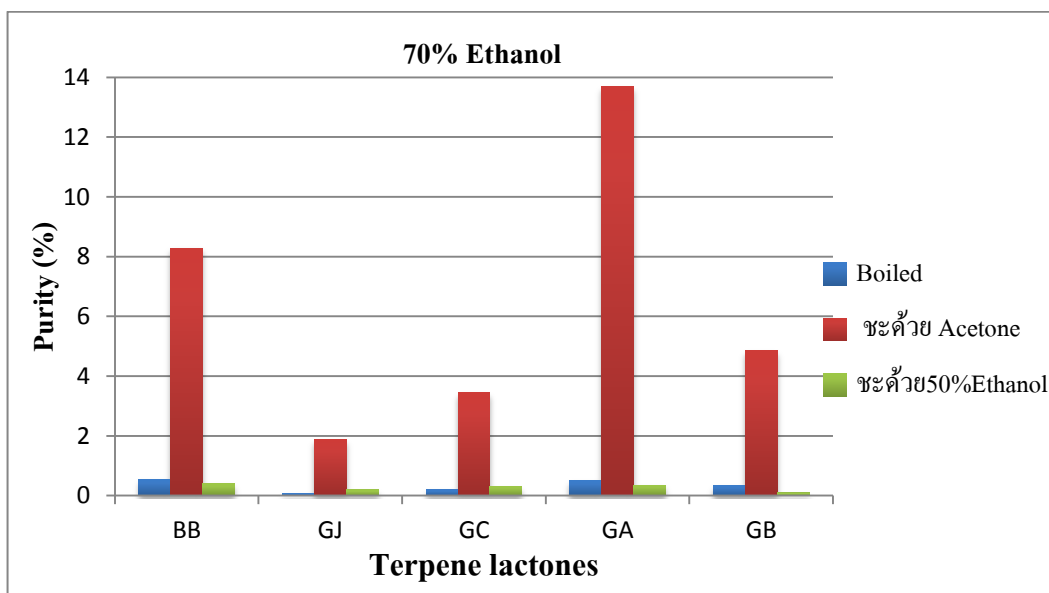
TTLs	ความบริสุทธิ์ (%)					
	ใบแปะก๊วยต้มใน 0.1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			ใบแปะก๊วยต้มใน 70%Ethanol		
	Boiled ก่อนลงคอลัมน์	ชะด้วย Acetone	ชะด้วย 50%Ethanol	Boiled ก่อนลงคอลัมน์	ชะด้วย Acetone	ชะด้วย 50%Ethanol
BB	0.6389	1.4599	0.3007	0.5405	8.2773	0.3908
GJ	0.0208	0.2238	0.0853	0.0760	1.8845	0.1854
GC	0.5985	0.3020	0.2148	0.1997	3.4512	0.3055
GA	1.0510	1.2288	0.1841	0.4969	13.6806	0.3471
GB	0.6558	0.4266	0.0813	0.3366	4.8404	0.0887
Total	2.9650	3.6411	0.8662	1.6497	32.1340	1.3175

จากตารางที่ 4.40 นำมาสร้างแผนภูมิแท่งแสดงความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแลคโตนที่สกัดได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยให้ Purity (%) เป็นแกน Y และTerpene lactones เป็นแกน X แสดงดังภาพต่อไปนี้



ภาพที่ 4.30 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ใน 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

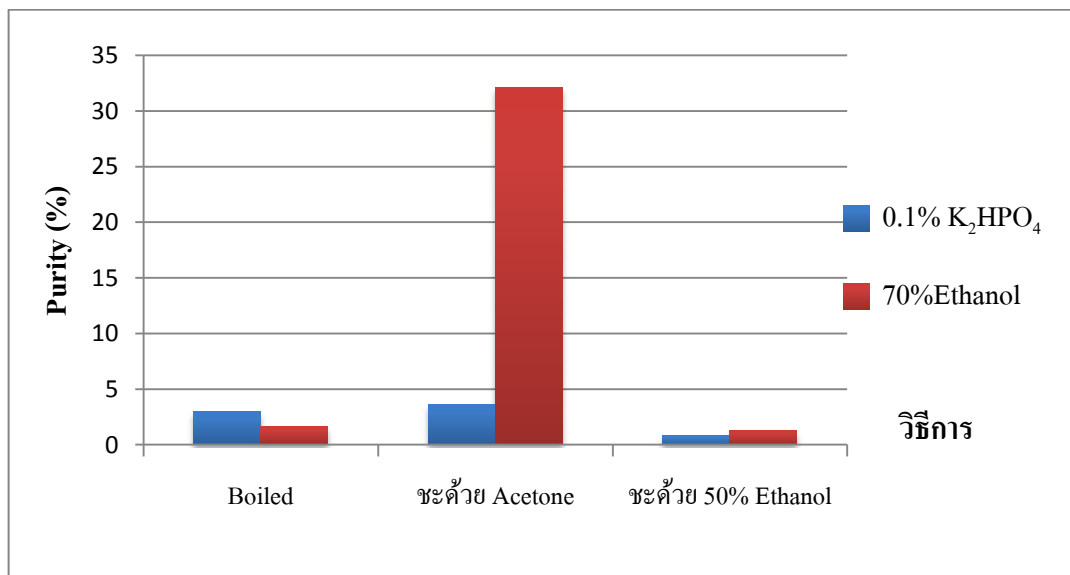
จากภาพที่ 4.30 เห็นได้ว่าสารที่ชะด้วย Acetone ทำให้ BB, GJ และ GA มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากการต้มด้วย 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> และสารที่ชะด้วย 50 % Ethanol ทำให้ GJ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นแต่ยังมีค่าน้อยกว่าการชะด้วย Acetone



ภาพที่ 4.31 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ ใน 70% Ethanol

จากรูปที่ 4.31 เห็นได้ว่าสารที่ชะด้วย Acetone ทำให้สารเทอร์ปีนแลคโตนมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากการต้ม 70 % Ethanol และสารที่ชะด้วย 50 % Ethanol ทำให้ GJ และ GC มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นแต่ยังมีค่าน้อยกว่าการชะด้วย Acetone

เพื่อการพิจารณาวิธีการในการเลือกตัวทำละลายและตัวชะที่เหมาะสมในการทดลองขั้นตอนต่อไป จึงได้นำค่าความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดมาเปรียบเทียบ ดังภาพที่ 4.32 โดยกำหนดให้ Purity (%) เป็นแกน Y และวิธีการเป็นแกน X



ภาพที่ 4.32 แผนภูมิแสดงค่าความบริสุทธิ์ จากการศึกษาค่าตัวทำละลายและสารตัวชะที่เหมาะสม

จากภาพที่ 4.32 เห็นได้ว่าการสกัดใบแปะก๊วยโดยการต้มในตัวทำละลาย 0.1%  $K_2HPO_4$  ให้ค่าความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแลคโตนมากกว่าการต้มในตัวทำละลาย 70% Ethanol เมื่อนำมาบรรจุลงคอลัมน์ พบว่าการต้มกับ 70 % Ethanol แล้วชะด้วย Acetone ให้ค่าความบริสุทธิ์มากกว่าการต้มใน 0.1%  $K_2HPO_4$  แล้วชะด้วย Acetone ซึ่งเมื่อชะด้วย 50% Ethanol ให้ผลเช่นเดียวกันแต่น้อยกว่า Acetone

จากผลการทดลองข้างต้น ทำให้ตัดสินใจเลือกวิธีการสกัดโดยการต้มกับ 70 % Ethanol แล้วนำไปชะด้วย Acetone เพื่อนำไปสู่การทดลองขั้นตอนต่อไป

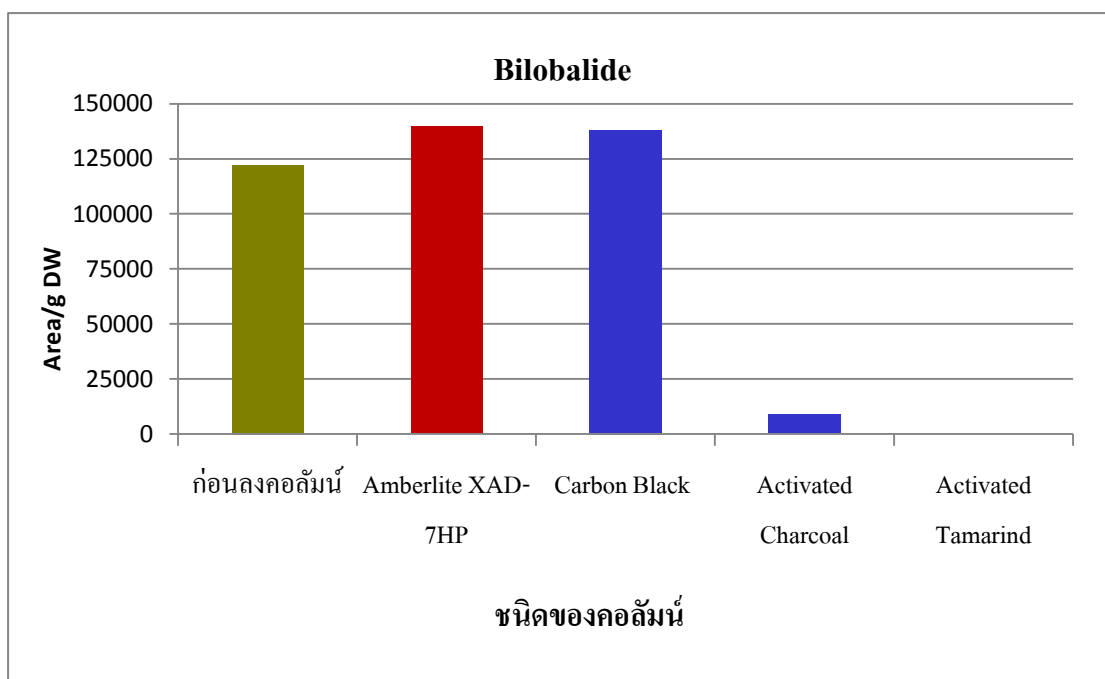
#### 4.4.2 ผลการวิจัยตอนที่ 4.2 การศึกษาความสามารถของตัวดูดซับ

จากการทดลองตอนที่ 4.1 เมื่อสามารถเลือกตัวทำละลายและตัวชะที่เหมาะสมสำหรับคาร์บอนคอลัมน์ได้แล้ว ดังนั้นจึงทำการสกัดสารโดยต้มกับ 70% Ethanol นำมาบรรจุลงคอลัมน์แบบ Slurry สำหรับคอลัมน์คาร์บอนที่ใช้เป็นตัวดูดซับ ได้แก่ Carbon black, Activated Charcoal, Activated from tamarind seeds และ Charcoal สารตัวชะที่ใช้ได้แก่ Acetone และให้คอลัมน์อ้างอิงเป็น Amberlite XAD-7HP สารตัวชะที่ใช้ได้แก่ 60 % Ethanol (Lai 2005) จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร เทอร์ปีนแลคโตนซึ่งประกอบด้วย BB GJ GC GA และ GB แสดงได้ดังตารางที่ 4.41

ตารางที่ 4.41 ปริมาณสารเทอร์ปีนแลคโตนจากการสกัดและผ่านคอลัมน์ด้วยตัวดูดซับต่างชนิดกัน

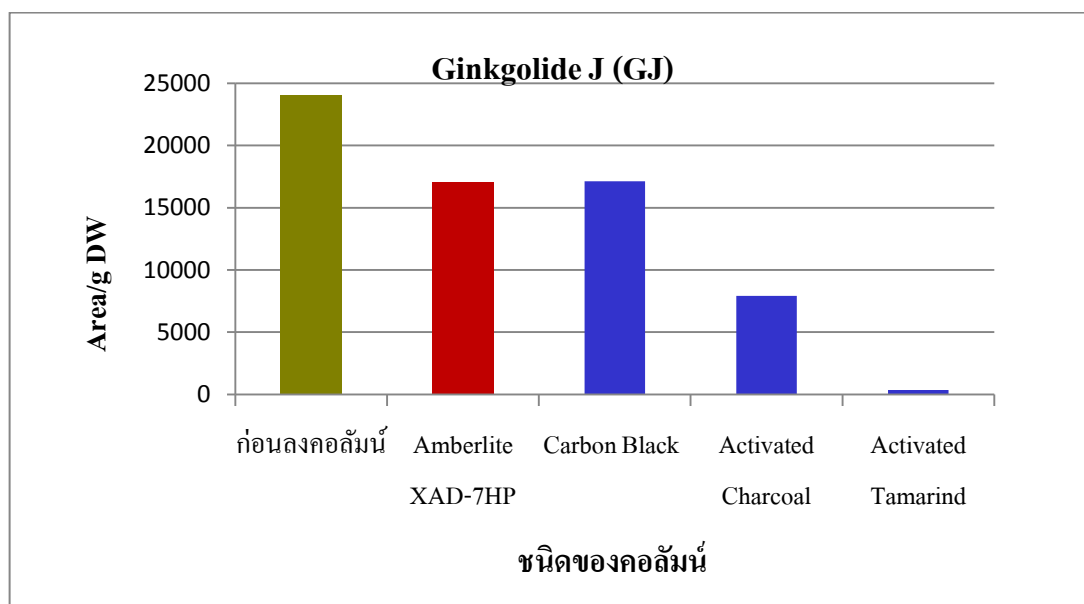
TTLs	ปริมาณสารสกัดเทอร์ปีนแลคโตน (Area/g DW)					
	ใบแปะก๊วย ต้มกับ 70%Ethanol	ตัวดูดซับ				
		Amberlite XAD-7HP	Carbon black	Activated charcoal	Activated from tamarind seeds	Charcoal
BB	122,298.1132	139,795.2936	138,189.3576	8,849.6587	295.9169	-
GJ	24,073.3093	17,050.6000	17,115.2343	7,916.6335	353.7163	-
GC	46,976.4257	50,371.3377	50,023.3199	9,230.0869	392.5376	-
GA	153,819.7159	163,005.6222	99,811.9985	4,780.2417	1,363.3496	-
GB	93,461.1830	114,965.3593	62,313.6909	2,688.8955	466.3642	-
Total	440,628.7471	485,188.2128	367,452.6012	33,465.5162	2,871.8847	-

จากตารางที่ 4.41 นำมาสร้างแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของสารสกัดเทอร์ปีนแลคโตนในคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยให้ Area/g DW เป็นแกน Y และชนิดของคอลัมน์เป็นแกน X แสดงดังภาพต่อไปนี้



ภาพที่ 4.33 แผนภูมิแสดงปริมาณของ BB ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ

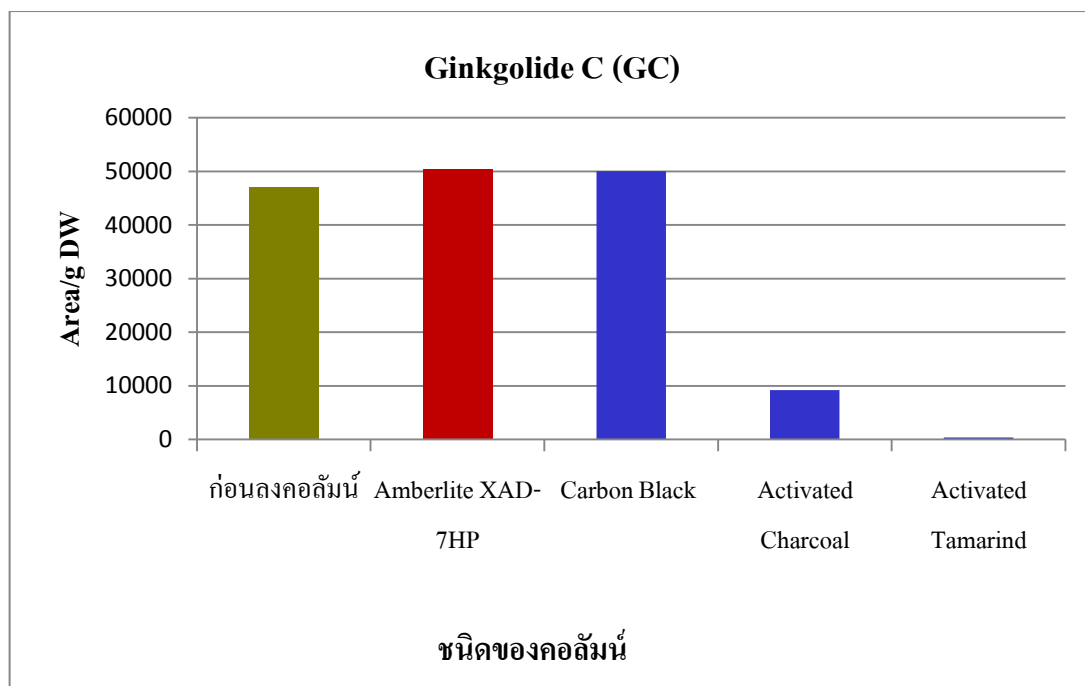
จากภาพที่ 4.33 จะเห็นว่า คอลัมน์ Amberlite XAD-7HP และ Carbon black ให้ปริมาณสารสกัด BB มากที่สุด



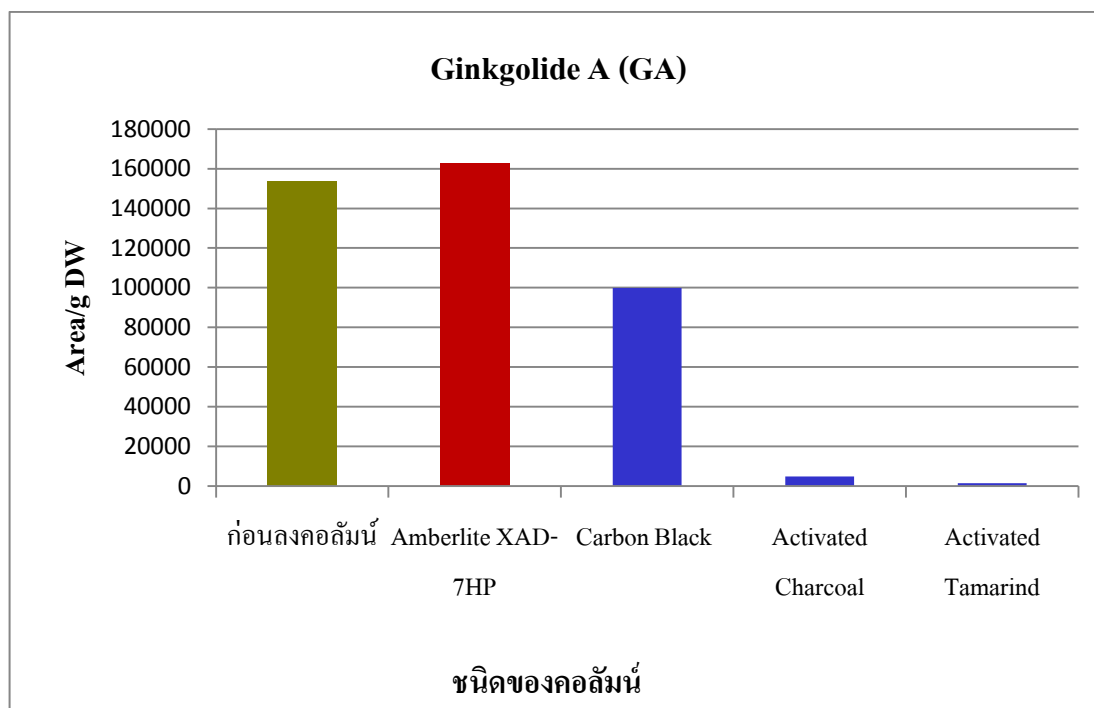
ภาพที่ 4.34 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GJ ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ

จากภาพที่ 4.34 จะเห็นว่า คอลัมน์เป็น Amberlite XAD-7HP และ Carbon black ให้ปริมาณสารสกัด GJ มากที่สุดในการทำคอลัมน์



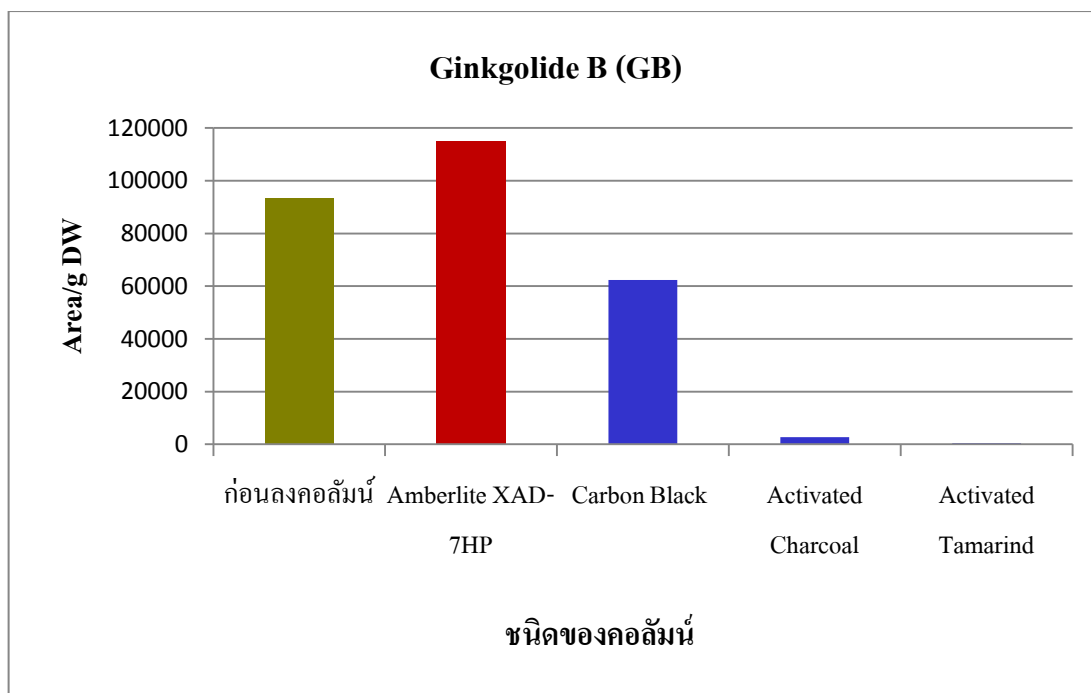


ภาพที่ 4.35 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GC ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ

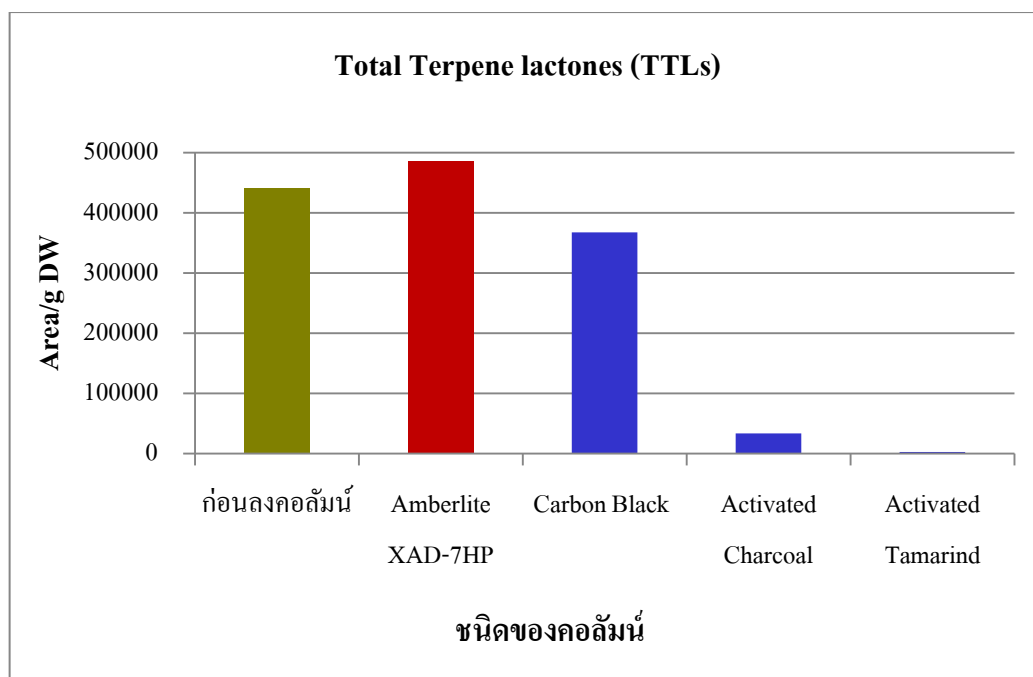


ภาพที่ 4.36 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GA ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ

จากภาพที่ 4.35 จะเห็นว่าคอลัมน์ Amberlite XAD-7HP และ Carbon black ให้ปริมาณสารสกัด GC มากที่สุด และจากภาพที่ 4.36 จะเห็นว่าคอลัมน์ Amberlite XAD-7HP ให้ปริมาณสารสกัด GA มากที่สุด



ภาพที่ 4.37 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GB ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ



ภาพที่ 4.38 แผนภูมิแสดงปริมาณของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ

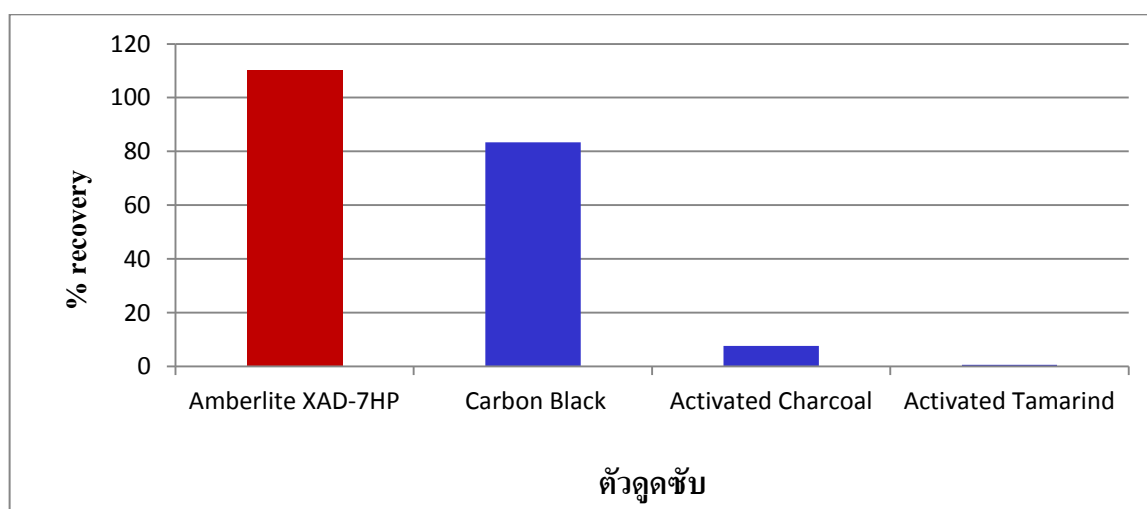
จากภาพที่ 4.37 จะเห็นได้ว่าคอลัมน์ Amberlite XAD-7HP ให้ปริมาณสารสกัด GB มากที่สุด และจากภาพที่ 4.38 จะเห็นได้ว่าคอลัมน์ Amberlite XAD-7HP ให้ปริมาณสารสกัดเทอร์ปีนแลคโตนมากที่สุด

จากปริมาณสารเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ทั้งหมด นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับโดยคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของสารเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ทั้งหมดต่อน้ำหนักใบแห้ง 1 กรัม หลังลงคอลัมน์ ทารด้วย พื้นที่ใต้กราฟของสารเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ทั้งหมดต่อน้ำหนักใบแห้ง 1 กรัม ก่อนลงคอลัมน์ แสดงดังตารางที่ 4.42

ตารางที่ 4.42 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การคืนกลับเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ทั้งหมดในคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วยตัวดูดซับต่างชนิดกัน

วิธีการ	การสกัด	คอลัมน์โครมาโตกราฟี			
	70% Ethanol	Amberlite XAD-7HP	Carbon Black	Activated Charcoal	Activated Tamarind
TTLs (Area/g DW)	440,628.7471	485,188.2128	367,452.6012	33,465.5162	28,71.8847
%recovery	-	110.1127	83.3928	7.5949	0.6518

จากตารางที่ 4.42 นำมาสร้างแผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสารเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ทั้งหมดในคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วยตัวดูดซับต่างชนิดกัน โดยให้ % recovery เป็นแกน Y และสารตัวชะเป็นแกน X แสดงดังภาพที่ 4.39



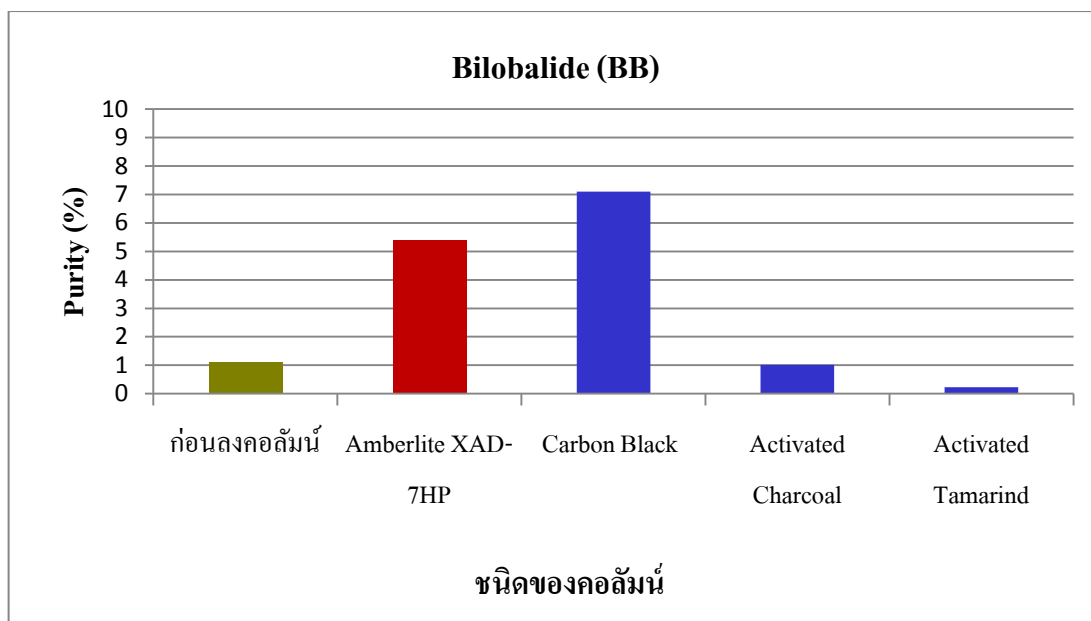
ภาพที่ 4.39 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การคืนกลับในคอลัมน์ที่ใช้ตัวดูดซับชนิดต่างๆ

จากภาพที่ 4.39 จะเห็นได้ว่า คอลัมน์ที่ใช้สารตัวดูดซับเป็นAmberlite XAD-7HP มีเปอร์เซ็นต์การคืนกลับมากที่สุด รองลงมาคือCarbon black Activated charcoal และActivated tamarind และจากคำแนะนำความบริสุทธิ์จึงนำมาสู่การหาความบริสุทธิ์ เพื่อเปรียบเทียบระหว่างคอลัมน์แสดงดังตารางที่ 4.43

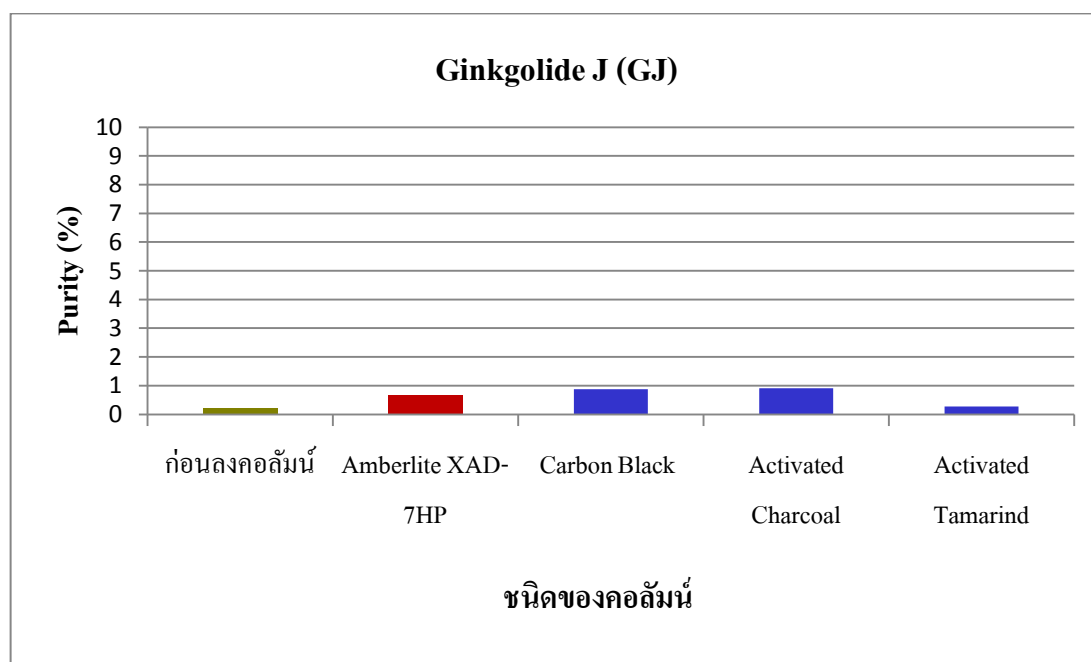
**ตารางที่ 4.43** การเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแลคโตนจากการสกัดและคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วยตัวดูดซับต่างชนิดกัน

TLs	ความบริสุทธิ์ (%)					
	ใบแปะก๊วย  ต้มกับ 70%Ethanol	ตัวดูดซับ				
		Amberlite XAD-7HP	Carbon black	Activated charcoal	Activated from tamarind seeds	Charcoal
BB	1.0933	5.3950	7.0963	1.0156	0.2314	-
GJ	0.2152	0.6580	0.8789	0.9085	0.2766	-
GC	0.4199	1.9400	2.5688	1.0591	0.3070	-
GA	1.3751	6.2907	5.1255	0.5486	1.0662	-
GB	0.8355	4.4368	3.2000	0.3086	0.3647	-
Total	3.9390	18.7205	18.8695	3.8404	2.2459	-

จากตารางที่ 4.43 นำมาสร้างแผนภูมิแท่งแสดงความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแลคโตน ในการต้มด้วย 70% Ethanol โดยให้ Purity (%) เป็นแกน Y และชนิดของคอลัมน์เป็นแกน X แสดงดังรูปภาพต่อไปนี้

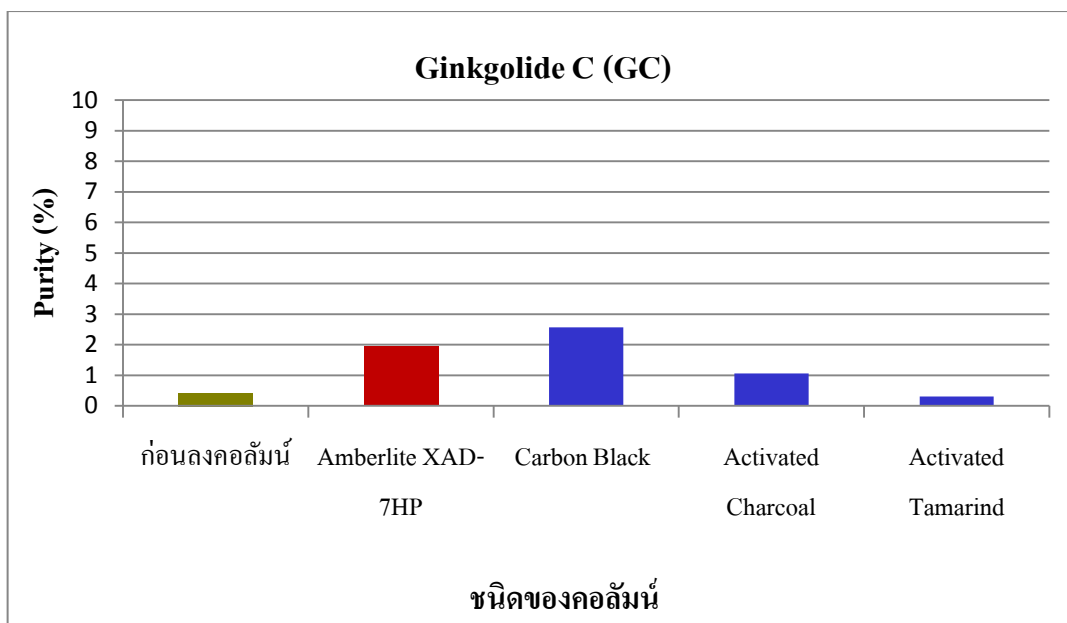


ภาพที่ 4.40 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ BB ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ

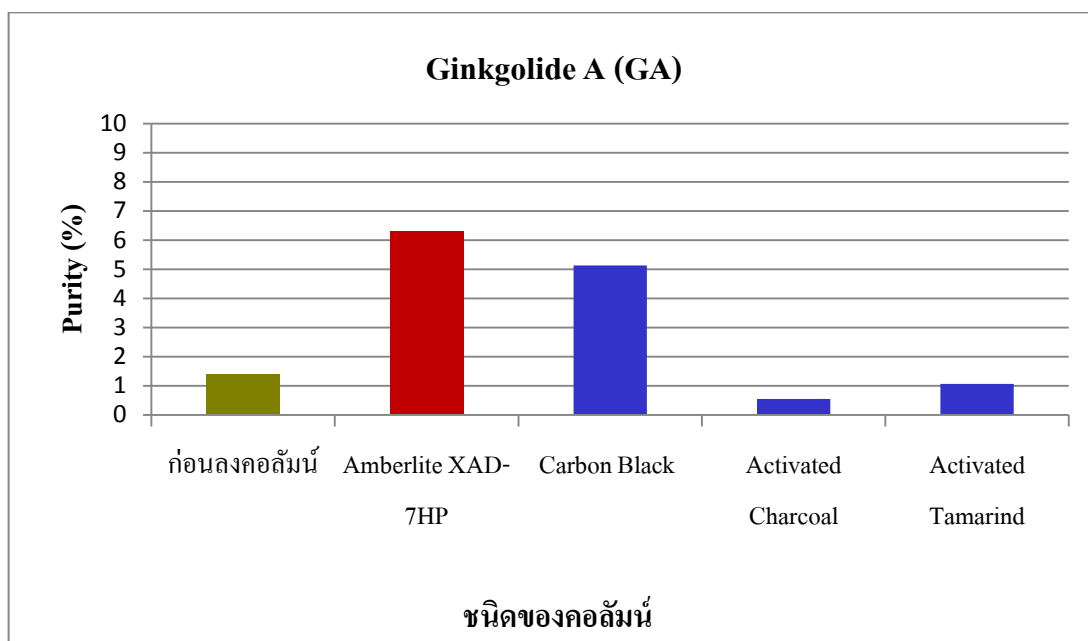


ภาพที่ 4.41 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GJ ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ

จากภาพที่ 4.40 จะเห็นได้ว่า ในคอลัมน์ Amberlite XAD-7HP และ Carbon black เพิ่มความบริสุทธิ์ให้ BB มากขึ้นและจากภาพที่ 4.41 จะเห็นว่าคอลัมน์ไม่ได้ช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์ให้ GJ

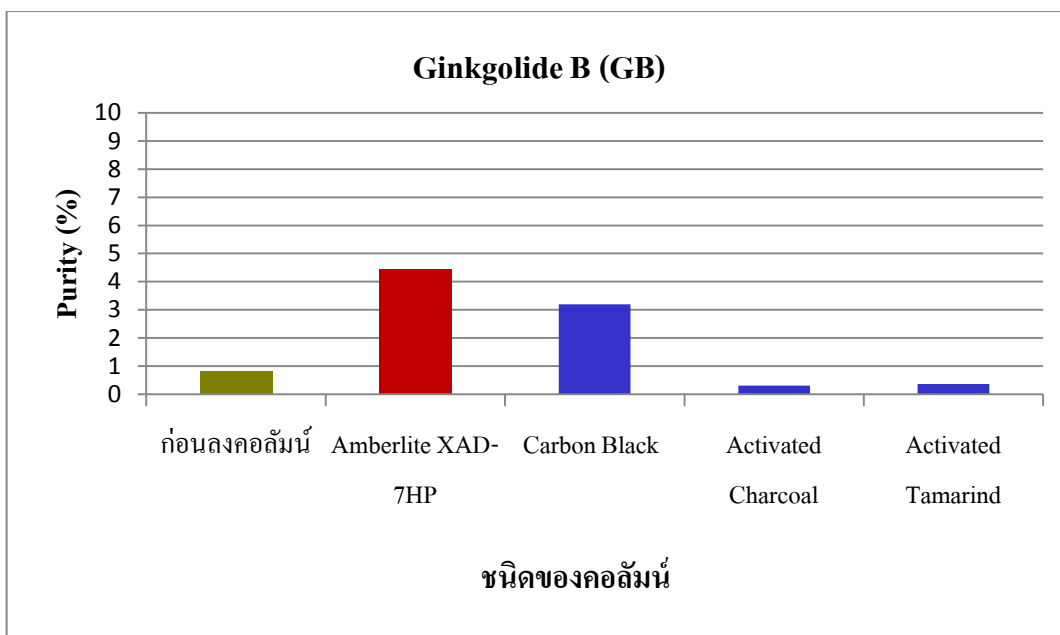


ภาพที่ 4.42 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GC ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ



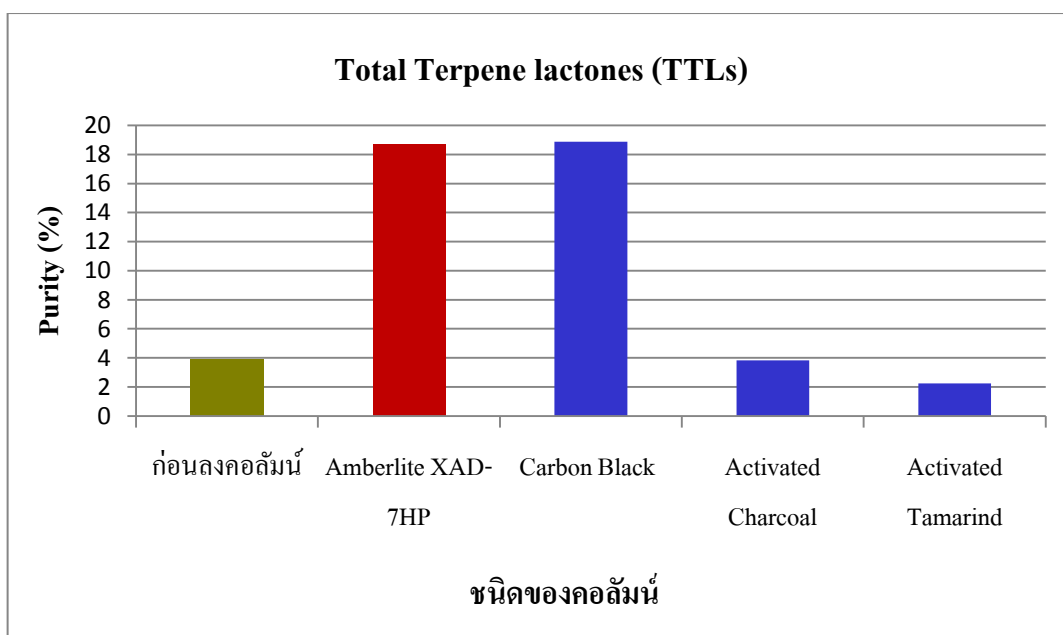
ภาพที่ 4.43 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GA ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ

จากภาพที่ 4.42 จะเห็นได้ว่าในคอลัมน์ Amberlite XAD-7HP และ Carbon black ช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์ให้ GC เพียงเล็กน้อย และจากภาพที่ 4.43 จะเห็นได้ว่า ในคอลัมน์ Amberlite XAD-7HP และ Carbon black เพิ่มความบริสุทธิ์ให้ GA มากขึ้น



ภาพที่ 4.44 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GB ก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ

จากภาพที่ 4.44 จะเห็นได้ว่าในคอลัมน์ Amberlite XAD-7HP และ Carbon black เพิ่มความบริสุทธิ์ให้ GB มากขึ้น



ภาพที่ 4.45 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดก่อนและหลังลงคอลัมน์ชนิดต่างๆ

จากภาพที่ 4.45 จะเห็นได้ว่าในคอลัมน์ Amberlite XAD-7HP และ Carbon black เพิ่มความบริสุทธิ์ให้สารเทอร์ปีนแลคโตนมากขึ้น

จากการทดลองเรื่องการศึกษาศักยภาพของตัวดูดซับ พบว่าการต้มใบแปะก๊วยกับ 70% Ethanol ให้ความบริสุทธิ์ 3.93 % เมื่อบรรจุลงในคอลัมน์ที่ใช้ตัวดูดซับชนิดต่างๆ พบว่า Carbon black ให้ความบริสุทธิ์ 18.87 % และ Amberlite XAD-7HP ให้ความบริสุทธิ์ 18.72 % ซึ่งเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแลคโตน

เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสารที่ต้มด้วย 70% Ethanol เมื่อลงคอลัมน์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับที่ได้จาก Amberlite XAD-7HP, Carbon black, Activated charcoal และ Activated charcoal from tamarind seeds มีค่าเท่ากับ 110.11 % 83.39 % 7.59 % และ 0.65 % ตามลำดับ

#### 4.4.3 ผลการวิจัยตอนที่ 4.3 การศึกษาประสิทธิภาพการล้าง impurity ด้วยน้ำกลั่น

จากการทดลองที่ 4.2 ในคอลัมน์ Activated charcoal ปริมาณสารเทอร์ปีนแลคโตนและความบริสุทธิ์ที่ได้มีค่าน้อยกว่า การทดลองจากตอนที่ 4.1 ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกันแต่ให้ผลต่างกันจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพการล้าง impurity ด้วยน้ำกลั่น เพื่อหาสาเหตุของปัญหาที่เกิดขึ้นจากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารเทอร์ปีนแลคโตน ซึ่งประกอบด้วย BB, GJ, GC, GA และ GB แสดงได้ดังตารางที่ 4.44

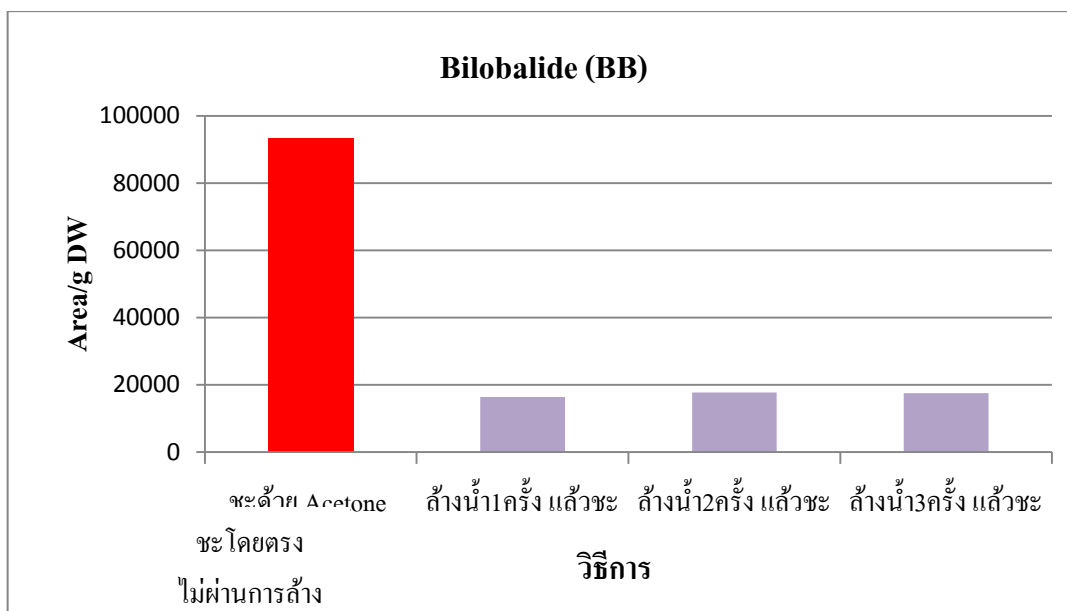
ตารางที่ 4.44 ปริมาณเทอร์ปีนแลคโตนจากการสกัดและการล้าง impurity ด้วยน้ำกลั่นในคอลัมน์

TTLs	ปริมาณสารเทอร์ปีนแลคโตน (Area/g DW)				
	ใบแปะก๊วย ต้มกับ 70% Ethanol	คอลัมน์ (Activated Charcoal)			
		ชะโดยตรง ไม่ผ่านการล้าง	ล้างน้ำกลั่น 1 ครั้ง แล้วชะ	ล้างน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วชะ	ล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วชะ
BB	163,347.7928	93,390.3773	16,368.3677	17,735.0059	17,533.2662
GJ	20,820.1228	4,632.2194	11,587.7414	9,716.4883	10,462.8326
GC	163,125.9156	64,871.7350	39,653.9405	29,466.7853	28,762.0838
GA	145,104.7215	200,052.7891	131,813.8454	96,055.0099	102,553.8182
GB	142,540.3910	90,466.4410	38,723.7850	27,393.1037	25,840.3182

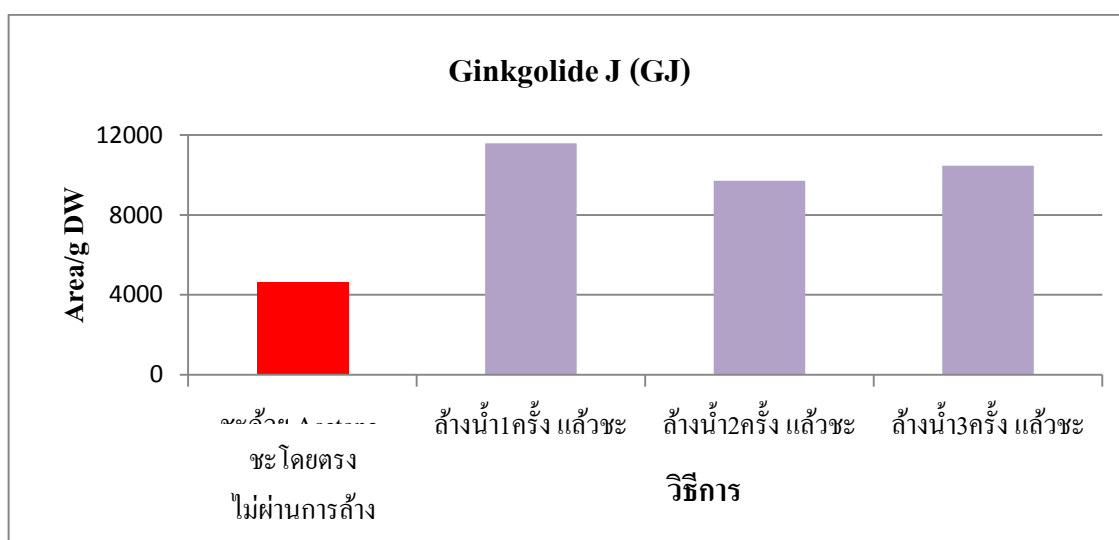


Total	634,938.9438	453,413.5618	238,147.6800	180,366.3931	185,152.3192
-------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

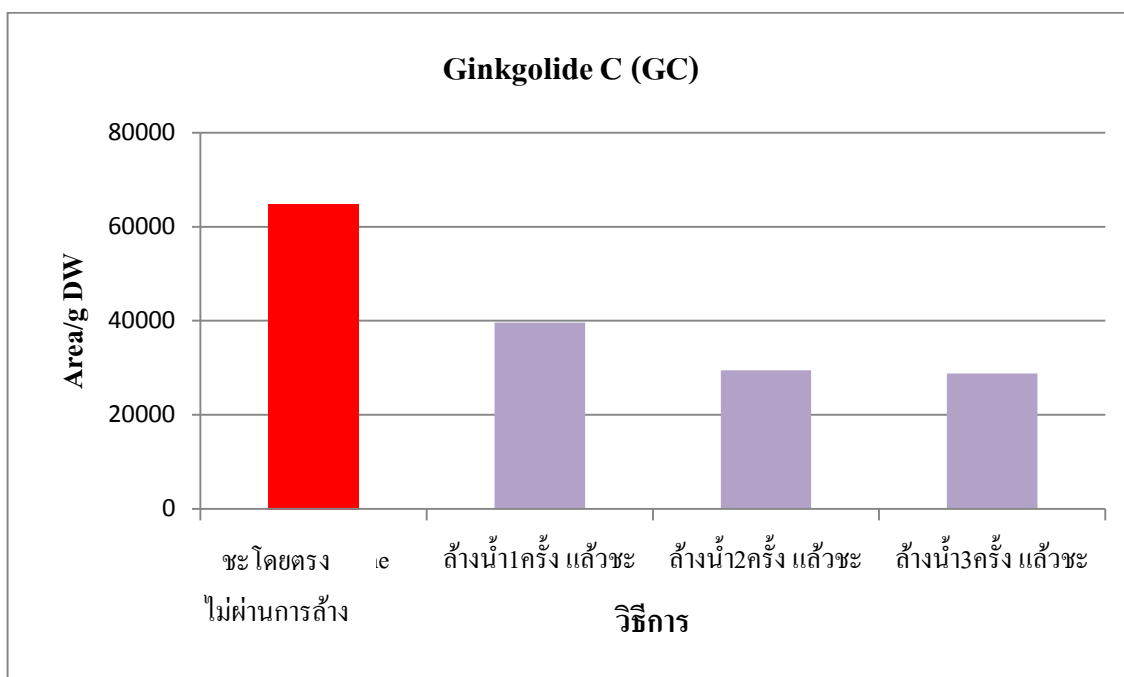
จากตารางที่ 4.44 นำมาสร้างแผนภูมิแท่งแสดงปริมาณของสารเทอร์ปีนแลคโตนโดยให้ Area/g DW เป็นแกน Y และวิธีการ เป็นแกน X แสดงดังรูปที่ 4.48



ภาพที่ 4.45 แผนภูมิแสดงปริมาณของ BB ในคอลัมน์ Activated charcoal  
จากภาพที่ 4.45 จะเห็นได้ว่าในคอลัมน์ที่ไม่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นให้ BB มากที่สุด

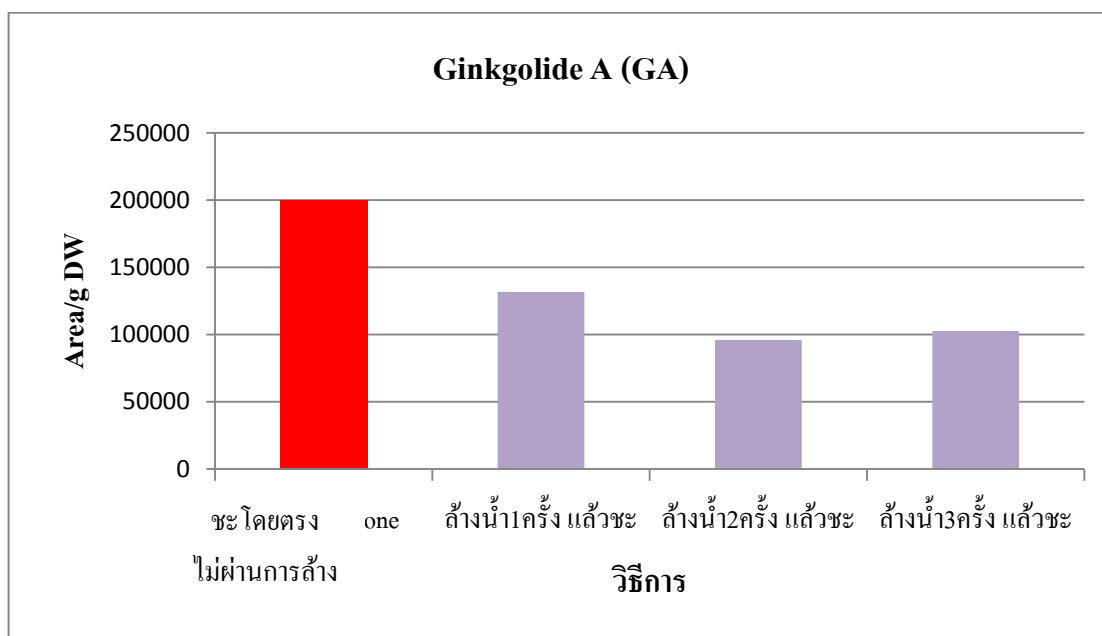


ภาพที่ 4.46 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GJ ในคอลัมน์ Activated charcoal  
จากภาพที่ 4.46 จะเห็นได้ว่าในคอลัมน์ที่ล้างด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาณ GJ ที่มากขึ้น



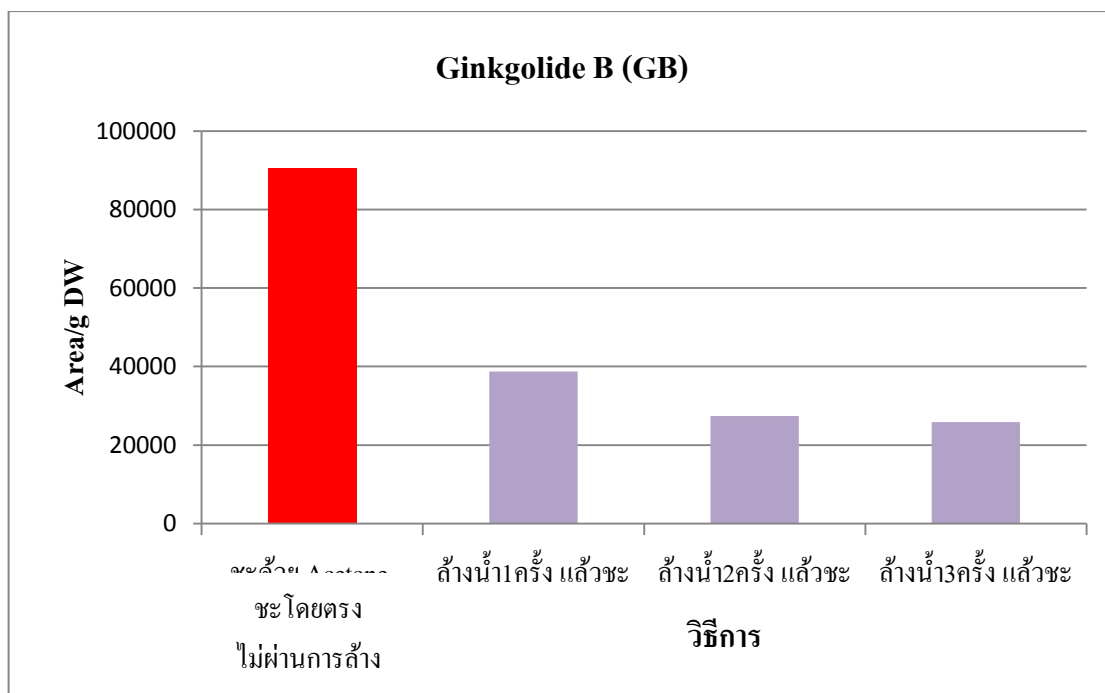
ภาพที่ 4.47 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GC ในคอลัมน์ Activated charcoal

จากภาพที่ 4.47 จะเห็นได้ว่าในคอลัมน์ที่ไม่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นให้ GC มากที่สุด

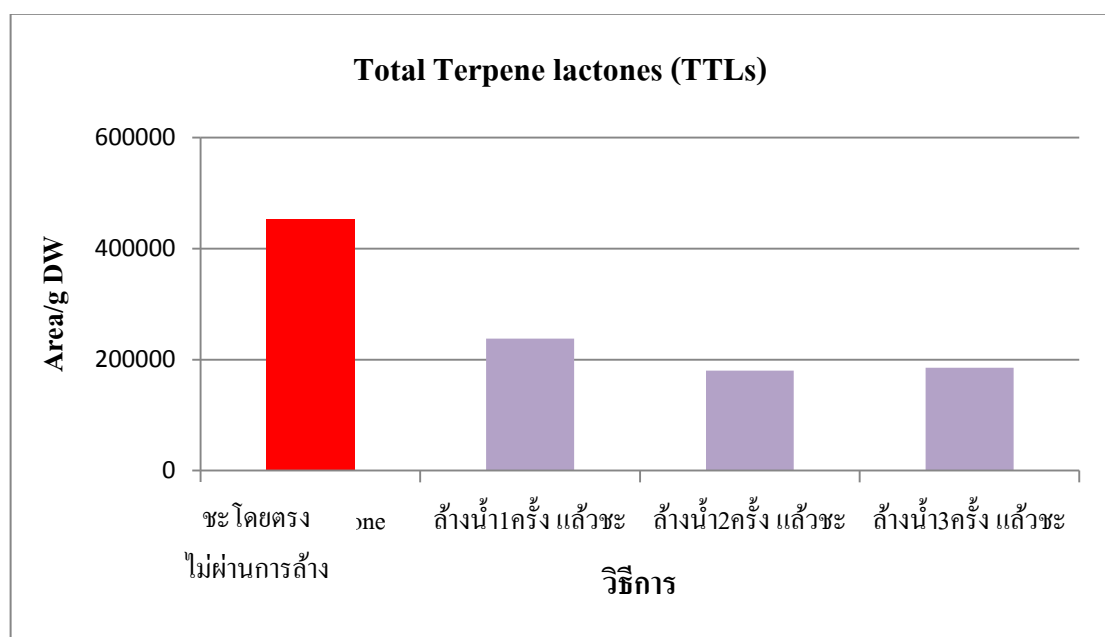


ภาพที่ 4.48 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GA ในคอลัมน์ Activated charcoal

จากภาพที่ 4.48 จะเห็นได้ว่าในคอลัมน์ที่ไม่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นให้ GA มากที่สุด



ภาพที่ 4.49 แผนภูมิแสดงปริมาณของ GB ในคอลัมน์ Activated charcoal



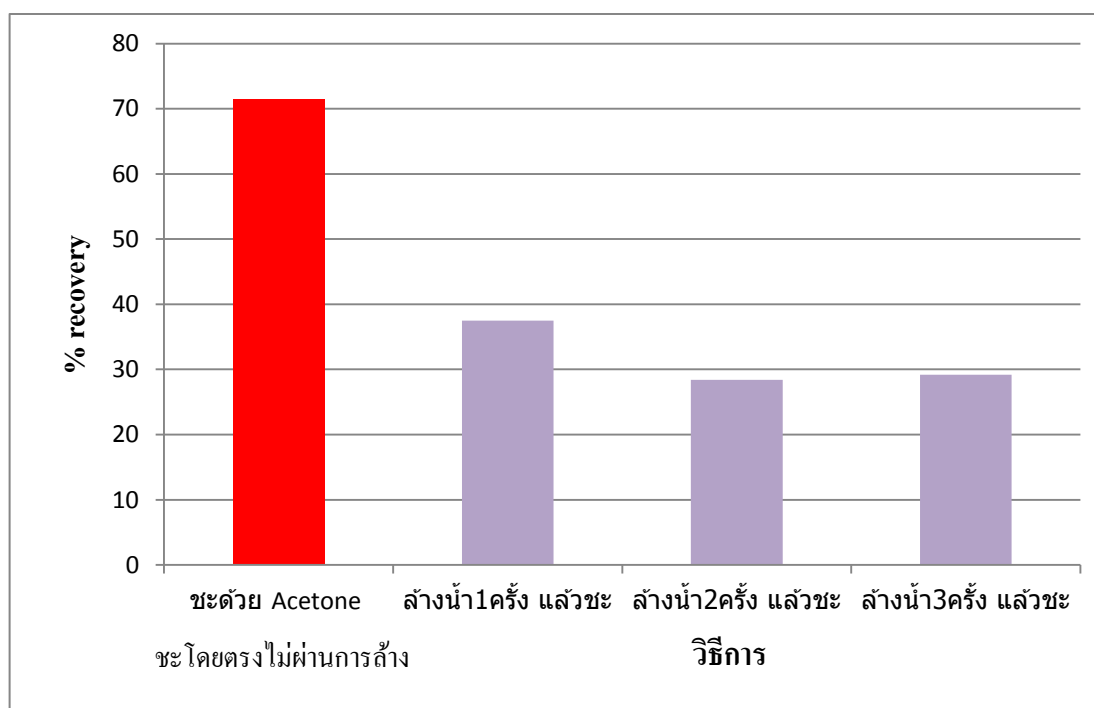
ภาพที่ 4.50 แผนภูมิแสดงปริมาณของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดในคอลัมน์ Activated charcoal

จากภาพที่ 4.49 จะเห็นได้ว่าในคอลัมน์ที่ไม่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นให้ GB มากที่สุดและจากภาพที่ 4.50 จะเห็นได้ว่าในคอลัมน์ที่ไม่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาณของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดมากที่สุด

ตารางที่ 4.45 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดในคอลัมน์

วิธีการ	การสกัด	คอลัมน์โครมาโตกราฟี			
	ใบแปะก๊วย ต้มกับ 70% Ethanol	ชะด้วย Acetone	ล้างน้ำ 1 ครั้ง แล้วชะ	ล้างน้ำ 2 ครั้ง แล้วชะ	ล้างน้ำ 3 ครั้ง แล้วชะ
TTLs (Area/g DW)	634,938.9438	453,413.5618	238,147.6800	180,366.3931	185,152.3192
% recovery	-	71.4106	37.5072	28.4069	29.1606

จากภาพที่ 4.49 จะเห็นว่าในคอลัมน์ที่ไม่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นให้ GB มากที่สุด และจากตารางที่ 4.45 นำมาสร้างแผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมด ในคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยให้ % recovery เป็นแกน Y และวิธีการ เป็นแกน X แสดงดังภาพต่อไปนี้



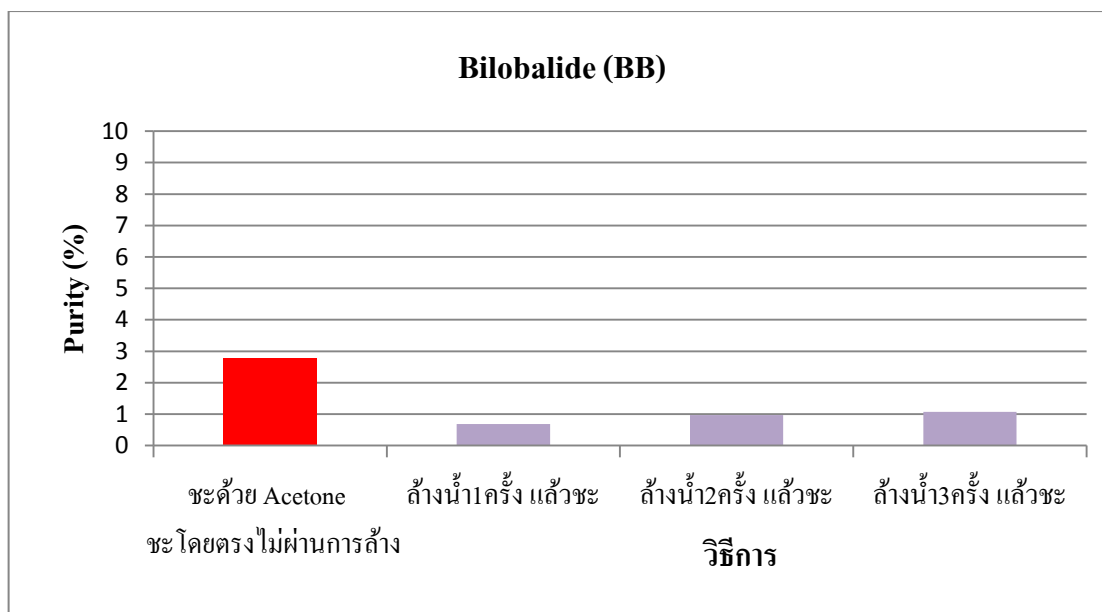
ภาพที่ 4.50ก แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของคอลัมน์ที่ล้างด้วยน้ำกลั่น

จากภาพที่ 4.50ก จะเห็นได้ว่าการสกัดใบแปะก๊วยโดยการต้มในตัวทำละลาย 70% Ethanol และบรรจุลงคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่า คอลัมน์ที่ไม่ได้ล้างน้ำกลั่นให้เปอร์เซ็นต์คืนกลับมากที่สุด รองลงมาคือ ล้างน้ำกลั่น 1 ครั้ง ส่วนการล้างน้ำกลั่น 2 ครั้ง และล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง ให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับที่ใกล้เคียงกัน

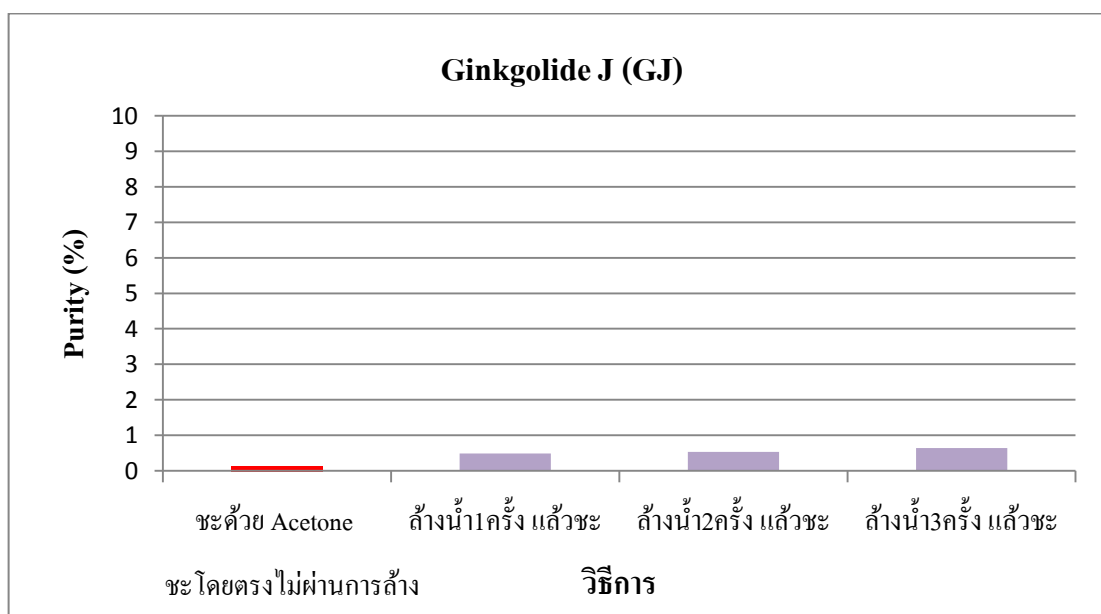
ตารางที่ 4.46 เปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของสารที่ได้จากการสกัดและในคอลัมน์ Activated charcoal

TTLs	ความบริสุทธิ์ (%)				
	ใบแปะก๊วย ต้มกับ 70% Ethanol	คอลัมน์ Activated charcoal			
		ชะด้วย Acetone ทันที่	ล้างน้ำกลั่น 1 ครั้งแล้วชะ	ล้างน้ำกลั่น 2 ครั้งแล้วชะ	ล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วชะ
BB	1.2331	2.7616	0.6820	0.9706	1.0678
GJ	0.1572	0.1370	0.4828	0.5318	0.6372
GC	1.2314	1.9183	1.6522	1.6127	1.7516
GA	1.0953	5.9156	5.4920	5.2570	6.2455
GB	1.0760	2.6751	1.6134	1.4992	1.5737
Total	4.7830	13.4076	9.9224	9.8713	11.2758

จากตารางที่ 4.46 นำมาสร้างแผนภูมิแท่งแสดงความบริสุทธิ์ของสารสกัด เทอร์ปีนแลคโตนโดยให้ Purity (%) เป็นแกน Y และวิธีการ เป็นแกน X แสดงดังภาพต่อไปนี้

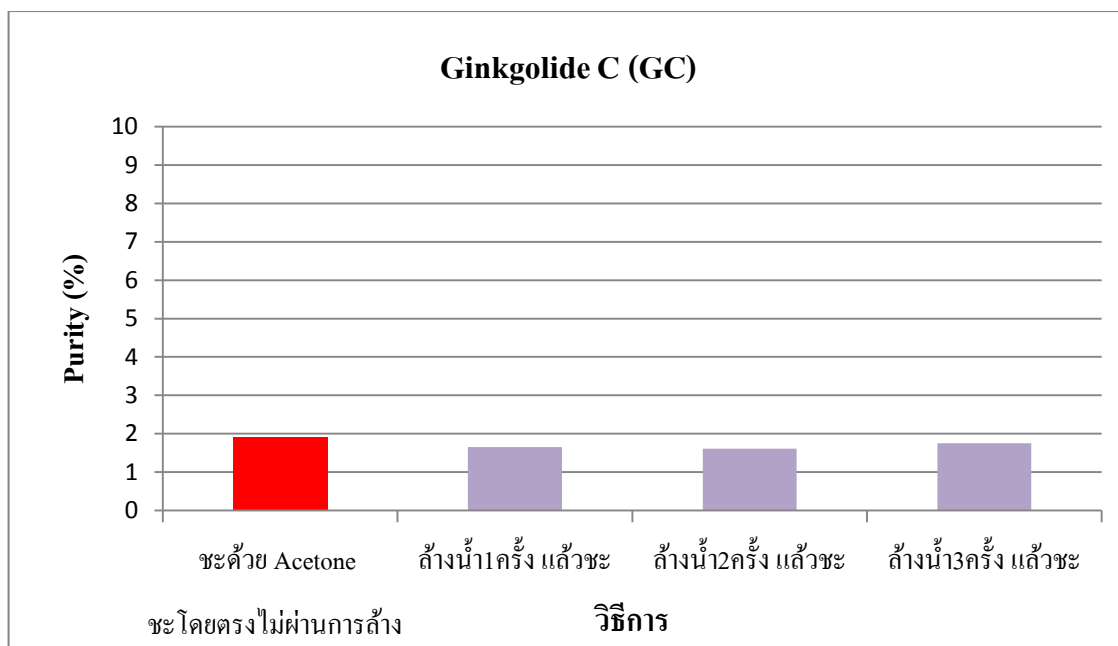


ภาพที่ 4.51 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ BB ในคอลัมน์ Activated charcoal

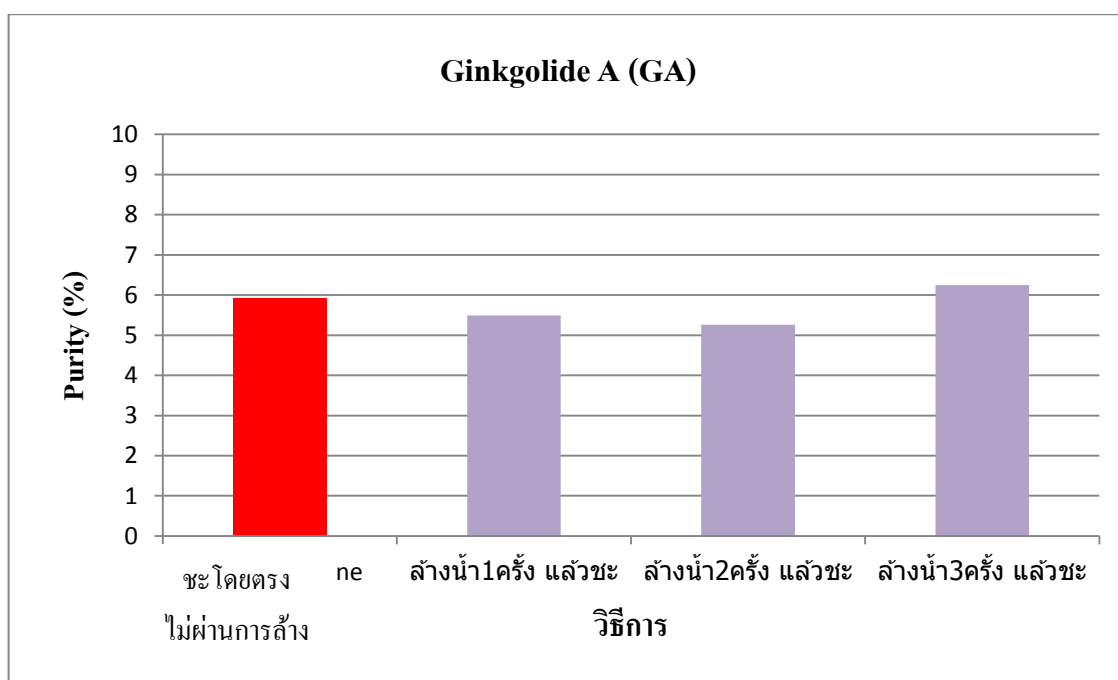


ภาพที่ 4.52 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GJ ในคอลัมน์ Activated charcoal

จากภาพที่ 4.51 จะเห็นได้ว่าในคอลัมน์ที่ไม่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นให้ความบริสุทธิ์ของ BB มากที่สุดและจากภาพที่ 4.52 จะเห็นได้ว่าการล้างไม่มีผลต่อความบริสุทธิ์ของ GJ

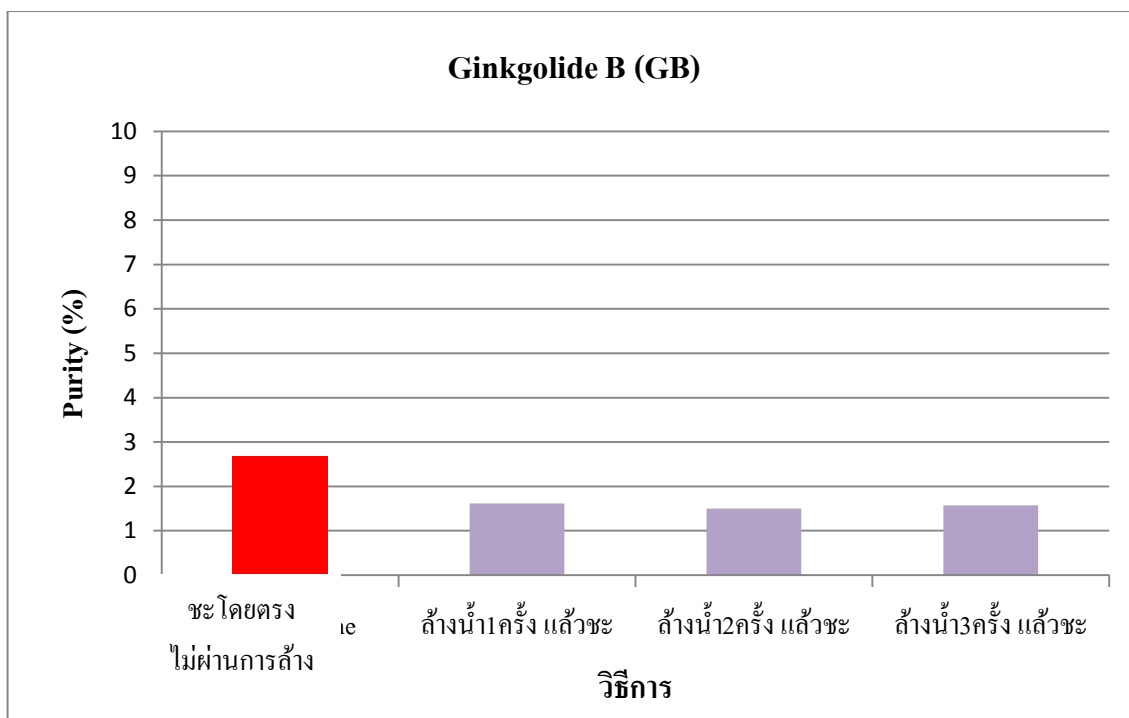


ภาพที่ 4.52ก แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GC ในคอลัมน์ Activated charcoal

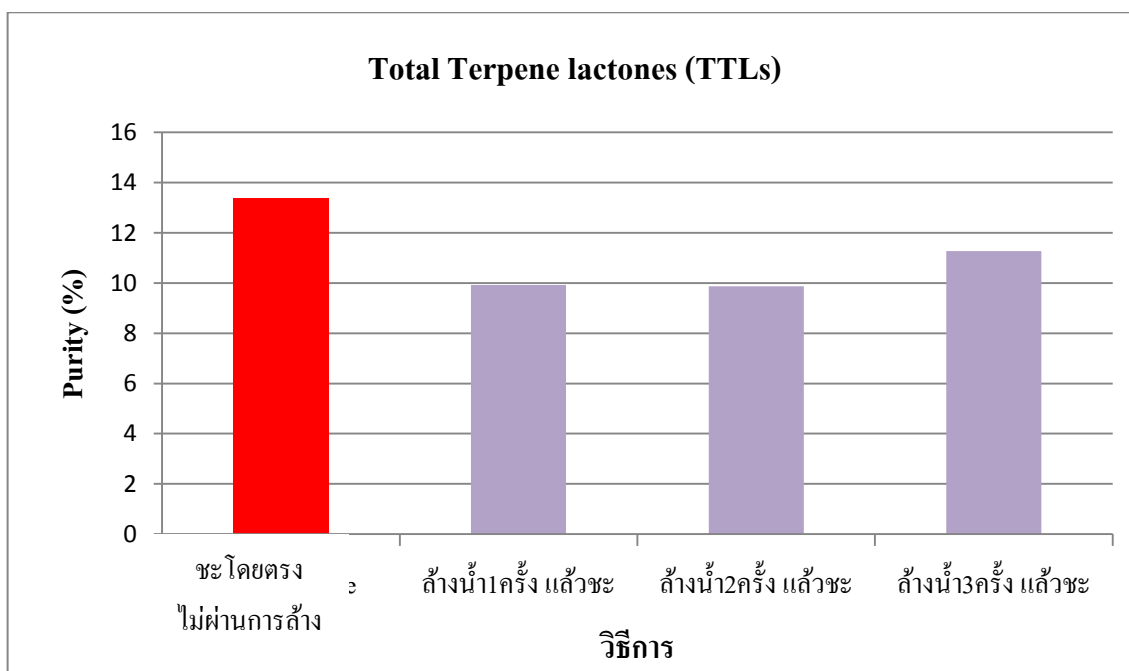


ภาพที่ 4.53 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GA ในคอลัมน์ Activated charcoal

จะเห็นว่าจากภาพที่ 4.52ก จะเห็นได้ว่าการล้างไม่มีผลต่อความบริสุทธิ์ของ GC และจากภาพที่ 4.53 จะเห็นได้ว่าการล้างไม่มีผลต่อความบริสุทธิ์ของ GA



ภาพที่ 4.53ก แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของ GB ในคอลัมน์ Activated charcoal



ภาพที่ 4.54 แผนภูมิแสดงความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแลคโตนทั้งหมดในคอลัมน์ Activated charcoal

จากภาพที่ 4.53 จะเห็นได้ว่าการล้างไม่มีผลต่อความบริสุทธิ์ของ GB และจากภาพที่ 4.54 จะเห็นได้ว่า การล้างไม่มีผลต่อความบริสุทธิ์ของ TTLs



จากการทดลองเรื่องการศึกษาประสิทธิภาพการล้าง impurity ด้วยน้ำกลั่น พบว่าการต้มใบแปะก๊วยกับ 70 % Ethanol ให้ความบริสุทธิ์เท่ากับ 4.78% เมื่อบรรจุลงในคอลัมน์ที่มี Activated charcoal เป็นตัวดูดซับ พบว่าคอลัมน์ที่ไม่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นให้ความบริสุทธิ์สารเทอร์ปีนแลคโตนเท่ากับ 13.41 % คอลัมน์ที่ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ให้ความบริสุทธิ์ 9.92 % คอลัมน์ที่ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ให้ความบริสุทธิ์ 9.87 % และคอลัมน์ที่ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ให้ความบริสุทธิ์ 11.28 % ซึ่งเพิ่มค่าความบริสุทธิ์ของสารเทอร์ปีนแลคโตน

**ตารางที่ 4.47** แสดงอัตราส่วนระหว่างการไม่ล้างน้ำต่อการล้างด้วยน้ำของสารเทอร์ปีนแลคโตนในคอลัมน์ Activated charcoal

TTLs	Area/g DW ของ ชะโดยตรง ไม่ล้างน้ำกลั่น	อัตราส่วนระหว่างการไม่ล้างน้ำต่อการล้างด้วยน้ำ		
		ล้างน้ำกลั่น 1 ครั้ง แล้วชะ	ล้างน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วชะ	ล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วชะ
BB	93,390.38	5.71	5.27	5.33
GJ	4,632.22	0.40	0.48	0.44
GC	64,871.74	1.64	2.20	2.26
GA	200,052.79	1.52	2.08	1.95
GB	90,466.44	2.34	3.30	3.50
Total	453,413.56	1.90	2.51	2.45

จะเห็นว่า น้ำมีผลต่อการล้าง BB มากที่สุด แต่มีผลทำให้ GJ เพิ่มขึ้น และสารตัวอื่นที่เหลือถูกล้างออกในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกัน

ส่วนเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสารที่ต้มด้วย 70% Ethanol เมื่อลงคอลัมน์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับที่ได้จากคอลัมน์ที่ไม่ล้างน้ำกลั่น คอลัมน์ล้างน้ำกลั่น 1 ครั้ง คอลัมน์ล้างน้ำกลั่น 2 ครั้ง และคอลัมน์ล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง มีค่าเท่ากับ 71.4106 % 37.5072 % 28.4069 % และ 29.1606% ตามลำดับ

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากวิธีการสกัดสารจากใบแปะก๊วยในการทดลองตอนที่ 1.1 การแช่ผงใบแปะก๊วยในตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิดเป็นเวลา 19 ชั่วโมง ตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิดที่ใช้ ได้แก่ Methanol, Ethanol, Isopropanol, Dichloromethane, Ethyl acetate และ Acetone โดยเมื่อได้สารสกัดแล้วนำมาทำการตรวจสอบปริมาณของเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง HPLC ในแต่ละวิธี พบว่าวิธีการสกัดด้วยการแช่ใน Methanol, Ethanol, Isopropanol, Dichloromethane, Ethyl acetate และ Acetone จะให้พื้นที่ใต้กราฟซึ่งแสดงถึงปริมาณรวมของเทอร์ปีนแอลกอฮอล์เป็น 1,081,316.85, 596,265.44, 85,421.65, 25,280.37, 78,124.21 และ 44,656.46 ต่อน้ำหนักใบแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ เมื่อเรียงลำดับวิธีการสกัดที่ให้ปริมาณรวมของเทอร์ปีนแอลกอฮอล์จากมากไปหาน้อยจะได้ว่าวิธีการสกัดด้วยการแช่ใน Methanol, Ethanol, Isopropanol, Ethyl acetate, Acetone และ Dichloromethane แต่เนื่องจากว่า Dichloromethane มีความบริสุทธิ์ (Purity) มากที่สุดถึง 87.5% จึงถูกเลือกนำไปใช้ในการทดลองตอนที่ 2 เพื่อใช้กำจัด impurity ก่อนที่จะนำไปประเหยแห้งแล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วย HPLC ต่อไป

จากวิธีการสกัดสารจากใบแปะก๊วยในการทดลองตอนที่ 1.2 การต้มผงใบแปะก๊วยในบัฟเฟอร์, pH 5 - pH 7, Ethanol 85.4% และน้ำ การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในบัฟเฟอร์จะทำให้ Ginkgolide ละลายออกมาอยู่ในชั้นน้ำได้ดีขึ้น ส่วนสารพวกที่เป็น impurity ที่ไม่มีขั้วและมีขั้วอ่อนๆ ชนิดอื่น จะไม่ละลายลงในชั้นน้ำ ต่อมาส่วนที่เป็นน้ำทั้งสองส่วนมาปรับ pH ให้เป็น 5.0 เพื่อจะทำให้สารพวกเทอร์ปีนแอลกอฮอล์เหล่านี้อยู่ในรูป protonated form ซึ่งทำให้สามารถถูกสกัดออกมาได้โดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Qing Lang and C.M. Wai, 1999) ส่วนพวก impurity อื่นๆ ที่อยู่ในสภาพ ionic หรือ hydrophilic จะยังคงละลายอยู่ในชั้นน้ำ โดยจะไม่ถูกสกัดออกมาโดยตัวทำละลายอินทรีย์ ในการทดลองนี้ได้ทดลองใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ Dichloromethane โดยเมื่อได้สารสกัดแล้วนำมาทำการตรวจสอบปริมาณของเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าวิธีการสกัดโดยใช้ Acetate buffer (pH 5), Citrate buffer (pH 6), Phosphate buffer (pH 7), Ethanol 85.4% และน้ำ จะให้พื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งแสดงถึงปริมาณรวมของเทอร์ปีนแอลกอฮอล์เป็น 67,737.15, 69,514.63, 79,355.04, 163,461.36 และ 92,331.47 ต่อน้ำหนักใบแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ เมื่อเรียงลำดับของวิธีในการสกัดที่ให้ปริมาณรวมของเทอร์ปีนแอลกอฮอล์จากมากไปหาน้อยจะได้ว่า การต้มใน Ethanol 85.4%, น้ำ, Phosphate buffer (pH 7), Citrate buffer (pH 6) และ Acetate buffer (pH 5) ส่วนเรื่องความบริสุทธิ์ (Purity) การสกัดด้วย

การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในบัฟเฟอร์ pH 6 จะให้ความบริสุทธิ์มากที่สุดคือ 75.8% เพราะฉะนั้นถ้าหากพิจารณาถึงเรื่องของผลของ pH ที่มีต่อการสกัด Terpene lactones จากบัฟเฟอร์ในช่วง pH 5 ถึง pH 7 พบว่า pH 7 เป็นพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด Terpene lactones จากใบแปะก๊วย เพราะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากที่สุดเมื่อเทียบกับการต้มในบัฟเฟอร์ pH 5 และ pH 6 และยังให้ความบริสุทธิ์สูงถึง 64.5 % อีกด้วย

เพราะฉะนั้นจากที่กล่าวมาทั้งหมดจึงสามารถสรุปการทดลองตอนที่ 1 ได้ว่า วิธีที่เหมาะสมที่สุดของการสกัด Terpene lactones จากใบแปะก๊วยคือ การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในน้ำ ซึ่งหากจะต้องนำไปผลิตจริงก็สามารถทำได้โดยการนำผงใบแปะก๊วยแห้งมาต้มในน้ำประมาณ 10 นาที จากนั้นนำไปกรองแบบลดความดันโดยเอาเฉพาะส่วนที่กรองได้ (filtrate) แล้วนำส่วนที่กรองได้ (filtrate) ไปปรับ pH ให้เป็น 5 จากนั้นนำไปทำ liquid-liquid extraction ด้วย Dichloromethane ใช้เอาเฉพาะชั้นของ Dichloromethane แล้วนำไประเหยแห้ง ก็จะได้ สารสกัดจากใบแปะก๊วย หรือ Terpene lactones ที่มีความบริสุทธิ์สูงตามที่ต้องการ

จากการทดลองสกัดสารจากใบแปะก๊วยในตอนที่ 2.1 การต้มผงใบแปะก๊วยใน 0.1%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ซึ่งเป็นสารละลายเกลือที่มีค่า pH ประมาณ 9 ซึ่งน่าจะทำให้สาร Terpene Lactones อยู่ในรูป Deprotonated form แล้วละลายออกมาอยู่ในชั้นน้ำเป็นจำนวนมาก และใช้ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งทำการสกัดในกรวยแยกที่ pH ต่าง ๆ คือที่ pH 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 เพื่อเปรียบเทียบว่า ที่ pH ใด สาร Terpene Lactones จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป Protonated form แล้วออกมาอยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากที่สุด โดยใช้ Buffer 2 กลุ่ม ได้แก่ Buffer Type และ Universal Buffer ทำการตรวจสอบปริมาณของ Terpene Lactones ด้วยเครื่อง HPLC-ELSD ได้ผลดังนี้ คือ

เมื่อใช้ Buffer Type ในการควบคุม pH จะให้พื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งแสดงถึงปริมาณ Total Terpene Lactones (TTLs) เป็น 369,694.1755, 444,727.7558, 419,087.1977, 437,855.4712, 215,784.9598 และ 102,698.6486 ต่อน้ำหนักใบแห้ง 1 กรัม และมีความบริสุทธิ์เป็น 48.3374 %, 48.9463 %, 59.8468 %, 54.9217 %, 56.9827% และ 55.6640 % ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่ BT pH 4 จะทำการสกัดสารได้ในปริมาณมากที่สุด และที่ BT pH 5 จะมีความบริสุทธิ์มากที่สุด

แต่เมื่อใช้ Universal Buffer ในการควบคุม pH จะให้พื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งแสดงถึงปริมาณ Total Terpene Lactones (TTLs) เป็น 520,224.7707, 521,808.2702, 522,974.8698, 460,625.9734, 128,019.3769 และ 6,385.2388 ต่อน้ำหนักใบแห้ง 1 กรัม และมีความบริสุทธิ์เป็น 59.0924 %, 49.2615 %, 55.5245 %, 49.2615 %, 55.5245 %

58.9416 %, 65.4452% และ 27.7857 % ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่ UBpH 5 จะทำการสกัดสารได้ในปริมาณมากที่สุดและที่ UB pH 7 จะมีความบริสุทธิ์มากที่สุด จึงนำค่า pH ที่ให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุดในตอนที่ 1 นี้ไปทำการทดลองต่อในตอนที่ 2.2

การทดลองตอนที่ 2.2 นำค่า pH ที่สกัดสารได้ปริมาณมากที่สุดจากผลการทดลองในตอนที่ 1 มาทดลองเปลี่ยนวิธีการโดยใช้การรีฟลักซ์ผงใบแปะก๊วยแห้งในสารละลาย 0.05 M Buffer pH 9 เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 60 °C เพื่อให้สาร Terpene Lactones อยู่ในรูป Deprotonated form แล้วละลายออกมาอยู่ในชั้นน้ำเช่นเดียวกับตอนที่ 1 และทดลองใช้คลื่นเสียงอัลตราโซนิก เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 60 °C ต่อมาทำการปรับ pH ให้เป็น pH 4 และ pH 5 โดยวิธีที่แตกต่างกัน จากนั้นทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ Ethyl acetate และ Dichloromethane พบว่าปริมาณของ Total Terpene Lactones (TTLs) ที่สกัดได้ ของตัวอย่างที่ใช้ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ จะสามารถสกัดสารได้มากกว่าตัวอย่างที่ใช้ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ในทุก ๆ สภาวะ แต่ตัวอย่างที่ใช้ Dichloromethane นั้น จะมีความบริสุทธิ์ของสาร Terpene Lactones มากกว่าค่อนข้างมาก ในทุก ๆ สภาวะเช่นกัน โดยในแต่ละสภาวะที่ใช้ตัวทำละลายเดียวกันจะมีค่าความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกัน

ในส่วน of ตัวอย่างที่ใช้ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เช่นเดียวกับตอนที่ 2.1 ตัวอย่างที่ให้ปริมาณของ TTLs มากที่สุด คือ ตัวอย่างที่ใช้ Universal Buffer pH 5 (UB 5) ตามด้วย pH 5 + NaCl, Buffer Type pH 4 (BT 4) และ pH 5 โดยจะให้พื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งแสดงถึงปริมาณ Total Terpene Lactones (TTLs) เป็น 298,644.4412, 286,481.0226, 280,186.4512 และ 258,651.3176 ต่อน้ำหนักใบแห้ง 1 กรัม และมีความบริสุทธิ์เป็น 59.6618%, 54.6430%, 56.9552% และ 56.7035% ตามลำดับจะเห็นว่า ที่ UB 5 จะให้ปริมาณ TTLs มากกว่าที่ BT 4 เช่นเดียวกับตอนที่ 2.1 ส่วนความบริสุทธิ์นั้นจะมีค่าใกล้เคียงกัน และจากการที่เติม NaCl เพื่อลดการเกิดอิมัลชันระหว่างชั้นน้ำกับชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า NaCl ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดให้ดียิ่งขึ้นอีกด้วย

ในส่วน of ตัวอย่างที่ใช้ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ตัวอย่างที่ให้ปริมาณของ TTLs มากที่สุด คือ ตัวอย่างที่ใช้ pH 5 ตามด้วย Buffer Type pH 4 (BT 4), pH 5 + NaCl และ Universal Buffer pH 5 (UB 5) โดยจะให้พื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งแสดงถึงปริมาณ Total Terpene Lactones (TTLs) เป็น 162,331.7981, 159,183.5705, 135,122.9593 และ 113,067.1456 ต่อน้ำหนักใบแห้ง 1 กรัม และมีความบริสุทธิ์เป็น 86.0974%, 86.3356%, 88.2480% และ 87.9055% ตามลำดับจะเห็นว่า ที่ UB 5 จะให้ปริมาณ TTLs น้อยกว่าที่

BT 4 ซึ่งขัดแย้งกับในตอนต้นที่ 2.1 ส่วนความบริสุทธิ์นั้นจะมีค่าใกล้เคียงกัน และจากการที่เติม NaCl เพื่อลดการเกิดอิมัลชันระหว่างชั้นน้ำกับชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า NaCl ทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดลดลง

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจึงสามารถสรุปผลการทดลองตอนที่ 2 ได้ว่า วิธีที่เหมาะสมที่สุดที่จะทำการสกัดสาร Terpene Lactones จากใบแปะก๊วยให้ได้ปริมาณมาก คือ ต้มผงใบแปะก๊วยในสารละลายที่เป็นเบส เช่น 0.1 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  นำไปกรองแบบลดความดัน นำส่วนที่กรองได้ไปเติม Universal Buffer pH 5 และทำการปรับ pH ให้เป็น 5 จากนั้นนำไปทำ Liquid-liquid extraction ด้วย Ethyl acetate เฉพาะส่วนของ Ethyl acetate ไประเหยแห้ง ก็จะได้สารสกัดจากใบแปะก๊วยตามที่ต้องการ แต่หากต้องการสารสกัดที่มีความบริสุทธิ์สูง ให้ใช้ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายอินทรีย์แทน

จากวิธีการสกัดสารจากใบแปะก๊วยในการทดลองตอนที่ 3.1การนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) เป็นเวลา 15 นาที โดยสกัดด้วยตัวทำละลายสารละลาย 6 ชนิด ได้แก่ สารละลาย Buffer pH ต่างๆ 3 pH ประกอบด้วย Buffer pH 7, Buffer pH 9, Buffer pH 11 และสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ อีก 3 ตัวทำละลาย ประกอบด้วย Ethyl acetate, Ethanol และน้ำกลั่น โดยนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ TTLs ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าสารละลาย Buffer pH 9 ให้ปริมาณ TTLs มากที่สุด คือ 135,360.10 Area/gDW ตามด้วย Buffer pH 7 และ Buffer pH 11 ตามลำดับและเมื่อพิจารณา Ginkgolide และ Bilobalide ในสารละลาย Buffer pH ข้างต้น ได้ปริมาณสารสกัด GA มากที่สุด ตามด้วย BB, GB, GC และ GJ ในตัวทำละลายอื่นๆ พบว่า Ethanol ให้ปริมาณ TTLs มากที่สุด คือ 597,944.37 Area/gDW ตามด้วย Ethyl acetate และน้ำกลั่น ตามลำดับ และเมื่อพิจารณา Ginkgolide และ Bilobalide ในตัวทำละลายข้างต้น พบว่าได้ปริมาณสารสกัด GA มากที่สุดตามด้วย GB, BB, GC และ GJ จากการทดลองจึงเลือกสารละลาย Buffer pH 9 และ Ethanol มาทำการทดลองต่อในตอนต้นที่ 3.3 และ 3.4 เนื่องจากให้ปริมาณ TTLs มากที่สุด

จากวิธีการสกัดสารจากใบแปะก๊วยในการทดลองตอนที่ 3.2 การนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัดโดยเทคนิค Reflux เป็นเวลา 60 นาที โดยสกัดด้วยตัวทำละลายสารละลาย 6 ชนิด ได้แก่ สารละลาย Buffer pH ต่างๆ 3 pH ประกอบด้วย Buffer pH 7, Buffer pH 9, Buffer pH 11 และสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ อีก 3 ตัวทำละลาย ประกอบด้วย Ethyl acetate, Ethanol และน้ำกลั่น โดยนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ TTLs ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าสารละลาย Buffer pH 11 ให้ปริมาณ TTLs มากที่สุด คือ 158,519.89 Area/gDW ตามด้วย Buffer pH 9 และ Buffer pH 7 ตามลำดับและเมื่อพิจารณา Ginkgolide และ Bilobalide ในสารละลาย Buffer pH ข้างต้น ได้ปริมาณสารสกัด GA มากที่สุด ตามด้วย GB, BB, GC และ GJ ในตัวทำละลายอื่นๆ พบว่า Ethanol ให้ปริมาณ TTLs มากที่สุด คือ 579,307.47 Area/gDW ตามด้วย Ethyl acetate และน้ำกลั่น

ตามลำดับ และเมื่อพิจารณา Ginkgolide และ Bilobalide ในตัวทำละลายข้างต้น พบว่าได้ปริมาณสารสกัด BB มากที่สุด ตามด้วย GA, GC, GB และ GJ จากการทดลองจึงเลือกสารละลาย Ethanol และ Buffer pH 9 เนื่องจากเมื่อเทียบปริมาณ TTLs ที่สกัดด้วยสารละลาย Buffer pH 11 ในการทดลองที่ 3.1 ได้ปริมาณ TTLs น้อยที่สุดจึงเลือก Buffer pH 9 มาทำการทดลองต่อในตอนๆที่ 3.3 และ 3.4 เพื่อพิจารณาปริมาณ TTLs

จากวิธีการสกัดสารจากใบแปะก๊วยในการทดลองตอนที่ 3.3 การนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัด โดยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction(UAE) เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยเทคนิค Reflux 60 นาที โดยสกัดด้วยตัวทำละลายสารละลาย 2 ชนิด ได้แก่ สารละลาย Buffer pH 9 และ Ethanol โดยนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ TTLs ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า Ethanol ให้ปริมาณ TTLs มากกว่า สารละลาย Buffer pH 9 คือ 490,829.74 Area/gDW และ 140,197.09 Area/gDW เมื่อพิจารณา Ginkgolide และ Bilobalide ในสารละลายข้างต้น ได้ปริมาณสารสกัด GA มากที่สุด ตามด้วย BB, GB, GC และ GJ จากการทดลองนี้พบว่าปริมาณสาร TTLs ที่สกัดด้วยตัวทำละลายสารละลาย Buffer pH 9 ได้ปริมาณเพิ่มขึ้นแต่ในทางกลับกันเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายสารละลาย Ethanol ได้ปริมาณ TTLs น้อยลง เมื่อเทียบกับการทดลองตอนที่ 3.1 และ ตอนที่ 3.2

จากวิธีการสกัดสารจากใบแปะก๊วยในการทดลองตอนที่ 3.4 การนำผงใบแปะก๊วยมาทำการสกัด โดยเทคนิค Reflux ที่เวลา 15, 30, และ 60 นาที ตามด้วยเทคนิคการ Ultrasonic assisted extraction(UAE) 15 นาที สกัดด้วยตัวทำละลายสารละลาย 2 ชนิด ได้แก่ สารละลาย Buffer pH 9 และ Ethanol โดยนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ TTLs ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลาย Buffer pH 9 ทำการ Reflux ที่ 60 นาทีให้ปริมาณ TTLs มากที่สุดคือ 282,511.09 Area/gDW ตามด้วย 15 และ 30 นาที ตามลำดับ และเมื่อพิจารณา Ginkgolide และ Bilobalide ในสารละลายข้างต้น ได้ปริมาณสารสกัด GA มากที่สุด ตามด้วย GB, BB, GC และ GJ ตามลำดับ และเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลาย Ethanol พบว่า Reflux ที่ 30 นาทีให้ปริมาณ TTLs มากที่สุด คือ 826,619.81 Area/gDW ตามด้วย 60 นาที และ 15 นาที ตามลำดับ เมื่อพิจารณา Ginkgolide และ Bilobalide ในสารละลายข้างต้น ได้ปริมาณสารสกัด BB มากที่สุด ตามด้วย GA, GB, GC และ GJ ตามลำดับ จากการทดลองนี้พบว่า การสกัดด้วยสารละลาย Ethanol ให้ปริมาณ TTLs มากที่สุด เมื่อเทียบกับการทดลองอื่นๆ

จากการทำงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นสรุปได้ว่าในการทดลองตอนที่ 3 การสกัดด้วยสารละลาย Ethanol โดยเทคนิค Reflux 30 นาที ตามด้วยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction(UAE) 15 นาที ให้ปริมาณ TTLs มากที่สุด ตามด้วยสกัดด้วยสารละลาย Ethanol โดยเทคนิค Reflux 60 นาที คือ 826,619.81 Area/gDW และ 579,307.47 Area/gDW และพบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลาย สารละลาย Buffer pH 7 ด้วย

เทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) 15 นาที ให้ความบริสุทธิ์มากที่สุด ตามด้วยการสกัดด้วยสารละลายสารละลาย Buffer pH 7 ด้วยเทคนิค Ultrasonic assisted extraction (UAE) 15 นาที คือ 94.11% และ 93.31%

ในส่วนของการทำบริสุทธิ์สารเทอร์ปีนแลคโตนในใบแปะก๊วยในการวิจัยตอนที่ 4.1 ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยวิธีการสกัดที่ใช้คือต้มผงใบแปะก๊วยกับ 70 % Ethanol นั้นในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีกำหนดให้ Amberlite XAD-7HP เป็นคอลัมน์อ้างอิง โดยคาร์บอนคอลัมน์ที่มีความสามารถเพียงพอที่จะทำบริสุทธิ์สารเทอร์ปีนแลคโตนได้ คือ Carbon black และ Activated charcoal

และเมื่อนำมาศึกษาความสามารถของตัวดูดซับชนิดต่างๆ ในการวิจัยตอนที่ 4.2 ซึ่งได้แก่ Carbon black Activated charcoal Activated from tamarind seeds Charcoal และมี Amberlite XAD-7HP เป็นตัวดูดซับอ้างอิง ในการทำบริสุทธิ์สารสกัดจากใบแปะก๊วย Carbon Black มีความสามารถในการทำบริสุทธิ์สารมากที่สุด รองลงมาคือ Activated Charcoal เมื่อเทียบกับคาร์บอนคอลัมน์อีก 2 ชนิด คือ Activated from tamarind seeds และ Charcoal ซึ่งตัวดูดซับทั้ง 2 ชนิดนี้ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการก่อกัมมันต์ (Activation) ทำให้ประสิทธิภาพของตัวดูดซับไม่ดี คือ มีพื้นที่ผิวน้อย และสิ่งสกปรกที่ยังเหลืออยู่ไปกีดขวางการดูดซับ

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการวิเคราะห์หาสารสกัด Terpene Lactones ซึ่งประกอบไปด้วย Bilobalide, Ginkgolide J, Ginkgolide C, Ginkgolide A และ Ginkgolide B โดยปกติแล้วจะต้องนำสารมาตรฐานมาฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อดู Retention time ของสารแต่ละตัว เนื่องจากโรงงานพิเศษมีงบประมาณจำกัด จึงทำให้อ้างอิงข้อมูลมาจากที่อื่นมาทำการเทียบ Retention time อาจทำให้ Retention time ของสารตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนไป

ในการทดลองตอนที่ 1.1 ควรที่จะเพิ่มวิธีการสกัดอีก 1 วิธีคือการแช่ในน้ำ เพื่อที่จะได้ใช้เปรียบเทียบกับ การทดลองตอนที่ 1.2 การต้มผงใบแปะก๊วยในน้ำจะทำให้ทราบว่า การให้ความร้อนมีผลต่อวิธีการสกัดด้วยน้ำหรือไม่ แต่เนื่องจากโรงงานพิเศษนี้ได้รับเงินสนับสนุนเพียงเล็กน้อยรวมถึงยังขาดเครื่องมือวิเคราะห์ HPLC-ELS Detector จึงต้องส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือซึ่งมีค่าวิเคราะห์ค่อนข้างสูง จึงไม่สามารถที่จะเพิ่มขั้นตอนการทดลองเข้าไปอีกได้

สำหรับการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งใน Ethanol 85.4% หรือตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ควรที่จะทำการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยการ Reflux ผงใบแปะก๊วยแห้งในตัวทำละลายอินทรีย์โดยวิธีนี้เราจะไม่สูญเสียตัวทำละลายอินทรีย์และ Terpene lactones ไปในระหว่างการสกัด

สำหรับการรีฟลักซ์ และการทำอัลตราโซนิก จะต้องควบคุมอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 60 °C แต่เครื่องให้ความร้อน และเครื่องอัลตราโซนิก ไม่สามารถปรับอุณหภูมิตามที่ต้องการได้ จึงทำการต้มน้ำเพื่อนำไปปรับให้ได้อุณหภูมิที่ต้องการ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยาก และอาจไม่ได้อุณหภูมิที่คงที่

สำหรับการนำเทคนิค Reflux และ Ultrasonic assisted extraction(UAE) มาสกัดสาร Terpene lactones โดยนำทั้งสองเทคนิคมาประยุกต์ใช้ในการสกัดผงใบแปะก๊วย ซึ่งประกอบด้วย เทคนิค Reflux ,Ultrasonic assisted extraction(UAE),Ultrasonic assisted extraction(UAE) ตามด้วย Reflux และการทำ Reflux ตามด้วยการทำ Ultrasonic assisted extraction(UAE) ดังนั้นถ้าหากทดลองทำการสกัดด้วยเทคนิค Reflux ในเครื่อง Ultrasonic ปริมาณ TTLs อาจจะเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการทดลองข้างต้น

จากโครมาโตแกรมของ 70% Ethanol ในการศึกษาเรื่องตัวทำละลายและสารตัวชะที่เหมาะสมที่เปอร์เซ็นต์การคืนกลับอยู่ในช่วงเกินค่าที่ยอมรับได้ (ค่าที่ยอมรับได้อยู่ระหว่าง 90-110 %) คือ 292 % เป็นเหตุมาจากวิธีการระเหยตัวทำละลายด้วยการให้ความร้อนโดยตรงบน Hot plate ความร้อนที่เกิน 100°C อาจมีผลต่อเสถียรภาพของสารเทอร์ปีนแลคโตน ทำให้ได้ค่าน้อยกว่าที่ควรจะเป็น ซึ่งหลังจากนี้เปลี่ยนไปใช้การระเหยด้วยการอังไอน้ำแทน

ในการวิจัยเรื่องการศึกษาความสามารถของตัวดูดซับ พบว่าคอลัมน์ Activated charcoal ให้โครมาโตแกรมที่ไม่ชัดเจน มีความบริสุทธิ์ต่ำ ปริมาณสารเทอร์ปีนแลคโตน้อยลง จากคอลัมน์ Activated charcoal ของเรื่องการศึกษาตัวทำละลายและสารตัวชะที่เหมาะสมจึงได้นำไปสู่การทดลองเรื่อง การทดสอบประสิทธิภาพการล้าง impurity ด้วยน้ำ ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า น้ำมีผลต่อการชะสารที่สนใจออกไปในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

ในการวิจัยเรื่องการศึกษาความสามารถของตัวดูดซับ พบว่าคอลัมน์ Activated from tamarind seeds มีปัญหาเรื่องการอุดตันของคอลัมน์ทำให้ไม่สามารถใช้วิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยตรงได้ จึงประยุกต์ใช้วิธีการกรองผ่านเครื่องกรองลดความดันโดยใช้เครื่องมือชนิดเดียวกันในการกรองสารสกัดจากใบแปะก๊วย



## บรรณานุกรม

- Amanlou, M., Mesgarpour, B., Farsam, H (2002). "Determination of Ginkgolides A and B In Ginkgo biloba leaves by HPLC using Activated Charcoal." Daru 10(4): 171-174.
- Bastianetto S, R. C., Dore S, Christen Y, Poirier J, Quirion R (2000). "The Ginkgobiloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid." Eur J Neurosci 12(6): 1882-1890.
- Beek, T. A. v. (2008). "Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts." Fitoterapia 79: 401-418.
- book/c/CM328/CM328-4.pdf, e.-b. r. e. e.-. (1 สิงหาคม 2557). "บทที่ 4 คอลัมน์โครมาโตกราฟี."
- Dubey AK, S. P., Upadhyaya D, Deshpande VY. (2004). "Ginkgo biloba—an appraisal." Kathmandu Univ Med J (KUMJ) 2(3): 225–229.
- Haas, R. a. (2006). "Amberlite™ XAD-7HP Industrial Grade Polymeric Adsorbent." [http://www.dow.com/assets/attachments/business/process\\_chemicals/amberlite\\_xad/amberlite\\_xad7\\_hp/tds/amberlite\\_xad7hp.pdf](http://www.dow.com/assets/attachments/business/process_chemicals/amberlite_xad/amberlite_xad7_hp/tds/amberlite_xad7hp.pdf) 2014.
- Houghton, P. (1994). "Herbal products." The Pharmaceutical Journal.
- Kaur, P. (2009). "Optimization of extraction technique and validation of developed RP-HPLC- ELSD method for determination of terpene trilactones in Ginkgo biloba leaves." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 50: 1060–1064.
- Kriegelstein J, A. F., El-Abhar H, Lippert K, Welsch M, Rupalla K, Henrich-Noack P (1990). "Neuroprotective effects of Ginkgo biloba constituents." Eur. J. Pharm Sci: 39-48.
- Lai, S. M., Chen, I. W., Tsai, M. J. (2005). "Preparative isolation of terpene trilactones from Ginkgo biloba leaves." Journal of Chromatography A 1092: 125-134.
- M.-J. Dubber, I. K. (2006). "Determination of terpene trilactone in Ginkgo biloba solid oral dosage forms using HPLC with evaporative light scattering detection." The Pharmaceutical and Biomedical Analysis Journal 41: 135-140.
- Po-Chuen Chan, Q. X. a. P. P. F. (2007). "Ginkgo Biloba Leave Extract Biological, Medicinal, and Toxicological Effects." Environmental Science and Health Part C 25: 211–244.
- Teris A. van Beeka, Paola Montoro (2009). "Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals." Journal of Chromatography A 1216: 2002–2032.
- Wai, Q. L. a. C. M. (1999). "An Extraction Method for Determination of Ginkgolides and Bilobalide in Ginkgo Leaf Extracts. Department of Chemistry." 71: 2929-2933.

Winter, E. (1991). "Effects of an extract of Ginkgo biloba on learning and memory in mice." *Pharmacol* 38(1): 109–114.

[www.sci.nu.ac.th](http://www.sci.nu.ac.th) (3 สิงหาคม 2557). "การทดลองที่ 6 โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง และโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์."

จุติพร อรุณโชติ, จ. โ., เทียนทิพย์ สงตะคุ, และศิริญาพร ปาโพธิ์ชัย (2554). การเตรียมถ่านกัมมันต์จากเถาแก่กรบโดยกระตุ้นด้วยกรดซัลฟิวริกและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับกับถ่านกัมมันต์ทางการค้า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชุติมา, ว. (2555). การสกัดอินนูลินและฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากแก่นตะวันด้วยอุลตราโซนิก วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ชูชาติ, อ. (2557). "เครื่องล้างอัลตราโซนิก." <http://home.kku.ac.th/chuare/12/ultrasoniccleaner.pdf>.

เชิดศักดิ์, ม. (2545). การสกัดสารพวก Terpene lactones และ Flavonoids จากใบ เปะก๊วย โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สายคนีย์, ห. (2552). ELSD กับงานวิเคราะห์สมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม.

อินทรานุปกรณ์, ร. (2550). การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เอมอร์, โ. (2542). เปะก๊วย สมุนไพรจีนรักษาความเสื่อม. จุลสารข้อมูลสมุนไพร: 3-11.



## สรุปการใช้จ่ายเงิน

	วันที่	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ
ไตรมาสที่ 1 (ต.ค. 57 - ธ.ค. 57)	-	-	-
ไตรมาสที่ 2 (ม.ค. 58 - มี.ค. 58)	24 ก.พ. 58	-	14,980.00
ไตรมาสที่ 3 (เม.ย. 58 - มิ.ย. 58)	21 เม.ย. 25	-	6,848.00
ไตรมาสที่ 4 (ก.ค. 58 - ก.ย. 58)	20 ก.ค. 58	-	16,948.80
	17 ก.ย. 58	-	10,272.00
	17 ก.ย. 58	951.20	-
	รวม	951.20	49,048.80

รวมรายจ่าย

50,000.00

## ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ไทย) อาจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์  
(อังกฤษ) Cherdsak Maneeruttanarungroj, Ph.D.
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 3606 00476 64 4
3. การทำงาน  
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์  
สถานที่ทำงาน สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง  
จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10520  
โทรศัพท์ 02-329-8400-11 ต่อ 6243 โทรสาร 02-329-8412  
โทรศัพท์มือถือ 084-662-6149 email: kmcherds@kmitl.ac.th
4. ประวัติการศึกษา  
ปริญญาตรี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปริญญาเอก ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. ประสบการณ์งานวิจัย
  1. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยเครื่องหมายพันธุกรรมเชิงโมเลกุล
  2. ศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน
  3. ศึกษากระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในจุลชีพสีเขียว

### ผลงานวิจัย

1. **Maneeruttanarungroj, C., Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. (2012) Sulfate permease (SulP) and hydrogenase (HydA) in the green alga *Tetraspora* sp. CU2551: Dependence of gene expression on sulfur status in the medium. Int J Hydrogen Energ37:15105-15116. (Impact factor 2010 = 4.053)**

2. **Maneeruttanarungroj, C.**, Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. (2010) A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. *Int J Hydrogen Energ* 35:13193-13199. (Impact factor 2010 = 4.053)
3. Nzila, A., Rottmann, M., Chitnumsub, P., Kiara, S. M., Kamchonwongpaisan, S., **Maneeruttanarungroj, C.**, Taweechai, S., Yeung, B. K., Goh, A., Lakshminarayana, S. B., Zou, B., Wong, J., Ma, N. L., Weaver, M., Keller, T. H., Dartois, V., Wittlin, S., Brun, R., Yuthavong, Y. and Diagana, T. T. (2010) Preclinical evaluation of the antifolate QN254, 5-chloro- N060-(2,5-dimethoxy-benzyl)-quinazoline-2,4,6-triamine, as an antimalarial drug candidate. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 2603–2610. (Impact factor 2010 = 4.672)
4. Dasgupta, T., Chitnumsub, P., Kamchonwongpaisan, S., **Maneeruttanarungroj, C.**, Nichols, SE., Lyons, TM., Tirado-Rives, J., Jorgensen, WL., Yuthavong, Y. and Anderson, K.S. (2009) Exploiting structural analysis, *in silico* screening, and serendipity to identify novel inhibitors of drug-resistant *Falciparum* malaria. *ACS ChemBiol* 4:29–40. (Impact factor 2010 = 5.698)
5. Supungul, P., Tang, S., **Maneeruttanarungroj, C.**, Rimphanitchayakit, V., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon A. (2008) Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* 32, 61–70. (Impact factor 2010 = 3.293)
6. **Maneeruttanarungroj, C.**, Pongsomboon, S., Wuthisuthimethavee, S., Klinbunga, S., Wilson, K.J., Swan, J., Li, Y., Whan, V., Chu, K.H., Li, C.P., Tong, J., Glenn, K., Rothschild, M., Jerry, D. and Tassanakajon, A. (2006) Development of polymorphic expressed sequence tag-derived

microsatellites for the extension of the genetic linkage map of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Anim Genet 37, 363–368. (Impact factor 2010 = 2.203)

#### รางวัลที่เคยได้รับ

1. 25 November 2012

Best oral presentation award from Young Scientist Program (13th FAOMBM congress).

Sirindhorn Science Home, NSTDA, Thailand

2. 20 April 2012

Best oral presentation award from The Science Forum 2012 (Applies Science and Technology session). Mahamakut Building, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand: April 19 – 20, 2012.

3. 03 April 2011

Outstanding presentation award from RGJ-Ph.D. Congress XII, Jomtein Palm Beach Resort Pattaya, Chonburi, Thailand.

4. 17 June 2010

Recognized as best graduate student, Chulalongkorn University, Thailand

5. 21 August 2005

The excellent graduate student award, the Prof. Dr. Tab Nilanidhi Foundation (the award was presented to the student who received the highest GPA above 3.70 in each department).

6. 13 July 2005

Outstanding Thesis Award, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University