

ปริมาณวิเคราะห์ของกรดไฮดรอกซีซิตริกในพืชสกุล *Garcinia*
โดยกะพิลารีอ์เล็ก โทพรอริชิส



นางสาวลักขมี หมั่นศรีธาราม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

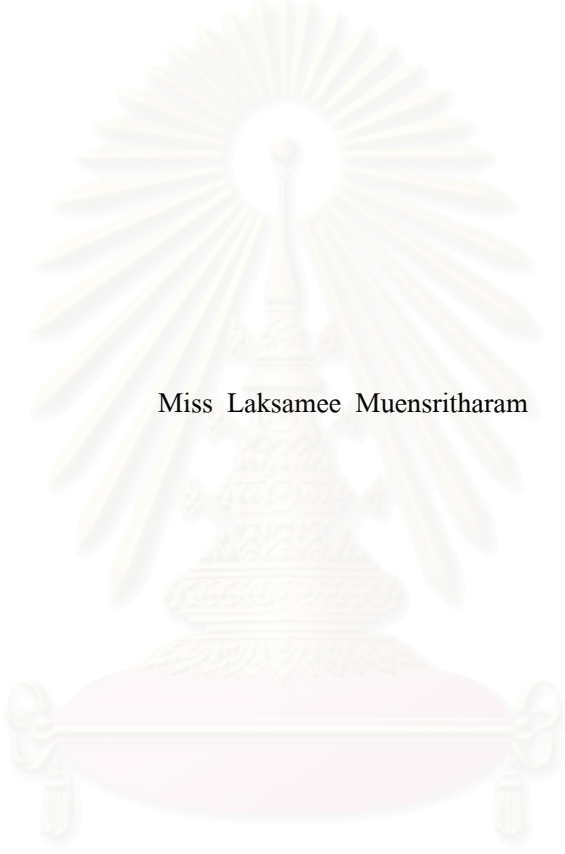
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

QUANTITATIVE ANALYSIS OF HYDROXYCITRIC ACID IN GENUS *Garcinia*
BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Miss Laksamee Muensritharam



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

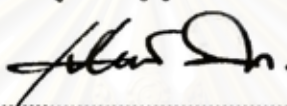
Chulalongkorn University

Academic Year 2006

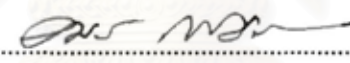
Copyright of Chulalongkorn University

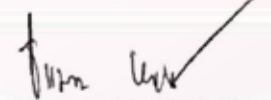
หัวข้อวิทยานิพนธ์ ปริมาณวิเคราะห์ของกรดไฮดรอกซีซิดริกในพืชสกุล *Garcinia*
โดยคະพິลลารີอີเล็กໂທຣຟອຣີສ
โดย นางสาวลักขมี หมั่นศรีธาราม
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธรรมบุญ หนูจักร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. ชัย โย ชัยชาญทิพยุทธ

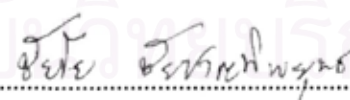
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท

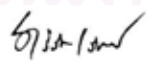

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต)

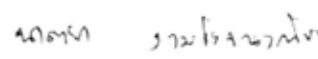
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธรรมบุญ หนูจักร)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชัย โย ชัยชาญทิพยุทธ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาดยา งามโรจนวิชย์)

ลักษณะ หนึ่มนศรีธาราม : ปริมาณวิเคราะห์ของกรดไฮดรอกซีซิดริกในพืชสกุล *Garcinia*
โดยคะพิลลารีอิล็กโทรฟอริซิส (QUANTITATIVE ANALYSIS OF
HYDROXYCITRIC ACID IN GENUS *Garcinia* BY CAPILLARY
ELECTROPHORESIS) อ.ที่ปริกษา : ศศ. คร. ธรรมบุญ หนูจักร, อ.ที่ปริกษาร่วม :
รศ. คร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, 60 หน้า.

ได้พัฒนาคะพิลลารีอิล็กโทรฟอริซิสเป็นวิธีการสำหรับหาปริมาณกรดไฮดรอกซีซิดริก
กรดไฮดรอกซีซิดริกแลคโตน และกรดอินทรีย์อื่นๆ ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารโดยการ
แปรเปลี่ยนชนิด ความเข้มข้น และพีเอชของบัฟเฟอร์ พบว่าค่าการแยกสารที่สมบูรณ์พื้นฐานพิกของ
กรดอินทรีย์ที่สนใจทั้งหมด เมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่ปรับพีเอชเป็น 9.2 ที่ประกอบด้วย 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 90
mM NaH_2PO_4 และ 0.5 mM เททระเดคซิลไดรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ จากการตรวจสอบความ
ถูกต้องของวิธีการที่พัฒนาขึ้น พบว่ามีความแม่นยำและความเที่ยงสูง ชิดจำกัดของการตรวจวัดที่
ยอมรับได้ (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 12.8 และ 15.7 ppm สำหรับกรดไฮดรอกซีซิดริกและกรดไฮดรอกซี
ซิดริกแลคโตน ตามลำดับ) เวลาวิเคราะห์เร็วภายใน 5 นาที การเพิ่มขึ้นอุณหภูมิของสารละลาย
มาตรฐานและสารละลายตัวอย่างมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาแลคโตนไนเซชันของกรดไฮดรอกซีซิดริก
ไปเป็นกรดไฮดรอกซีซิดริกแลคโตน ดังนั้นจึงเก็บสารละลายตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิค่าก่อนการ
วิเคราะห์ เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 120 °C ที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง พบว่าอุณหภูมิของการสกัดที่
อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 °C) ได้ปริมาณกรดไฮดรอกซีซิดริกที่มากกว่าและปริมาณกรดไฮดรอกซี
ซิดริกแลคโตนที่น้อยกว่า แต่ปริมาณรวมทั้งคำนวณเป็นกรดไฮดรอกซีซิดริกไม่แตกต่างกันอย่างมี
นัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิห้องสำหรับการสกัดตัวอย่าง เมื่อใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ไปวิเคราะห์
ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรในเชิงพาณิชย์ของกรดไฮดรอกซีซิดริกจำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าแต่ละ
ตัวอย่างมีปริมาณรวมของกรดไฮดรอกซีซิดริกที่แตกต่างกันในช่วง 2.1 ถึง 6.5 เปอร์เซ็นต์โดย
น้ำหนัก หรือ 10.4 ถึง 32.3 มิลลิกรัมต่อแคปซูล นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของปริมาณรวมของ
กรดไฮดรอกซีซิดริกในใบ และ/หรือ ผลของตัวอย่างพืชสกุล *Garcinia* เช่น ส้มแขก ชะมวงใต้
ชะมวงตะวันออกและ มะดัน โดยที่ปริมาณรวมของกรดไฮดรอกซีซิดริกมากที่สุด 21 และ 24
เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในส่วนใบแก่ของชะมวงใต้และผลแก่ของส้มแขกตามลำดับ ดังนั้นวิธีการที่
พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพร และตรวจสอบปริมาณ
รวมของกรดไฮดรอกซีซิดริกในแหล่งและสายพันธ์ต่างๆของพืชสกุล *Garcinia* ได้

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต *ส.ชัยโย*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปริกษา *King, Uth*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปริกษาร่วม *ศ.ดร. ชัยชาญทิพยุทธ*

4772446923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: CAPILLARY ELECTRORESIS / HYDROXYCITRIC ACID / GARCINIA

LAKSAMEE MUENSRITHARAM : QUANTITATIVE ANALYSIS OF HYDROXYCITRIC ACID IN GENUS *Garcinia* BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS. THESIS ADVISOR : ASST.PROF. THUMNOON NHUJAK , Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC.PROF. CHAIYO CHAICHANTIPYUTH, Ph.D., 60 pp.

Capillary electrophoresis (CE) was developed as a method for quantitative determination of hydroxycitric acid (HCA), hydroxycitric acid lactone (HCAL) and other carboxylic acids. The separation was optimized by varying type, concentration and pH of buffers. The achieved baseline resolution of all interest carboxylic acids was obtained using the adjusted pH 9.2 buffer containing 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 90 mM NaH_2PO_4 and 0.5 mM tetradecyltrimethylammonium bromide. The validated method was found to give high accuracy and precision, acceptable limit of detection (particularly 12.8 and 15.7 ppm for HCA and HCAL, respectively), and fast analysis time within 5 min. An increase in the temperature of standard and sample solutions resulted in lactonization of HCA to become HCAL, and therefore the sample solutions were kept at low temperature before CE analysis. In comparison with room temperature (25 °C) for sample extraction, the extraction temperature of 120 °C gave the greater amount of HCA and the smaller amount of HCAL, but non-significant difference in the total amount calculated as HCA. Therefore, the room temperature was chosen for sample extraction. Using this developed method, the five samples of commercial herbal products of HCA were found to contain different amounts of total HCA ranging from 2.1 to 6.5 %w/w or 10.4 to 32.3 mg/capsule. In addition, the different amounts of total HCA were obtained in leaf and/or fruit samples of genus *Garcinia* such as *G. atroviridis*, *G. cowa*, *G. nigrolineata* and *G. schomburgkiana*, with the highest amount of 21 and 25 %w/w total HCA in the old leaf of *G. cowa* and ripe fruit of *G. atroviridis*, respectively. Therefore, this developed method can be used for quality control of commercial herbal products and monitoring HCA in various sources and species of genus *Garcinia*.

Field of study Biotechnology

Academic year 2006

Student's signature.....*Laksamee Muensritharam*

Advisor's signature.....*Thumnoon Nhuja*

Co-advisor's signature.....*Chaiyo Chaichantipyuth*

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอย่างยิ่งต่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชรรมนุญ หนูจักร และ รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ ข้อคิดเห็น คำแนะนำและคำปรึกษาต่างๆ คอยดูแลตลอดการวิจัยอย่างสม่ำเสมอ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรมศาสตร์ คณาจารย์ และนักวิจัยทุกคนของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรมศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำต่างๆ และดูแลตลอดการวิจัย

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้เงินทุนสนับสนุนงานวิจัย ประจำปีการศึกษา 2549

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ดูแล ให้คำแนะนำ และให้ความสะดวกในเรื่องต่างๆ

ขอขอบคุณ พี่ๆ และเพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา และครอบครัววันเลี้ยง ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างพืชสกุล *Garcinia* และให้การดูแลเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดามารดา และพี่ชาย ที่ให้การสนับสนุนการศึกษา และเป็นกำลังใจให้ด้วยดีตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูป.....	ญ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน.....	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ห้กรดไฮดรอกซีซิทริก.....	5
1.3 วัตถุประสงค์.....	5
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	5
1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	6
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้.....	6
2 ทฤษฎี	
2.1 คัพอิเล็กโตรโฟรีซิส (capillary electrophoresis, CE).....	7
2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง CE.....	7
2.3 ประเภทของเทคนิค CE.....	9
2.4 ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility, μ).....	9
2.5 อิเล็กโตรออสโมซิส (electroosmosis).....	10
2.6 พฤติกรรมเคลื่อนที่ของสาร.....	12
2.7 อิเล็กโตรฟีโรแกรมและไมเกรชันไทม์ (electropherogram and migration time).....	14
2.8 คุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE (Qualitative and Quantitative Analysis in CE).....	15
3 การทดลอง	
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	16
3.2 สารเคมี.....	16

3.3	การแยกสารมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน.....	17
3.4	การเตรียมสารละลาย.....	17
3.5	ภาวะของ CE สำหรับการทดลอง.....	19
3.6	การหาภาวะของ CE.....	20
3.7	การตรวจสอบวิธีการ (method validation).....	20
3.8	การสลายตัวของกรดไฮดรอกซีซิทริก.....	22
3.9	การประยุกต์กับตัวอย่างจริง.....	23
4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1	การแยกสารมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน.....	24
4.2	การเลือกภาวะของ CE.....	25
4.3	การหาภาวะของ CE.....	25
4.4	การตรวจสอบวิธีการ (Method Validation).....	36
4.5	การสลายตัวของกรดไฮดรอกซีซิทริกและการเตรียมตัวอย่าง.....	43
4.6	การประยุกต์กับตัวอย่างจริง.....	45
5	สรุปผลการทดลอง.....	54
	รายการอ้างอิง.....	56
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	60

สารบัญตาราง

	หน้า
3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟสอบเทียบ.....	18
3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อหาความเที่ยง.....	21
3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อหาความแม่นยำ.....	21
3.4 การเตรียมสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 500 ppm ที่เดิมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ.....	21
4.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ.....	36
4.2 สูตรกราฟสอบเทียบสำหรับปริมาณวิเคราะห์.....	39
4.3 ความเที่ยงของไมเกรชันไทม์.....	40
4.4 ความเที่ยงของพื้นที่ ($A_{\text{corr, สารมาตรฐาน}} / A_{\text{corr, ICA}}$).....	41
4.5 ความแม่นยำของปริมาณวิเคราะห์.....	42
4.6 เปรียบเทียบปริมาณกรดอินทรีย์ (ppm) จากการสกัด 2 วิธี.....	44
4.7 ปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร.....	48
4.8 ปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร (มิลลิกรัม / แคปซูล).....	48
4.9 ปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างพืชสกุล <i>Garcinia</i> (% w/w).....	52

สารบัญรูป

	หน้า
1.1 กลไกการยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมันของกรดไฮดรอกซีซีตริก.....	4
2.1 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE.....	7
2.2 การไหลของอิเล็กโทรออสโมซิสในเคพิลลารี (EOF).....	11
2.3 พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารภายใต้ภาวะ EOF มาก และกรณีที่มีผิวของเคพิลลารีเป็นประจุลบและใช้ขั้วไฟฟ้าปกติ.....	12
2.4 การกลับทิศทางของ EOF โดยใช้สารลดแรงตึงผิวประเภทแคทไอออน.....	13
3.1 สูตรโครงสร้างของกรดอินทรีย์.....	17
4.1 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของสารละลายมาตรฐาน โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ.....	27
4.2 ไมเกรชันไทม์ ของสารที่ pH ต่างๆของฟอสเฟตบัฟเฟอร์.....	28
4.3 ค่า μ ของสารที่ pH ต่างๆของฟอสเฟตบัฟเฟอร์.....	28
4.4 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของสารละลายมาตรฐาน โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2.....	30
4.5 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของสารละลายมาตรฐาน โดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ กับ NaH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ pH 9.2	32
4.6 ไมเกรชันไทม์ ของสารโดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ กับ NaH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ pH 9.2.....	33
4.7 ค่า μ ของสาร โดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ กับ NaH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ pH 9.2.....	33
4.8 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของสารละลายมาตรฐาน โดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ กับ NaH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ pH 9.2.....	34
4.9 ไมเกรชันไทม์ ของสารโดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ กับ NaH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ pH 9.2.....	35
4.10 ค่า μ ของสาร โดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ กับ NaH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ pH 9.2.....	35
4.11 แสดงตัวอย่างอิเล็กโทรฟีโรแกรมของสารละลายมาตรฐาน.....	37
4.12 กราฟสอบเทียบสำหรับปริมาณวิเคราะห์.....	38
4.13 ปฏิกิริยาแลกโตไนเซชัน (lactonization).....	43
4.14 การเปลี่ยนแปลงของกรดไฮดรอกซีซีตริก และกรดไฮดรอกซีซีตริกแลกโตนที่อุณหภูมิต่างๆ ในสารละลายมาตรฐานและในสารละลายตัวอย่าง.....	44
4.15 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของตัวอย่างผลิตภัณฑ์.....	47

4.16 อีเล็กโทรฟีโรแกรมของพืชสกุล *Garcinia*.....50

4.17 อีเล็กโทรฟีโรแกรมของพืชสกุล *Garcinia*51



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

z	ค่าประจุของสาร
e	ค่าประจุของอิเล็กตรอน
η	ความหนืดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์
r_h	Hydrodynamic radius of an ion เป็นรัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน ซึ่งเป็นรัศมีของไอออนที่มีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบขณะที่ไอออนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า
μ	ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility)
μ_A	ค่า μ ของสารตัวอย่าง A
μ_B	ค่า μ ของ BGE counter ion
μ_C	ค่า μ ของ BGE co-ion
μ_{eo}	ความสามารถในการเคลื่อนที่เนื่องจากอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic mobility)
μ°	ความสามารถในการเคลื่อนที่สัมบูรณ์ (absolute mobility)
d	ขนาดของกะพิลลารี
E	ความเข้มศักย์ไฟฟ้า
I	ionic strength
v_{ep}	Electroosmotic velocity
v_{eo}	Electrophoretic velocity
v_{net}	ผลรวมของความเร็วของสาร ($v_{ep} + v_{eo}$)
V	ความต่างศักย์ที่ใช้ในการแยกสาร
V_{inj}	ปริมาณของสารตัวอย่างที่บรรจุ
t_m	ไมเกรชันไทม์
t_{inj}	เวลาที่ใช้บรรจุสาร
t_{eo}	ไมเกรชันไทม์ของสารที่ไม่มีประจุ หรือ EOF marker
L	ความยาวทั้งหมดของกะพิลลารี
l	ความยาวจากปลายกะพิลลารีด้านบรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด
Q	ปริมาณของสารที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจ
A_{corr}	corrected peak area (พื้นที่ใต้พีกหารด้วยไมเกรชันไทม์)
$A_{corr, \text{สารมาตรฐาน}}$	corrected peak area ของสารมาตรฐาน
$A_{corr, ICA}$	corrected peak area ของกรดไอโซซิติริก

CE	capillary electrophoresis
BGE	background electrolyte
EOF	electroosmotic flow
HPLC	high performance liquid chromatography
OA	กรดออกซาลิก
MA	กรดมาลิก
ICA	กรดไอโซซिटริก
CA	กรดซิทริก
TA	กรดทาพาลิก
HCA	กรดไฮดรอกซีซิทริก
HCAL	กรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน
UV	ultraviolet
CZE	Capillary Zone Electrophoretic
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantitative
ppm	part per million
RSD	relative standard deviation
TTAB	tetradecyltrimethylammonium bromide
%w/w	weight percentage by weight

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีสำคัญ หรือสมมติฐาน

พืชสกุล *Garcinia* เป็นพืชสกุลใหญ่มีการกระจายตัวอยู่ในแถบทวีปเอเชีย บริเวณเขตเส้นศูนย์สูตร ทวีปแอฟริกา และเกาะโพลินีเซีย ซึ่งมีทั้งหมด 180 สปีชีส์ ส่วนในประเทศไทยมีการสำรวจและรายงานว่ามี 22 สปีชีส์ [เต็ม สมิตินันท์: 2523] กระจายอยู่ในทั่วทุกภาคของประเทศ ทั้งนี้ได้มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับสารที่พบในส่วนต่างๆของต้นในหลายๆสปีชีส์ ซึ่งสารที่พบประกอบด้วย xanthone และอนุพันธ์ของ xanthone [Rukachaisirikul *et al.*: 2003] โดยมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในการนำมาใช้เป็นยาฆ่าเชื้อโรคเนื่องจากมีความสามารถในการทำลายเชื้อราหลายชนิด และยังมีคุณสมบัติในการเป็นสารแอนติออกซิแดน [Tamil Selvi *et al.*: 2003] นอกจากนี้ยังพบกรดอีกหลายชนิด เช่น กรดออกซาลิก กรดมาลิก กรดซิตริก กรดไฮดรอกซีซิตริก และกรดไฮดรอกซีซิตริกแลกโตน โดยกรดไฮดรอกซีซิตริกนั้นได้มีการศึกษาพบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน ในส่วนที่จะเป็นไขมันสะสมต่อไป [Badmaev *et al.*: 1999, Heymsfield *et al.*: 1998] จากคุณสมบัติข้อนี้จึงมีการศึกษาเพื่อที่จะนำไปใช้ในการลดน้ำหนักอย่างปลอดภัยต่อไป

แหล่งที่พบกรดไฮดรอกซีซิตริก

จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ากรดไฮดรอกซีซิตริกนั้นสามารถพบได้ในส่วนต่างๆของพืชสกุล *Garcinia* สายพันธุ์ที่พบในประเทศอินเดีย คือ *Garcinia cambogia*, *Garcinia cowa* และ *Garcinia indica* ซึ่งพบกรดไฮดรอกซีซิตริกในส่วนเปลือกผลแห้ง ผลสด และใบ [Jayaprakasha *et al.*: 2002, Jayaprakasha and Sakariah: 1998, Jayaprakasha and Sakariah: 2002] แต่พืชสกุล *Garcinia* สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยนั้นยังมีการศึกษากันน้อย ในงานวิจัยนี้จะได้ศึกษาพืชสกุล *Garcinia* 4 สายพันธุ์ดังนี้คือ

Garcinia atroviridis Griff. ex T. Anderson มีชื่อสามัญคือ มะขามแขก ส้มแขก ส้มควาย ส้มพะงุน ส้มมะวน และอาแซกะลูโก มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้น สูง 6-12 เมตร ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปขอบขนานแกม กว้าง 3-5 ซม. ยาว 12-20 ซม. ปลายใบเรียวแหลม โคนใบรูปปลีมน สีเขียวเข้ม ใบอ่อนสีแดง ก้านใบยาว 1.5-2 ซม. ดอกแยกเพศ ดอกตัวผู้เป็นกระจุก 2-3 ดอก เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ซม. กลีบเลี้ยงชั้นนอกรูปขอบขนานหรือรูปโล่ ชั้นในขอบกลีบบาง ขนาดใหญ่กว่า กลีบดอกรูปไข่กลับแกมรูปโล่ ขนาดใหญ่สีแดงเลือดคนก ก้านช่อบริเวณยาว เรียงเป็นวงติดอยู่บนฐานรองดอกมีเนื้อ

อับเรณูรูปขอบขนานแคบ ดอกตัวเมียเป็นดอกเดี่ยวที่ปลายกิ่ง กลีบเลี้ยงและกลีบดอกลักษณะคล้าย ในดอกตัวผู้ แต่กลีบดอกมีขนาดเล็กกว่า เกสรตัวผู้ที่เป็นหมันติดอยู่บนแอนนูลัส รั้งไขรูป ทรงกระบอก มีสันผลรูปกลมแป้น มีสันและร่องจำนวนมาก สีเหลืองแกมส้มสด น้ำน้ำ รสเปรี้ยวจัด พบมากทางตอนเหนือของประเทศพม่า และมาเลเซียในประเทศไทยพบในพื้นที่ทางภาคใต้ เช่น สงขลา ยะลา ปัตตานี สตูล นราธิวาส พังงา ภูเก็ต กระบี่ ชุมพร และระนอง ชอบขึ้นในที่ซึ่งมีฤดูแล้ง ที่สั้น ในเขตร้อนชื้นที่มีฝนตกชุกในป่าแถบพื้นที่ราบต่ำจนถึงความสูงของภูเขา 600 เมตร

Garcinia schomburgkiana Pierre มีชื่อสามัญคือมะดัน มีลักษณะเป็นไม้ต้นรอเลื้อย ขนาด กลาง สูง 4 - 10 ม. ลำต้นตรง มีกิ่งแขนงแตกออกรอบลำต้นขนานกับพื้นหรือโค้งเล็กน้อย กิ่งเป็น สีเหลือง สีออกดำ เปลือกนอก เรียบหรือแตกเป็นร่องเล็กเล็กตามยาวลำต้น สีน้ำตาลอ่อนถึงเข้มจัด เปลือกใน สีชมพู กระจุกสีเหลืองใบ เป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกันเป็นคู่ รูปขอบขนาน หรือรูปไข่ กลีบ กว้าง 25 ซม. ยาว 9 ซม. ปลายใบมน โคนสอบขอบเรียบ เนื้อใบหนาคล้ายแผ่นหนัง เส้นแขนง ใบมีประมาณ 20 คู่ ไม่ชัดเจน ก้านใบ ยาวประมาณ 5 มม. หลังใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ท้องใบสีจาง กว่า เกือบ ไม่มีขน ใบอ่อน สีน้ำตาลแดงสดใส ดอก ออกตามง่ามใบ มีดอกเพศผู้และดอกสมบูรณ์ เพศ ออกเป็นกระจุก ๆ ละ 3 - 6 ดอก ก้านดอก ยาว 1 - 2 มม. กลีบรองกลีบดอก 4 กลีบ ก่อนข้าง กลม อกเป็นกระพุ้ง กว้าง 3.5 มม. ยาว 5 มม. กลีบดอกมี 4 กลีบ รูปรีแกมรูปไข่ กว้างประมาณ 3 มม. ยาว 6.5 มม. ปลายกลม โคนสอบแคบ ดอกเพศผู้ มีเกสรผู้จำนวนมาก เรียงเป็นวง 5 - 6 วง บน ฐานดอก ก้านเกสรสั้น เป็นสีเหลือง อับเรณูมี 4 พู เห็นได้ชัด ไม่มีเกสรเมีย ดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสร ผู้ 12 - 20 อัน รวมกันเป็นกลุ่ม 4 กลุ่ม รั้งไขมี 5 ช่อง ยอดเกสรแยกเป็น 5 แฉก ดอกสีแดงเรื่อ หรือสี ชมพู ผลสด รูปรี หรือขอบขนาน กว้าง 1.5 - 2.5 ซม. ยาว 3 - 5 ซม. ผิวบางเกลี้ยง สีเขียวเป็นมัน ผล แก่จัด เมื่อมีอายุ 4 - 5 เดือน ผลน้ำน้ำ มีรสเปรี้ยว ภายในผลมี 3 - 6 เมล็ด ถ้าเมล็ดดิบพุดหนึ่งจะ โต ผลเปรี้ยวสามารถพบได้ในพื้นที่ทุกภาคของประเทศไทย มาเลย์ และพินินซูลาห์พบตามลำธาร และหนอง บึง ในป่าดงดิบแล้ง เจริญเติบโตได้ดีในดินเกือบทุกชนิด แต่ชอบดินร่วนโปร่ง มีการ ระบายน้ำดีมีความชื้นสูงและมีความอุดมสมบูรณ์สูง ปัจจุบันมีปลูกตามบ้านเรือนหรือสวนทั่ว ๆ ไป

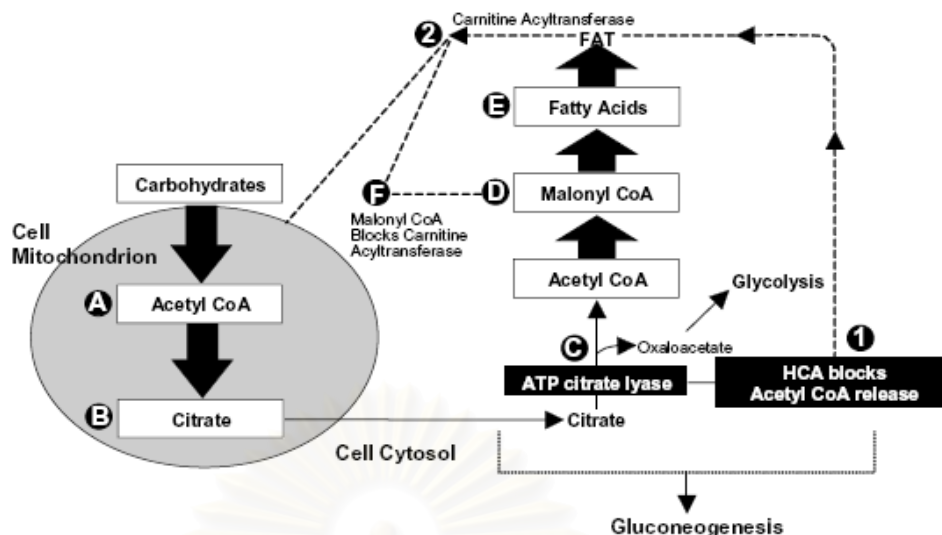
Garcinia cowa Roxb. ex DC. มีชื่อสามัญคือ ชะมวง กะมวง มวง ยอดมวง หรือส้มมวง มี ลักษณะ เป็นต้นไม้ ขนาดกลาง สูง 15 - 20 ม. เรือนยอด เป็นพุ่มรูปกรวยคว่ำ ทรงสูง แตกกิ่งชั้น เดียว เปลือกนอก เรียบ สีน้ำตาลเข้มเกือบดำ ต้นแก่มีรอยแตกตามยาวโดยรอบลำต้น และอาจมีรอย แผล เปลือกใน สีชมพูถึงแดง มีน้ำยางสีเหลืองข้นไหลเยิ้มออกมาจากเปลือกต้น ใบเป็น ใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกันข้ามเป็นคู่ ๆ แต่ละคู่เรียงตรงกันข้ามเป็นมุมฉากซึ่งกันและกัน ใบรูปไข่ขอบขนาน ปลายใบและโคนใบแหลม ผิวใบเป็นมัน เนื้อใบหนา ขอบใบเรียบมีเคลือบมันรอบขอบใบ ใบอ่อน สีแดงอมเหลือง ใบแก่สีเขียวเข้ม แห้งสีน้ำตาลอ่อนแกมชมพู ท้องใบมีจุดและก้านใบยาว 1 - 1.5 ซม. เส้นใบมีมาก ละเอียด แต่มองเห็นได้ทางหลังใบ ใบมีรสเปรี้ยว มีดอกเป็นช่อขนาดเล็ก กลีบ

ดอกแข็ง หนา ขนาด 10 - 15 มม. แตกออกจากโคนใบและปลายกิ่ง ดอกเพศผู้ สีชมพูถึงแดง ขนาดเล็ก กระจุกละ 3 - 8 ดอก ก้านช่อดอก ยาว 3 - 4 มม. กลีบรองกลีบดอก 4 กลีบ รูปรีแกมขอบขนาน ขนาด 4 - 6 × 6 มม. ปลายกลีบกลม กลีบดอกมี 4 กลีบ รูปรีขนาด 2.5 - 4.5 ซม. เกสรผู้จำนวนมาก ก้านเกสรสั้นอับเรณูรูปขอบขนานเป็นสี่เหลี่ยม เกสรตัวผู้ไม่สมบูรณ์เชื่อมกันเป็นกลุ่มรอบรังไข่ไม่มีเกสรเพศเมีย ดอกเพศเมีย เป็นดอกเดี่ยว ๆ ก้านดอกสั้นมาก กลีบรองดอกและกลีบดอกคล้ายคลึงดอกเพศผู้ แต่มีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย รังไข่แบบ superior รูปกลม ผิวเป็นพู 6 - 8 พู ก้านเกสรสั้น ยอดเกสรแยกเป็น 6 - 8 แฉก เป็นปุ่มปม ภายในแบ่งเป็น 6 - 8 ช่อง แต่ละช่องมีไข่ 1 หน่วย ดอกแยกเพศอยู่ต่างต้น ลักษณะของผลสดเป็นทรงกลม ผิวเรียบมีร่องรอยเป็นพูบาง ๆ รอบผล ขนาดผล 2.5 - 3.0 ซม. ผลอ่อน สีเขียวอมเหลือง ผลแก่ เมื่อสุกมีสีเหลืองถึงส้ม ผลสุกจะแตกออกเป็นหลายเลี้ยวภายใน เนื้อผลสีเหลืองส้ม จำนวนเมล็ด มีเมล็ด 7 - 12 เม็ด เมล็ดมีสีเหลืองถึงส้มพบใน อินเดีย พม่า มาเลเซียและตอนใต้ของประเทศไทย เดิบโตได้ดีตามป่าดงดิบถึงระดับน้ำทะเลปานกลาง 600 ม. และป่าพรุ

ส่วนลักษณะของ *Garcinia nigrolineata* Planch. ex T. Anderson หรือชะมวงตราด นั้น คล้ายกับ *Garcinia cowa* Roxb. ex DC. จะต่างกันที่ลักษณะของใบ คือจะมีใบที่ใหญ่กว่า ในประเทศไทยนั้นพบได้ในแถบภาคตะวันออก จังหวัดระยอง จันทบุรี และตราด

กลไกการยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมันของกรดไฮดรอกซีซิทริก [Soni et al.: 2004]

เมื่อรับประทานอาหารเข้าไปร่างกายจะย่อยอาหารเหล่านั้นให้อยู่ในรูปที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้และเผาผลาญเพื่อให้ได้พลังงานตามที่ร่างกายต้องการ ส่วนที่เหลือจากการเผาผลาญจะถูกนำมาสังเคราะห์และเก็บไว้ในส่วนต่างๆของร่างกาย ไขมันก็เป็นรูปหนึ่งที่ร่างกายนำสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เหลือจากการเผาผลาญมาสังเคราะห์และเก็บไว้ในส่วนต่างๆของร่างกาย เมื่อมีมากเกินไปทำให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพตามมา เช่น โรคอ้วน โดยกรดไฮดรอกซีซิทริกมีคุณสมบัติในการยับยั้งการสังเคราะห์ไขมันได้ดังรูปที่ 1 อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตจะถูกย่อยสลายเป็น Acetyl CoA ซึ่งเป็นตัวตั้งต้นในการสังเคราะห์ไขมัน โดยขบวนการนี้เกิดขึ้นใน mitochondria แต่เนื่องจากขบวนการสังเคราะห์ไขมันนั้นเกิดขึ้นใน cytosol ซึ่งอยู่ภายนอก Acetyl CoA มีขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านออกไปได้จึงถูกเปลี่ยนเป็น citrate ซึ่งมีขนาดเล็กทำให้สามารถออกมามากมายนอก mitochondria ได้ และจะมีเอนไซม์ ATP citrate lyase มาเปลี่ยน citrate เป็น Acetyl CoA โดย Acetyl CoA เป็นตัวตั้งต้นในการสลายไปเป็นพลังงานตามที่ร่างกายต้องการ และ Acetyl CoA ส่วนที่เหลือจะถูกนำไปสังเคราะห์ไขมัน แต่เมื่อมีกรดไฮดรอกซีซิทริกเข้าไปในร่างกาย กรดไฮดรอกซีซิทริกจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATP citrate lyase ทำให้ citrate ไม่สามารถเปลี่ยนกลับไปเป็น Acetyl CoA ได้ จึงไม่มีสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน



รูปที่ 1.1 กลไกการยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมันของกรดไฮดรอกซีซีตริก: สำนานจาก [Soni et al.: 2004]

ปัจจุบันประเทศไทยมีการจำหน่ายผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของกรดไฮดรอกซีซีตริก ส่วนมากจะเป็นส่วนสกัดจากผลส้มแขกอินเดีย (*Garcinia cambogia*) แต่กรดไฮดรอกซีซีตริก สามารถพบในสายพันธุ์อื่นด้วยดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค คัพริลลือเล็กโทโรฟริซิส (capillary electrophoresis, CE) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซีตริกในส่วนสกัดและเปรียบเทียบปริมาณของกรดไฮดรอกซีซีตริกในพืชสกุล *Garcinia* ได้แก่ ส้มแขกไทย (*Garcinia atroviridis* Griff. ex T. Anderson) มะดัน (*Garcinia schomburgkiana* Pierre) ชะมวง (*Garcinia cowa* Roxb. ex DC.) และชะมวงตราด (*Garcinia nigrolineata* Planch ex T. Anderson) โดยจะศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อปริมาณของ กรดไฮดรอกซีซีตริก ได้แก่ ระยะเวลาแก่อ่อนของผลหรือใบ รวมทั้งหาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดกรดไฮดรอกซีซีตริกที่มีอยู่ในส่วนต่างๆของพืชและศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวของกรดไฮดรอกซีซีตริกในสารมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

เทคนิค CE เป็นการแยกสารที่มีประจุด้วยไฟฟ้าในหลอดคัพริลลือขนาดเล็กที่บรรจุสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte, BGE) กลไกการแยกของสารขึ้นอยู่กับความสามารถของการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoresis mobility) ทั้งนี้เทคนิค CE มีข้อดีเหนือเทคนิคไฮเพอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) คือ ไม่ใช้หรือใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อย ไม่เสี่ยงต่อการทำลายหรือการอุดตันคอลัมน์

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซิทริก

ได้มีรายงานการวิจัยในการสกัดแยกกรดไฮดรอกซีซิทริกจากเปลือกผลแห้งของส้มแขก (*Garcinia cambogia*) โดยใช้วิธีการต้มกับน้ำภายใต้แรงดันและแยกกรดไฮดรอกซีซิทริกออกจากส่วนสกัดโดยใช้ cation exchange resin [Jena *et al.*: 2002, Lewis and Neelakantan: 1965] นอกจากนี้ยังมีการใช้ Soxhlet extractor มี acetone และ methanol เป็น solvent ในการสกัด [Jena *et al.*: 2002] และมีการวิเคราะห์ปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกในส่วนสกัดของผลส้มแขกอินเดีย (*Garcinia cambogia*) โดยใช้เทคนิค HPLC พบว่าพิกของกรดไฮดรอกซีซิทริก แยกออกจากพิกอื่นไม่สมบูรณ์ [Jayaprakasha and Sakariah: 1998] ทำให้ขาดความเชื่อมั่นของปริมาณกรดที่วิเคราะห์ได้ แต่ได้มีการนำ เทคนิค HPLC มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดกรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดอินทรีย์อื่นๆในส่วนต่างๆของต้น *Garcinia cowa* และ *Garcinia indica* พบว่ามีปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกในแต่ละส่วนของต้นแตกต่างกัน โดยในเปลือกของผลแห้งจะมีปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกมากที่สุด นอกจากพบกรดไฮดรอกซีซิทริกแล้วยังพบกรดออกซาลิกและกรดซิทริกอีกด้วย แต่พบในปริมาณที่น้อย [Jayaprakasha *et al.*: 2002, Jayaprakasha and Sakariah: 1998]

สำหรับการแยกและวิเคราะห์กรดอินทรีย์ด้วยเทคนิค CE ที่ผ่านมานั้นได้มีการพัฒนาขึ้นเพื่อวิเคราะห์ในตัวอย่างหลายชนิด ได้แก่ ผลไม้ น้ำผลไม้ [Kandl and Kupina: 1999, Saavadra *et al.*: 2000] เบียร์ ไวน์ [Kandl and Kupina: 1999, Moreno *et al.*: 2003] และนม [Buiarelli *et al.*: 2003, Izco *et al.*: 2003, Izco *et al.*: 2002] เป็นต้น

1.3 วัตถุประสงค์

- 1) หาภาวะที่เหมาะสมของอะพอลาร์ไอเล็กโทโรฟอริซิสสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริก
- 2) เปรียบเทียบปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกในพืชสกุล *Garcinia*
- 3) ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการสลายตัวของกรดไฮดรอกซีซิทริกในสารมาตรฐานและส่วนสกัด

1.4 ขอบเขตการวิจัย

หาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค CE สำหรับการแยกและวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริก จากนั้นประยุกต์นำเทคนิค CE ที่พัฒนาขึ้นมาวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดอินทรีย์ต่างๆในส่วนสกัดจากส่วนต่างๆของพืชสกุล *Garcinia* รวมทั้งศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวของกรดไฮดรอกซีซิทริกในสารมาตรฐานและส่วนสกัด

1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย

- 1) ศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง
- 2) หาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค CE สำหรับการแยกและวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริก
 - 2.1) การหาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค CE สำหรับการแยกและวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริก
 - 2.1.1 ชนิด ความเข้มข้นและค่า pH ของบัฟเฟอร์
 - 2.1.2 ชนิดและปริมาณตัวละลายอินทรีย์ในบัฟเฟอร์
 - 2.2) การตรวจสอบความถูกต้องของเทคนิค CE
- 3) สกัดกรดอินทรีย์จากส่วนต่างๆของพืชสกุล *Garcinia*
 - 3.1) คัดเลือกพืชสกุล *Garcinia* ได้แก่ ส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff. ex T. Anderson) มะคัง (*Garcinia schomburgkiana* Pierre) ชะมวง (*Garcinia cowa* Roxb. ex DC.) และชะมวงตราด (*Garcinia nigrolineata* Planch ex T. Anderson) โดยคัดเลือกส่วนของใบอ่อน ใบแก่ และผล
 - 3.2) วิธีการสกัด [Jayaprakasha *et al.*: 2002]

นำส่วนของพืชมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ สกัดด้วยน้ำ โดยใช้ autoclave จากนั้นนำมากรองผ่านผ้าและกระดาษกรอง นำชิ้นพืชที่เหลือไปสกัดซ้ำ เดิมถ่านกัมมันต์ลงไปใต้น้ำสกัดและให้ความร้อน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองและล้างถ่านกัมมันต์ด้วยน้ำ น้ำสกัดที่ได้นำมาทำให้เข้มข้นเหลือปริมาณเพียงเล็กน้อย โดยใช้สูญญากาศ จากนั้นเติมเอธานอล ทิ้งให้ตกตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยง ล้างตะกอนด้วยเอธานอล 2 ครั้ง จากนั้นทำให้น้ำสกัดเข้มข้นและเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 4) วิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริกในส่วนสกัดจากส่วนต่างๆของพืชสกุล *Garcinia* ใช้เทคนิค CE แยกและวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดอินทรีย์ในส่วนสกัด โดยเปรียบเทียบปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดอินทรีย์ในส่วนต่างๆของพืชสกุล *Garcinia*
- 5) หาปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวของกรดไฮดรอกซีซิทริกในสารมาตรฐานและส่วนสกัด อุณหภูมิในการเก็บรักษา โดยเก็บสารสกัดกรดไฮดรอกซีซิทริกในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน และวัดปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริกที่เหลืออยู่
- 6) วิเคราะห์ผลการทดลอง สรุปผลการดำเนินงานวิจัย และรวบรวมข้อมูลเพื่อเขียนวิทยานิพนธ์

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ได้ภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริกโดยกะพิลลารีอิลีกโทรฟอริซิส

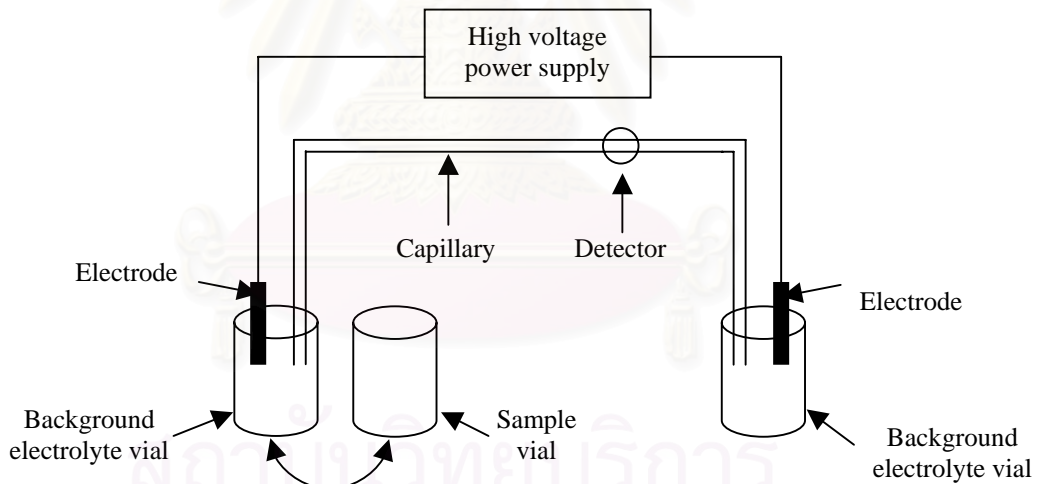
บทที่ 2

ทฤษฎี

2.1 คัพิดลารีอิเล็กโทรเฟอร์ซิส (capillary electrophoresis, CE)

คัพิดลารีอิเล็กโทรเฟอร์ซิส (capillary electrophoresis, CE) เป็นเทคนิคใหม่ของการแยกสารภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า โดยให้สารเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่บรรจุในคัพิดลารีขนาดเล็ก หลักการแยกสารอาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility) ซึ่งขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างประจุต่อขนาดของไอออน เทคนิค CE นำมาประยุกต์ใช้กับการแยกสารไอออนบวกและไอออนลบของสารประกอบอินทรีย์หรืออนินทรีย์ ตลอดจนถึงสารโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เปปไทด์ โปรตีน และพอลิเมอร์ เป็นต้น

2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง CE [Weinberger: 2000]



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง CE: ดัดแปลงจาก [Weinberger: 2000]

1) คัพิดลารี (capillary)

คัพิดลารีที่ใช้กันทั่วไปในปัจจุบันเป็น fused silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 10 ถึง 200 μm ยาวประมาณ 20 ถึง 100 cm ภายนอกของคัพิดลารีเคลือบด้วย พอลิเอไมด์ เพื่อป้องกันการแตกหัก และลอกพอลิเอไมด์ออกเฉพาะบริเวณตรวจวัดภายในกรณีที่ใช้เครื่องตรวจวัด เช่น UV-Visible

2) สารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte, BGE)

สารละลายอิเล็กโทรไลต์ส่วนใหญ่เป็นบัฟเฟอร์บรรจุอยู่ใน vial ซึ่งมีปลายทั้งสองข้างของ คัพพิลลารีจุ่มอยู่

3) เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (voltage supply)

เครื่องกำเนิดไฟฟ้ากระแสตรงที่ให้ความต่างศักย์ -30 ถึง 30 kV และกระแสสูงสุดไม่เกิน $300 \mu\text{A}$ ในการแยกสารส่วนใหญ่นิยมใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวก ในด้านเครื่องตรวจวัดหรือ ด้านปลายออก (outlet) เป็นขั้วลบ (แคโทด) และด้านนิตสารหรือด้านเข้า (inlet) เป็นขั้วบวก (แอโนด) ซึ่งเรียกการให้ศักย์ไฟฟ้าแบบนี้ว่าขั้วไฟฟ้าปกติ (normal polarity) หรือหากสลับขั้วให้ ด้านปลายเป็นขั้วบวก (ศักย์ไฟฟ้าเป็นลบ) เรียกการให้ศักย์ไฟฟ้าแบบนี้ว่าสลับขั้วไฟฟ้า (reversed polarity)

4) ขั้วไฟฟ้า (electrode) ส่วนใหญ่ใช้แท่งโลหะแพลทินัม

5) เครื่องตรวจวัด (detector)

เครื่องตรวจวัดที่ใช้ใน CE ดัดแปลงมาจากเครื่องตรวจวัดที่ใช้ในเทคนิค HPLC เครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้กันมากที่สุดใน CE คือ UV-Visible คือ มีสภาพไวในการตรวจวัด (sensitivity) ที่ดีกว่าเครื่องตรวจวัดชนิดอื่นๆ ที่ใช้ใน CE ได้แก่ amperometer, conductivity detector และ mass spectrometer (MS) เป็นต้น การใช้เครื่องตรวจวัด MS มีข้อดี คือความไวสูงและสามารถใช้เพื่อ ยืนยันสูตร โครงสร้างของสารได้แต่มีราคาแพง

6) ระบบการบรรจุสารตั้งอย่าง (injection)

โดยทั่วไปการบรรจุสารเข้าไปในคัพพิลลารีมี 2 วิธี ได้แก่ การใช้ไฟฟ้า (electrokinetic injection) และการใช้ความดัน (pressure injection)

ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CE ทำได้โดยเติม BGE เข้าไปในคัพพิลลารี หลังจากนั้นก็บรรจุ สารตัวอย่างเข้าไป เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าผ่านขั้วไฟฟ้าที่จุ่มอยู่ที่ BGE vial ทั้งสอง สารจะเคลื่อนที่ในคัพพิลลารีและเกิดการแยกของสารตามความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility) แต่ละชนิด

2.3 ประเภทของเทคนิค CE

เทคนิค CE แบ่งออกเป็น 6 ประเภทตามกลไกการแยกสาร

1. Capillary Zone Electrophoretic (CZE)
2. Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC)
3. Capillary Electrochromatography (CEC)
4. Capillary Gel Electrophoresis (CGE)
5. Capillary Isoelectric Focusing (CIEF)
6. Capillary Isotachopheresis (CITP)

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับเทคนิค CZE จึงอธิบายหลักการ ของเทคนิค CZE เท่านั้น CZE หรือ free solution capillary zone electrophoresis เป็นเทคนิคที่เป็นที่รู้จักและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ของเทคนิค CE การแยกสารใน CZE อาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร ซึ่งขึ้นอยู่กับความแตกต่างของอัตราส่วนของค่าประจุต่อขนาดของสารตัวอย่าง ตัวกลางที่ใช้ในคะพิลลารีเป็นเพียงบัฟเฟอร์ทั่วไป หรือบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยสารเติมแต่งบางชนิดที่ไม่ทำให้กลไกของการแยกเปลี่ยนแปลงไป สารเติมแต่งบัฟเฟอร์ เช่น ตัวทำละลายอินทรีย์ สารลดอิเล็คโตรออสโมซิส (electroosmosis suppressant) สารเติมแต่งไครัลบางชนิด เป็นต้น

2.4 ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility, μ)

ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าหรือความสามารถในการเคลื่อนที่ของสาร (electrophoretic mobility หรือ mobility, μ หน่วยสากลเป็น $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) นิยามเป็นความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic velocity, v_{ep}) ภายใต้อิทธิพลของความเข้มของสนามไฟฟ้า (electric field strength, E) 1 V m^{-1} และมีสัมพันธกับตัวแปรต่างๆ ดังสมการ 2.1 [Foret: 1993]

$$\mu = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{ze}{6\pi\eta r_h} \quad (2.1)$$

z คือ ค่าประจุของสาร

e คือ ค่าประจุของอิเล็กตรอน (1.6×10^{-19} คูโลมบ์)

η คือ ความหนืดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์

r_h คือ รัศมีไฮโดรไดนามิกของไอออน (hydrodynamic radius of an ion) ซึ่งเป็นรัศมีของไอออนที่มีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบขณะที่ไอออนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า

ที่อุณหภูมิ $25 \text{ }^\circ\text{C}$ และสารละลายอิเล็กโทรไลต์เจือจางมากๆ หรือที่ความแรงไอออน (ionic strength, I , หน่วยเป็น mol Kg^{-1} หรือ mol/l) ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์มีค่าประมาณศูนย์ เรียก

ความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าที่ว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่สัมบูรณ์หรือความสามารถในการเคลื่อนที่จำกัด (absolute mobility หรือ limiting mobility, μ°) ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของสารหนึ่งๆ

ปัจจัยที่มีผลต่อค่า μ ได้แก่

1) ความแรงไอออนิก (ionic strength) หรือความเข้มข้นของ BGE โดยเมื่อเพิ่มความแรงไอออนิกของ BGE ทำให้ effective charge (z) ลดลง r_h มากขึ้น (r_h จะเป็นผลรวมของ r_h ของไอออนของสารตัวอย่างและเคาเตอร์ไอออน (counter ion) [Foret: 1993] ดังนั้นค่า μ จะลดลง

2) ความหนืดและอุณหภูมิ โดยสมการ 2.1 ค่า μ จะแปรผกผันตามความหนืดของ BGE [Kenndler, 1998] ดังนั้นเมื่อเพิ่มค่าความหนืดค่า μ จะลดลง การเพิ่มอุณหภูมิทำให้ความหนืดของ BGE ลดลง ดังนั้นค่า μ จะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของอุณหภูมิ โดยทั่วไปค่า μ เพิ่มขึ้น 2 ถึง 3% ต่อการเพิ่มอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส [Kenndler:1998]

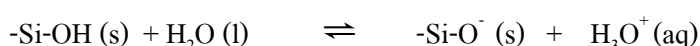
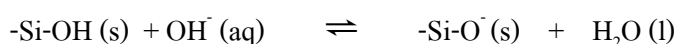
3) pH ของ BGE มีผลต่อ μ ของสารตัวอย่างที่เป็นกรดอ่อนหรือกรดแก่ โดยการเพิ่ม pH ของ BGE จะมีผลต่อการเพิ่มดีกรีการแตกตัวของสาร (the degree of dissociation) ของกรดอ่อนทำให้ μ ของกรดอ่อนเพิ่มขึ้น และลดดีกรีของ โพรโทเนต (the degree of protonation) ของเบสอ่อน ทำให้ μ ของเบสอ่อนลดลง [Kenndler: 1998]

4) ตัวทำละลายอินทรีย์ โดยทั่วไปเมื่อเติมตัวทำละลายมีผลทำให้ค่า μ ลดลง เนื่องจากดีกรีของการแตกตัวของสารที่เป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อนลดลง จึงทำให้ effective charge ของสารลดลง ดังนั้นมีผลทำให้ลด μ [Kenndler: 1998]

5) ขนาดของกะพิลลารี (d) และความเข้มศักย์ไฟฟ้า (E) ที่ใช้ จากสมการ 2.1 จะเห็นว่าค่า μ ไม่ขึ้นกับ d และ E แต่ในทางปฏิบัติ การเพิ่ม d และ E ทำให้ μ เพิ่มขึ้น เนื่องจากผลของ Joule heating ที่เพิ่มขึ้นทำให้กะพิลลารีมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้น

2.5 อิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmosis) [Grossman: 1992]

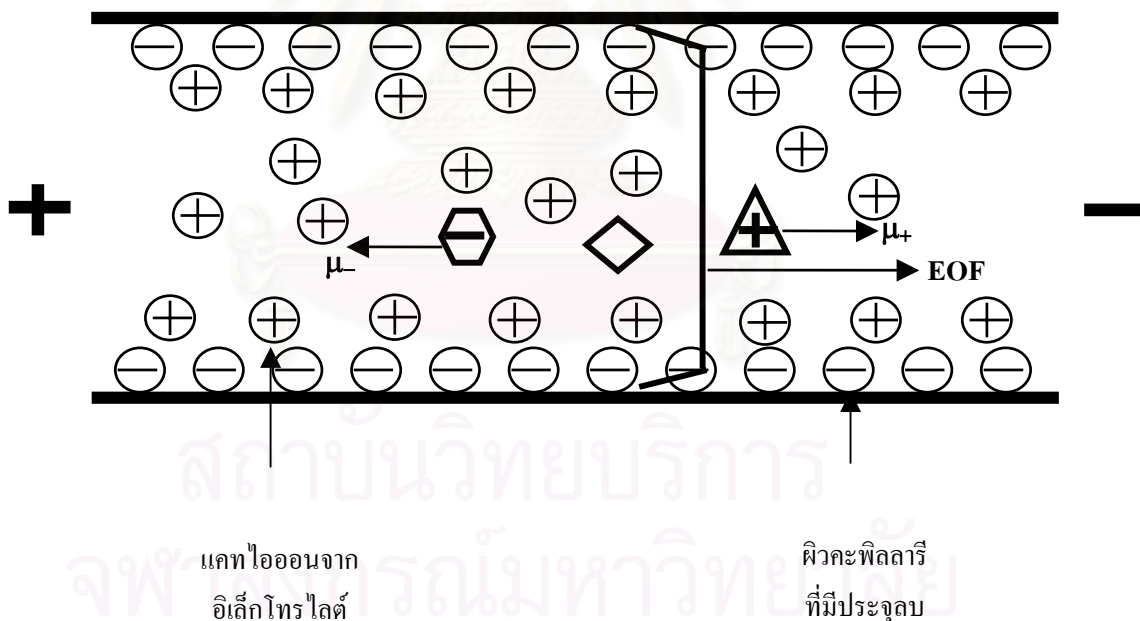
ที่ผิวด้านในของกะพิลลารีประกอบด้วยหมู่ซิลินอล (-Si-OH) และเมื่อสัมผัสกับสารละลาย อิเล็กโทรไลต์หรือบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH > 3 จะเกิดการไอออนไนซ์ ทำให้ผิวด้านในของกะพิลลารีมีประจุลบ



ทำให้เกิด H^+ หรือ H_3O^+ กระจายอยู่ในสารละลายหรือรวมกับ OH^- เกิดเป็น โมเลกุลของน้ำ โดยทั่วไปในการวิเคราะห์ด้วย CE จะล้างกะพิลลารีด้วยเบสแก่ เช่น NaOH หรือ KOH และตามด้วย

สารละลายอิเล็กโทรไลต์หรือบัฟเฟอร์ ดังนั้น H^+ จึงน้อยมากเมื่อเทียบกับแคทไอออนจากสารละลายอิเล็กโทรไลต์หรือบัฟเฟอร์ แคทไอออนจากสารละลายอิเล็กโทรไลต์หรือบัฟเฟอร์จะเกิด double layer ขึ้น แคทไอออนบางส่วนจะติดอยู่ที่ผิวของคะพิลลารี เรียกว่า Stern layer หรือ inner immobilized Helmholtz plane ซึ่งจะไม่เคลื่อนที่เนื่องจากอิทธิพลของแรงไฟฟ้าสถิต (electrostatic force) และ/หรือ แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der waals force) แคทไอออนบางส่วนกระจายอยู่ในสารละลายเป็น diffusion layer และแคทไอออนที่เหลือจะอยู่ใน bulk solution

ผลของการเกิด double layer ทำให้ในสารละลายมีแคทไอออนมากกว่าแอนไอออน เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่ปลายทั้งสองข้างของคะพิลลารี (ปลายด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วแคโทดหรือขั้วลบ) ดังรูปที่ 2.2 แคทไอออนของสารละลายอิเล็กโทรไลต์มากมายที่อยู่ใน diffusion layer และ bulk solution จะเคลื่อนที่ไปทางขั้วแคโทดได้ โดยปกติแคทไอออนของอิเล็กโทรไลต์จะถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของน้ำ ทำให้คิงโมเลกุลของน้ำเคลื่อนที่ไปยังขั้วแคโทดด้วย เรียกปรากฏการณ์ของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของน้ำหรือสารละลายนี้ว่า อิเล็กโทรออสโมซิส และเรียกการเคลื่อนที่ด้วยอิทธิพลนี้ว่าการไหลของอิเล็กโทรออสโมซิส (electroosmotic flow, EOF)



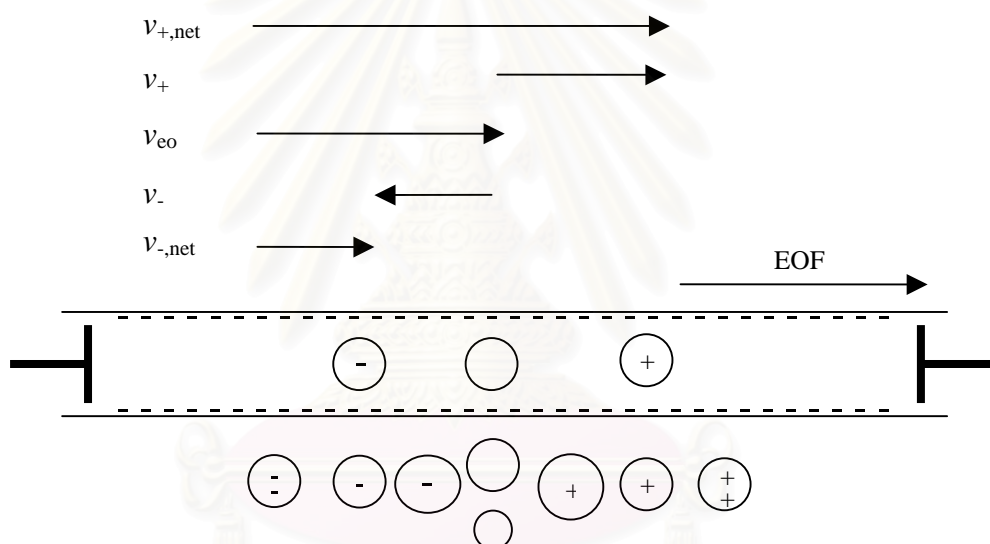
รูป 2.2 การไหลของอิเล็กโทรออสโมซิสในคะพิลลารี (EOF): คัดแปลงจาก [Landers: 1997]

ปัจจัยที่มีผลต่อค่า EOF ได้แก่

1. pH ของ BGE: โดยที่การลด pH ของ BGE ทำให้การแตกตัวของหมู่ซิลินอลที่บริเวณผิวคะพิลลารีลดลง ดังนั้น EOF จะลดลง
2. ความแรงไอออนิกของ BGE: ถ้าเพิ่มความแรงไอออนิกของ BGE ทำให้ EOF ลดลง แต่ถ้าเพิ่มขึ้นมากๆ อาจทำให้ EOF เพิ่มขึ้นเนื่องจากผลของ Joule heating
3. ปัจจัยอื่นๆ: เช่น ความหนืด อุณหภูมิ ขนาดของคะพิลลารีและความเข้มข้นสนามไฟฟ้า มีผลต่อ EOF เช่นเดียวกับค่า μ

2.6 พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสาร

การเคลื่อนที่ของสารภายใต้ภาวะที่มี EOF มาก



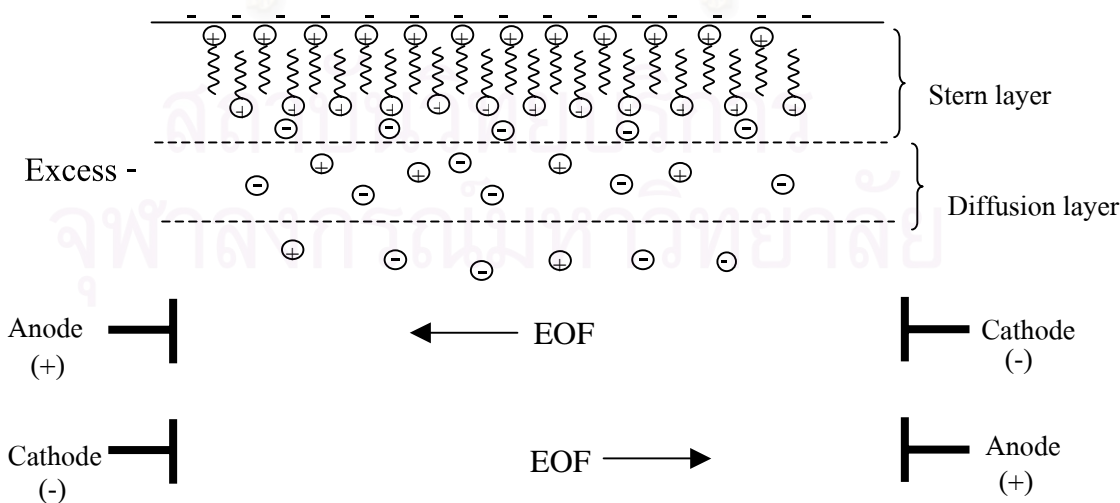
รูป 2.3 พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสารภายใต้ภาวะ EOF มาก และกรณีผิวของคะพิลลารีเป็นประจุลบและใช้ขั้วไฟฟ้าปกติ: ดัดแปลงจาก [Li: 1992]

จากรูป 2.3 เมื่อผิวคะพิลลารีเป็นประจุลบและด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วแคโทด (ขั้วลบ) EOF จะมีทิศทางไปทางขั้วแคโทด สารตัวอย่างที่เป็นแคทไอออนมีทิศทางของ μ ไปทางขั้วแคโทดเช่นกัน ดังนั้นแคทไอออนจะเคลื่อนที่ไปขั้วแคโทดด้วย EOF และ electrophoretic velocity ($v_{+,net} = v_+ + v_{eo}$) โดยที่แคทไอออนที่มีประจุมากและรัศมีไอออนไฮโดรไดนามิกน้อย (ค่า μ มาก) จะเคลื่อนที่ออกมาก่อน ส่วนสารตัวอย่างที่มีแอนไอออนซึ่งมีทิศทางของ μ ไปทางขั้วแอโนด แต่ถ้า v_{eo} มีขนาดมากกว่า v_- แอนไอออนเคลื่อนที่ไปขั้วแคโทดผ่านเครื่องตรวจวัดได้ โดยลำดับการเคลื่อนที่ที่ตรงกันข้ามกับแคทไอออน กล่าวคือ แอนไอออนที่มีประจุมากและรัศมีไฮโดรไดนามิกน้อย (ค่า μ

มาก) จะเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง ส่วนสารที่ไม่มีประจุจะเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดได้เนื่องจาก EOF

การกลับทิศทางการไหลของ EOF (reversed EOF)

ในกรณีที่ประจุลบมีค่า μ มากกว่า μ_{co} หรือ μ มีค่าน้อยกว่า μ_{co} เล็กน้อย ถ้าวิเคราะห์โดยใช้ EOF ปกติ และขั้วปกติ (ด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วลบ) สารจะไม่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดหรือใช้เวลาในการเคลื่อนที่นาน วิธีการหนึ่งที่ย่างและราคาถูก คือ การเคลือบผิวอะนอดด้วยสารลดแรงตึงผิว (dynamic coating) เพื่อกลับทิศทางของ EOF และใช้ reversed polarity (ด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วบวก) เพื่อให้ทิศทางของ μ และ μ_{co} ไปทางเดียวกับด้านเครื่องตรวจวัด ซึ่งวิธีการทำได้โดยเติมสารลดแรงตึงผิวแคทไอออน (cationic surfactant) ลงไปใน BGE ในปริมาณที่น้อยกว่าความเข้มข้นและเกิดไมเซลล์จะทำให้โมเลกุลส่วนหัวของสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวกเกิดแรงดึงดูดแบบไอออนิก (ionic force) และถูกดูดซับที่ผิวอะนอดซึ่งเป็นประจุลบ ดังรูปที่ 2.6 เมื่อเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิวขึ้นอีก ส่วนหางของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะเข้าแทรก เกิดแรงแวนเดอร์วาลส์กับส่วนหางของสารลดแรงตึงผิวกับชั้นแรก และหันส่วนหัวออก ทำให้เปรียบเสมือนว่าผิวอะนอดมีประจุบวก (แทนที่จะเป็นประจุลบเหมือนที่ผ่านมา) และมีแอนไอออนมากกว่าแคทไอออนในสารละลาย แอนไอออนบางส่วนเกิดเป็น Stern layer และบางส่วนกระจายอยู่ในสารละลาย ถ้าให้ศักย์ไฟฟ้าขั้วปกติแอนไอออนลบจะเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก (ด้านฉีดสารตัวอย่าง) ทำให้เกิดการไหลของ EOF ในทิศทางตรงข้ามกับปกติทั่วไป เรียกว่า Reversed EOF และถ้าต้องการให้ EOF มีทิศไปทางเครื่องตรวจวัด ต้องสลับขั้วไฟฟ้าให้ด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วบวกหรือแคโทด (reversed polarity) สารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้กลับทิศทางของ EOF คือ tetradecyltrimmonium bromide (TTAB) และ cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)



รูปที่ 2.4 การกลับทิศทางของ EOF โดยใช้สารลดแรงตึงผิวประเภทแคทไอออน

การกลับทิศทางของ EOF มักประยุกต์ในกรณีที่สารตัวอย่างเป็นประจุลบที่มีค่า μ น้อยกว่า μ_{eo} ไม่นานนักหรือค่า μ มากกว่า μ_{eo} โดยจะต้องใช้ reversed polarity of applied voltage ควบคู่กันด้วย เพื่อให้พาสารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด

2.7 อิเล็กโทรฟีโรแกรมและไมเกรชันไทม์ (electropherogram and migration time)

เมื่อสารตัวอย่างที่บรรจุเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดจะแสดงผลออกมา เรียกว่า อิเล็กโทรฟีโรแกรม (electropherogram) และระยะเวลาที่สารเคลื่อนที่จากปลายแคโทดด้านบรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด เรียกว่า ไมเกรชันไทม์ (migration time) ดังที่กล่าวมาแล้วว่า ในเทคนิค CE สารจะเคลื่อนที่ภายใต้อิทธิพลของ EOF ด้วย ดังนั้นผลรวมของความเร็วของสาร (v_{net}) ดังสมการ [Kenndler: 1998]

$$v_{net} = v_{ep} + v_{eo} \quad (2.2)$$

$$\mu_{net} = \mu + \mu_{eo} \quad (2.3)$$

t_m หน่วยในวินาที มีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ดังสมการ

$$t_m = \frac{l}{v_{net}} = \frac{IL}{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V} \quad (2.4)$$

L คือ ความยาวทั้งหมดของแคโทด (m)

l คือ ความยาวจากปลายแคโทดด้านบรรจุสารจนถึงเครื่องตรวจวัด (m)

V คือ ศักย์ไฟฟ้า (V)

ในทางปฏิบัติ เมื่อทราบค่า t_m ของสาร จะสามารถคำนวณ μ_{eo} และ μ ได้ดังสมการ

$$\mu_{eo} = \frac{IL}{Vt_{eo}} \quad (2.5)$$

$$\mu = \mu_{net} - \mu_{eo} = \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eo}} \right) \frac{IL}{V} \quad (2.6)$$

t_{eo} คือ ไมเกรชันไทม์ของสารที่ไม่มีประจุ หรือ EOF marker

2.8 คุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE (Qualitative and Quantitative Analysis in CE)

คุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) CE สามารถทำได้โดยเปรียบเทียบจากค่าไมเกรชัน ไทม์ (t_m) และค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (electrophoretic mobility, μ_{ep}) นอกจากนี้ยังมีเทคนิคที่ เรียกว่า spiked techniques ซึ่งใช้เมื่อสงสัยพิกัดเป็นพิกัดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยทำการเติมสารละลายมาตรฐานลงไปในการละลายตัวอย่าง ถ้าพื้นที่ใต้พิกัดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับก่อน spiking ก็แสดงว่าเป็นพิกัดนั้นน่าจะเป็นสารที่สงสัย ในกรณีที่ใช้ photodiode array UV detector สามารถเปรียบเทียบ UV spectrum ได้ และปริมาณของสารที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจ (Q) มีความสัมพันธ์กับตัวแปรต่างๆ ดังสมการที่ 2.8

$$Q \text{ (mole)} = \frac{\text{Peak area (AUs)} \times V_F \text{ (m}^3 \text{ s}^{-1})}{\text{Response factor (AU mol}^{-1} \text{ m}^{-3})} \quad (2.8)$$

V_F คือ volume flow ของสารตัวอย่างที่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัด

แม้ว่ามีรายงานวิจัยว่าปริมาณของสารที่บรรจุด้วยความดันในเทคนิค CE มีความเที่ยงสูง [Mayer: 2001] แต่อย่างไรก็ตามความไม่เที่ยงของปริมาณที่บรรจุขึ้นอยู่กับความไม่เที่ยงของความดัน เวลาและความหนืดของ BGE ในกะปิลลารีที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของกะปิลลารีในส่วนที่ไม่ได้ควบคุม ในงานวิจัยโดยทั่วไปของปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) ที่ใช้คำนวณหรือหาปริมาณของสาร คือ การทำกราฟสอบเทียบ (calibration plot) ซึ่งใช้วิธีต่างๆกัน ดังนี้

1) external standard

การสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง corrected peak area (แกน y) กับ ความเข้มข้นต่าง (แกน x) จะได้กราฟเส้นตรง ($y = mx + c$) สำหรับการหาปริมาณสารตัวอย่างทำโดย corrected peak area ของพิกัดหรือพื้นที่ใต้พิกัดที่วิเคราะห์ได้ มาคำนวณหาความเข้มข้นจากสมการเส้นตรง

2) internal standard

internal standard คือ สารมาตรฐานอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ใช่สารที่ต้องการวิเคราะห์ และเติมลงไปในการละลายและสารละลายมาตรฐาน เพื่อลดความผิดพลาดเนื่องจากการฉีดสาร (injection) ที่ไม่เท่ากันในแต่ละครั้ง โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของ corrected peak area ของสารมาตรฐานต่อ corrected peak area กับความเข้มข้นต่างๆ สำหรับการหาปริมาณสารตัวอย่างทำโดยนำสัดส่วน corrected peak area ของสารตัวอย่างต่อ corrected peak area ของ internal standard ที่วิเคราะห์ได้จาก CE มาคำนวณหาความเข้มข้นจากสมการเส้นตรง

บทที่ 3

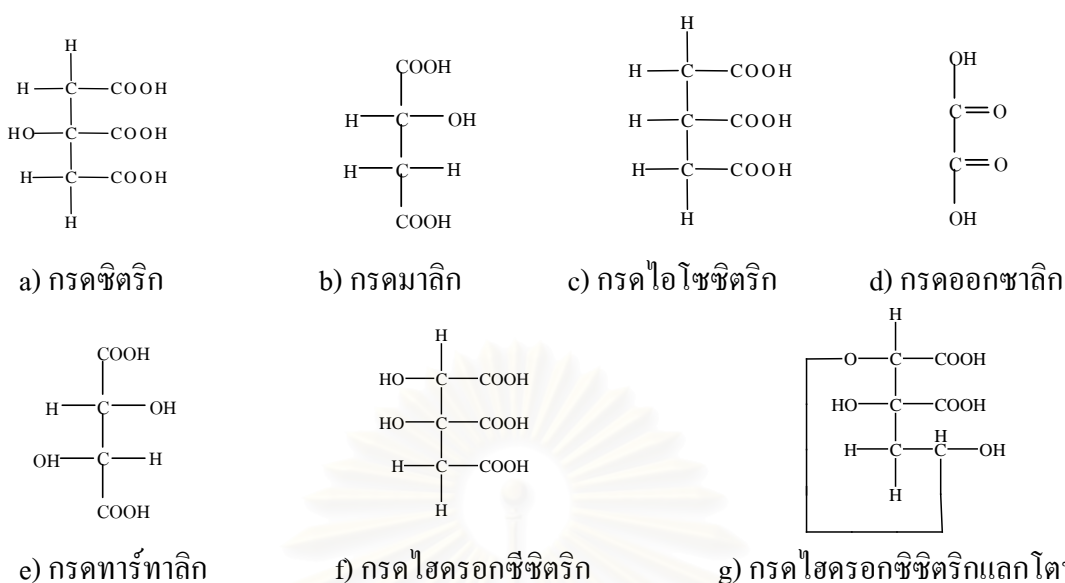
การทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1) เครื่องกะพิลาไรอิลีกโทรโพลิซิส: CE ของ Beckman รุ่น 5010
- 2) เครื่องวัด pH
- 3) เครื่องผลิตน้ำ Milli Q

3.2 สารเคมี

- 1) (-)-hydroxycitric acid calcium salt ($C_6H_5O_8$)₂Ca₃ > 98.0% ของบริษัท Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (มวลโมเลกุล 530.43 g mol⁻¹ คิดเป็น hydroxycitric acid (HCA) 416.89 g mol⁻¹) ประเทศ ญี่ปุ่น
- 2) citric acid (CA) ของบริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมนี
- 3) isocitric acid (ICA) ของบริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมนี
- 4) tartaric acid (TA) ของบริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมนี
- 5) oxalic acid (OA) ของบริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมนี
- 6) malic acid (MA) ของบริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมนี
- 7) sodium hydroxide ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 8) Na₂B₄O₇·10H₂O ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 9) NaH₂PO₄·2H₂O ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 10) Na₂HPO₄·12H₂O ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 11) tetradecyltrimethyl ammonium bromide (TTAB) ของบริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมนี
- 12) diethyl ether ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 13) H₃PO₄ ของบริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมนี
- 14) HCl ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 15) น้ำ Milli Q



รูปที่ 3.1 สูตรโครงสร้างของกรดอินทรีย์

3.3 การแยกสารมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน [Lewis *et al.*: 1965]

การแยกสารมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนทำได้โดยนำผลส้มแขกแห้งมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ สกัดด้วยน้ำ โดยใช้ autoclave จากนั้นนำมากรองผ่านผ้าและกระดาษกรอง นำชิ้นพืชที่เหลือไปสกัดซ้ำ เติมน้ำก้นต้มลงไปใต้น้ำสกัดและให้ความร้อน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองและล้างถ่านกัมมันต์ด้วยน้ำ น้ำสกัดที่ได้นำมาทำให้เข้มข้นเหลือปริมาณเพียงเล็กน้อย โดยใช้สูญญากาศ จากนั้นเติมเอทานอล ทิ้งให้ตกตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 2 ครั้ง ทำให้เข้มข้น จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริก ให้ความร้อนแล้วนำน้ำสกัดไปทำให้แห้ง นำของแข็งที่ได้มาสกัดด้วย ไดเอทิลอีเทอร์ 2 ครั้ง ทิ้งไว้ให้ตกผลึก และหาความบริสุทธิ์ด้วย CE

3.4 การเตรียมสารละลาย

3.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- 1) สารละลายมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริก 2000 ppm
ซึ่ง (-)-hydroxycitric acid calcium salt 0.0636 g ละลายด้วยน้ำ แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 ml ในขวดวัดปริมาตร
- 2) สารละลายมาตรฐานกรดอินทรีย์อื่นๆ 2000 ppm
ซึ่งสารมาตรฐานกรดอินทรีย์ 0.0500 g ละลายด้วยน้ำ แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 ml ในขวดวัดปริมาตร

3) สารละลายมาตรฐานสำหรับสร้างกราฟสอบเทียบ

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริก กรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน กรดซิทริก กรดมาลิก กรดออกซาลิกและกรดทาร์ทาลิกที่ประกอบด้วยกรดไอโซซิทริก 200 ppm เป็น internal standard โดยปีเปตสารละลายต่างๆ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟสอบเทียบ

ขวดที่	ความเข้มข้นของสารละลาย (ppm)						
	OA	MA	CA	TA	HCA	HCAL	ICA
1	10	30	30	30	50	50	200
2	25	50	50	50	100	100	200
3	50	75	75	75	150	200	200
4	100	100	100	100	200	300	200
5	150	150	150	150	250	400	200
6	200	200	250	200	300	500	200
ขวดที่	ปริมาตรที่ปีเปต (μl)						
	2000ppm OA	2000ppm MA	2000ppm CA	2000ppm TA	2000ppm HCA	2000ppm HCAL	2000ppm ICA
1	25.0	75.0	75.0	75.0	125.0	125.0	500.0
2	62.5	125.0	125.0	125.0	250.0	250.0	500.0
3	125.0	187.5	187.5	187.5	375.0	500.0	500.0
4	250	250.0	250.0	250.0	500.0	750.0	500.0
5	375.0	375.0	375.0	375.0	625.0	1000.0	500.0
6	500.0	500.0	625.0	500.0	750.0	1250.0	500.0

จากตารางเติมน้ำจนมีปริมาตร 5 ml ในขวดวัดปริมาตร

3.4.2 การเตรียมสารละลายสำหรับบัฟเฟอร์

1) สารละลาย 100 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$

ซึ่ง $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 1.9068 g ละลายด้วยน้ำแล้วปรับเป็น 50 ml ในขวดวัด

ปริมาตร

2) สารละลาย 100 mM NaH_2PO_4

ซึ่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.7800 g ละลายด้วยน้ำแล้วปรับเป็น 50 ml ในขวดวัด

ปริมาตร

3) สารละลาย 100 mM Na_2HPO_4

ซึ่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.7907 g ละลายด้วยน้ำแล้วปรับเป็น 50 ml ในขวดวัด

ปริมาตร

4) สารละลาย 5.0 mM TTAB

ซึ่ง TTAB 0.0841 g ละลายด้วยน้ำแล้วปรับเป็น 50 ml ในขวดวัดปริมาตร

3.5 ภาวะของ CE สำหรับการทดลอง

ภาวะของ CE เริ่มต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดอินทรีย์อื่น ๆ ในการทดลองนี้ คือ

คะพิลลารี : 57 cm (50.0 cm to detector) \times 50 μm i.d. uncoated fused silica capillary

อุณหภูมิ : 25°C

ศักย์ไฟฟ้า : -20 kV

การบรรจุสาร : ความดันเป็นเวลา 10 วินาที

capillary rinsing : ก่อนการทดลองในแต่ละวัน rinse ด้วย 0.1M NaOH เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย BGE 15 นาที และ rinse ด้วย BGE 2 นาที ก่อนการทดลองแต่ละครั้ง

BGE : ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ บอเรตบัฟเฟอร์ และบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรต และฟอสเฟต ที่ประกอบด้วย 0.5 mM TTAB

หาภาวะของ BGE ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกด้วยเทคนิค CE โดยได้ทำการศึกษาผลของชนิด ความเข้มข้น และ pH ของ BGE

3.6 การหาภาวะของ CE

3.6.1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ผลของ pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมบัฟเฟอร์ของ 50 mM Na_2HPO_4 ที่ pH 6.0 ถึง 9.0 ที่ประกอบด้วย 0.5 mM TTAB แล้วใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.6

3.6.2 บอเรตบัฟเฟอร์และบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตและฟอสเฟต

1) ผลของ pH ของบอเรตบัฟเฟอร์

เตรียมบัฟเฟอร์ของ 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ pH 8.0 ถึง 10.0 ที่ประกอบด้วย 0.5 mM TTAB แล้วใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.5

2) ผลของสัดส่วนของความเข้มข้นของบอเรตกับฟอสเฟต

เตรียมบัฟเฟอร์ผสมระหว่าง $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; NaH_2PO_4 ที่ประกอบด้วย 0.5 mM TTAB ในอัตราส่วนความเข้มข้น (mM) ที่ต้องการ แล้วปรับเป็น pH 9.2 ด้วย 1M NaOH แล้วใช้เป็น BGE สำหรับวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค CE โดยใช้ภาวะอื่นของ CE ในหัวข้อ 3.6

3.7 การตรวจสอบวิธีการ (method validation)

3.7.1 กราฟสอบเทียบ

สร้างกราฟสอบเทียบสำหรับปริมาณวิเคราะห์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานในข้อ 3.4 ซึ่งประกอบด้วยสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆดัง ตาราง 3.1 โดยใช้กรดไอโซซิดริกเป็น internal standard

3.7.2 ความเที่ยง และความแม่นยำ

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแต่ละสารละลายมาตรฐานประกอบด้วย 200 ppm กรดไอโซซิดริกเป็น internal standard ในเมทริกซ์ที่เป็นน้ำ ดังตารางที่ 3.2 และ 3.3

2) เตรียมสารละลายตัวอย่าง 500 ppm ที่ spike ด้วยสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อหาความเค็ม

ความเข้มข้นของสารละลาย (ppm)						
OA	MA	CA	TA	HCA	HCAL	ICA
60	20	200	160	200	200	200
ปริมาตรที่ pipette (μ l)						
0.15	50	500	400	500	500	500

จากตารางเติมน้ำจืดมีปริมาตร 5 ml ในขวดวัดปริมาตร

ตารางที่ 3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อหาความเค็ม

ความเข้มข้นของสารละลาย (ppm)						
OA	MA	CA	TA	HCA	HCAL	ICA
30	30	40	40	75	75	200
130	130	130	130	180	250	200
ปริมาตรที่ pipette (μ l)						
750.0	750.0	100.0	100.0	187.5	187.5	500.0
325.0	325.0	325.0	325.0	450.0	625.0	500.0

จากตารางเติมน้ำจืดมีปริมาตร 5 ml ในขวดวัดปริมาตร

ตารางที่ 3.4 การเตรียมสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 500 ppm ที่เติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลาย (ppm)						
OA	MA	CA	TA	HCA	HCAL	ICA
30	30	40	40	75	75	200
130	130	130	130	180	250	200
ปริมาตรที่ pipette (μ l)						
750.0	750.0	100.0	100.0	187.5	187.5	500.0
325.0	325.0	325.0	325.0	450.0	625.0	500.0

จากตารางเติมน้ำจืดมีปริมาตร 5 ml ในขวดวัดปริมาตร

3) นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมดังตารางที่ 3.2 มาวิเคราะห์ด้วย CE โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้ง เป็นเวลา 5 วัน โดยเปรียบเทียบค่าไมเกรชันไทม์ และ พื้นที่ ($A_{\text{corr, สารมาตรฐาน}} / A_{\text{corr, ICA}}$)

4) นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 500 ppm ที่เตรียมดังตารางที่ 3.3 มาวิเคราะห์ด้วย CE โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้ง จากนั้นคำนวณหาปริมาณโดยใช้กราฟมาตรฐานในหัวข้อ 3.9 แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารที่วิเคราะห์ได้ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

3.8 การสลายตัวของกรดไฮดรอกซีซิทริก

3.8.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสลายตัวของกรดไฮดรอกซีซิทริก

ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสลายตัวในสารมาตรฐานและในตัวอย่าง

นำสารมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริก สารมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน และสารละลายตัวอย่างเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 65, 25, 4 และ -4 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นำมาตรวจวัดปริมาณสารทุก 5 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 25, 4 และ -4 องศาเซลเซียส นำมาตรวจวัดปริมาณสารทุก 5 วัน เป็นเวลา 30 วัน

3.8.2 การศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ

วิธีที่ 1 อุณหภูมิห้อง

ชั่งตัวอย่าง 1.2500 กรัม ที่บดละเอียด สกัดด้วยน้ำให้มีปริมาตร 15 ml เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาตะกอนออก ที่ 2500 rpm 5 นาที แยกส่วนใสเก็บไว้ ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำส่วนส่วนใสมารวมกัน แล้วเจือจางตามความเหมาะสมโดยประกอบด้วยกรดไอโซซิทริก 200 ppm จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE ที่ภาวะเหมาะสมที่หาได้จากการทดลอง แล้วคำนวณหาปริมาณกรดทั้งสองโดยใช้กราฟสอบเทียบในหัวข้อ 3.9

วิธีที่ 2 อุณหภูมิประมาณ 120 องศาเซลเซียส

ทำคล้ายวิธีที่ 1 แต่หลังจากสกัดด้วยน้ำนำไปให้ความร้อนโดยใช้ หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า

3.9 การประยุกต์กับตัวอย่างจริง

3.9.1 การหาปริมาณกรดอินทรีย์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์

เตรียมตัวอย่าง ตามวิธีที่ 1 ที่อุณหภูมิห้อง โดยชั่งตัวอย่าง 1.2500 กรัม ที่บดละเอียด สกัดด้วยน้ำให้มีปริมาตร 15 ml เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาตะกอนออก ที่ 2500 rpm 5 นาที แยกส่วนใสเก็บไว้ ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำส่วนส่วนใสมารวมกัน แล้วเจือจางตามความเหมาะสมโดยประกอบด้วยกรดไอโซซिटริก 200 ppm จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE ที่ภาวะเหมาะสมที่ได้จากการทดลอง แล้วคำนวณหาปริมาณกรดทั้งสองโดยใช้กราฟสอบเทียบในหัวข้อ 3.9

3.9.2 การหาปริมาณกรดอินทรีย์ในตัวอย่างพืชสกุล *Garcinia*

จากตัวอย่างพืชแห้งนำมาบดละเอียด และเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับในตัวอย่างผลิตภัณฑ์

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การแยกสารมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน

การแยกสารมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนจากผลส้มแขกแห้งทำได้โดยนำผลส้มแขกแห้งมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ สกัดด้วยน้ำเนื่องจากกรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน มีคุณสมบัติสามารถละลายได้ดีในน้ำและเอทานอล [Jean *et al.*: 2002] ทำให้ทั้งกรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนสามารถละลายออกมาอยู่ในส่วนของน้ำได้แต่ในการสกัดด้วยน้ำนอกจากจะได้สารทั้งสองชนิดออกมาแล้วยังมีสารอื่นๆถูกสกัดออกมาพร้อมกันด้วย เช่น กรดอินทรีย์ต่างๆที่มีอยู่ในผลส้มแขกแห้ง เพกตินและสารอื่นๆจึงกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการออกบางส่วนด้วยถ่านกัมมันต์และให้ความร้อนเพราะถ่านกัมมันต์สามารถทำงานได้ดีในอุณหภูมิสูง ทำให้สามารถกำจัดสารบางชนิดที่ถูกสกัดออกมาพร้อมกับกรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนออกไปได้บางส่วนสังเกตได้จาก น้ำสกัดที่ได้มีลักษณะที่ใสและสีอ่อนลง จากนั้นกำจัดเพกตินโดยการตกตะกอนเพกตินออกโดยเติมเอทานอลลงไปทำให้เพกตินที่ละลายอยู่ในน้ำสามารถตกตะกอนออกมาได้โดยตะกอนของเพกตินมีลักษณะเป็นวุ้นสีน้ำตาลอ่อน สามารถนำออกได้โดยการปั่นเหวี่ยง ส่วนกรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนยังละลายอยู่ในส่วนใสด้านบนเพราะสารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติสามารถละลายได้ดีทั้งในน้ำและเอทานอลดังที่กล่าวมาแล้ว จากนั้นนำไปทำให้น้ำสกัดเข้มข้นขึ้นโดยใช้อ่างควบคุมอุณหภูมิเนื่องจากในน้ำสกัดมีส่วนของน้ำและเอทานอลละลายอยู่ดังนั้นส่วนที่จะระเหยออกไปก่อนคือส่วนของเอทานอลเนื่องจากมีจุดเดือดที่ต่ำกว่าน้ำ จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกและให้ความร้อนเพื่อให้ในน้ำสกัดมีสภาพที่เป็นกรดสูงเนื่องจากกรดไฮดรอกซีซิทริกเมื่ออยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมสามารถเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของแลกโตนได้ แล้วนำน้ำสกัดไปทำให้แห้งเนื่องจากในน้ำสกัดนั้นมีกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนอยู่เป็นส่วนใหญ่จึงสามารถทำให้แห้งได้เพราะถ้าในน้ำสกัดมีกรดไฮดรอกซีซิทริกอยู่มากแล้วจะทำให้ไม่สามารถทำให้น้ำสกัดแห้งได้เนื่องจากกรดไฮดรอกซีซิทริกไม่สามารถตกผลึกได้ [Lewis and Neelakantan: 1965] จากนั้นนำของแข็งที่ได้มาสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ จากคุณสมบัติของกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนสามารถละลายได้บ้างในไดเอทิลอีเทอร์ [Jean *et al.*: 2002] ซึ่งสามารถใช้สมบัตินี้แยกกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนออกจากสารอื่นๆได้ เมื่อทิ้งไว้จะได้ผลึกของกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน และส่วนของไดเอทิลอีเทอร์ นั้นจะระเหยออกไปเอง

4.2 การเลือกภาวะของ CE

ในงานวิจัยนี้ต้องการแยกและวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดอื่นๆที่มีอยู่ในส่วนสกัดของพืชสกุล *Garcinia* และในผลิตภัณฑ์ที่มีกรดไฮดรอกซีซิทริกเป็นส่วนประกอบ ซึ่งกรดไฮดรอกซีซิทริกนั้นสามารถแตกตัวอยู่ในรูปที่มีประจุได้จึงเลือกการวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดอื่นๆโดยใช้เทคนิค capillary zone electrophoresis (CZE) ตรวจวัดแบบโดยตรง (direct detection) ที่ความยาวคลื่นแสงของแสง UV ที่ 200 nm เนื่องจากกรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดอื่นๆสามารถดูดกลืนแสง UV ในความยาวคลื่นนี้ได้

คะพิลลารีในงานวิจัยนี้ใช้เป็น uncoated fused silica capillary ขนาด 50 μm i.d. \times 57 cm (50 cm to detector) เนื่องจาก uncoated fused silica capillary หาง่าย ราคาไม่แพง และไม่ยุ่งยากในการเก็บรักษา

สารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วง pH 6 ถึง 8 บอเรตบัฟเฟอร์ และบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตและฟอสเฟต เนื่องจาก จากค่า pK_a ที่มีการรายงานไว้ของ กรดออกซาลิก คือ 1.23 และ 4.19 กรดซิทริก คือ 3.14, 4.77 และ 6.39 กรดมาลิก 3.40 และ 5.11 คือ และกรดทาร์ทาลิก คือ 3.22 และ 4.81 [Lide: 1980] พบว่าสามารถแตกตัวอยู่ในรูปที่มีประจุได้โดยปรับ pH ของสารละลายให้เหมาะสม หรืออาจกล่าวได้ว่าการแตกตัวของกรดขึ้นอยู่กับค่า pH ของสารละลาย

ในงานวิจัยนี้ใช้ BGE ที่ประกอบด้วย tetradecyltrimethylammonium (TTAB) เพื่อเป็นการกลับทิศ EOF ไปทางขั้วบวก (reversed EOF) โดยมีด้านเครื่องตรวจวัดเป็นขั้วบวกเช่นกัน เนื่องจากค่า μ° ของสารที่มีการรายงานไว้ในช่วง pH 6 ถึง 8 กรดซิทริก ประมาณ -4 ถึง $-8 \times 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{S}^{-1}$ กรดทาร์ทาลิก ประมาณ $-4 \times 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{S}^{-1}$ โดยที่ μ_{eo} มีค่าประมาณ -4 ถึง $-8 \times 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{S}^{-1}$ ดังนั้นจะพบว่าค่า μ° ของสารมีค่าใกล้เคียงกับค่า μ_{eo} ทำให้สารจะไม่เคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดหรือใช้เวลาในการเคลื่อนที่ดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 2.4.5

4.3 การหาภาวะของ CE

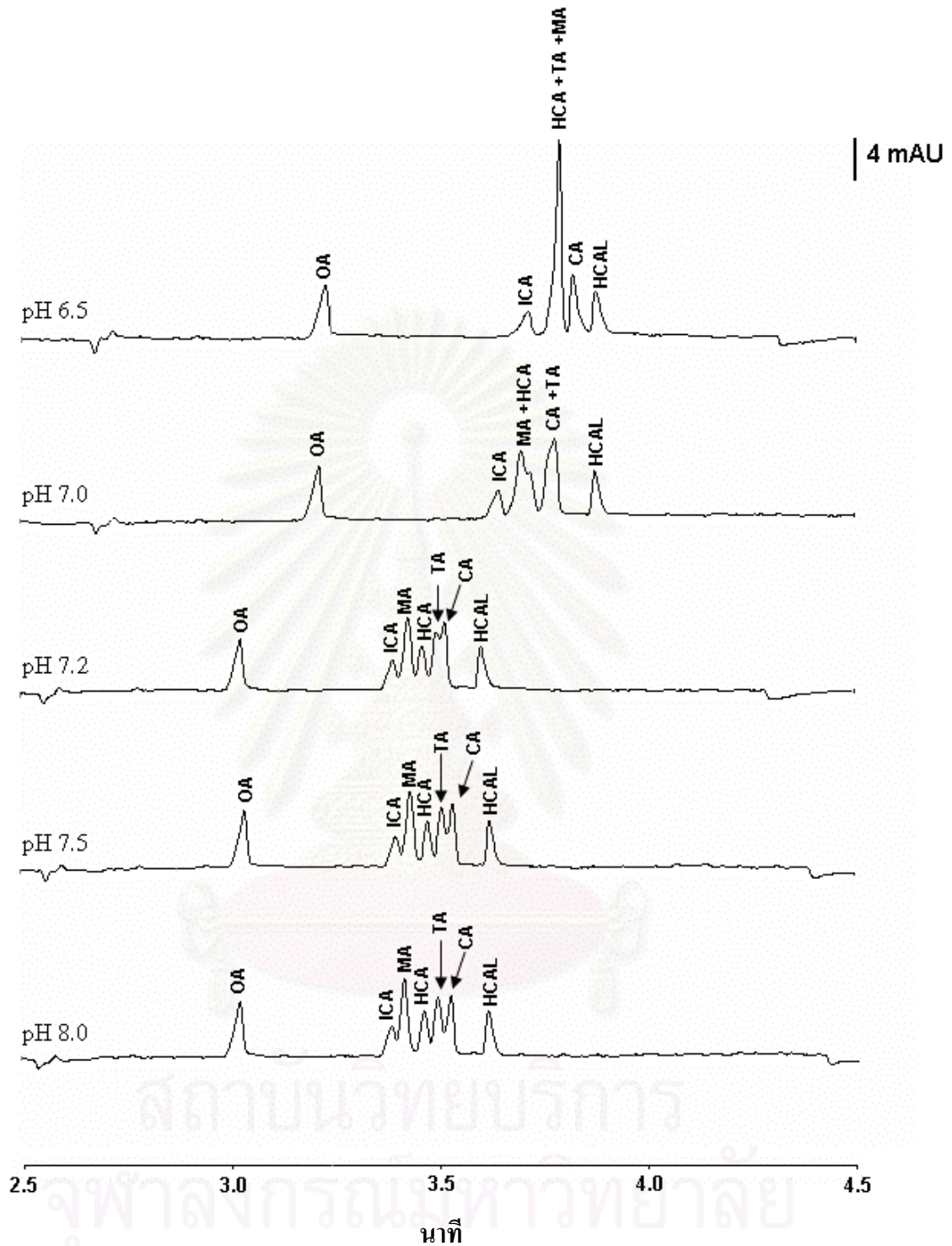
ในงานวิจัยนี้ได้หาภาวะที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการแยกและวิเคราะห์กรดไฮดรอกซีซิทริก กรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน กรดออกซาลิก กรดมาลิก กรดซิทริก กรดทาร์ทาลิก ด้วยเทคนิค CE โดยศึกษาผลของชนิดของบัฟเฟอร์ (บอเรต ฟอสเฟต และบัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตและฟอสเฟต) และ pH ของบัฟเฟอร์

4.3.1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

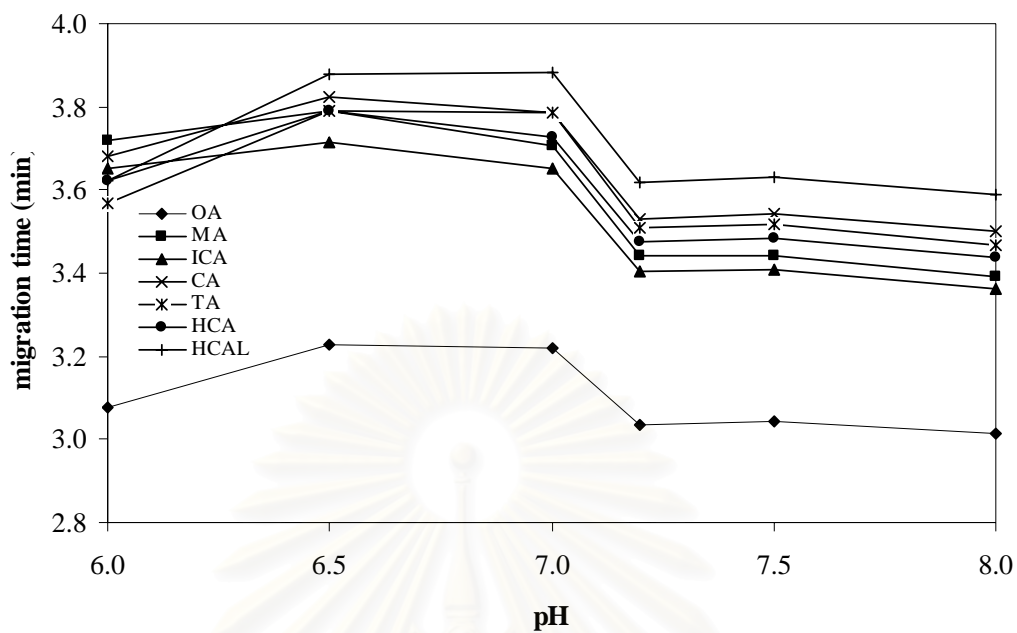
จากค่า pK_a ของกรดฟอสฟอริก คือ 2.15, 7.22 และ 11.50 [Weast: 1987] สารละลายอิเล็กโทรไลต์จะอยู่ในรูปของบัฟเฟอร์ได้นั้น pH ของสารละลายควรอยู่ในช่วง $pK_a \pm 1$ ที่ค่า pK_a ของกรดฟอสฟอริกเท่ากับ 2.12 ทำให้สารตัวอย่างอยู่ในรูปไม่มีประจุเนื่องจากค่า pK_a ของสารตัวอย่างดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 4.2 และที่ค่า pK_a ของกรดฟอสฟอริกเท่ากับ 12.67 นั้นทำให้ผิวของคะปิลลารีสึกกร่อนได้เนื่องจากสัมผัสกับสารละลายที่เป็นเบสมาก ดังนั้นค่า pH ที่เหมาะสมคือ 7.12 ± 1 โดยใช้สารละลาย 50 mM Na_2HPO_4 ที่ประกอบด้วย 0.5 mM TTAB และปรับ pH ด้วยกรดฟอสฟอริก

เมื่อนำสารละลายมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริก กรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน กรดออกซาลิก กรดมาลิก กรดซิตริก กรดทาร์ทาลิก และมีกรดไอโซซิทริกเป็น internal standard มาวิเคราะห์ด้วย CE โดยใช้ 50 mM Na_2HPO_4 ที่ pH 7.2 ได้อิเล็กโทรฟีโรแกรมดังรูปที่ 4.1

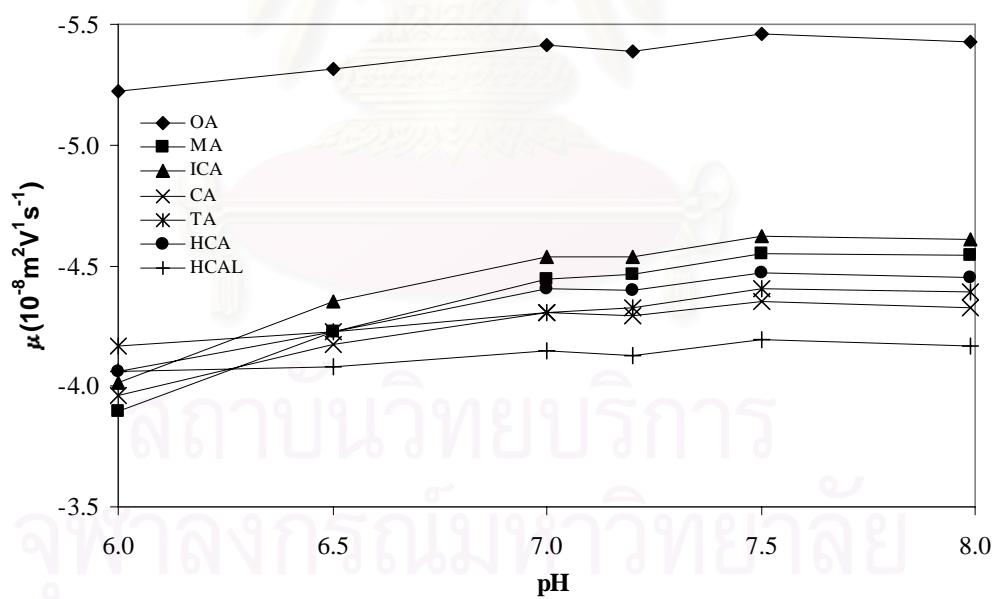
จากรูปที่ 4.1 ที่รูป pH 7.2 จะเห็นว่า ICA, MA, CA, TA และ HCA ซ้อนทับกัน แต่ OA และ HCAL สามารถแยกออกมาจากพีคอื่นได้สมบูรณ์ โดยออกมาที่ออกมาที่ไมเกรชั่นไทม์ 3.035 และ 3.617 นาที ตามลำดับ จากหัวข้อ 2.4.4 ค่า pH ของ BGE จะมีผลต่อดีกรีการแตกตัวของสารทำให้การเคลื่อนที่ของสารเปลี่ยนแปลงไป จึงได้ปรับ pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วง pH 6 ถึง pH 8 เมื่อนำสารละลายมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริก กรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน กรดออกซาลิก กรดมาลิก กรดซิตริก กรดทาร์ทาลิก และมีกรดไอโซซิทริกเป็น internal standard มาวิเคราะห์ด้วย CE โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วง pH 6 ถึง pH 8 ได้อิเล็กโทรฟีโรแกรมดังรูปที่ 4.1 พบว่าพีคของ OA และ HCAL สามารถแยกออกมาจากสารอื่นๆ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ทุก pH แต่พีคอื่นๆ ไม่สามารถแยกออกจากกันได้



รูปที่ 4.1 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของสารละลายมาตรฐาน โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ: ภาวะของ CE: uncoated fused silica capillary ขนาด $50\ \mu\text{M} \times 57\ \text{cm}$ (50 cm ถึงเครื่องตรวจวัด), อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 °C, ความต่างศักย์ที่ใช้แยกสาร -20 kV, บรรจุสารตัวอย่างด้วยความดัน 0.5 psi เป็นเวลา 10 s, ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 200 nm



รูปที่ 4.2 ไมเกรชันไทม์ของสารที่ pH ต่างๆของฟอสเฟตบัฟเฟอร์



รูปที่ 4.3 ค่า μ ของสารที่ pH ต่างๆของฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ผลของ pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อไมเกรชันโทม์ของสาร แสดงดังรูป 4.2 พบว่า ไมเกรชันโทม์ลดลงเมื่อเพิ่มค่า pH ทำให้ ไมเกรชันโทม์มีค่าลดลงคือใช้เวลาในการที่สารผ่านเครื่องตรวจวัดเร็วขึ้น และ OA ใช้เวลาในการออกมาที่เครื่องตรวจวัดเร็วกว่าสารอื่น โดยที่ MA, ICA, CA, TA, HCA และ HCAL ใช้เวลาใกล้เคียงกันและในช่วง pH 6 ถึง pH 7.2 มีการสลับตำแหน่งของสารที่ออกมาด้วย และจากค่า t_{co} และ t_m ในอิเล็กโตรฟีโรแกรมรูปที่ 2 สามารถนำมาคำนวณค่า μ ได้โดยใช้สมการที่ 2.7 ได้ผลดังรูปที่ 4.3 โดยรวมนั้นเมื่อ pH ของบัฟเฟอร์มีค่าสูงขึ้นทำให้ค่า μ ของสารทั้ง 7 ชนิด มีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากคิกริการแตกตัวของสารเพิ่มขึ้นตาม pH [Kenndler: 1998] และเนื่องจากสารแต่ละตัวมีค่า pK_a ไม่เท่ากันจึงมีการแตกตัวต่างกันทำให้มีค่า μ ที่ต่างกันด้วย พบว่าค่า μ ของ OA มีค่าน้อยที่สุดเนื่องจากสามารถผ่านเครื่องตรวจวัดออกมาก่อนและแยกออกจากสารอื่นได้อย่างชัดเจน แต่ ICA, MA, CA, TA และ HCA ค่า μ มีค่าใกล้เคียงกันจึงแยกออกจากกันไม่ได้ โดยที่ pH 6 HCA มีค่า μ เท่ากันกับ HCAL ทำให้พีกออกมาที่เดียวกันและเมื่อเพิ่มเป็น pH 6.5 ทำให้ TA, MA, และ HCA มีค่า μ เท่ากันพีกจึงออกมาพร้อมกันและมีการสลับตำแหน่งกันเมื่อเพิ่มเป็น pH 6.5 โดยที่ pH 6 สารออกมาตามลำดับดังนี้คือ OA, TA, HCA+ HCAL, ICA, MA และ MA ตามลำดับ แต่ที่ pH 6.5 สารออกมาตามลำดับดังนี้คือ OA, ICA, MA+ HCA+ TA, CA และ HCAL เมื่อเพิ่มเป็น pH 7 ค่า μ ของ TA และ CA มีค่าเท่ากันจึงทำให้พีกออกมาพร้อมกันและมีการสลับตำแหน่งของสาร โดยมีลำดับของสารดังนี้คือ OA, ICA, MA, HCA, TA+CA และ HCAL ตามลำดับที่ pH 7.2 ถึง pH 8 สารแยกออกจากกันแต่ยังมีบางส่วนที่ซ้อนทับกัน โดยมีลำดับการออกของสารดังนี้ OA, ICA, MA, HCA, TA, CA และ HCAL เมื่อพิจารณาค่า μ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันจึงไม่สามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน

ดังนั้นจากการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารละลายอิเล็กโตรไลต์สามารถแยก OA และ HCAL ออกจากสารอื่นๆได้ แต่ไม่สามารถแยก MA, ICA, CA, TA และ HCA ออกจากกันได้จึงศึกษาในบัฟเฟอร์ชนิดอื่นต่อไป

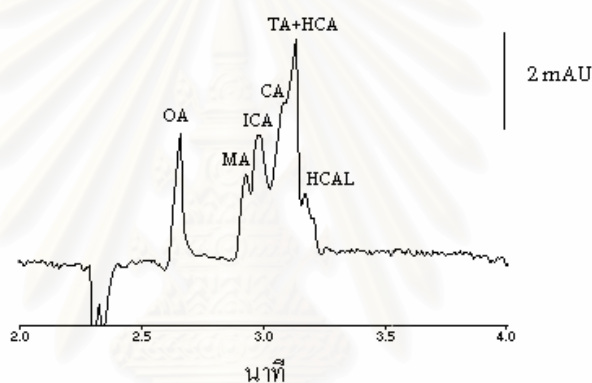
4.3.2 บอเรตบัฟเฟอร์

จากการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไม่สามารถแยกพีกของสารทั้ง 7 ชนิดออกจากกันให้ได้พีกที่สมบูรณ์ได้จึงเปลี่ยนชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้มาเป็นบอเรตบัฟเฟอร์ โดยใช้ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ละลายด้วยน้ำ จะได้บัฟเฟอร์แสดงดังสมการเคมี 4.3



ดังนั้นในสารละลายที่ประกอบไปด้วยกรดบอริก (H_3BO_3) ซึ่งเป็นกรดอ่อนและบอเรต ($B(OH)_4^-$) ซึ่งเป็นคู่กรด ในปริมาณเท่าๆกันดังนั้นสารละลายจึงมีสภาพเป็นบัฟเฟอร์

ในการทดลองเริ่มแรกใช้สารละลาย 20 mM $Na_2B_4O_7$ ที่ค่า pH 9.2 ซึ่งใกล้เคียงกับ pK_a ของกรดบอริกซึ่งมีค่าเท่ากับ 9.14 เมื่อนำสารละลายมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริก กรดไฮดรอกซีซิทริก แล็กโตน กรดออกซาลิก กรดมาลิก กรดซิทริก กรดทาร์ทาลิก และมีกรดไอโซซิทริกเป็น internal standard มาวิเคราะห์ด้วย CE โดยใช้บัฟเฟอร์ดังกล่าวได้อิเล็กโทรฟีโรแกรมดังรูปที่ 4.4 พบว่าสามารถแยก OA ออกจากสารอื่นได้แต่ MA, ICA, CA, TA, HCA และ HCAL ไม่สามารถแยกออกจากกันได้สมบูรณ์ โดยมีลำดับการเคลื่อนที่ของสารดังนี้ OA, MA, ICA, CA, TA, HCA และ HCAL ซึ่งลำดับการเคลื่อนที่ของสารต่างจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในรูป 4.1 ดังนั้นจึงได้ทดลองใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่างฟอสเฟตและบอเรต



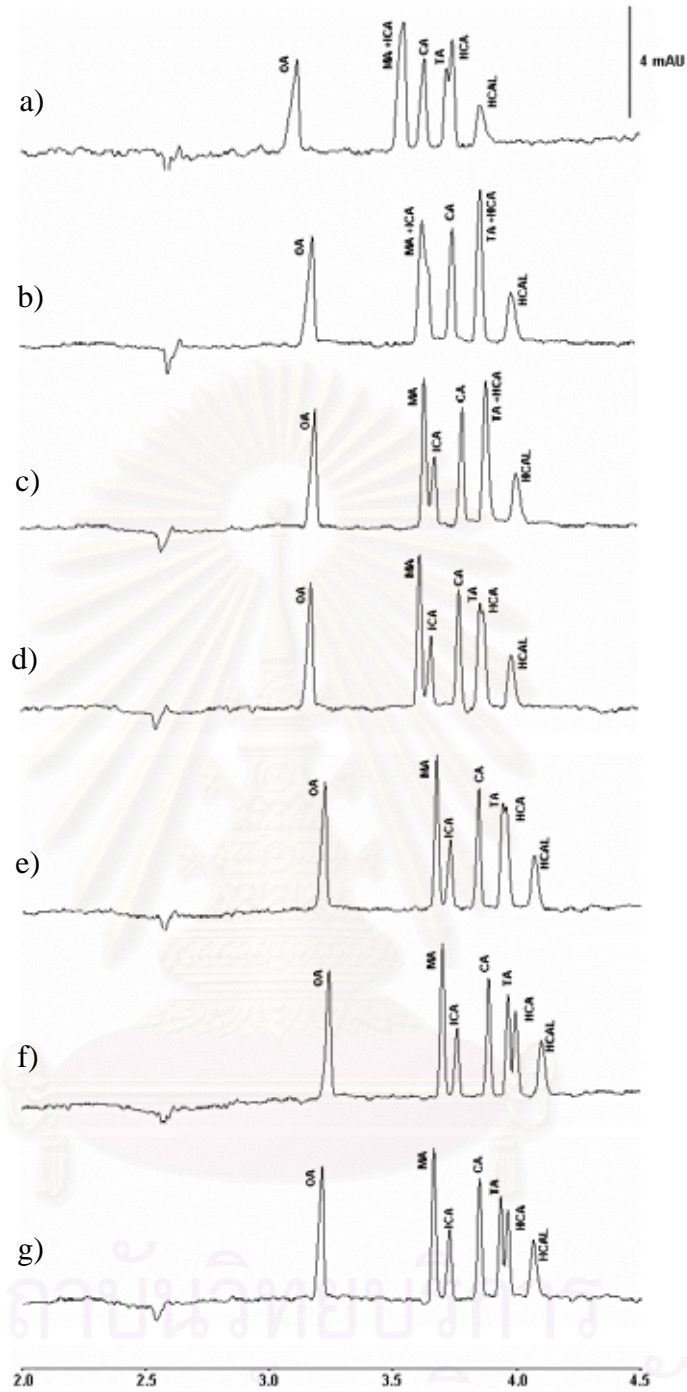
รูปที่ 4.4 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของสารละลายมาตรฐาน โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 : ภาพของ CE: ดังรูปที่ 4.1

4.3.3 บัฟเฟอร์ผสมระหว่างบอเรตและฟอสเฟต

จากการศึกษาในบัฟเฟอร์เดี่ยวพบว่าไม่สามารถแยกสารทั้ง 7 ชนิดออกจากกันได้ และลำดับการเคลื่อนที่ของสารในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และบอเรตบัฟเฟอร์ต่างกัน จึงได้ทดลองนำ NaH_2PO_4 ความเข้มข้น 20, 40, 60, 70, 80, 90 และ 100 mM เติมลงใน 20 mM $Na_2B_4O_7$ แล้วปรับให้สารละลายผสมมี pH เท่ากับ 9.2 ด้วย 1 M NaOH เมื่อนำสารละลายมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริก กรดไฮดรอกซีซิทริก แล็กโตน กรดออกซาลิก กรดมาลิก กรดซิทริก กรดทาร์ทาลิก และมีกรดไอโซซิทริกเป็น internal standard มาวิเคราะห์ด้วย CE โดยใช้บัฟเฟอร์ผสมดังกล่าว อิเล็กโทรฟีโรแกรมดังรูปที่ 4.5 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaH_2PO_4 การซ้อนทับกันของพีกลดลง โดยที่ 40 mM NaH_2PO_4 พีกของ MA ซ้อนทับกับพีกของ ICA และ พีกของ TA ซ้อนทับกับพีกของ HCA แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaH_2PO_4 มากขึ้นมีผลทำให้พีกที่ซ้อนทับกันอยู่สามารถแยกออกจากกันได้มากขึ้นโดยพีกของ MA สามารถแยกออกจากพีกของ ICA ที่ความเข้มข้นของ NaH_2PO_4 เท่ากับ 90

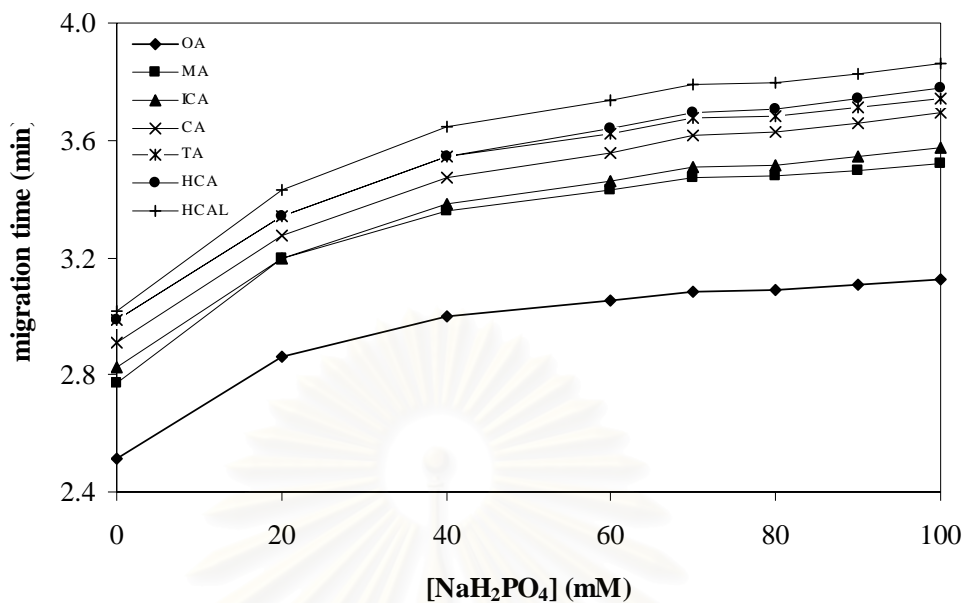
mM แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaH_2PO_4 ถึง 100 mM พีกของกรดทาร์ทาลิก และกรดไฮดรอกซีซิทริกสามารถแยกออกจากกันได้แต่ยังแยกออกจากกันได้ไม่สมบูรณ์ และจากค่าไมเกรชันโทม์ของสารทั้ง 7 ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.6 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaH_2PO_4 มีผลทำให้ไมเกรชันโทม์เพิ่มขึ้นด้วย จึงนำค่าไมเกรชันโทม์ที่ได้คำนวณค่า μ แสดงดังรูปที่ 4.7 พบว่า ค่า μ เพิ่มขึ้นเมื่อเติม 20 mM NaH_2PO_4 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaH_2PO_4 ทำให้ค่า μ ลดลงเล็กน้อยเนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BGE เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ effective charge (z) ลดลง และ r_h มากขึ้น ดังนั้นค่า μ จึงลดลง [Foret, 1993] แต่เมื่อเติม 70 ถึง 100 mM NaH_2PO_4 ทำให้ค่า μ เริ่มคงที่ อาจเนื่องจากผลของ Joule heating มากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BGE จึงมีผลทำให้ค่า μ มีค่าเพิ่มขึ้นและจากที่กล่าวมาข้างต้นทำให้โดยรวมแล้วค่า μ นั้นคงที่

จากการศึกษาในบัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ กับ 20, 40, 60, 70, 80, 90 และ 100 mM NaH_2PO_4 พบว่ายังไม่สามารถแยกพีกของสารออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์จึงทดลองเพิ่มความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ต่อไป

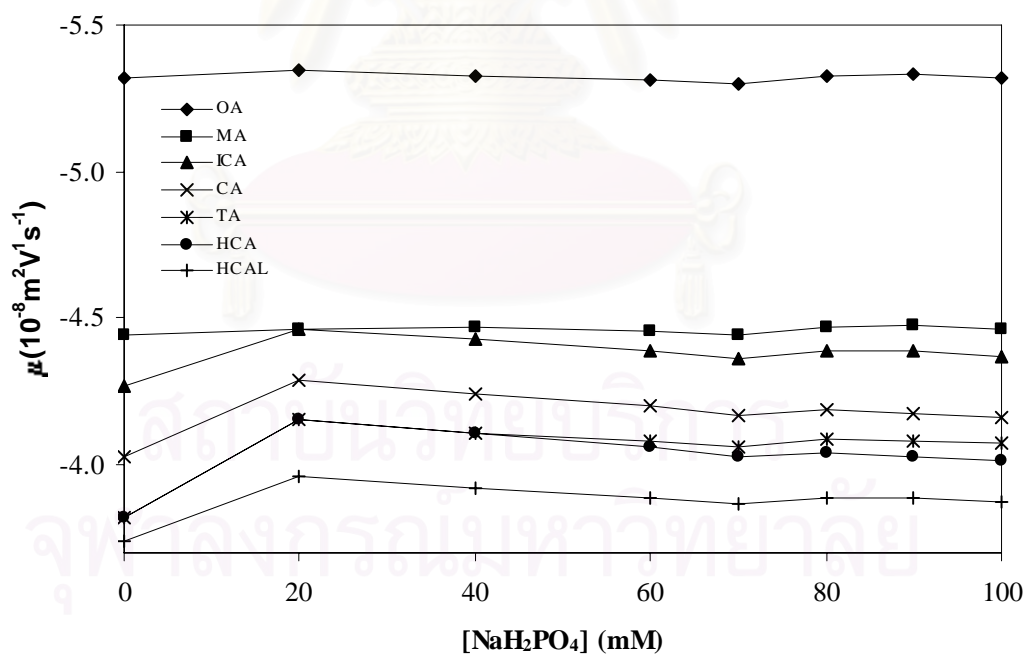


รูปที่ 4.1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

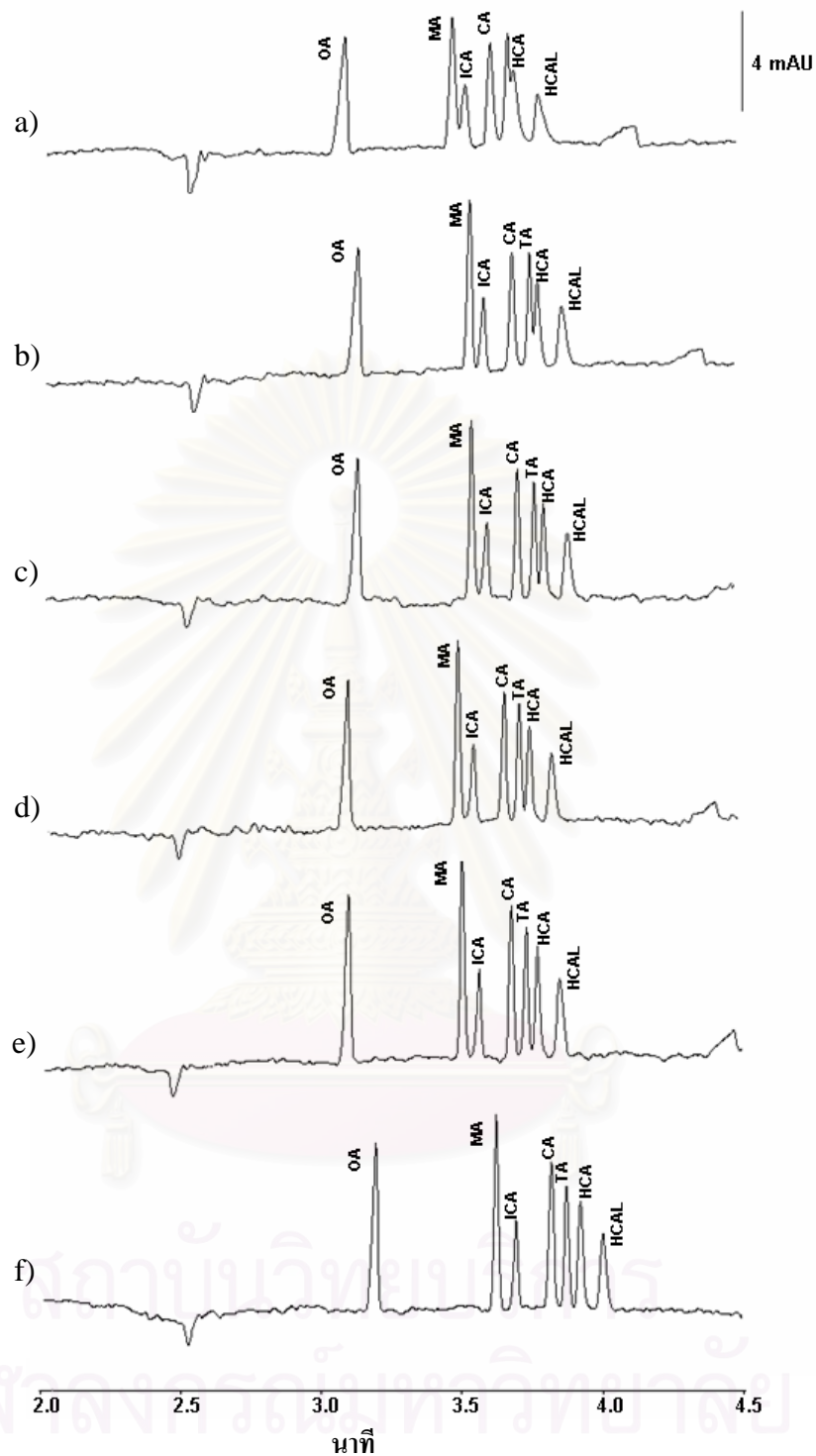
รูปที่ 4.5 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของสารละลายมาตรฐาน โดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ กับ NaH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ pH 9.2 โดย 1 M NaOH: ภาวะของ CE: ดังรูปที่ 4.1: ความเข้มข้นของ NaH_2PO_4 (a) 20 (b) 40 (c) 60 (d) 70 (e) 80 (f) 90 และ (g) 100 mM



รูปที่ 4.6 ไมเกรชันไทม์ ของสารโดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ กับ NaH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ pH 9.2

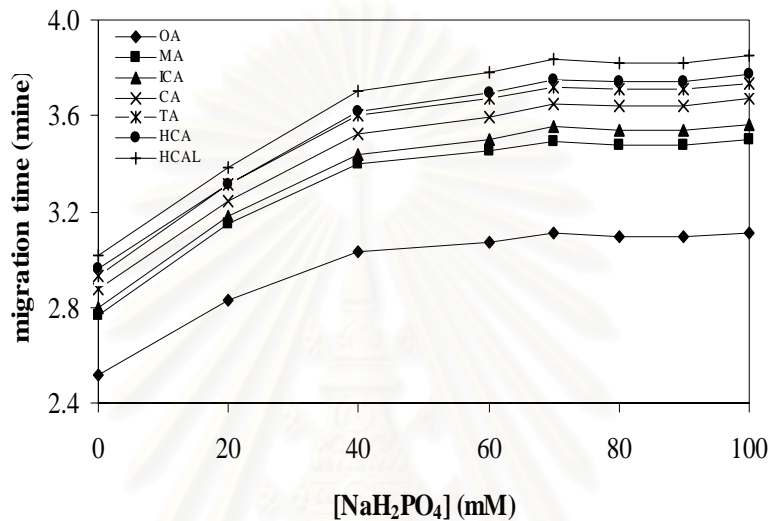


รูปที่ 4.7 ค่า μ ของสารโดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ กับ NaH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ pH 9.2

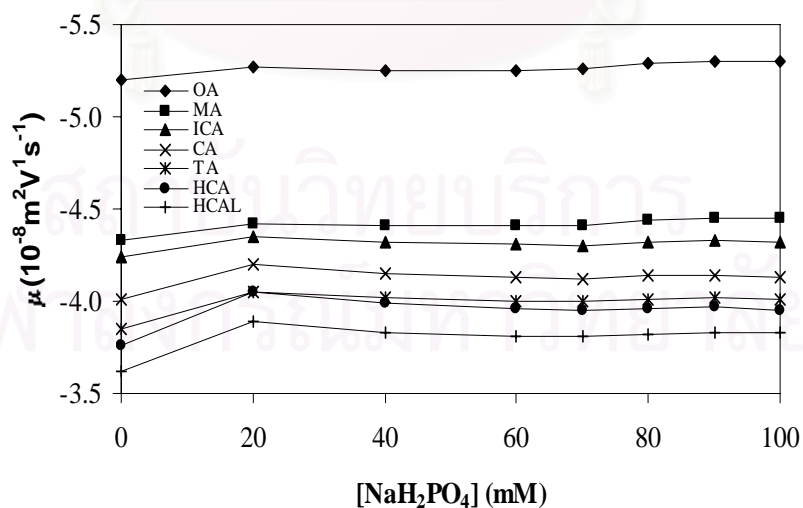


รูปที่ 4.8 อิเล็กโทรฟีโรแกรมของสารละลายมาตรฐาน โดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ กับ NaH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ pH 9.2 โดย 1 M NaOH: ภาวะของ CE: ดังรูปที่ 4.1: ความเข้มข้นของ NaH_2PO_4 (a) 20 (b) 40 (c) 60 (d) 70 (e) 80 และ (f) 90 mM

จากการศึกษาในบัฟเฟอร์ผสมโดยเพิ่มความเข้มข้นของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ เป็น 30 mM กับ 20, 40, 60, 70, 80, 90 และ 100 mM NaH_2PO_4 ได้อิเล็กโตรฟีโกราฟีโรแกรมดังรูปที่ 4.8 และได้ค่าไมเกรชันไทม์ดังรูปที่ 4.9 พบว่าพีกสามารถแยกออกจากกันได้ดีขึ้น เมื่อคำนวณค่า μ พบว่าได้ค่า μ ใกล้เคียงกับการใช้ 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ แสดงดังรูปที่ 4.10 แต่สารสามารถแยกออกจากกันได้ดีกว่า เนื่องจาก BGE มีความเข้มข้นมากขึ้น โดยภาวะที่สามารถแยกสารได้ดีคือบัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ กับ 90 mM NaH_2PO_4 ที่ pH 9.2 โดยปรับด้วย 1M NaOH



รูปที่ 4.9 ไมเกรชันไทม์ ของสารโดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ กับ NaH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ pH 9.2



รูปที่ 4.10 ค่า μ ของสารโดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ กับ NaH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ pH 9.2

4.4 การตรวจสอบวิธีการ (Method Validation)

4.4.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัด และขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ

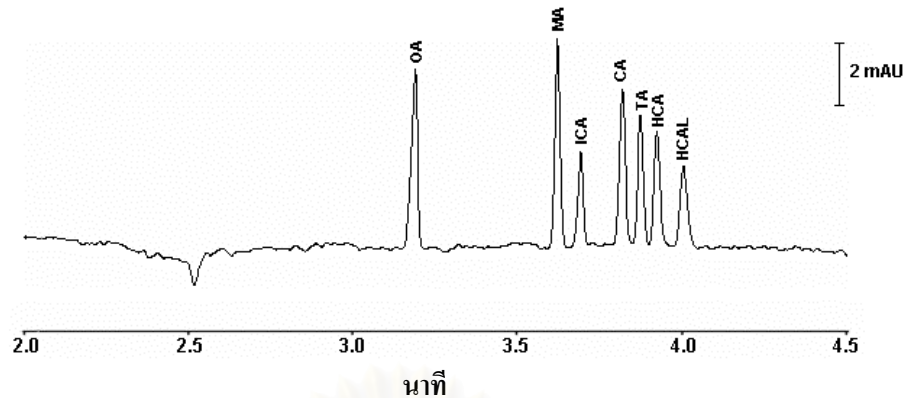
ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) นิยามเป็นความเข้มข้นของสารที่ให้อัตราส่วนของสัญญาณต่อสัญญาณรบกวนเท่ากับ 3 และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantiation, LOQ) มีค่าอัตราส่วนเดียวกันเท่ากับ 10 ค่า LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

สาร	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
กรดออกซาลิก	3.9	11.9
กรดมาลิก	0.9	2.6
กรดซิตริก	12.1	36.5
กรดทาร์ทาลิก	10.2	30.4
กรดไฮดรอกซีซิตริก	12.8	38.5
กรดไฮดรอกซีซิตริกแลกโตน	15.7	47.3

4.4.2 กราฟสอบเทียบ

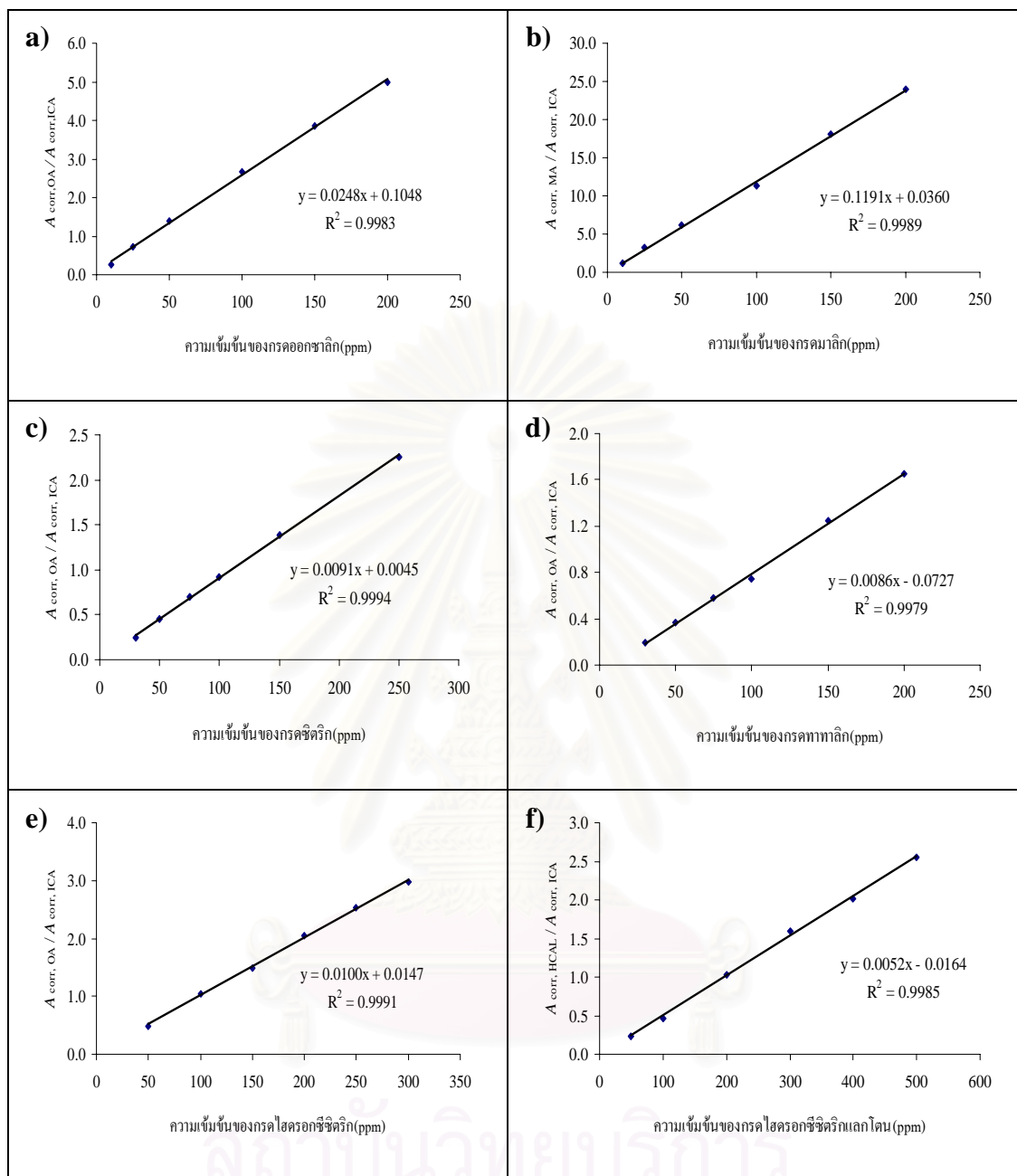
ในงานวิจัยนี้ ทำกราฟสอบเทียบในการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ในพืชสกุล *Garcinia* ซึ่งกรดอินทรีย์ที่พบมากคือ กรดไฮดรอกซีซิตริก และ กรดไฮดรอกซีซิตริกแลกโตน [Jayaprakasha and Sakariah: 2002] จึงให้ความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 50 ถึง 300 ppm และ 50 ถึง 500 ppm ตามลำดับ นอกจากนี้อาจพบกรดอินทรีย์อื่นอีกเช่น กรดออกซาลิก กรดมาลิก กรดซิตริก และกรดทาร์ทาลิก ซึ่งมีอยู่ในปริมาณน้อย [Jayaprakasha and Sakariah: 1998] จึงให้ความเข้มข้นของกรดออกซาลิก และกรดมาลิกอยู่ในช่วง 10 ถึง 200 ppm และเข้มข้นของกรดซิตริก และกรดทาร์ทาลิกอยู่ในช่วง 30 ถึง 200 ppm ตามลำดับ โดยมีกรดไอโซซิตริก เป็น internal standard เนื่องจากไม่พบในตัวอย่าง นอกจากนี้ยังมีสูตร โครงสร้างคล้ายกับกรดไฮดรอกซีซิตริก จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็น internal standard ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยเติมกรดไอโซซิตริกลงไปในการละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของกรดไอโซซิตริกเท่ากับ 200 ppm โดยแต่ละความเข้มข้นของสารฉีดซ้ำ 2 ครั้ง



รูปที่ 4.11 ตัวอย่างอิเล็กโทรฟีโรแกรมของสารละลายมาตรฐาน 200 ppm กรดออกซาลิก 20 ppm กรดมาลิก 200 ppm กรดซิตริก 200 ppm กรดทาร์ทาลิก 200 ppm กรดไฮดรอกซีซิตริก และ 200 ppm กรดไฮดรอกซีซิตริกแลกโตน ที่ประกอบด้วย 200 ppm กรดไอโซซิตริก โดยใช้บัฟเฟอร์ผสมระหว่าง 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ และ 90 mM NaH_2PO_4 ที่ประกอบด้วย 0.5 mM TTAB ที่ pH 9.2 เป็น BGE: ภาวะอื่นๆของ CE: ดังรูปที่ 4.1

จากอิเล็กโทรฟีโรแกรมจะได้เป็น corrected peak area (A_{corr} , นิยามดังหัวข้อที่ 2.4.7) ของสารมาตรฐาน และกรดไอโซซิตริก นำมาคิดเป็นค่าอัตราส่วนของ A_{corr} ของสารมาตรฐานกับกรดไอโซซิตริก และแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของ $A_{\text{corr, สารมาตรฐาน}} / A_{\text{corr, ICA}}$ กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ดังรูปที่ 4.13 โดยที่ค่า R^2 มีค่าใกล้เคียง 1 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของ $A_{\text{corr, สารมาตรฐาน}} / A_{\text{corr, ICA}}$ กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานมีความสัมพันธ์ในลักษณะเชิงเส้นตรง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 กราฟสอบเทียบสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของ a) กรดออกซาลิก b) กรดมาลิก c) กรดซิตริก d) กรดทาร์ทาลิก e) กรดไฮดรอกซีซิตริก และ f) กรดไฮดรอกซีซิตริกแลคโตน

ตารางที่ 4.2 สรุปกราฟสอบเทียบสำหรับปริมาณวิเคราะห์

สาร	ช่วงความเข้มข้น, ppm	สมการเส้นตรง		
		ความชัน	จุดตัดแกน Y	r^2
OA	10 – 200	0.0248	0.1048	0.9983
MA	10 – 200	0.1191	0.0360	0.9989
CA	30 – 250	0.0091	0.0045	0.9994
TA	30 – 200	0.0086	-0.0727	0.9979
HCA	50 – 300	0.0100	0.0147	0.9991
HCAL	50 - 500	0.0052	-0.0164	0.9985

4.4.3 ความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

การหาความเที่ยงของการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารทั้ง 6 ชนิด ทำโดยเตรียมและวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของกรดออกซาลิก กรดมาลิก กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก กรดไฮดรอกซีซิตริก และกรดไฮดรอกซีซิตริกแลกโตน โดยมีกรดไอโซซิตริกเป็น internal standard ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 10 ครั้งภายในวันเดียวกัน และเปรียบเทียบความแตกต่างเป็นเวลา 5 วัน ได้ค่าไมเกรชันไทม์ ดังตารางที่ 4.2 และอัตราส่วนของ A_{corr} ของสารมาตรฐานกับ internal standard ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ความเที่ยงของไมเกรชันโทรม์

ความ เที่ยง	RSD (%) และค่าเฉลี่ยของไมเกรชันโทรม์ (นาทิจ)						
	OA	MA	ICA	CA	TA	HCA	HCAL
	60 ppm	20 ppm	200 ppm	200 ppm	160 ppm	200 ppm	200 ppm
ภายในวัน							
วันที่ 1	0.47 (3.27)	0.55 (3.73)	0.56 (3.82)	0.59 (3.94)	0.61 (4.03)	0.63 (4.07)	0.64 (4.17)
วันที่ 2	0.65 (3.29)	0.74 (3.75)	0.75 (3.83)	0.81 (3.96)	0.84 (4.05)	0.82 (4.09)	0.84 (4.19)
วันที่ 3	0.28 (3.19)	0.32 (3.63)	0.32 (3.70)	0.34 (3.82)	0.35 (3.90)	0.35 (3.94)	0.35 (4.03)
วันที่ 4	0.51 (3.12)	0.60 (3.53)	0.61 (3.61)	0.62 (3.72)	0.63 (3.79)	0.64 (3.83)	0.66 (3.91)
วันที่ 5	0.71 (3.05)	0.80 (3.44)	0.81 (3.51)	0.83 (3.62)	0.85 (3.69)	0.85 (3.72)	0.88 (3.80)
ต่างวัน							
รวม	3.13 (3.18)	3.62 (3.62)	3.73 (3.69)	3.84 (3.81)	3.93 (3.89)	4.00 (3.93)	4.10 (4.02)

หมายเหตุ : แต่ละตัวอย่างในแต่ละวันทำการฉีดซ้ำ 10 ครั้ง

: ค่าเฉลี่ยแสดงในวงเล็บ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 ความเที่ยงของพื้นที่ ($A_{\text{corr, สารมาตรฐาน}} / A_{\text{corr, ICA}}$)

ความเที่ยง	RSD.(%) และค่าเฉลี่ยของพื้นที่					
	OA	MA	CA	TA	HCA	HCAL
	60 ppm	20 ppm	200 ppm	160 ppm	200 ppm	200 ppm
ภายในวัน						
วันที่ 1	3.72 (1.65)	3.41 (2.59)	3.33 (1.91)	3.36 (1.46)	3.80 (1.49)	3.33 (1.26)
วันที่ 2	3.38 (1.58)	3.84 (2.53)	3.28 (1.91)	3.19 (1.43)	3.03 (1.42)	3.26 (1.24)
วันที่ 3	3.53 (1.66)	3.71 (2.52)	2.86 (1.97)	2.38 (1.47)	3.38 (1.40)	3.45 (1.24)
วันที่ 4	3.22 (1.62)	3.54 (2.51)	3.29 (1.90)	3.56 (1.48)	2.70 (1.34)	3.73 (1.23)
วันที่ 5	3.26 (1.63)	3.71 (2.63)	3.99 (2.09)	2.84 (1.48)	3.10 (1.34)	4.03 (1.28)
ต่างวัน						
รวม	1.75 (1.63)	2.05 (2.56)	4.13 (1.96)	1.50 (1.46)	4.61 (1.40)	1.66 (1.25)

หมายเหตุ : แต่ละตัวอย่างในแต่ละวันทำการฉีดซ้ำ 10 ครั้ง

: ค่าเฉลี่ยแสดงในวงเล็บ

จากตารางที่ 4.2 และ 4.3 พบว่าไมเกรชันโทม์ของสารมาตรฐานเมื่อวิเคราะห์ในวันเดียวกันนั้นมีความเที่ยงสูง (RSD < 2%) เนื่องจากก่อนเริ่มต้นวิเคราะห์ในแต่ละวันนั้นมีการให้กระแสไฟฟ้าก่อนเป็นเวลา 30 นาที เพื่อเป็นการปรับสภาวะในคอลัมน์ แต่เมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันค่าไมเกรชันโทม์ของสารจะต่างกันเนื่องจากใช้ reversed EOF จัดเป็น dynamic coating ซึ่งจะขึ้นอยู่กับความเที่ยงของความเข้มข้นของ TTAB ในการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ในแต่ละวัน ความเที่ยงของพื้นที่ทั้งภายในวันเดียวกันและต่างวันมีค่า RSD ที่ใกล้เคียงกันซึ่งแสดงดังตารางที่ 2 โดยมีค่าน้อยกว่า 5% ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

การหาความแม่นยำของการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารทั้ง 6 ชนิดในเมทริกซ์ที่เป็นน้ำและที่ spike ลงไปในสารละลายตัวอย่าง โดยแต่ละสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างประกอบด้วย 200 ppm กรดไอโซซิทริกเป็น internal standard แล้วคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแสดงดังรูปที่ 4.12 โดยคำนวณออกมาเป็น % recovery แสดงดังตารางที่ 4.4 จะเห็น

ว่า % recovery นั้นอยู่ในช่วง 95.2 ถึง 102.4 และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) น้อยกว่า 5% แสดงว่ามีค่าความแม่นยำของปริมาณวิเคราะห์ที่ยอมรับได้นอกจากนี้เมทริกซ์ที่เป็นน้ำและสารละลายตัวอย่าง ให้ผลของความเที่ยงและความแม่นยำในช่วงที่ไม่แตกต่างกัน

ตาราง 4.5 ความแม่นยำของปริมาณวิเคราะห์

สาร	ปริมาณสารที่เติม (ppm)	เมทริกซ์			
		น้ำ		สารละลายตัวอย่าง	
		% recovery	RSD (%)	% recovery	RSD (%)
OA	30	100.6	1.7	97.5	3.8
	130	101.4	2.0	95.2	3.2
MA	30	102.4	2.1	99.8	4.1
	130	100.6	1.6	101.6	3.5
CA	40	99.7	1.8	96.0	3.5
	130	100.7	1.3	97.8	3.1
TA	40	99.2	3.2	97.1	4.8
	130	100.7	1.1	99.4	3.6
HCA	75	100.8	1.1	97.8	4.7
	180	100.1	1.0	98.8	4.2
HCAL	75	99.8	2.1	99.7	2.6
	250	101.1	1.2	98.3	2.9

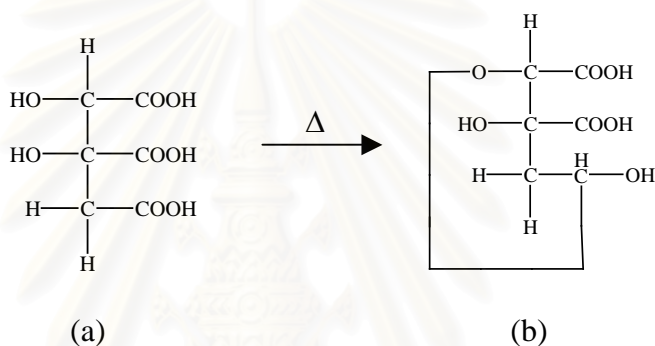
หมายเหตุ: แต่ละตัวอย่างทำการฉีดซ้ำ 10 ครั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การสลายตัวของกรดไฮดรอกซีซิทริกและการเตรียมตัวอย่าง

4.5.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการสลายตัวของกรดไฮดรอกซีซิทริก

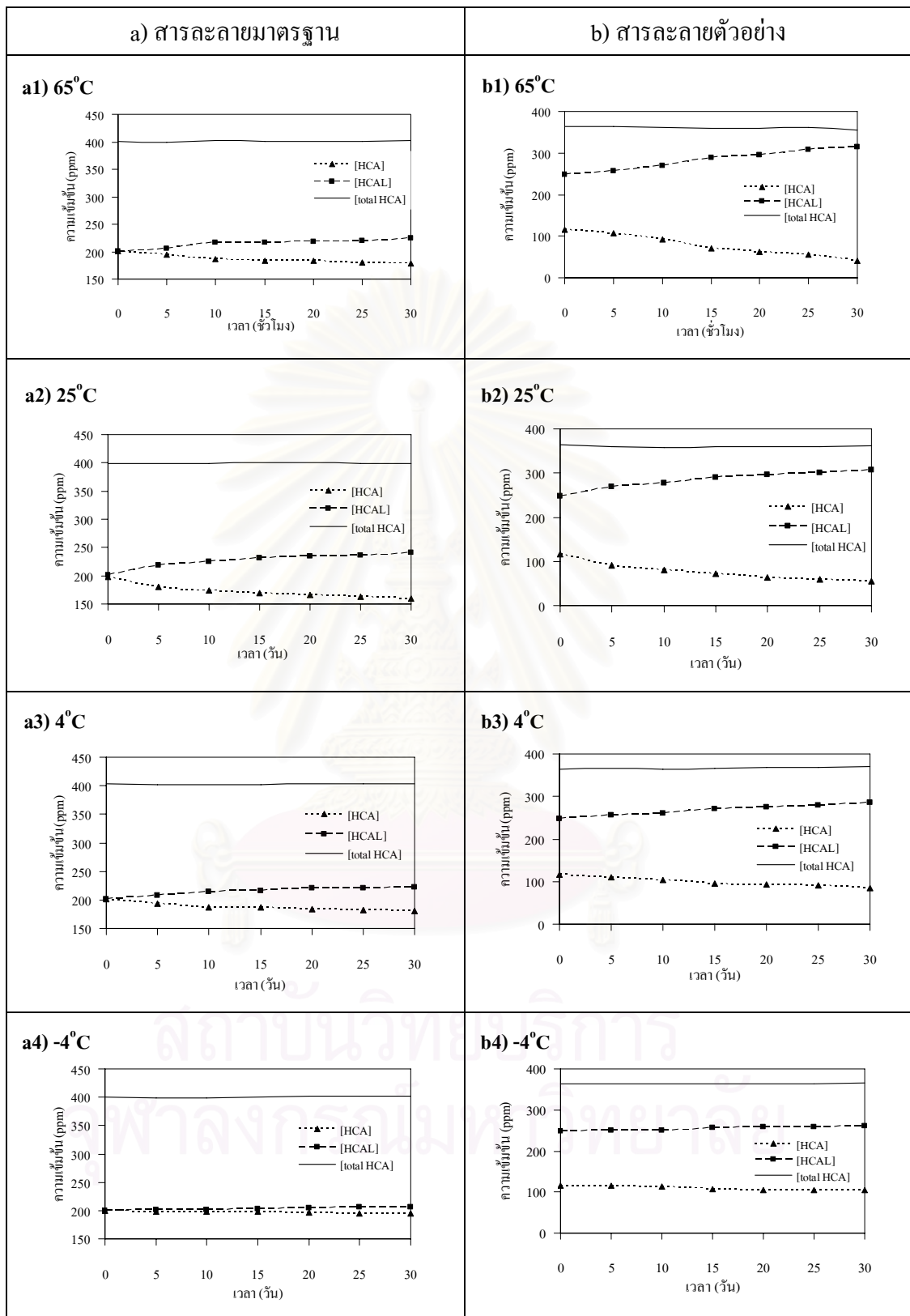
กรดไฮดรอกซีซิทริกนั้นเมื่อเป็นสารเดี่ยวๆจะไม่มีความเสี่ยงเนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยาแลคโตไนเซชัน (lactonization) เกิดเป็นวง ดังรูปที่ 4.13 เป็นสารประเภทแลคโตน เรียกว่า กรดไฮดรอกซีซิทริกแลคโตน ซึ่งเมื่อกรดไฮดรอกซีซิทริกเปลี่ยนเป็นกรดไฮดรอกซีซิทริกแลคโตนแล้วทำให้คุณสมบัติในการจับกับเอ็นไซม์ในขบวนการสังเคราะห์กรดไขมันนั้นลดลง [Jena *et al.*: 2002] ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเปลี่ยนรูปของกรดไฮดรอกซีซิทริก โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารทั้งสองชนิดเมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่างทั้งในส่วนที่เป็นสารละลายมาตรฐานและส่วนสกัด



รูปที่ 4.13 ปฏิกิริยาแลคโตไนเซชัน (lactonization): (a) กรดไฮดรอกซีซิทริก (b) กรดไฮดรอกซีซิทริกแลคโตน

จากผลการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการสลายตัวของสารละลายมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริก พบว่าเมื่อเก็บรักษาสารละลายมาตรฐานกรดไฮดรอกซีซิทริกไว้ที่อุณหภูมิ 65, 25, 4 และ -4 องศาเซลเซียส พบว่าทำให้ปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกนั้นลดลงแต่ปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกแลคโตนกลับเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.14 a) แสดงให้เห็นว่า เมื่อกรดไฮดรอกซีซิทริกได้รับความร้อนสามารถเกิดปฏิกิริยาแลคโตไนเซชัน (lactonization) เกิดเป็นวง กลายเป็นกรดไฮดรอกซีซิทริกแลคโตนได้โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อสารละลายได้รับความร้อน คือเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 65, 25 และ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกจะลดลงมากกว่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสลายตัวของกรดไฮดรอกซีซิทริกในสารละลายตัวอย่างดังแสดงในรูปที่ 4.14 b) พบว่าผลของการสลายตัวของกรดไฮดรอกซีซิทริก นั้นเป็นเช่นเดียวกับการศึกษาในสารละลายมาตรฐานดังที่กล่าวมาแล้ว แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิมีผลต่อการสลายตัวของกรดไฮดรอกซีซิทริกเป็นกรดไฮดรอกซีซิทริกแลคโตน โดยจะเกิดปฏิกิริยาได้ดีเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น



รูปที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงของกรดไฮดรอกซีซิทริก และกรดไฮดรอกซีซิทริกแลคโตนที่อุณหภูมิต่างๆ ใน a) สารละลายมาตรฐานและใน b) สารละลายตัวอย่าง

4.5.2 การศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ

จากการศึกษาในหัวข้อ 4.7 พบว่าอุณหภูมินั้นส่งผลต่อการเปลี่ยนรูปของกรดไฮดรอกซีซิทริกไปเป็นกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน แต่ในขั้นตอนการสกัดกรดอินทรีย์นั้นใช้อุณหภูมิในการสกัดที่สูง [Jena *et al.*: 2002] ในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบการสกัดโดยใช้อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) กับการสกัดที่อุณหภูมิสูงโดยใช้ autoclave (120 องศาเซลเซียส) วิธีการสกัดดังหัวข้อที่ 3.12

จากตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณกรดอินทรีย์ที่สกัดได้โดยใช้อุณหภูมิลดและอุณหภูมิสูง ซึ่งผลการเพิ่มของอุณหภูมิจึงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสาร โดยมีผลทำให้ปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกเพิ่มขึ้นและมีผลทำให้ปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนลดลง แต่การเพิ่มอุณหภูมิลดกลับไม่มีผลต่อปริมาณรวมของกรดไฮดรอกซีซิทริก กรดซิทริกและกรดออกซาลิกเลย เมื่อนำปริมาณกรดออกซาลิก กรดซิทริก ปริมาณรวมของกรดไฮดรอกซีซิทริกที่ตรวจวัดได้มา เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี Paired sample t-test (2-tail) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิไม่มีผลต่อปริมาณกรดที่ตรวจวัดได้อย่างมีนัยสำคัญ และนำปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริก และกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนมาเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี Paired sample t-test (1-tail) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าการเพิ่มของอุณหภูมิทำให้ปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกเพิ่มขึ้นและมีผลทำให้ปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบปริมาณกรดอินทรีย์ (ppm) จากการสกัด 2 วิธี

ตัวอย่าง	อุณหภูมิ	ปริมาณกรดอินทรีย์ (ppm)						
		OA ^a	MA	CA ^a	TA	HCA ^b	HCAL ^b	Total HCA ^a
M1	อุณหภูมิห้อง	nd	nd	104.7 ± 2.1	nd	31.7 ± 0.7	70.7 ± 0.5	100.6 ± 1.8
	120 °C	nd	nd	104.5 ± 1.0	nd	28.5 ± 0.5	72.1 ± 1.4	102.5 ± 0.2
M2	อุณหภูมิห้อง	14.6 ± 0.1	nd	97.1 ± 0.2	nd	68.1 ± 0.1	127.9 ± 2.8	196.0 ± 2.7
	120 °C	15.0 ± 0.02	nd	96.7 ± 5.5	nd	65.7 ± 2.0	131.5 ± 4.0	197.2 ± 2.3
M3	อุณหภูมิห้อง	nd	nd	51.4 ± 1.8	nd	50.7 ± 1.4	148.2 ± 1.0	198.9 ± 0.5
	120 °C	nd	nd	52.9 ± 0.7	nd	43.5 ± 0.5	154.6 ± 3.7	198.1 ± 4.2
M4	อุณหภูมิห้อง	nd	nd	89.9 ± 3.3	nd	61.6 ± 2.0	242.4 ± 3.7	304.1 ± 5.4
	120 °C	nd	nd	92.8 ± 0.5	nd	49.1 ± 1.2	255.7 ± 2.3	304.7 ± 1.3
ผลของการเพิ่มอุณหภูมิ ต่อปริมาณกรดอินทรีย์		ไม่มีผล	-	ไม่มีผล	-	มีผลทำให้ ปริมาณ HCA เพิ่มขึ้น	มีผลทำให้ ปริมาณ HCAL ลดลง	ไม่มีผล

หมายเหตุ: nd หมายถึง ตรวจไม่พบ (<LOD)

^a เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี Paired sample t-test (2-tail) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^b เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี Paired sample t-test (1-tail) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.6 การประยุกต์กับตัวอย่างจริง

4.6.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร

จากการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดซึ่งโดยทั่วไปนั้นผลิตภัณฑ์สมุนไพรของกรดไฮดรอกซีซิทริกนั้นจะอยู่ในรูปของสั้มแขกผสมกับพืชหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสมุนไพรโดยนำพืชมาบดละเอียดแล้วบรรจุแคปซูล และระบุเป็นน้ำหนักของพืช โดยไม่มีการสกัดสารสำคัญออกมา ซึ่งสั้มแขกมักจะผสมในผลิตภัณฑ์ที่มีสรรพคุณเป็นยาระบายและเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในการลดน้ำหนัก

การหาปริมาณสารในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร สามารถทำได้โดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์มาชั่งและเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่เหมาะสมดังหัวข้อที่ 4.8 และเจือจางตามความเหมาะสมแล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย CE เพื่อหาปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดอินทรีย์อื่นๆ โดยใช้เทคนิค CE ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งแสดงอิเล็กโทรฟีโรแกรมดังรูปที่ 4.15

จากรูปที่ 4.15 พบว่าในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั้ง 5 ชนิด นั้น สามารถตรวจวัดพบกรดอินทรีย์ 4 ชนิดคือกรดออกซาลิก กรดซิตริก กรดไฮดรอกซีซิทริก และ กรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน โดยพบกรดออกซาลิกในปริมาณที่น้อย แต่ในตัวอย่าง M5 นั้นตรวจวัดไม่พบกรดไฮดรอกซีซิทริก และ กรดไฮดรอกซีซิทริก และในทุกตัวอย่างของตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรตรวจวัดไม่พบกรดมาลิกและกรดทาร์ทาลิกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ อาจเนื่องจากมีน้อยมากจนมีระดับต่ำกว่าค่า LOD จึงไม่สามารถตรวจวัดได้ หรือไม่มีในตัวอย่าง

จากอิเล็กโทรฟีโรแกรมสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของกรด (C ในหน่วย ppm) ได้โดยนำค่า $A_{\text{corr, สารตัวอย่าง}} / A_{\text{corr, ICA}}$ แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารแต่ละชนิดในรูปที่ 4.12 แล้วคำนวณเป็นปริมาณสารในหน่วยกรัมต่อน้ำหนักส่วนตัวอย่าง 100 กรัม (P , %w/w) โดยใช้สมการ 4.1 ซึ่งแสดงปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ดังตารางที่ 4.6

$$P = \frac{fCV}{10W} \quad (4.1)$$

W คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่ชั่งได้ (หน่วยเป็น g)

V คือ ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลายตัวอย่าง (หน่วยเป็น L)

f คือ จำนวนเท่าที่เจือจางสารละลายตัวอย่างจากเริ่มต้น (dilution factor)

C คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่เทียบจากกราฟมาตรฐาน (หน่วยเป็น ppm)

เนื่องจากกรดไฮดรอกซีซิทริกสามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนได้ ดังนั้นปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริก และกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนจึงไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่สกัดและการเก็บรักษา ดังนั้นจึงคำนวณปริมาณกรดทั้งสองชนิดออกมาเป็นปริมาณรวมของกรดไฮดรอกซีซิทริก โดยใช้สมการที่ 4.2

$$\text{total HCA} = W_{\text{HCA}} + (W_{\text{HCAL}} \times \frac{MW_{\text{HCA}}}{MW_{\text{HCAL}}}) \quad (4.2)$$

W_{HCA} คือ น้ำหนักของกรดไฮดรอกซีซิทริก (g)

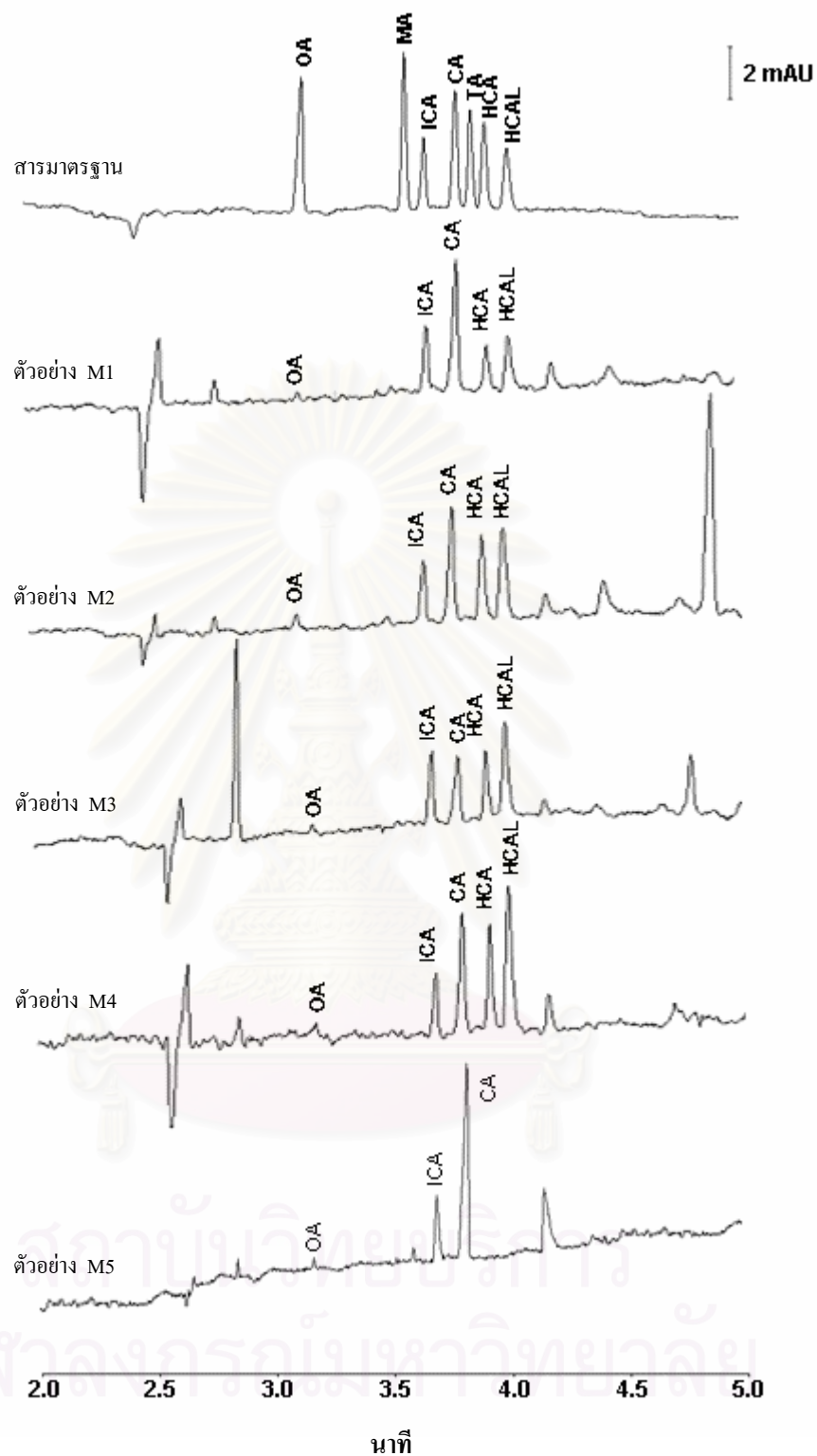
W_{HCAL} คือ น้ำหนักของกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน (g)

MW_{HCA} คือ น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮดรอกซีซิทริก (g mol^{-1})

MW_{HCAL} คือ น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน (g mol^{-1})

จากตารางที่ 4.7 จะเห็นว่า เมื่อคำนวณปริมาณรวมของกรดไฮดรอกซีซิทริกแล้วนั้น ในตัวอย่าง M4 มีปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริกวมมากที่สุด และในตัวอย่าง M2 และ M3 มีปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริกวมใกล้เคียงกัน ส่วนในตัวอย่าง M1 นั้นมีปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริกวมน้อยที่สุด และจากปริมาตรสุทธิของตัวอย่างต่อแคปซูลที่ซึ่งได้จริงแสดงดังตารางที่ 4.6 สามารถนำมาคำนวณหาปริมาณของกรดอินทรีย์ที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ต่อแคปซูลได้ ดังตารางที่ 4.8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.15 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยใช้สารละลาย 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ และ 90 mM NaH_2PO_4 ที่ประกอบด้วย 0.5 mM TTAB ที่ pH 9.2 เป็น BGE: ภาวะอื่นๆของ CE: ดังรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.7 ปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร (% w/w)

ตัวอย่าง	ปริมาณกรดอินทรีย์ (% w/w)						
	OA	MA	CA	TA	HCA	HCAL	Total HCA
M1	nd	nd	2.10 ± 0.03	nd	0.57 ± 0.01	1.44 ± 0.03	2.13 ± 0.03
M2	0.03 ± 0.00	nd	1.93 ± 0.16	nd	1.36 ± 0.00	2.54 ± 0.06	4.11 ± 0.06
M3	nd	nd	0.85 ± 0.02	nd	1.01 ± 0.03	2.96 ± 0.02	4.22 ± 0.04
M4	nd	nd	2.07 ± 0.01	nd	1.23 ± 0.04	4.87 ± 0.07	6.50 ± 0.09
M5	0.02 ± 0.00	nd	3.46 ± 0.05	nd	nd	nd	nd

หมายเหตุ: nd หมายถึง ตรวจไม่พบ (< LOD)

แต่ละตัวอย่างนี้ซ้ำ 3 ครั้ง

ตารางที่ 4.8 ปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร (มิลลิกรัม/แคปซูล)

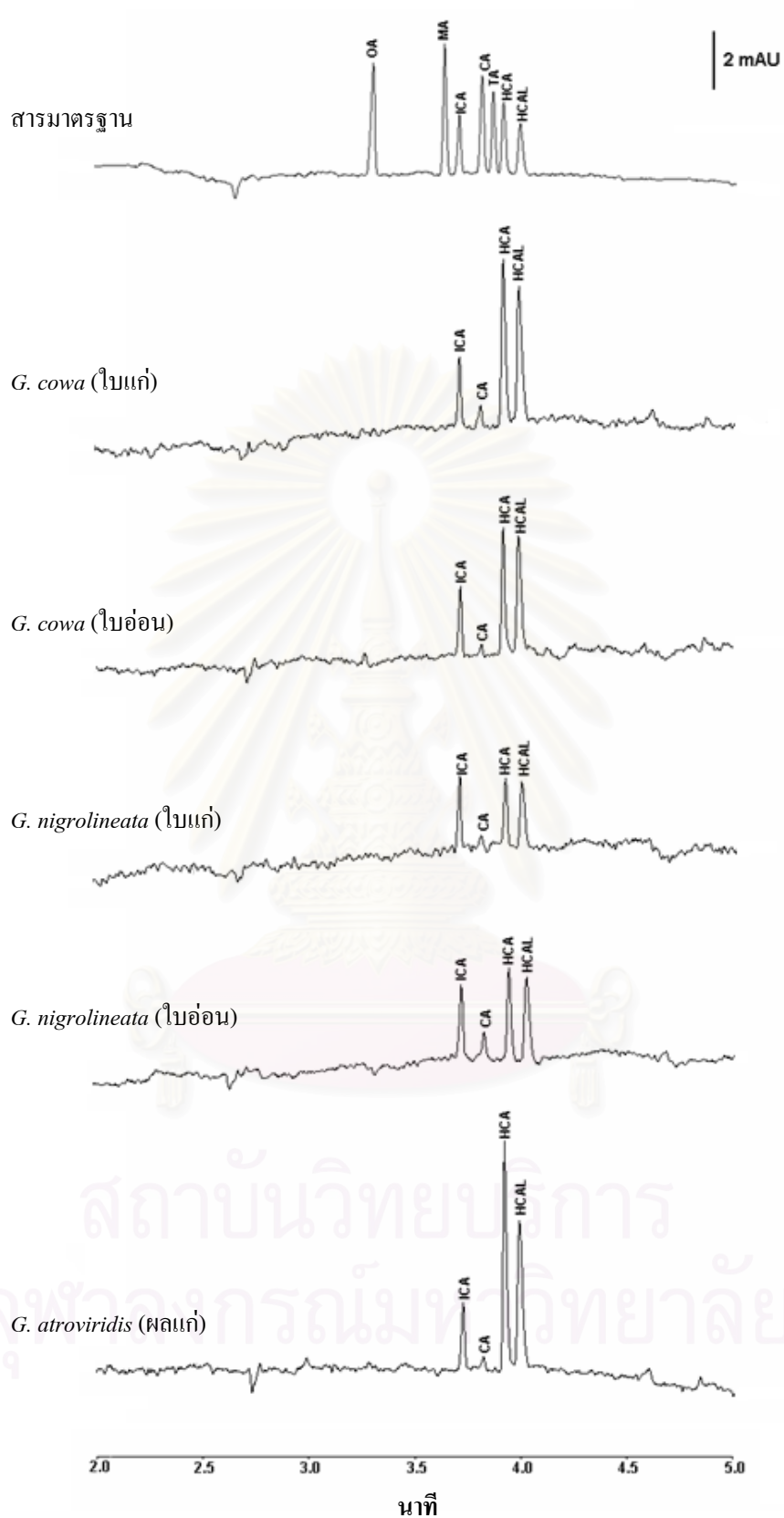
ตัวอย่าง	ปริมาณสุทธิ, มิลลิกรัม/แคปซูล		ปริมาณกรดอินทรีย์, มิลลิกรัม/แคปซูล ^a				
	ที่ระบุ	ที่วัดได้	OA	CA	HCA	HCAL	Total HCA
M1	-	488.1 ± 33.1	-	10.25 ± 0.71	2.78 ± 0.19	7.03 ± 0.50	10.40 ± 0.73
M2	350	299.6 ± 6.4	0.10 ± 0.00	5.78 ± 0.50	4.07 ± 0.09	7.61 ± 0.24	12.31 ± 0.23
M3	310	350.7 ± 2.8	-	2.98 ± 0.07	3.54 ± 0.11	10.38 ± 0.11	14.80 ± 0.18
M4	-	497.7 ± 11.1	-	10.30 ± 0.24	6.12 ± 0.24	24.24 ± 0.64	32.35 ± 0.85
M5	500	503.7 ± 7.6	0.12 ± 0.00	17.43 ± 0.36	-	-	-

หมายเหตุ: ^a ค่า SD รวมค่า SD ของปริมาณสุทธิต่อแคปซูล

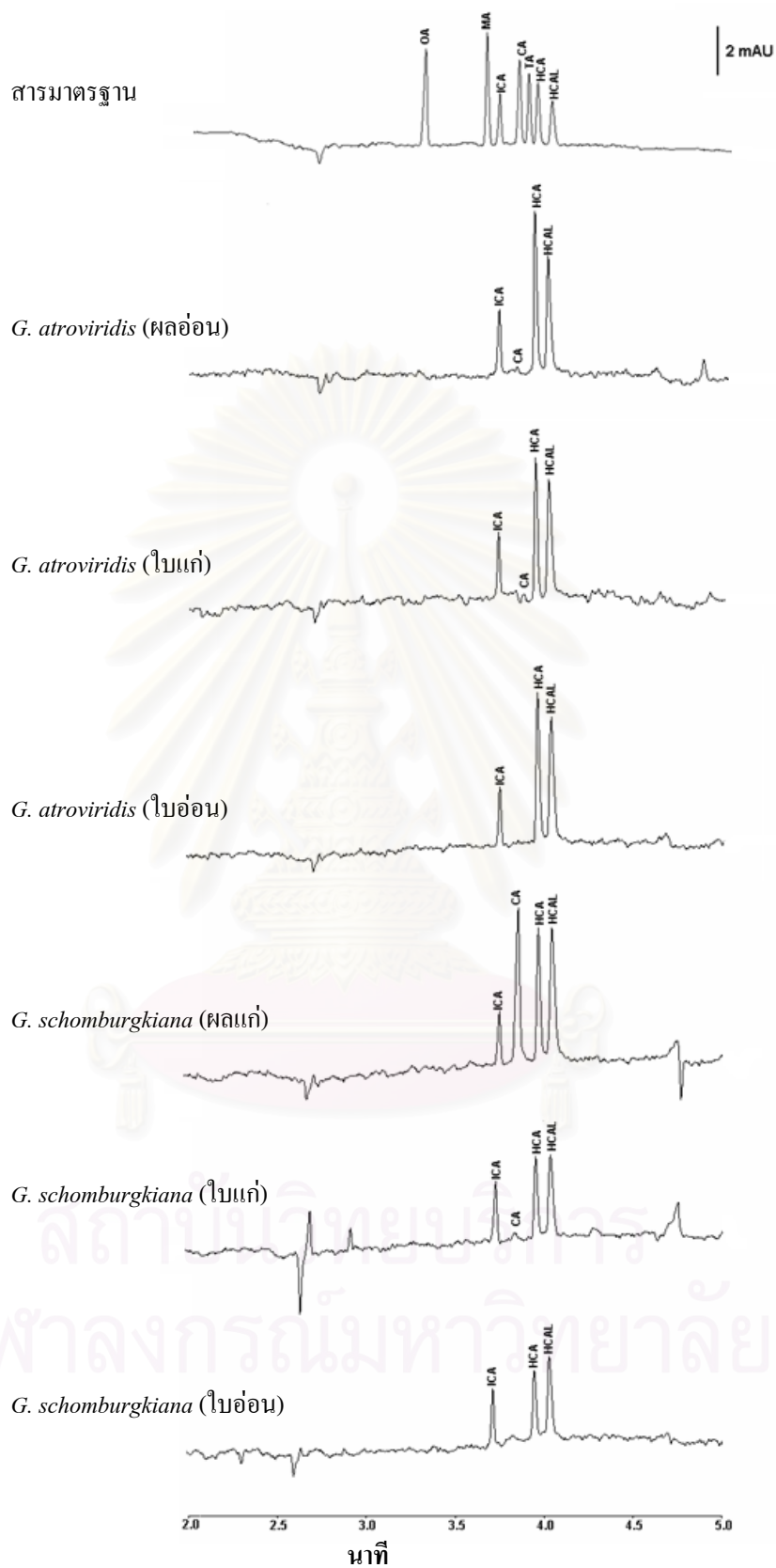
4.6.2 ตัวอย่างพืชสกุล *Garcinia*

ในพืชสกุล *Garcinia* เป็นแหล่งของกรดไฮดรอกซีซิทริกซึ่งมีการนำไปใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง โดยงานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาแหล่งของกรดไฮดรอกซีซิทริกใหม่ในพืชสกุล *Garcinia* ที่มีอยู่ในประเทศไทย คือ *Garcinia atroviridis* Griff. ex T. Anderson (ส้มแขก), *Garcinia schomburgkiana* Pierre (มะดัน), *Garcinia cowa* Roxb. ex DC. (ชะมวง) และ *Garcinia nigrolineata* Planch. ex T. Anderson (ชะมวงตราด) โดยศึกษาในส่วนต่างๆของต้นอีกทั้งยังศึกษาด้วยว่ามีกรดอินทรีย์ชนิดใดบ้างที่พบในพืชเหล่านี้ โดยใช้เทคนิค CE ที่ได้พัฒนาขึ้น

จากรูปที่ 4.16 และ รูปที่ 4.17 พบว่าในพืชสกุล *Garcinia* ทั้ง 4 สปีชี้นั้นตรวจพบกรดอินทรีย์ 4 ชนิด คือ กรดไฮดรอกซีซิทริก กรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน กรดซิทริก และกรดออกซาลิก ส่วนกรดมาลิกและทาร์ทาลิกนั้นไม่สามารถตรวจพบได้เนื่องจากมีอยู่ในปริมาณที่น้อยกว่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ซึ่งพบกรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน ในปริมาณที่สูง รองลงมาคือกรดซิทริก และพบกรดออกซาลิกในปริมาณที่น้อยและในบางส่วนของต้นตรวจไม่พบเลยหรือพบในปริมาณที่น้อยกว่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ คือ ผลส้มแขกแก่ ใบมะดันแก่และใบชะมวงแก่ โดยจะสังเกตได้ว่าปริมาณของกรดที่พบนั้นนอกจากจะแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์และแต่ละส่วนของต้น แล้วยังแตกต่างกันในส่วนของอายุของพืชในแต่ละส่วนอีกด้วย โดยสปีชีส์ที่พบกรดไฮดรอกซีซิทริกคือส้มแขกในส่วนของผลแก่ รองลงมาคือชะมวงในส่วนของใบแก่ แล้วยังสังเกตพบอีกว่าเมื่อพบกรดไฮดรอกซีซิทริกในปริมาณที่สูงก็จะพบว่ามีปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนสูงตามไปด้วยเนื่องจากกรดไฮดรอกซีซิทริกเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมสามารถเปลี่ยนรูปอยู่ในรูปของกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนได้ [Jean *et al.*: 2002] จากอิเล็กทรอนิกส์โปรแกรมที่ได้สามารถนำมาคำนวณหาปริมาณของกรดอินทรีย์ที่พบได้ดังแสดงใน ตารางที่ 4.9 และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี one-way ANOVA พบว่าปริมาณกรดอินทรีย์มีผลต่อส่วนต่างๆของลำต้นในแต่ละสายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยพบว่ากรดออกซาลิกพบมากที่สุดที่ชะมวงในส่วนของใบอ่อน กรดซิทริก พบมากที่สุดที่มะดันในส่วนของผล ส่วนปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกนั้นคำนวณได้จากผลรวมระหว่างกรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน ซึ่งพบว่ากรดไฮดรอกซีซิทริกพบมากที่สุดที่ส้มแขกในส่วนของผลแก่ รองลงมาคือชะมวงในส่วนของใบแก่ ซึ่งปริมาณที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.8



รูปที่ 4.16 อิเล็กโทรโฟโแกรมของพืชสกุล *Garcinia* โดยใช้สารละลาย 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ และ 90 mM NaH_2PO_4 ที่ประกอบด้วย 0.5 mM TTAB ที่ pH 9.2 เป็น BGE: ภาวะอื่นๆของ CE: ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.17 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของพืชสกุล *Garcinia* โดยใช้สารละลาย 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ และ 90 mM NaH_2PO_4 ที่ประกอบด้วย 0.5 mM TTAB ที่ pH 9.2 เป็น BGE: ภาวะอื่นๆของ CE: ดังรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.9 ปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างพืชสกุล *Garcinia* (% w/w) (5 ชุดตัวอย่าง แต่ละชุดตัวอย่างฉีดซ้ำ 2 ครั้ง)

ตัวอย่าง	แหล่ง	กรดอินทรีย์ (% w/w)						
		OA	MA	CA	TA	HCA	HCAL	Total HCA
<i>G.atroviridis</i>								
ผลอ่อน	จ. สงขลา	0.01 ± 0.14 ^d	nd	0.26 ± 0.10 ^a	nd	5.85 ± 0.60	11.20 ± 1.48	17.95 ± 2.01 ^c
ผลแก่		nd	nd	0.89 ± 0.19 ^{cd}	nd	8.32 ± 1.18	15.09 ± 2.46	24.61 ± 2.58 ^e
ใบอ่อน		0.04 ± 0.01 ^{bc}	nd	0.23 ± 0.09 ^a	nd	5.08 ± 0.73	12.23 ± 0.22	18.29 ± 0.87 ^c
ใบแก่		0.03 ± 0.01 ^{bc}	nd	0.25 ± 0.04 ^a	nd	5.13 ± 0.70	11.28 ± 0.64	17.30 ± 1.25 ^{dc}
<i>G.schomburgkiana</i>								
ผลแก่	จ. ระชนบุรี	0.07 ± 0.02 ^{cd}	nd	8.59 ± 0.83 ^c	nd	3.25 ± 1.38	11.71 ± 1.97	15.90 ± 3.35 ^d
ใบอ่อน		0.02 ± 0.01 ^{ab}	nd	0.61 ± 0.17 ^b	nd	1.97 ± 0.72	7.00 ± 0.63	9.53 ± 1.32 ^b
ใบแก่		nd	nd	0.34 ± 0.11 ^a	nd	2.91 ± 0.37	9.44 ± 0.51	13.10 ± 0.51 ^c
<i>G.cowa</i>								
ใบอ่อน	จ. สงขลา	0.09 ± 0.01 ^d	nd	0.79 ± 0.18 ^{bc}	nd	4.15 ± 0.31	11.19 ± 0.74	16.24 ± 0.89 ^d
ใบแก่		nd	nd	1.07 ± 0.08 ^d	nd	6.48 ± 0.23	13.52 ± 0.73	21.08 ± 0.94 ^f
<i>G.nigrolineata</i>								
ใบอ่อน	จ. ชลบุรี	0.03 ± 0.01 ^{ab}	nd	1.10 ± 0.17 ^d	nd	2.62 ± 0.30	7.40 ± 0.38	10.62 ± 0.41 ^b
ใบแก่		0.02 ± 0.00 ^{ab}	nd	0.69 ± 0.16 ^{bc}	nd	2.21 ± 0.14	4.84 ± 0.41	7.44 ± 0.44 ^a

หมายเหตุ: nd หมายถึงตรวจไม่พบ (< LOD)

สัญลักษณ์ a,b...ที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง ลำดับปริมาณกรดอินทรีย์มีผลต่อส่วนต่างๆของลำต้นในแต่ละสายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ปริมาณของกรดกรดไฮดรอกซีซิทริกรวมในตัวอย่างพืชสกุล *Garcinia* จากตารางที่ 4.8 จะเห็นว่าพบมากที่สุดในส่วนในส้มแขกในส่วนของผลแก่ 24.6 ± 2.6 %w/w รองลงมาคือชะมวงในส่วนของใบแก่ 21.1 ± 0.9 %w/w ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีรายงานการหาปริมาณกรดอินทรีย์ในตัวอย่างพืชสกุล *Garcinia* คือใน *G. cambogia* หรือส้มแขกอินเดีย ในส่วนของผลมีปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริก 16-18 %w/w [Jayaprakasha and Sakariah: 1998] *G. indica* ในส่วนของใบและผล 4.1-4.6 และ 10.3-12.7 %w/w ตามลำดับ [Jayaprakasha and Sakariah: 2002] และใน *G. cowa* ในส่วนของผล 12.7 %w/w [Jayaprakasha et al.: 2002] ซึ่งจากที่รายงานไว้นั้นจะรายงานผลเป็นปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกอย่างเดียวโดยที่ไม่คิดเป็นปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริกรวม คือผลรวมของปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริกและกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตน เนื่องจากกรดทั้งสองชนิดนี้ไม่เสถียร โดยกรดไฮดรอกซีซิทริกสามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดไฮดรอกซีซิทริกแลกโตนได้เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้นถ้ารายงานเป็นปริมาณกรดไฮดรอกซีซิทริกอย่างเดียวทำให้ค่าที่ได้ไม่น่าเชื่อถือ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการหาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคอะพอลาร์ริโอเล็กโทโพรซิซิส (capillary electrophoresis, CE) สำหรับแยกและวิเคราะห์ปริมาณกรดออกซาลิก กรดมาลิก กรดซิตริก กรดทาร์ทาลิก กรดไฮดรอกซีซิตริก และกรดไฮดรอกซีซิตริกแลกโตน โดยมีกรดไอโซซิตริกเป็น internal standard และภาวะของ CE ที่เลือกใช้ ดังต่อไปนี้คือ อะพอลาร์ริโอขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 μm ยาว 57 cm (50 cm ถึงเครื่องตรวจวัด) ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C บรรจุสารละลายตัวอย่างโดยใช้ความดันที่ 0.5 psi เป็นเวลา 10 วินาที ศักย์ไฟฟ้าสำหรับการแยก -20 kV ตรวจวัดโดยตรงด้วยเครื่องตรวจวัด UV ที่ความยาวคลื่น 200 nm BGE เป็นฟอสเฟต และ/หรือ บอเรตบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 0.5 mM tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) เพื่อทำหน้าที่กักลับทิศทางของ EOF

ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่และการแยกของสาร โดยศึกษาจาก ชนิด pH และความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ระบบบัฟเฟอร์ที่ศึกษาได้แก่ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ช่วง pH 6.0-8.0 และความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ผสมระหว่างฟอสเฟตและบอเรต

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เตรียมจากสารละลาย Na_2HPO_4 ที่ประกอบด้วย 0.5 mM TTAB ปรับ pH 6.0-8.0 ด้วยกรดฟอสฟอริก พบว่าสามารถแยกพิกของกรดออกซาลิกและกรดไฮดรอกซีซิตริกแลกโตนได้เท่านั้น

บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 เตรียมจากสารละลาย $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วย 0.5 mM TTAB พบว่าไม่สามารถแยกพิกใดได้เลยแต่ลำดับการเคลื่อนที่ของสารต่างจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์ผสมระหว่างฟอสเฟตและบอเรตเตรียมจากสารละลาย NaH_2PO_4 และ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วย 0.5 mM TTAB ปรับเป็น pH 9.2 ด้วย 0.1 NaOH จากการปรับเปลี่ยนความเข้มข้น พบว่าสารละลายผสมระหว่าง 90 mM NaH_2PO_4 และ 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ สามารถแยกสารออกจากกันได้ดีที่สุด

ดังนั้นระบบ BGE ที่เหมาะสมสำหรับกรดแยกกรดออกซาลิก กรดมาลิก กรดซิตริก กรดทาร์ทาลิก กรดไฮดรอกซีซิตริก กรดไฮดรอกซีซิตริกแลกโตน และกรดไอโซซิตริก ได้อย่างสมบูรณ์ คือ สารละลายผสมระหว่าง 90 mM NaH_2PO_4 และ 30 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ที่ประกอบด้วย 0.5 mM TTAB ปรับเป็น pH 9.2 ด้วย 0.1 NaOH จากการตรวจสอบวิธีการ (method validation) พบว่ามีความเที่ยงและความถูกต้องสูงทั้งเมทริกซ์ที่เป็นน้ำและสารละลายตัวอย่าง

จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาแลคโตไนเซชัน (lactonization) ทำให้กรดไฮดรอกซีซิทริกเปลี่ยนรูปไปเป็นกรดไฮดรอกซีซิทริกแลคโตน ดังนั้นในขั้นตอนการสกัดสารตัวอย่างจึงให้วิธีสกัดกรดอินทรีย์โดยไม่ใช้ความร้อนเข้ามาร่วมด้วย

จากการนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด นำไปวิเคราะห์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีส่วนผสมของสารสกัด *Garcinia* พบว่า สารที่สามารถตรวจพบคือ กรดออกซาลิก ซึ่งพบในปริมาณน้อย กรดซิตริก กรดไฮดรอกซีซิทริก และกรดไฮดรอกซีซิทริกแลคโตน ซึ่งพบในปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์ จากการเปรียบเทียบปริมาณของกรดไฮดรอกซีซิทริกรวม ในส่วนต่างๆของต้นในแต่ละสายพันธุ์ของพืชสกุล *Garcinia* พบว่าพบมากที่สุดในส่วนเปลือกในส่วนของผลแก่ รองลงมาคือชะมวงในส่วนของใบแก่ 24.6 ± 2.6 %w/w และ 21.1 ± 0.9 %w/w ตามลำดับ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เต็ม สมิตินันท์. 2523 ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ บางเขน..

ภาษาอังกฤษ

Badmaev, V., Majeed, M., Conte, A.A., Schaller, J.L., Firenzuoli, F., Gori, L., eymfield, S.B., Allison, D.B., vasselli, J.R., Pietrobelli, A., Greenfield, D. and Nunez, C. 1999. *Garcinia cambogia* for weight loss. JAMA. **282**: 233-235.

Buiarelli, F., Cartoni, G., Coccioli, F. and Jasionowska, R. 2003. Capillary zone electrophoresis of some organic acids in milk whey. J. Sep. Sci. **26**: 425-428.

Chanda, M. and Rempel, G. L. 1999. Separation of Hydroxycitric Acid Lactone from Fruit Pectins and Polyhydroxyphenols on Polybenzimidazole Weak-Base Resin. Ind. Eng. Chem. Res. **38**: 2474-2481.

Chang, R. 1991. Chemistry. New York: Mcgraw-Hill Inc.

Chankvetadze B. 1997. Capillary Electrophoresis in Chiral Separation. Chichester: John Wiley & Son

Colin, F. Poole. 2003. The Essence of Chromatography. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Science, B.V.

- Corinne Rivasseau; Anne-Marie Boisson; Gaëlle Mongélard; Georgy Couram; Olivier Bastien and Richard Bligny. 2006. Rapid analysis of organic acids in plant extracts by capillary electrophoresis with indirect UV detection Directed metabolic analyses during metal stress. J.Chromatogr. A. **1129**: 283-290.
- Dyson, N. 1990. Chromatographic Integration Method. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Elizângela Abreu Dutra; Maria Inês Rocha Miritello Santoro; Gustavo Amadeu Micke; Marina Franco Maggi Tavares and Erika Rosa Maria Kedor-Hackmanna. 2006. Determination of α -hydroxy acids in cosmetic products by capillary electrophoresis. J.Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **40**: 242-248.
- Foret, F. and Bocek, P. 1993. Capillary Zone Electrophoresis. Weinheim: Wiley_VCH.
- Grossman, P.D. and Cplburn, J.C. 1992. Capillary Electrophoresis. San Diego: Academic Press
- Heymsfield, S.B.; Allison D.B.; Vasselli, J.R.; Pietrobelli, A.; Greenfield, D. and Nunez, C. 1998. *Garcinia cambogia* (Hydroxycitric Acid) as a potential antiobesity agent a randomized controlled trial. JAMA. **280**: 1596-1600.
- Inés Matoa; JoséF. Huidobro; Jesús Simal-Lozano and M Teresa Sancho. 2006. Simultaneous determination of organic acids in beverages by capillary zone electrophoresis. Anal. Chim. Acta. **565**: 190-197.
- Izco, J.M.; Tormo, M.; Harris, A.; Tong, P.S. and Jimenez-Flores, R. 2003. Optimization and validation of a rapid method to determine citrate and inorganic phosphate in milk by capillary electrophoresis. J. Dairy Sci. **86**: 86-95.
- Izco, J.M.; Tormo, M. and Jimenez-Flores, R. 2002. Development of a CE method to analyze organic acids in dairy products: Application to study the metabolism of heat-shocked spores. J. Agric. Food Chem. **50**: 1765-1773.

- Jayaprakasha, G.K.; Jena, B.S. and Sakariah, K.K. 2002. Organic acid from leaves, fruits, and rinds of *Garcinia cowa*. J. Agric. Food Chem. **50**: 3531-3434.
- Jayaprakasha, G.K. and Sakariah, K.K. 1998. Determination of organic acids in *Garcinia combogia* (Desr.) by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A. **806**: 337-339.
- Jayaprakasha, G.K. and Sakariah, K.K. 2002. Determination of organic acids in leaves and rinds of *Garcinia indica* (Desr.) by LC. J. Agric. Food Chem. **28**: 379-384.
- Jena, B.S.; Jayaprakasha, G.K.; Singh, R.P. and Jayaprakasha, G.K. 2002. Chemistry and Biochemistry of (-)-Hydroxycitric acid from *Garcinia*. J. Agric. Food Chem. **50**: 10-22.
- Kenndler, E. 1998. High Performance Capillary Electrophoresis. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Kandl, T. and Kupina, S. 1999. An improved capillary electrophoresis procedure for the determination of organic acids in grape juice and wine. American J. Enology Viticultur. **50**: 155-161.
- Landers, J.P. 1997. Handbook of Capillary Electrophoresis. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.
- Lewis, Y.S. and Neelakantan, S. 1965. (-)-Hydroxycitric acid-the principal acid in the fruits of *Garcinia cambogia* Desr. Phytochemistry. **4**: 619-625.
- Li, S.F.Y. 1992. Capillary Electrophoresis. Amsterdam: Elsevier.
- Luc JC van Loon; Johannes JM van Rooijen; Bas Niesen; Hans Verhagen; Wim HM Saris and Anton JM Wagenmakers. 2000. Effects of acute (-)-hydroxycitrate supplementation on substrate metabolism at rest and during exercise in humans. Am J. Clin Nutr. **72**: 1445–1450.

- Min Wang; Feng Qu; Xiao-Quan Shan and Jin-Ming Lin. 2002. Development and optimization of a method for the analysis of low-molecular-mass organic acids in plants by capillary electrophoresis with indirect UV detection. J. Chromatogr. A. **989**: 285-292.
- Moreno, M.V.G.; Jurado, C.J. and Barroso, C.G. 2003. Determination of organic acids by capillary electrophoresis with simultaneous addition of Ca and Mg as complexing agents. J. Chromatogr. A. **57**: 185-189.
- Nhujak, T. 2001. Quantitative Aspects of Capillary Electrophoresis and Chiral Analysis. *PhD Thesis*. University of York.
- Saavadra, L.; Garcin, A. and Barbas, C. 2000. Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acid as adulteration markers in organic juice. J. Chromatogr. A. **881**: 395-401.
- Soni, M.G.; Burdock, G.A.; Preuss, H.G.; Stohs, S.J.; Ohia, S.E. and Bagchi, D. 2004 Safety assessment of (-)-hydroxycitric acid and Super CitriMax[®], a novel calcium/potassium salt. 2004. Food and Chemical Toxicology. **42**: 1513-1529.
- Tamil Selvi, A.; Joseph, G.S. and Jayaprakasha, G.K. 2003 Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. Food Microbiology. **20**: 455-460.
- Vatcharin Rukachaisirikula; Thunwadee Ritthiwigroma; Athipol Pinsaa; Prakart Sawangchoteb and Walter C. Taylor. 2003. Xanthones from the stem bark of *Garcinia nigrolineata*. Phytochemistry. **64**: 1149-1156.
- Weast, R.C. 1987. Handbook of Chemistry and Physics. 1st ed. Florida: CRC Press, Inc. Boca Raton.
- Weinberger, R. 2000. Practical Capillary Electrophoresis. San Diego: Academic Press.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวลักขมี หมื่นศรีธาราม เกิดวันที่ 2 มิถุนายน 2525 จังหวัดราชบุรี สำเร็จมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ. 2542 จากโรงเรียนเบญจมราชูทิศ ราชบุรี สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรี หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2546 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547 และสำเร็จการศึกษาในปี 2549



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย