โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในกระชายโดยวิธีอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี

Determination of flavonoids in fingerroot using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ชื่อนิสิต นายณัฐกิตติ์ ชื่นชูธรรม

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในกระชายโดยวิธีอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี

Determination of flavonoids in fingerroot using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

โดย

นายณัฐกิตติ์ ชื่นชูธรรม

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

โครงการ การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในกระชายโดยวิธีอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี

โดย นายณัฐกิตติ์ ชื่นชูธรรม

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนูญ หนูจักร)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ ..... เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในกระชายโดยวิธีอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดม แมสสเปกโทรเมตรี

ชื่อนิสิตโครงการ นายณัฐกิตติ์ ชื่นชูธรรม เลขประจำตัว 5633069823

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนูญ หนูจักร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

ได้หาภาวะที่เหมาะสมและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี (UHPLC-MS/MS) สำหรับปริมาณวิเคราะห์ของสารประกอบฟลาโวนอยด์หลัก 4 ชนิด ได้แก่ alpinetin, pinocembrin, cardamonin และ pinostrobin รวมถึงสารตั้งต้นหลักของฟลาโวนอยด์ 2 ชนิด ได้แก่ phenylalanine และ cinnamic acid จากกระชาย 2 ส่วน คือ ส่วนเหง้าและส่วนราก ได้ใช้ภาวะของการวิเคราะห์ด้วย UHPLC-MS/MS ดังต่อไปนี้ คือ เฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์ของกรดฟอร์มิกในน้ำ 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร และกรดฟอร์มิกในอะซิโตไนไตรล์ 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้คอลัมน์ Zorbax SB-C18 (ขนาด 2.1x50 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร) และปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีด 2 ไมโครลิตร ผลการทดลองได้ขีดจำกัดของการตรวจวัดอยู่ในช่วง 0.0047-0.042 มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณอยู่ในช่วง 0.014-0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำสารละลายของสารสกัดตัวอย่างกระชายมาเติมฟลาโวนอยด์ที่ทราบความเข้มข้น 0.05-25 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในสารละลายของสารสกัดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างกระชาย 1 กรัมด้วยตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ (ในอัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วพบว่าร้อยละ 52 ของข้อมูลร้อยละการกลับคืนของการสกัด และร้อยละ 85 ของข้อมูลส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วงของเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างกระชายส่วนเหง้าและส่วนราก จากแหล่งเพาะปลูก 4 จังหวัด พบว่าส่วนเหง้ามีปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่าส่วนราก 1.3-6.0 เท่า โดยที่ปริมาณ pinostrobin > pinocembrin > alpinetin > cardamonin ยกเว้นเพชรบูรณ์ที่ pinocembrin > alpinetin > pinostrobin > cardamonin นอกจากนี้ยังพบสารตั้งต้นของฟลาโวนอยด์ โดยที่ phenylalanine > cinnamic acid และปริมาณของฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากกว่าปริมาณสารตั้งต้นดังกล่าว 30-200 เท่า

คำสำคัญ: ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี, แมสสเปกโทรเมตรี, ฟลาโวนอยด์, กระชาย

Project Title Determination of flavonoids in fingerroot using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Student Name Nattakit Chuenchutham Student ID 5633069823

Advisor Name Associate Professor Thumnoon Nhujak, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2016

Abstract

Quantitative analysis was optimized and validated by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for determination of four major flavonoids, namely alpinetin, pinocembrin, cardamonin and pinostrobin, and two major flavonoid precursors, namely phenylalanine and cinnamic acid, in two parts of fingerroot: rhizome and rootlet. The following UHPLC-MS/MS conditions were performed: gradient elution mobile phase of 0.1% v/v formic acid in water:0.1% v/v formic acid in acetonitrile, flow rate of 0.2 mL/min and Zorbax SB-C18 column (2.1 x 50 mm, 1.8 µm) and injection volume of 2 µL. The results showed the limit of detection and limit of quantitation in the ranges of 0.0047-0.042 and 0.014-0.13 mg/L, respectively. Using blank fingerroot samples spiked with flavonoids and their precursors at known concentrations in the ranges of 0.05 – 25 ppm into 1.0 mL of the extract solution obtained from the extraction of 1 gram of fingerroot with 10 mL of 50:50 v/v methanol-water, 52% of the experimental recovery data and 85% of the relative standard deviation data were obtained to be within the acceptable values. For sample analysis of rhizome and rootlet of fingerroot from four cultivated areas, rhizome was found to contain 1.3-6.0 folds higher amounts of flavonoids than rootlet. The amounts of major flavonoids in fingerroot were found in the order pinostrobin > pinocembrin > alpinetin > cardamonin, except for pinocembrin > alpinetin > pinostrobin > cardamonin for the sample from Phetchabun province. In addition, the amounts of flavonoid precursors were found, phenylalanine > cinnamic acid with the total amounts of the flavonoids approximately 30-200 folds the total amounts of their precursors.

Keywords: high performance liquid chromatography, mass spectrometry, flavonoid, fingerroot

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนูญ หนูจักร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ในงานวิจัย อีกทั้งยังให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ตรวจทานและแก้ไขข้อบกพร่อง จนรายงานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง ประธานคณะกรรมการสอบโครงการ และอาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด กรรมการสอบโครงการ ที่สละเวลาและให้ความกรุณาในการตรวจแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนผู้วิจัยให้สามารถนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่ ๆ นิสิตระดับบัณฑิตศึกษาในกลุ่มวิจัยที่ให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน และขอขอบคุณภาควิชาเคมี ที่สนับสนุนในด้านเครื่องมือและอนุมัติเงินทุนสนับสนุนสำหรับงานวิจัยนี้ และสุดท้ายขอขอบคุณครอบครัวและเพื่อน ๆ ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัยนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ค
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ซ
สารบัญตาราง	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
1.2 ทฤษฎี	2
1.2.1 สารประกอบฟลาโวนอยด์	2
1.2.2 อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี (UHPLC-MS/MS)	4
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
1.4 วัตถุประสงค์	12
1.5 ขอบเขตงานวิจัย	12
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	12
บทที่ 2 การทดลอง	13
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	13
2.2 สารเคมี	14
2.3 การเตรียมสารละลาย	14
2.4 การวิเคราะห์ด้วย UHPLC-MS/MS	17
2.5 การหาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)	17
2.6 การเตรียมตัวอย่าง	18
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	20
3.1 การหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการแยกสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วย UHPLC-MS/MS	20

3.2 สภาวะที่ใช้ในการแยกสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วย UHPLC-MS/MS 21
3.3 การหาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) 23
3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่าง 26
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 32
เอกสารอ้างอิง 33
ภาคผนวก ก 36
ภาคผนวก ข 49
ประวัติผู้วิจัย 60

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 ส่วนประกอบของเครื่อง UHPLC-MS/MS 4
รูปที่ 1.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ isocratic elution 5
รูปที่ 1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ gradient elution 6
รูปที่ 1.4 six-port injection valve 6
รูปที่ 1.5 แผนภาพของ triple quadrupoles 9
รูปที่ 1.6 channel electron multiplier detector 9
รูปที่ 1.7 แสดงการแยกตัวประกอบของข้อมูลปกติ (X) ด้วยเทคนิค PCA เป็นสกอร์ (T) และโหลดดิ้ง (P) 10
รูปที่ 1.8 ข้อมูลปกติ (ซ้าย) ข้อมูลตัวอย่างจากเทคนิค PCA (ขวา) 10
รูปที่ 3.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน 6 ชนิด และ internal standard (IS) 22
รูปที่ 3.2 ลำดับการแยกของสารมาตรฐานผสม 6 ชนิด และ IS ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร 22
รูปที่ 3.3 แผนภูมิเปรียบเทียบปริมาณสารระหว่างส่วนเหง้าและรากจากจังหวัดต่าง ๆ 28
รูปที่ 3.4 กราฟแสดงผล PCA ของการจัดกลุ่มกระชายส่วนเหง้าจากทั้ง 4 แหล่งเพาะปลูก 29
รูปที่ 3.5 กราฟแสดงผล PCA ของสารระเหยยากที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของตัวอย่างกระชายส่วนเหง้าจากแต่ละแหล่งเพาะปลูก 29
รูปที่ 3.6 กราฟแสดงผล PCA ของการจัดกลุ่มกระชายส่วนเหง้าและสารระเหยยากที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของตัวอย่างกระชายส่วนเหง้าจากแต่ละแหล่งเพาะปลูก 30
รูปที่ 3.7 กราฟแสดงผล PCA ของการจัดกลุ่มกระชายส่วนรากจากทั้ง 4 แหล่งเพาะปลูก 30
รูปที่ 3.8 กราฟแสดงผล PCA ของสารระเหยยากที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของตัวอย่างกระชายส่วนราก 31
รูปที่ 3.9 กราฟแสดงผล PCA ของการจัดกลุ่มกระชายส่วนรากและสารระเหยยากที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของตัวอย่างกระชายส่วนรากจากแต่ละแหล่งเพาะปลูก 31

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 โครงสร้าง สูตรโมเลกุล และมวลโมเลกุลของฟลาโวนอยด์และสารตั้งต้นของฟลาโวนอยด์ที่ใช้ในการศึกษา 3

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์ของสารละลายมาตรฐาน 6 ชนิดและ IS ที่เลือกจากตาราง ก.1 เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารประกอบฟลาโวนอยด์ 20

ตารางที่ 3.2 อัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ ณ เวลาต่าง ๆ 21

ตารางที่ 3.3 ค่า LOD, LOQ และ linearity ที่ได้จากโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน 23

ตารางที่ 3.4 พารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ 23

ตารางที่ 3.5 ค่า recovery ที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนเหง้าของกระชาย (n = 3) 24

ตารางที่ 3.6 ค่า recovery ที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนรากของกระชาย (n = 3) 25

ตารางที่ 3.7 สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน 6 ชนิด 26

ตารางที่ 3.8 ปริมาณสารตั้งต้นของฟลาโวนอยด์ 2 ชนิดและฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดในกระชายเหลือง 27

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

ประเทศไทยมีการใช้พืชสมุนไพรมากมายสำหรับประกอบอาหารหรือใช้เป็นยามาตั้งแต่โบราณ หนึ่งในนั้น คือ กระชาย อยู่วงศ์เดียวกับขิง คือ Zingiberaceae ในไทยมี 3 ชนิด ได้แก่ กระชายเหลือง กระชายแดง และกระชายดำ แต่ละชนิดจะมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์และสรรพคุณทางยาแตกต่างกัน โดยชนิดที่นิยมใช้กันมาก คือ กระชายเหลือง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. และส่วนที่ใช้คือเหง้าและราก แพทย์แผนโบราณของไทยนิยมนำมาใช้ทั้งในการรักษาโรคและการบำรุงร่างกาย จนได้ชื่อว่าเป็น “โสมไทย” ซึ่งถือเป็นยาอายุวัฒนะด้วย[1] นอกจากนั้นก็ใช้ประกอบอาหารและใช้เป็นเครื่องเทศ เพราะช่วยดับกลิ่นคาวของเนื้อสัตว์ได้เป็นอย่างดี โดยส่วนที่นิยมนำมาใช้ประกอบอาหารมากที่สุดคือ รากสะสมอาหาร หรือที่เรียกว่า นมกระชาย ให้รสและกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์[2] คือเผ็ดร้อนขม จากองค์ประกอบทางเคมีเฉพาะตัว

รสและกลิ่นอันเป็นเอกลักษณ์รวมถึงสรรพคุณทางยาของกระชายนั้น มาจากสารเคมีในกระชาย ซึ่งสารเคมีในพืชเรียกโดยทั่วไปว่า เมแทบอไลต์ (metabolite) แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ เมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) และเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite)[3] โดยในกระชายมีสารสำคัญ คือ สารประกอบฟลาโวนอยด์ จัดอยู่ในกลุ่มเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ และเป็นสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด ช่วยให้เม็ดเลือดไม่จับตัวเป็นก้อนอุดตัน ป้องกันการเกิดมะเร็ง เป็นสารต้านจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังเป็นสารต้านอาการแพ้ ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ โดยทั่วไปการวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์หรือพวกสารระเหยยากจะนิยมใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (liquid chromatography, LC) เนื่องจากเหมาะกับการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นของเหลวระเหยยากและสามารถแยกสารที่มีสมบัติทางเคมีต่างกัน เช่น ความมีขั้ว-ไม่มีขั้ว เป็นต้น นิยมใช้ร่วมกับเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี (mass spectrometry, MS) ทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ รวมทั้งทำให้ทราบมวลโมเลกุลและสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารได้

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและแยกสารต่าง ๆ ในตัวอย่างหลายชนิด ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี (high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) เช่น Nagy และคณะ[4] ศึกษาสารกลุ่ม phytosterols และ cholesterol metabolites ในพลาสมาหรือน้ำเลือดของคนโดยใช้เทคนิค HPLC-

MS ร่วมกับเคโมเมทริกซ์ในการแบ่งกลุ่มคนที่มีระดับคอเลสเตอรอลในเลือดต่างกันได้ 4 กลุ่ม, Kovács และคณะ[5] ศึกษาสารกลุ่มฟีนอลิกในไวน์ฮังการีโดยเทคนิค LC-SSI-MS สามารถระบุฟลาโวนอยด์ได้ถึง 26 ชนิด, Trakoontivakorn และคณะ[6] ศึกษาสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในกระชายแดงโดยเทคนิค HPLC-MS พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ 6 ชนิด ได้แก่ pinocembrin chalcone, cardamonin, pinocembrin, pinostrobin, 4-hydroxypanduratin A และ panduratin A เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เทคนิคอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี (ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS) เช่น Magiera และ Zareba[7] ศึกษากรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในเก๋ากี้หรือโกจิเบอร์รี่โดยเทคนิค UHPLC-UV และ UHPLC-MS/MS แยกสารได้กว่า 20 ชนิด, Speer และคณะ[8] ศึกษากรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในน้ำผึ้งโดยเทคนิค UPLC-Q/TOF-MS ระบุสารได้ถึง 37 ชนิด, Harikrishna และคณะ[9] ศึกษาพวกกรดอะมิโนและเมแทบอไลต์ทุติยภูมิในแคลลัสของกระชายเหลืองโดยเทคนิค UPLC-MS พบสารมากกว่า 50 ชนิด โดยพบฟลาโวนอยด์ที่สำคัญ 5 ชนิด ได้แก่ panduratin pinostrobin cardamonin alpinetin และ pinocembrin เป็นต้น

ดังนั้นการวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในกระชาย สามารถทำได้โดยสกัดสารจากกระชายและตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UHPLC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง ตรวจวัดสารได้ในปริมาณต่ำและวิเคราะห์ปริมาณสารที่ไม่สามารถแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ด้วยเทคนิค HPLC ได้ โดยศึกษาในกระชายเหลืองที่สามารถหาได้ง่ายในประเทศไทย ซึ่งจะใช้กระชายต่างส่วนกัน ได้แก่ ส่วนเหง้าและส่วนรากที่นิยมใช้ประกอบอาหารกันมากที่สุด และแหล่งเพาะปลูก 4 แหล่ง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม จังหวัดพิษณุโลก จังหวัดเพชรบูรณ์ และจังหวัดระนอง เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่แตกต่างกันในกระชายชนิดและต้นเดียวกันแต่ต่างส่วนกัน รวมไปถึงต่างแหล่งเพาะปลูกด้วย

1.2 ทฤษฎี

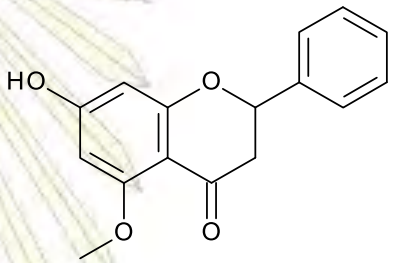
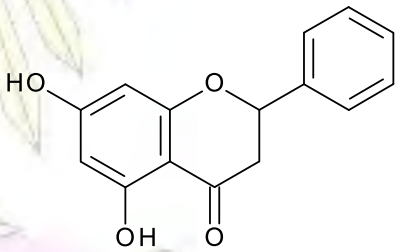
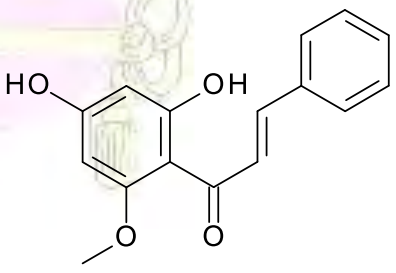
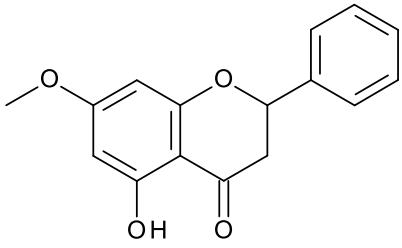
1.2.1 สารประกอบฟลาโวนอยด์

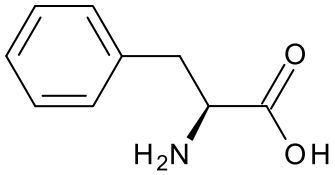
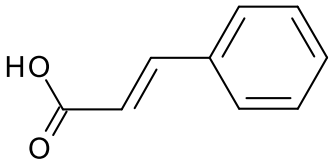
ฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบฟีนอลิก ประเภทพอลิฟีนอล มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติกที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลรวมอยู่ในโมเลกุลตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สามารถละลายในน้ำได้ ส่วนใหญ่มักพบอยู่รวมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ยังสามารถแบ่งเป็น 6 กลุ่มย่อย ได้แก่ anthocyanidins, flavan-3-ols, flavonols, flavanones, flavones และ isoflavones โดยสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่ในการหน่วงเหนี่ยว

หรือเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้ นอกจากนั้นยังมีฤทธิ์ในการลดอาการอักเสบ ต่อต้านการแข็งตัวของหลอดเลือด ต่อต้านมะเร็ง ปกป้องระบบประสาท

แหล่งของอาหารที่พบฟลาโวนอยด์มาก ได้แก่ พืช ผักและผลไม้ เช่น ถั่วเหลือง กระชายดำ สารสกัดจากเมล็ดองุ่น เครื่องดื่มต่าง ๆ เช่น ชา ไวน์ เป็นต้น และเนื่องจากกระชายเหลืองนั้น เป็นพืชที่มีฟลาโวนอยด์หลายชนิดและบางชนิดพบในปริมาณสูง งานวิจัยนี้จึงวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดในกระชายเหลือง ได้แก่ alpinetin, pinocembrin, cardamonin, pinostrobin รวมไปถึงสารตั้งต้นของ ฟลาโวนอยด์ 2 ชนิด ได้แก่ phenylalanine และ cinnamic acid มีโครงสร้าง ดังแสดงในตารางที่ 1.1

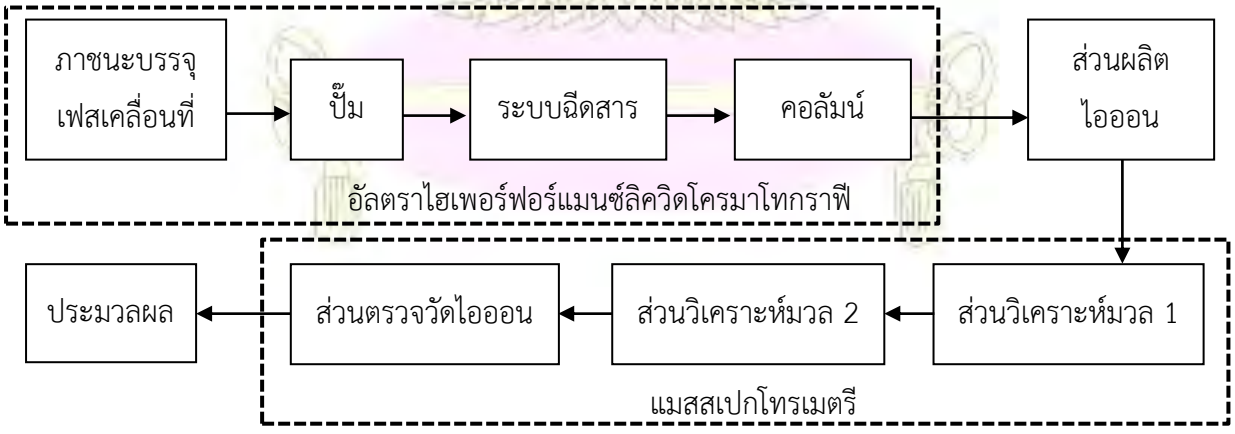
ตารางที่ 1.1 โครงสร้าง สูตรโมเลกุล และมวลโมเลกุลของฟลาโวนอยด์และสารตั้งต้นของฟลาโวนอยด์ที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อสาร	สูตรโมเลกุล	มวลโมเลกุล	โครงสร้าง
Alpinetin	$C_{16}H_{14}O_4$	270.1	
Pinocembrin	$C_{15}H_{12}O_4$	256.1	
Cardamonin	$C_{16}H_{14}O_4$	270.1	
Pinostrobin	$C_{16}H_{14}O_4$	270.1	

ชื่อสาร	สูตรโมเลกุล	มวลโมเลกุล	โครงสร้าง
Phenylalanine	$C_9H_{11}NO_2$	165.1	
cinnamic acid	$C_9H_8O_2$	148.1	

1.2.2 อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี (UHPLC-MS/MS)

UHPLC-MS/MS เป็นเทคนิคควบคู่กันระหว่างการแยกสารด้วย UHPLC โดยใช้หลักการแยกตามสมบัติทางเคมีของสารแต่ละชนิด เช่น ความมีขั้ว (polar) และไม่มีขั้ว (non-polar) เป็นต้น ซึ่งอาศัยสมดุลระหว่างเฟสคงที่ (stationary phase) ซึ่งมีสถานะเป็นของแข็งที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เป็นตัวทำละลายนำพาสารเข้าและออกจากคอลัมน์ และแมสสเปกโทรเมตรีเป็นเทคนิคที่ใช้หลักการทำให้สารเกิดการแตกตัวเป็นไอออนและวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) โดยรูปแบบการแตกตัวของสารเป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิด สามารถบอกโครงสร้างทางเคมีของสารได้ จึงเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ในการวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์สารที่ปริมาณต่ำถึงระดับส่วนในพันล้านส่วน (ppb) ได้อีกด้วย แผนภาพการทำงานของ UHPLC-MS/MS แสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 ส่วนประกอบของเครื่อง UHPLC-MS/MS

หลักการและทฤษฎีอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (UHPLC)

UHPLC เป็นเทคนิคาการแยกสารโดยอาศัยสมดุลของเฟส 2 เฟส คือ เฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยเฟสเคลื่อนที่จะเคลื่อนที่ไปชะสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าคอลัมน์ ซึ่งมีเฟสคงที่เป็นของแข็งบรรจุอยู่ หลักการและทฤษฎีเหมือนกับเทคนิค HPLC แต่ UHPLC เป็นการพัฒนาเทคนิค HPLC ในส่วนของอนุภาคสารที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์หรือก็คือเฟสคงที่ให้มีขนาดเล็กลง และคอลัมน์มีขนาดสั้นลง ทำให้ใช้สารในการวิเคราะห์น้อยลง เวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์จึงสั้นลง ทำให้ลักษณะฐานพีกแคบ เกิดการแยกที่ดีขึ้น จากการที่อนุภาคเฟสคงที่ในคอลัมน์มีขนาดเล็กลง ทำให้เครื่อง UHPLC ต้องการแรงดันเพื่อขับเคลื่อนเฟสเคลื่อนที่ที่สูงกว่าเครื่อง HPLC จึงต้องใช้เครื่องสูบฉีดของเหลวที่มีความแข็งแรงและทนต่อความดันสูง ซึ่ง UHPLC นี้สามารถทนแรงดันได้สูงสุดถึง 1,200 บาร์ จากเดิม 400 บาร์ ทำให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น เวลาในการวิเคราะห์จึงน้อยลง

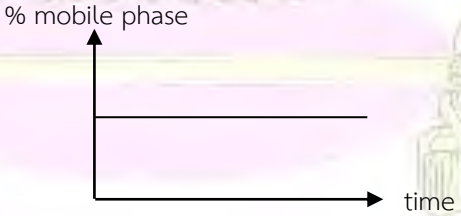
องค์ประกอบของเครื่องมือในอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

1. ปั๊ม (pump)

เนื่องจากอนุภาคของเฟสคงที่ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์มีขนาดเล็กมาก ทำให้เกิดความดันในคอลัมน์สูงและต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ จึงจำเป็นต้องใช้ pump ความดันสูง เพื่อผลักเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลผ่านคอลัมน์ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบแยกได้ 2 วิธี คือ

1.1 การผ่านเฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติก (isocratic elution)

เป็นการใช้เฟสเคลื่อนที่ชนิดเดียวหรือหลายชนิดที่มีอัตราส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่คงที่ตลอดการทดลอง ใช้ pump ชนิด isocratic pump

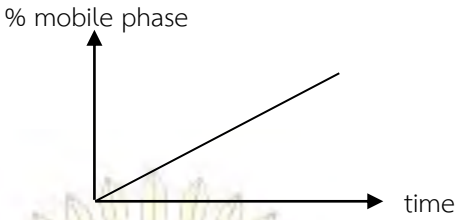


รูปที่ 1.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ isocratic elution

1.2 การผ่านเฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์ (gradient elution)

เป็นการใช้เฟสเคลื่อนที่มากกว่า 1 ชนิด ที่อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการวิเคราะห์ เป็นวิธีที่เหมาะในการแยกสารผสมที่มีสมบัติในการละลายแตกต่างกันมาก สามารถแยกได้ดีกว่าแบบ isocratic elution งานวิจัยนี้ใช้การผ่านเฟสเคลื่อนที่

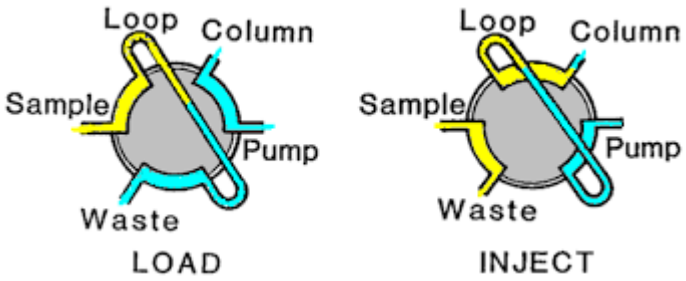
แบบเกรเดียนท์ ใช้ pump ชนิด binary pump โดยผสมเฟสเคลื่อนที่แบบความดันสูง (high pressure mixing) ซึ่งจะสูบฉีดเฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิด เข้ามาผสมกันภายใต้ความดันสูงก่อนผ่านเข้าคอลัมน์



รูปที่ 1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ gradient elution

2. ระบบฉีดสาร (injection system)

การฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์มีความสำคัญต่อการแยกสารมาก เนื่องจากสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าคอลัมน์ ควรอยู่ในลักษณะที่มีแถบแคบที่สุดเท่าที่จะทำได้ และไม่ไปรบกวนการไหลของเฟสเคลื่อนที่ โดยงานวิจัยนี้ใช้การฉีดสารระบบ autosampler สำหรับความดันสูงสุด 1,200 บาร์ ที่ฉีดสารด้วยความเร็วและมีความแม่นยำสูง โดยฉีดสารเข้าไปใน six-port injection valve ดังรูปที่ 1.4 ที่ควบคุมการหมุนด้วยมอเตอร์ความเร็วสูง เมื่อฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในท่อพักสารตัวอย่าง (sample loop) ซึ่งมีปริมาตรคงที่ จากนั้นมอเตอร์จะหมุนให้เฟสเคลื่อนที่ไล่ของเหลวทั้งหมดลงสู่คอลัมน์



รูปที่ 1.4 six-port injection valve[10]

3. คอลัมน์ (column)

คอลัมน์ที่ใช้สำหรับงานวิจัยนี้ เป็นคอลัมน์ที่ทำจากสแตนเลส มีความยาว 5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ 2.1 มิลลิเมตร เฟสคงที่ภายในคอลัมน์มีหลายประเภท เช่น normal phase, reversed phase, ion-exchange, size-exclusion เป็นต้น ในที่นี้ใช้ชนิด reversed phase ซึ่งเป็นที่นิยมสำหรับการวิเคราะห์ด้วย UHPLC เป็นเฟสคงที่ที่ไม่มีสภาพขั้ว คือ C-18 และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีสภาพขั้วสูง โดยใช้น้ำและอะซิโตไนไตรล์ ได้ลำดับการชะคือสารที่มีขั้วมากจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ก่อน เนื่องจากมีความสามารถในการละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้สูงกว่า

หลักการและทฤษฎีแมสสเปกโทรเมตรี (MS)

หลักการของเทคนิคนี้ คือการเปลี่ยนรูปโมเลกุลของสารตัวอย่างให้กลายเป็นไอออนและมีประจุบวก ซึ่งถ้าหากมีพลังงานมากพอ ไอออนที่เกิดขึ้นอาจแตกตัวกลายเป็นไอออนย่อย ๆ ได้ต่อไปอีก จากนั้นจึงทำการแยกและตรวจวัดไอออนต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นตามค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio, m/z) ของไอออนเหล่านั้น และบันทึกข้อมูลที่ได้จากการตรวจวัดนี้ในรูปของแมสสเปกตรัมของสารตัวอย่าง ซึ่งก็คือกราฟแสดงผลที่มีแกน x เป็นปริมาณสัมพัทธ์ของไอออนแต่ละชนิดที่เกิดขึ้น และมีแกน y เป็นค่ามวลต่อประจุของไอออนเหล่านั้น เทคนิคแมสสเปกโทรเมตรีเป็นเทคนิคที่มีการทำลายสารตัวอย่างไปในกระบวนการที่ทำให้เกิดเป็นไอออน แต่เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวในการตรวจวัดสูงมาก ทำให้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างใช้สารปริมาณต่ำมาก

องค์ประกอบของเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ที่ใช้เป็นเครื่องตรวจวัดเมื่อต่อกับอัลตราไฮเพอร์ ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

1. ระบบนำเข้าสารตัวอย่าง (inlet system)

สำหรับเทคนิค UHPLC-MS/MS นั้น เครื่อง UHPLC ที่ต่อกับแมสสเปกโทรมิเตอร์จะทำหน้าที่เป็น inlet system

2. ส่วนผลิตไอออน (ion source)

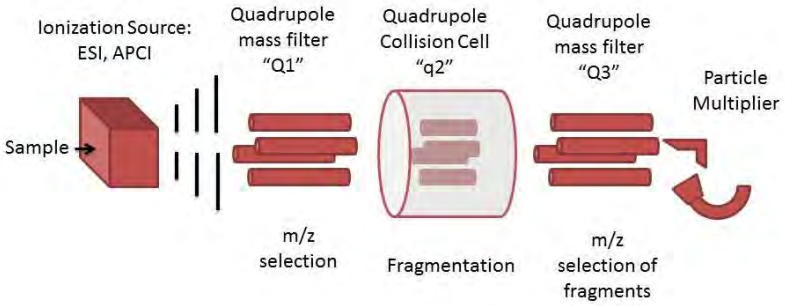
เป็นส่วนที่ให้พลังงานที่สูงเพียงพอกับสารตัวอย่าง เพื่อให้เกิดไอออไนเซชันกลายเป็นไอออนโมเลกุลหรือ parent ion โดยไอออนโมเลกุลที่เกิดขึ้นนี้ ถ้ามีพลังงานสะสมสูงกว่าพลังงานพันธะก็จะเกิดการแตกของพันธะภายในไอออนโมเลกุล กลายเป็นไอออนย่อย ๆ (fragment ion) หรือ daughter ion ที่มีขนาดเล็กลงกว่าเดิม ไอออนย่อยนี้หากยังมีพลังงานสูงอยู่ ก็สามารถแตกตัวเป็นไอออนย่อยลงไปได้อีก หลังจากนั้นไอออนที่เกิดขึ้นจากส่วนผลิตจะถูกส่งผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (Mass analyzer) ส่วนผลิตไอออนในปัจจุบันมีหลายวิธี ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธี electrospray ionization

electrospray ionization (ESI) เป็นเทคนิคผลิตไอออนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งเหมาะสำหรับวิเคราะห์สารตัวอย่างที่อยู่ในรูปของไอออนในสารละลาย โดยเมื่อสารละลายออกจากระบบของ UHPLC จะเข้าสู่หลอดแคพิลลารี ซึ่งจะมีการให้ค่าศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงประมาณ 3000 โวลต์ ทำให้ ณ บริเวณนี้เกิดเป็นสนามไฟฟ้าที่มีความแรงมาก เมื่อสารละลายผ่านออกจากปลายหลอดแคพิลลารี จึงมีลักษณะเป็นหยดของเหลวที่มีประจุอยู่ที่ผิว และเมื่อเกิดการระเหยของหยดของเหลวจะทำให้

หยดของเหลวมีขนาดเล็กลงเรื่อย ๆ ประจุจะเข้าใกล้กันมากขึ้นจนเกิดการแตกกระจายเป็นไอออน สำหรับเทคนิค ESI สามารถเลือกที่จะวิเคราะห์ไอออนบวกหรือไอออนลบก็ได้ ถ้าเลือกวิเคราะห์ไอออนบวก (positive mode) ไอออนบวกเท่านั้นที่จะผ่านเข้าไปยังส่วนตรวจวัด ในทางกลับกันถ้าวิเคราะห์ไอออนลบ (negative mode) ไอออนลบเท่านั้นที่จะผ่านเข้าไปยังส่วนตรวจวัด

3. ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer)

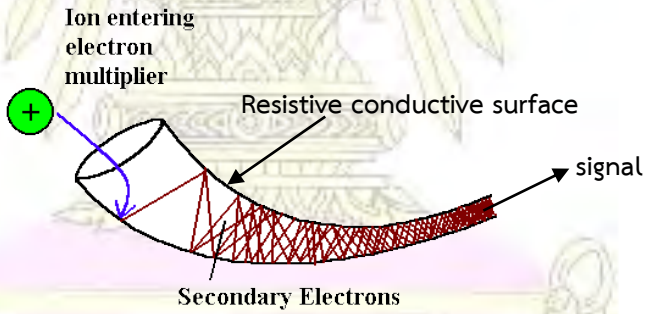
หน้าที่ของส่วนวิเคราะห์มวล คือ การวิเคราะห์ค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของอนุภาคที่ส่งมาจากส่วนผลิตไอออน โดยทำการแยกไอออนตามค่า m/z ของไอออนนั้น ส่วนวิเคราะห์มวลมีหลายประเภท เช่น quadrupole, time of flight (TOF), ion trap, ion cyclotron resonance (ICR) เป็นต้น ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะ quadrupole ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นเครื่องวิเคราะห์มวลที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะมีขนาดกะทัดรัด ราคาไม่สูง การใช้งานค่อนข้างง่าย มีความทนทานและความเร็วในการวิเคราะห์สูง quadrupole ประกอบไปด้วยโลหะกลม 4 แท่งที่เชื่อมต่อกันทางไฟฟ้า วางตัวขนานกัน ดังรูปที่ 1.5 เริ่มจากการโฟกัสไอออนด้วย ion optic ให้เคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในบริเวณช่องตรงกลางระหว่างแท่งโลหะทั้ง 4 การแยกไอออนทำโดยการปรับค่าสนามไฟฟ้าภายในบริเวณช่องตรงกลางของแท่งโลหะเหล่านี้ ทำให้ไอออนที่มี m/z เฉพาะค่าหนึ่ง ๆ เท่านั้นที่สามารถเคลื่อนที่ผ่านออกไปยังส่วนตรวจวัดได้ ในงานวิจัยนี้ใช้ส่วนวิเคราะห์มวลแบบ triple quadrupole (QQQ) ซึ่งประกอบด้วย quadrupole ทั้งหมด 3 หน่วย โดย quadrupole หน่วยแรก (Q1) ทำหน้าที่เป็นแมสสเปกโทรมิเตอร์ตัวที่ 1 (MS1) เพื่อคัดเลือกไอออนตั้งต้น (precursor ion) ที่ต้องการศึกษาส่งต่อไปยัง quadrupole หน่วยที่สอง (Q2) ซึ่งทำหน้าที่เป็น collision cell เหนี่ยวนำให้เกิดการแตกตัวของไอออนโดยไม่มีการแยกมวลของไอออน เรียกขั้นตอนนี้ว่า collision induced dissociation (CID) และไอออนย่อยที่เกิดจากการแตกตัวจาก Q2 จะถูกส่งต่อไปยัง quadrupole หน่วยที่สาม (Q3) ซึ่งทำหน้าที่เป็นแมสสเปกโทรมิเตอร์ตัวที่ 2 (MS2) เพื่อวิเคราะห์ไอออนย่อยที่เกิดขึ้นเหล่านี้ นอกจากนี้การวิเคราะห์สารด้วยระบบ triple quadrupole สามารถทำได้หลายรูปแบบขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงาน ในงานวิจัยนี้เลือกวิเคราะห์แบบ dynamic multiple reaction monitoring (DMRM) เป็นการวิเคราะห์สารแบบจำเพาะเจาะจงโดย Q1 จะเลือกให้ผ่านเฉพาะ precursor ion ที่สนใจ จากนั้น collision cell จะทำให้ precursor ion แตกตัวเป็น product ion เพื่อส่งเข้าสู่ Q3 โดยมวลของ product ion ที่เราเลือกไว้เท่านั้นที่จะผ่าน Q3 ไปได้ ส่วน product ion ที่เหลือที่ไม่ได้เลือกจะถูกกรองออกโดย Q3



รูปที่ 1.5 แผนภาพของ triple quadrupoles[11]

4. ส่วนตรวจวัด (detector)

continuous dynode electron multiplier detector เรียกกันทั่วไปว่า channel electron multiplier (CEM) หรือ channeltron มีลักษณะเป็นหลอดแก้วรูปกรวย ดังรูปที่ 1.6 เมื่อไอออนผ่านส่วนวิเคราะห์มวลมาแล้วตกกระทบที่ผิวภายในของ detector และจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาจำนวนหนึ่ง อิเล็กตรอนเหล่านี้จะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้าภายใน detector ให้วิ่งไปชนผนังบริเวณที่มีศักย์ไฟฟ้าสูงขึ้นที่อยู่ถัดไป ทำให้เกิดการปลดปล่อยอิเล็กตรอนมากขึ้น เกิดการเพิ่มจำนวนของอิเล็กตรอนจากการเคลื่อนที่สะท้อนผนังไปมา มีการขยายสัญญาณอย่างต่อเนื่องไปจนถึงขั้วแอโนดที่อยู่ทางตอนปลาย จุดนี้สัญญาณอิเล็กตรอนหรือสัญญาณไฟฟ้าจะถูกตรวจวัดและแปรให้อยู่ในรูปของแมสสเปกตรัม



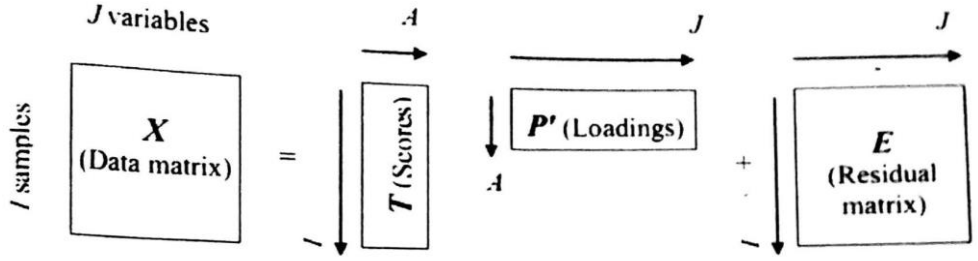
รูปที่ 1.6 channel electron multiplier detector[12]

1.2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis, PCA)[13]

เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมสูงสุด ในการแปลงและแสดงผลของการทดลองให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการสรุปและอภิปรายผล หลักการคือ การเปลี่ยนแปลงตัวแปรในการทดลองให้อยู่ในรูปของ ตัวแปรสมมติ (latent variable) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า principal component (PC) ซึ่งตัวแปรดังกล่าวเกิดจากสมการเชิงเส้นของตัวแปรที่ได้ในการทดลอง ถือเป็นเทคนิคหนึ่งในการลดจำนวนตัวแปรของการ

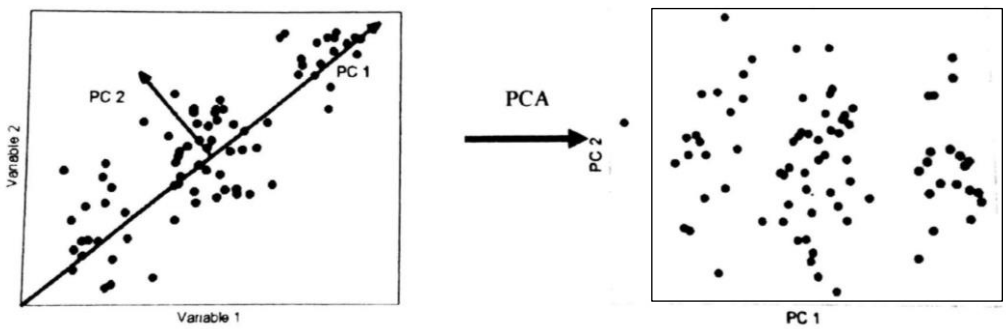
ทดลองเพื่อให้ง่ายต่อการวิเคราะห์มากขึ้น อีกทั้งตัวแปรสมมติ (PC) เหล่านี้จะมีความเป็นอิสระต่อกัน (orthogonal) คือไม่มีความสัมพันธ์กันนั่นเอง จะทำให้มีความสะดวกต่อการวิเคราะห์ข้อมูล เมื่อเทียบกับการวิเคราะห์โดยตรงจากตัวแปรอิสระปกติซึ่งมีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน (correlation) แม้ว่าตัวแปรสมมติจะช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูลในเชิงคุณภาพได้เป็นอย่างดีเพื่อบ่งบอกถึงความเหมือนและความแตกต่างกันของกลุ่มข้อมูล แต่ตัวแปรดังกล่าวจะไม่มีความหมายในทางกายภาพ

เทคนิค PCA นี้จะเริ่มจากการแยกตัวแปรของข้อมูลปกติ (X) โดยสมมติว่ามีจำนวนข้อมูลเป็น I ตัวอย่าง x J ตัวแปรอิสระ เมื่อผ่านเทคนิค PCA แล้วจะสามารถแยกข้อมูลปกติออกเป็นสองข้อมูลย่อยที่มีชื่อว่า สกอร์ (scores, T) และโหลดดิ้ง (loadings, P) ดังสมการ $X = T \cdot P + E$ โดยมีขนาดและมิติดังรูปที่ 1.7



รูปที่ 1.7 แสดงการแยกตัวประกอบของข้อมูลปกติ (X) ด้วยเทคนิค PCA เป็นสกอร์ (T) และโหลดดิ้ง (P)

เทคนิค PCA จะศึกษาถึงความแปรผันของข้อมูล (variation) ในแต่ละชุดเทียบกับจุดกำเนิด ซึ่งอาจเป็นค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งหมด โดยปกติ PC แรกนั้นจะให้ค่าความแปรผัน (eigenvalue) ที่สูงที่สุด และค่าความแปรผันจะลดลงตามลำดับของ PC โดยถ้าความแปรผันนั้นไม่ได้เทียบกับจุดกำเนิดจะทำให้ PC ที่ได้จากข้อมูลมีลำดับของความแปรผันผิดเพี้ยนและไม่ถูกต้อง เพราะฉะนั้นการปรับมาตราในแนวตั้งโดยฉพาะการทำ mean centring ของข้อมูลเริ่มต้นจึงมีความสำคัญอย่างมากก่อนที่จะนำเอาข้อมูลนั้นมาทำการคำนวณด้วยเทคนิค PCA ตัวอย่างแสดงภาพ PC ดังรูปที่ 1.8



รูปที่ 1.8 ข้อมูลปกติ (ซ้าย) ข้อมูลตัวอย่างจากเทคนิค PCA (ขวา)

สำหรับเทคนิค PCA มีวิธีการคำนวณหลายวิธี อย่างไรก็ตามการคำนวณเหล่านี้จะให้ผลลัพธ์ที่เป็นข้อมูลตัวอย่าง (score) และข้อมูลตัวแปร (loading) ที่เหมือนกัน และจะได้ PC แรกที่มีความสำคัญมากที่สุดที่แสดงถึงอิทธิพลขององค์ประกอบหลักในข้อมูลปกติ และ PC ต่อ ๆ ไปจะมีความสำคัญน้อยลง ซึ่งแสดงถึงองค์ประกอบหลักลำดับย่อยลงมา เพราะฉะนั้น PC หลัง ๆ จึงมีค่าความสำคัญ (%variance) ที่น้อย ซึ่งแสดงถึงข้อมูลอิสระ (noise) ที่มาจากเครื่องมือ หรือค่าเบี่ยงเบนจากสภาวะในการทดลอง แต่ไม่ได้มาจากองค์ประกอบหลัก ไม่ควรนำมาพิจารณา

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในกระชายมีสารสำคัญมากมายที่เป็นสารระเหยยาก หนึ่งในนั้นคือ สารประกอบฟลาโวนอยด์ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) และเป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด ช่วยให้เม็ดเลือดไม่จับตัวเป็นก้อนอุดตัน ป้องกันการเกิดมะเร็ง เป็นสารต้านจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังเป็นสารต้านอาการแพ้ ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ โดยมีนักวิจัยมากมายได้พยายามแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้จากกระชาย

Rukayadi และคณะ[14] ได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* ของสารสกัดจากกระชายเหลือง โดยสกัดส่วนเหง้าด้วยเมทานอล พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* และสามารถกำจัด *E. coli* ได้เมื่อใช้ความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของค่า MIC

Mahmood และคณะ[15] ศึกษาฤทธิ์ในการเร่งการรักษาบาดแผลในหนูของสารสกัดกระชายเหลือง พบว่าสารสกัดจากเหง้ากระชายช่วยเร่งการรักษาบาดแผลได้โดยไม่มีผลข้างเคียง ไม่มีความเป็นพิษ เพราะในสารสกัดกระชายมีองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์อยู่ซึ่งมีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ ทำให้เพิ่มอัตราการงอกขยายของเซลล์เยื่อบุผิว นอกจากนั้นก็ยังมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แผลจึงหายเร็วขึ้น

Khalid และคณะ[16] วิเคราะห์ฟลาโวนอยด์และชาลโคนในกระชายโดยการสกัดด้วยเมทานอลและใช้เทคนิค HPLC แยกสารได้ 8 ชนิด ได้แก่ alpinetin, pinocembrin, pinostrobin, 4-hydroxypanduratin A, panduratin A, pinocembrin chalcone, cardamonin และ pinostrobin chalcone ซึ่งจากข้อมูลที่ได้พบว่า pinostrobin มีปริมาณมากที่สุด ผู้วิจัยได้เสนอกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biosynthetic pathway) ไว้ว่า phenylalanine เปลี่ยนเป็น cinnamic acid ต่อด้วย cinnamoyl-coenzyme A จากนั้นเปลี่ยนเป็น pinocembrin chalcone ซึ่งเป็น precursor หรือสารตั้งต้นในการเกิด flavonoids จึงทำให้พบสารชนิดนี้ในปริมาณที่น้อยมาก จึงสรุปว่าที่ pinostrobin มีปริมาณมากที่สุดเนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์

Sukari และคณะ[17] ได้พิสูจน์เอกลักษณ์ของฟลาโวนอยด์จากกระชายเหลือง โดยสกัดด้วยเฮกเซนและคลอโรฟอร์ม ใช้ column chromatography ในการแยกสารและวิเคราะห์ด้วย IR, MS และ NMR สามารถแยกและระบุฟลาโวนอยด์ได้ 5 ชนิด ได้แก่ pinostrobin, pinocembrin, alpinetin, cardamonin และ boesenbergin A

Tewtrakul และคณะ[18] ศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ HIV-1 protease ของฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดที่สกัดและแยกได้จากเหง้าของกระชายเหลืองได้แก่ pinostrobin, pinocembrin, cardamonin และ alpinetin โดยสกัดด้วยเอทานอลและแยกด้วยเทคนิค column chromatography พบว่า cardamonin มีค่าการยับยั้งการทำงานของ HIV-1 protease อย่างน่าพอใจด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Khalid และคณะ[19] ศึกษาฟลาโวนอยด์ในเหง้าและเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของกระชายเหลือง โดยสกัดด้วยเมทานอลและใช้เทคนิค HPLC แยกฟลาโวนอยด์ 5 ชนิด ได้แก่ alpinetin, pinocembrin, cardamonin, pinostrobin และ panduratin A พบว่าในเหง้ากระชายมีปริมาณสารทั้ง 5 ชนิดมากกว่าในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง และมีปริมาณสารเรียงจากมากไปน้อยคือ pinostrobin, pinocembrin, alpinetin, panduratin A และ cardamonin

1.4 วัตถุประสงค์

วิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกระชายโดยวิธีอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี (UHPLC-MS/MS)

1.5 ขอบเขตงานวิจัย

1. หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ด้วย UHPLC-MS/MS
2. ตรวจความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)
3. หาปริมาณฟลาโวนอยด์ในกระชาย 2 ส่วน ได้แก่ เหง้าและราก จากแหล่งเพาะปลูก 4 จังหวัด

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. มีความรู้ความเข้าใจในองค์ประกอบและหลักการทำงานของ UHPLC-MS/MS
2. สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมและวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ในกระชายเหลืองได้
3. สามารถเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ในกระชายเหลือง ระหว่างส่วนเหง้าและรากในแต่ละจังหวัดได้

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 เครื่อง UHPLC-MS/MS (ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer)

- ปั๊ม Agilent 1290 binary pump
- ระบบฉีดสารตัวอย่าง Agilent 1290 infinity autosampler
- ส่วนวิเคราะห์มวล Agilent 6490 triple quadrupole

2.1.2 คอลัมน์ Zorbax SB-C18 (2.1x50 mm, 1.8 µm)

2.1.3 เครื่องชั่งเชิงวิเคราะห์ (model XS105, Mettler Toledo)

2.1.4 เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer genie 2, Scientific Industries)

2.1.5 เครื่องล้างความถี่สูง (ultrasonic cleaner)

2.1.6 เครื่องปั่นละเอียด

2.1.7 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Hettich UNIVERSAL 320 R)

2.1.8 หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร (LP Italia)

2.1.9 หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Hycon Plastics)

2.1.10 ไมโครปิเปต ขนาด 2 – 20, 20 – 200, 100 – 1000 ไมโครลิตร (Eppendorf)

2.1.11 ปิเปตทิป ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Hycon Plastics)

2.1.12 กระบอกฉีดยาปราศจากเข็มชนิดใช้ครั้งเดียว ขนาด 3 มิลลิลิตร (Nipro)

2.1.13 ตัวกรองสารสำหรับกระบอกฉีดยา ขนาด 0.22 ไมโครเมตร (nylon membrane)

2.1.14 ขวดฉีดสารตัวอย่างอัตโนมัติ ขนาด 2 มิลลิลิตร (vials and caps, Agilent Technologies)

2.1.15 ขวดกำหนดปริมาตร ขนาด 50, 100, 250 มิลลิลิตร

2.1.16 บีกเกอร์ ขนาด 10, 50, 100, 150, 250 มิลลิลิตร

2.1.17 กระบอกตวง ขนาด 25 และ 50 มิลลิลิตร

2.1.18 ขวดเก็บสาร ขนาด 20 และ 50 มิลลิลิตร

2.1.19 ขวดดูแรน ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.1.20 ขวดบรรจุเฟสเคลื่อนที่ขนาด 500 มิลลิลิตร

2.2 สารเคมี

2.2.1 น้ำบริสุทธิ์ (milli-q)

2.2.2 methanol (LC-MS grade, J.T.Baker)

2.2.3 acetonitrile (LC-MS grade, J.T.Baker)

2.2.4 formic acid (analytical reagent grade, Fisher Scientific)

2.2.5 3-amino-4-methylbenzoic acid (internal standard, IS)

2.2.6 alpinetin (ChromaDex)

2.2.7 cardamonin (Toronto Research Chemicals)

2.2.8 cinnamic acid

2.2.9 phenylalanine

2.2.10 pinocembrin (Toronto Research Chemicals)

2.2.11 pinostrobin (Sigma-Aldrich)

2.3 การเตรียมสารละลาย

2.3.1 สารละลายเฟสเคลื่อนที่กรดฟอร์มิกในน้ำ milli-q 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร

นำน้ำ milli-q มาเติมลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร และปิเปตกรดฟอร์มิกเข้มข้นปริมาณ 250 ไมโครลิตรลงไป แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ milli-q จนถึงขีดกำหนดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน บรรจุลงในขวดบรรจุเฟสเคลื่อนที่

2.3.2 สารละลายเฟสเคลื่อนที่กรดฟอร์มิกในเมทานอล 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร

นำเมทานอลมาเติมลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร และปิเปตกรดฟอร์มิกเข้มข้นปริมาณ 250 ไมโครลิตรลงไป แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนถึงขีดกำหนดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน บรรจุลงในขวดบรรจุเฟสเคลื่อนที่

2.3.3 สารละลายเฟสเคลื่อนที่กรดฟอร์มิกในอะซิโตไนไตรล์ 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร

นำอะซิโตไนไตรล์มาเติมลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ปิเปตกรดฟอร์มิกเข้มข้นปริมาณ 250 ไมโครลิตรลงไป ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไตรล์จนถึงขีดกำหนดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน บรรจุลงในขวดบรรจุเฟสเคลื่อนที่

2.3.4 สารละลายมาตรฐาน alpinetin และ cardamonin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งสารมาตรฐาน 5 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล ปริมาณ 50 มิลลิลิตร และเก็บสารละลายแต่ละชนิดในขวดเก็บสาร

2.3.5 สารละลายมาตรฐาน pinocembrin และ pinostrobin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งสารมาตรฐาน 5 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล ปริมาณ 10 มิลลิลิตร และเก็บสารละลายแต่ละชนิดในขวดเก็บสาร

2.3.6 สารละลายมาตรฐาน cinnamic acid ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลาย cinnamic acid ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ 2000 ไมโครลิตร ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล เขย่าให้เข้ากัน บรรจุใส่ในขวดเก็บสารขนาด 50 มิลลิลิตร

2.3.7 สารละลายมาตรฐาน phenylalanine ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลาย phenylalanine ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ 2000 ไมโครลิตร ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล เขย่าให้เข้ากัน บรรจุใส่ในขวดเก็บสารขนาด 50 มิลลิลิตร

2.3.8 สารละลายมาตรฐาน 3-amino-4-methylbenzoic acid ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับใช้เป็น internal standard

ปิเปตสารละลาย 3-amino-4-methylbenzoic acid ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ 2000 ไมโครลิตร ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอล เขย่าให้เข้ากัน บรรจุใส่ในขวดเก็บสารขนาด 50 มิลลิลิตร

2.3.9 สารละลายมาตรฐาน 6 ชนิด และ internal standard ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อทำ MS optimization

ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ 2.3.4) ปริมาณ 300 ไมโครลิตร และปิเปตเมทานอล ปริมาณ 1200 ไมโครลิตร ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรรวม 1500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร และทำในลักษณะเดียวกันกับสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 500 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ 2.3.5 และ ข้อ 2.3.6, 2.3.7, 2.3.8) แต่เปลี่ยนปริมาณที่ปิเปตเป็น 60 และ 750 ไมโครลิตร ปิเปตเมทานอลปริมาณ 1440 และ 750 ไมโครลิตร ตามลำดับ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร ได้สารละลายมาตรฐาน 6 ชนิด และ IS

2.3.10 สารละลายมาตรฐานผสม 6 ชนิด (mix standard solution) และ internal standard ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ 2.3.9) ชนิดละ 100 ไมโครลิตร และปิเปตเมทานอล ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ลงใน vial เดียวกัน ได้ปริมาตรรวม 1000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร

2.3.11 สารละลายมาตรฐาน 6 ชนิด และ internal standard ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ 2.3.9) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และปิเปตเมทานอล ปริมาณ 900 มิลลิลิตร ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรรวม 1000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ทำซ้ำจนครบ 6 ชนิด และ IS

2.3.12 สารละลายมาตรฐานผสม 6 ชนิด ความเข้มข้น 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมี 3-amino-4-methylbenzoic acid เป็น internal standard ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง (calibration curve)

2.3.12.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 3-amino-4-methylbenzoic acid (internal standard) ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ 2.3.9 ยกเว้น internal standard) ปริมาณต่าง ๆ ตามความเข้มข้นที่ต้องการและเติมเมทานอล:น้ำอัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร เพื่อให้ปริมาตรรวมเป็น 1000 ไมโครลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานผสม 6 ชนิด ความเข้มข้น 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีความเข้มข้นของ internal standard เป็น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร

2.3.12.2 เนื่องจากขีดจำกัดปริมาตรของไมโครปิเปต การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 0.001, 0.005, 0.01, 0.025 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงต้องเตรียมจากความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร (เตรียมเหมือนข้อ 2.3.12.1 แต่ไม่ใส่ internal standard) โดยวิธีเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมทั้ง 5 ความเข้มข้นนี้เตรียมเหมือนในข้อ 2.3.12.1

2.4 การวิเคราะห์ด้วย UHPLC-MS/MS

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย UHPLC-MS/MS มีดังนี้

ปริมาตรสารที่ฉีด : 2 ไมโครลิตร

อัตราการไหล : 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที

อุณหภูมิคอลัมน์ : 40 องศาเซลเซียส

คอลัมน์ : Zorbax SB-C18 (2.1x50 mm, 1.8 μm)

อุณหภูมิแก๊ส N_2 : 200 องศาเซลเซียส

เฟสเคลื่อนที่ : กรดฟอร์มิกในน้ำ 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร กับกรดฟอร์มิกในอะซิโตไนไตรล์ 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร

ส่วนผลิตไอออน : electrospray ionization (ESI) ผลิตทั้งประจุบวกและประจุลบ (โหมด positive และ negative)

ส่วนวิเคราะห์มวล : triple quadrupoles (QQQ) โหมด dynamic multiple reaction monitoring (DMRM)

2.5 การหาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

2.5.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) ของการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยการสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกระชายตัวอย่าง ด้วยวิธี internal standard โดยนำสารละลายมาตรฐานผสม 6 ชนิด มาจำนวน 12 ความเข้มข้น (จากข้อ 2.3.12) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค UHPLC-MS/MS และสร้างกราฟมาตรฐานขึ้น ให้แกน y แสดงข้อมูลพื้นที่ใต้พีก (peak area) และแกน x แสดงความเข้มข้นของสารในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร จะได้ calibration curve จากนั้นจะได้ช่วงความเป็นเส้นตรงจากค่า LOQ จนถึงความเข้มข้นที่สูงที่สุด

2.5.2 ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD)[20]

นำโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสม 6 ชนิดช่วงความเข้มข้น 0.001 – 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ได้จากการวิเคราะห์มาพิจารณาสัญญาณที่ได้ของสารแต่ละชนิด เลือกช่วงความเข้มข้นต่ำสุด 6 ความเข้มข้นแรก คือ 0.001 – 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มาคำนวณค่า LOD ดังนี้

$$\mathrm{LOD} = \frac{3.3\mathrm{S_{y/x}}}{\mathrm{A}}\sqrt{1 + \mathrm{h_0} + \frac{1}{\mathrm{I}}}$$

เมื่อ $S_{y/x}$ คือ the residual standard deviation

A คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

I คือ จำนวนความเข้มข้นที่นำไปใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

h_0 คือ the leverage for the blank sample หาได้จากสมการด้านล่างนี้

$$h_0 = \frac{\bar{c}_{cal}^2}{\sum_{i=1}^{I}(c_i - \bar{c}_{cal})^2}$$

เมื่อ $\bar{c}_{cal}$ คือ ความเข้มข้นเฉลี่ยที่นำมาสร้างกราฟมาตรฐาน

c_i คือ ความเข้มข้นที่นำมาสร้างกราฟมาตรฐาน

2.5.3 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

วิธีทำเหมือนข้อ 2.5.2 แต่การคำนวณทำได้ดังนี้

$$LOQ = \frac{10S_{y/x}}{A}\sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}}$$

2.5.4 recovery

ทำการเติมสารละลายมาตรฐานผสม 6 ชนิดและ IS ลงไปในสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดกระชาย ซึ่งปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้คงที่และ IS มีความเข้มข้นสุดท้ายคงที่คือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไปมี 4 ระดับดังแสดงในตาราง ก.2

2.6 การเตรียมตัวอย่าง

2.6.1 การเลือกกระชาย

ชนิดกระชายที่ใช้ คือ กระชายเหลือง นำมาจากแหล่งเพาะปลูก 4 แหล่ง ได้แก่ นครปฐม พิษณุโลก เพชรบูรณ์ และระนอง ซึ่งจะใช้กระชาย 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนเหง้าและส่วนราก

2.6.2 การสกัดกระชาย

2.6.2.1 นำกระชายทั้ง 2 ส่วนมาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง

2.6.2.2 หั่นกระชายทั้ง 2 ส่วนเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปปั่นแต่ละส่วนแยกกัน

2.6.2.3 ชั่งกระชายส่วนละ 1 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร

2.6.2.4 เติมเมทานอล:น้ำอัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปิดฝา

2.6.2.5 นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร 1 นาที แล้ว sonicated เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารอีก 1 นาที

2.6.2.6 นำไปทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง โดยใช้ความเร็วรอบ 4000 rpm 10 นาที

2.6.2.7 ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสมา 300 ไมโครลิตร ใส่บีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร และ เติมเมทานอล:น้ำอัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร ปริมาณ 2700 ไมโครลิตร คนให้เข้ากัน

2.6.2.8 บรรจุสารละลายที่ได้ลงในกระบอกฉีดยาที่มีตัวกรองประมาณ 2 มิลลิลิตร

2.6.2.9 ฉีดสารละลายผ่านตัวกรองลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.6.2.10 ดูดสารละลายจากหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์มา 950 ไมโครลิตร ใส่ใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร และเติม Internal standard ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร ได้สารละลายปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC-MS/MS

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการแยกสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วย UHPLC-MS/MS

วิธีการที่ใช้ในการหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมคือ MS optimization หรือการหามวลของไอออนที่เหมาะสมต่อการแยกสารด้วยเทคนิค UHPLC-MS/MS โดยใช้โปรแกรม MassHunter Optimizer พารามิเตอร์ที่ต้องการใช้ในการแยกสารประกอบฟลาโวนอยด์ คือ precursor ion, product ion และ collision energy ทำการวิเคราะห์ไอออน 2 โหมด คือ positive และ negative ได้ค่าต่าง ๆ ดังตาราง ก.1 จากนั้นเลือกค่า precursor ion, product ion และ collision energy ที่เหมาะสมซึ่งดูจากค่า abundance เลือก product ion ที่ให้ค่า abundance สูงสุด เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของสาร เพราะจะให้สัญญาณที่มีพื้นที่ใต้พีกสูงเหมาะกับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ และเลือกค่า abundance อีกค่าหนึ่งที่มีค่าใกล้เคียงกันเป็นการยืนยันสารละลายมาตรฐาน โดยผลการเลือกพารามิเตอร์ที่เหมาะสม แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์ของสารละลายมาตรฐาน 6 ชนิดและ IS ที่เลือกจากตาราง ก.1 เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารประกอบฟลาโวนอยด์

ชื่อสาร	โหมด	มวลโมเลกุล	precursor ion	product ion	collision energy	Abundance
IS	positive	151.06	152.1	76.9	62	464,556
phenylalanine	positive	165.08	166.1	119.9	9	157,735
				76.9	41	85,484
cinnamic acid	positive	148.05	149.1	76.9	37	921
alpinetin	positive	270.09	271.1	166.9	17	919,540
				123.9	45	142,213
pinocembrin	positive	256.07	257.1	152.9	21	213,299
				102.8	33	108,599
cardamonin	positive	270.09	271.1	166.9	21	1,321,921
				123.9	45	194,731
pinostrobin	positive	270.09	271.1	167	17	187119
				103	29	92605

หมายเหตุ IS = internal standard ในงานวิจัยนี้สารที่ใช้ คือ 3-amino-4-methylbenzoic acid

3.2 สภาวะที่ใช้ในการแยกสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วย UHPLC-MS/MS

ในการแยกสารทั้ง 6 ชนิดและ IS ปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่อง UHPLC-MS/MS คือ 2 ไมโครลิตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คือ 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ กรดฟอร์มิกในน้ำ 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (%v/v) : กรดฟอร์มิกในอะซิโตไนไตรล์ 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (%v/v) และผ่านเฟสเคลื่อนที่แบบ gradient elution เพื่อประสิทธิภาพการแยกที่สมบูรณ์ โดยได้อัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ ณ เวลาต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 3.2 และผลการแยกสารละลายมาตรฐานโดยใช้สภาวะดังกล่าวแสดงในรูปที่ 3.1 และลำดับการแยกของสารมาตรฐานผสม 6 ชนิดและ IS แสดงในรูปที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 อัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ ณ เวลาต่าง ๆ

เวลา (นาที)	กรดฟอร์มิกในน้ำ 0.1% v/v	กรดฟอร์มิกในอะซิโตไนไตรล์ 0.1% v/v
0.00	90	10
2.00	90	10
17.00	0	100
19.50	0	100
20.00	90	10

จากโครมาโทแกรมรูป 3.2 สรุปลำดับการแยกและ retention time (t_R) ของสารละลายมาตรฐาน 6 ชนิดและ IS ได้ดังนี้

พีคที่ 1: phenylalanine t_R = 1.13 นาที

พีคที่ 2: 3-amino-4-methylbenzoic acid (IS) t_R = 2.00 นาที

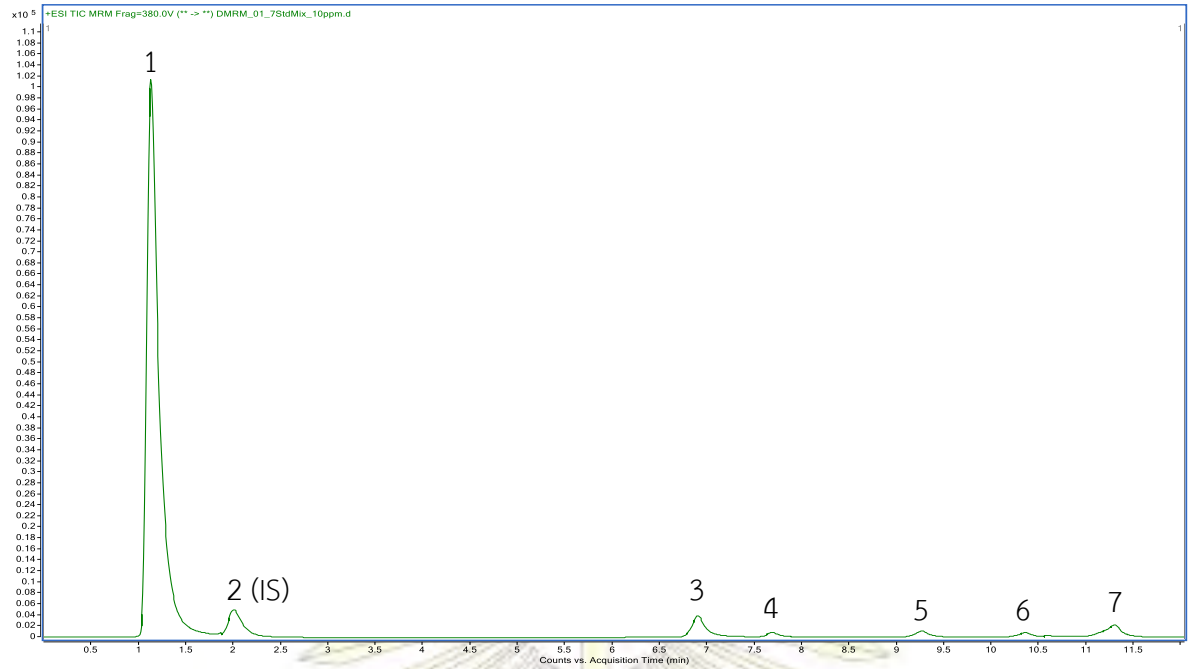
พีคที่ 3: cinnamic acid t_R = 6.90 นาที

พีคที่ 4: alpinetin t_R = 7.68 นาที

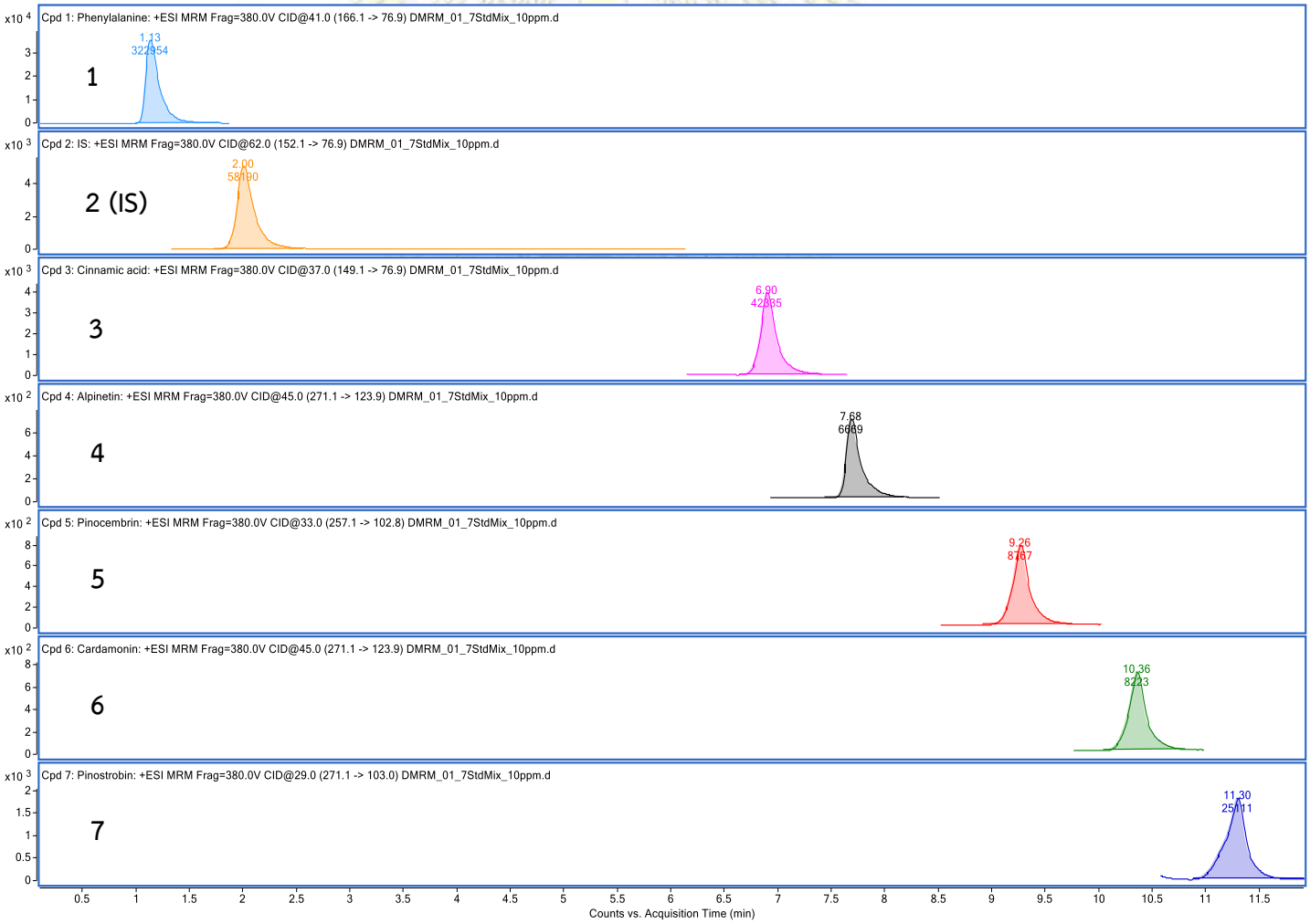
พีคที่ 5: pinocembrin t_R = 9.26 นาที

พีคที่ 6: cardamonin t_R = 10.36 นาที

พีคที่ 7: pinostrobin t_R = 11.30 นาที



รูปที่ 3.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน 6 ชนิด และ internal standard (IS)



รูปที่ 3.2 ลำดับการแยกของสารมาตรฐานผสม 6 ชนิด และ IS ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.3 การหาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

จากโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด คือ phenylalanine, cinnamic acid, alpinetin, pinocembrin, cardamonin และ pinostrobin รวมถึง internal standard ในรูป ข.1 – ข.7 นำมาหาค่า LOD และ LOQ และเมื่อได้ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) จึงสามารถระบุช่วงความเข้มเข้นที่ใช้ได้ (linearity) โดยผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.3

เมื่อระบุช่วงความเข้มข้นที่ใช้ได้แล้ว นำช่วงความเข้มข้นที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน 6 ชนิด ได้กราฟมาตรฐานดังแสดงในรูป ข.8 – ข.13 และได้พารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.3 ค่า LOD, LOQ และ linearity ที่ได้จากโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน

ชื่อสาร	ช่วงความเข้มข้น (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Linearity (mg/L)
phenylalanine	0.001 – 10.00	0.0047	0.0142	0.025 – 10.00
cinnamic acid	0.001 – 10.00	0.0132	0.0399	0.05 – 10.00
alpinetin	0.001 – 10.00	0.0087	0.0263	0.05 – 10.00
pinocembrin	0.001 – 10.00	0.0103	0.0313	0.05 – 10.00
cardamonin	0.001 – 10.00	0.0424	0.1284	0.25 – 10.00
pinostrobin	0.001 – 10.00	0.0348	0.1055	0.25 – 10.00

ตารางที่ 3.4 พารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

ชื่อสาร	ช่วงความเข้มข้นที่ใช้ได้ (mg/L)	slope	intercept	R^2
phenylalanine	0.025 – 10.00	1.0023	0.0021	1.0000
cinnamic acid	0.05 – 10.00	0.0677	-0.0007	1.0000
alpinetin	0.05 – 10.00	0.0114	0.0006	1.0000
pinocembrin	0.05 – 10.00	0.0151	0.0002	1.0000
cardamonin	0.25 – 10.00	0.0144	-0.0005	1.0000
pinostrobin	0.25 – 10.00	0.0436	0.0017	1.0000

จากการหาค่า recovery โดยทำการเติมสารละลายมาตรฐาน 6 ชนิดและ IS ลงในสารตัวอย่างกระชาย ที่ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง ได้ค่าตามตาราง ก.3 และ ก.4 มารายงานค่า %recovery เป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ แสดงในตารางที่ 3.5 และ 3.6

ตารางที่ 3.5 ค่า recovery ที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนเหง้าของกระชาย (n = 3)

ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่เติมลงในสารละลายของสารสกัดตัวอย่าง (mg/L)	mean recovery (%)	RSD (%)	
		ค่าจากการทดลอง	ค่าจากการทดลอง	ค่าที่ยอมรับ
phenylalanine	0.1	102	29	23
	0.25	115	11	19
	0.5	121	9	18
	1	102	1	16
cinnamic acid	0.05	101	24	25
	0.125	93	6	22
	0.25	82	6	19
	0.5	85	2	18
Alpinetin	0.5	70	33	18
	1.25	109	26	15
	2.5	86	16	14
	5	108	2	13
pinocembrin	2	75	16	14
	5	141	13	13
	10	145	5	11
	20	131	0.1	10
cardamonin	0.5	69	31	18
	1.25	138	8	15
	2.5	133	4	14
	5	109	1	13
pinostrobin	2.5	119	8	14
	6.25	123	11	12
	12.5	123	10	11
	25	105	1	10

ตารางที่ 3.6 ค่า recovery ที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนรากของกระชาย (n = 3)

ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่เติมลงในสารละลายของสารสกัดตัวอย่าง (mg/L)	mean recovery (%)	RSD (%)	
		ค่าจากการทดลอง	ค่าจากการทดลอง	ค่าที่ยอมรับ
phenylalanine	0.1	122	29	23
	0.25	115	11	19
	0.5	110	9	18
	1	94	1	16
cinnamic acid	0.05	58	24	25
	0.125	86	6	22
	0.25	85	6	19
	0.5	88	2	18
Alpinetin	0.5	113	33	18
	1.25	110	26	15
	2.5	102	16	14
	5	86	2	13
pinocembrin	2	169	16	14
	5	156	13	13
	10	122	5	11
	20	92	0.1	10
cardamonin	0.5	92	31	18
	1.25	124	8	15
	2.5	105	4	14
	5	99	1	13
pinostrobin	2.5	118	8	14
	6.25	111	11	12
	12.5	109	10	11
	25	93	1	10

หมายเหตุ เกณฑ์การยอมรับของตาราง 3.5 และ 3.6 เป็นดังนี้

ก. recovery ของช่วงความเข้มข้น 0.05 – 25 ppm คือ 80 – 110%[21]

ข. RSD ขึ้นกับความเข้มข้น คือ $2^{(1-0.5\log C)}$ โดยที่ C คือ อัตราส่วนความเข้มข้น (concentration fraction) เช่น 1 ppm ค่า C = 10^{-6} เป็นต้น[22]

3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์กระชายเหลือง 2 ส่วน คือ ส่วนเหง้าและส่วนราก โดยกระชายที่ใช้นำมาจากแหล่งเพาะปลูกที่ต่างกัน 4 จังหวัด และสกัดซ้ำ 6 ครั้ง โดยใช้กระชาย 1 กรัม ต่อเมทานอล:น้ำ (อัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร) 10 มิลลิลิตร (เหตุที่เลือกใช้เมทานอล:น้ำ อัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร เป็นสารละลายที่ใช้สกัด เนื่องจากจะเห็นว่าค่าพื้นที่ใต้พีกและอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกจากตาราง ก.10 อยู่ในระดับกลาง ไม่น้อยจนเกินไป) และได้ค่าความเข้มข้นของสารในกระชายแต่ละจังหวัดดังตาราง ก.5 – ก.8 โดยใช้สมการเส้นตรงตามตารางที่ 3.7 นำมาคำนวณหาปริมาณสาร 6 ชนิดในหน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงในตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.7 สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน 6 ชนิด

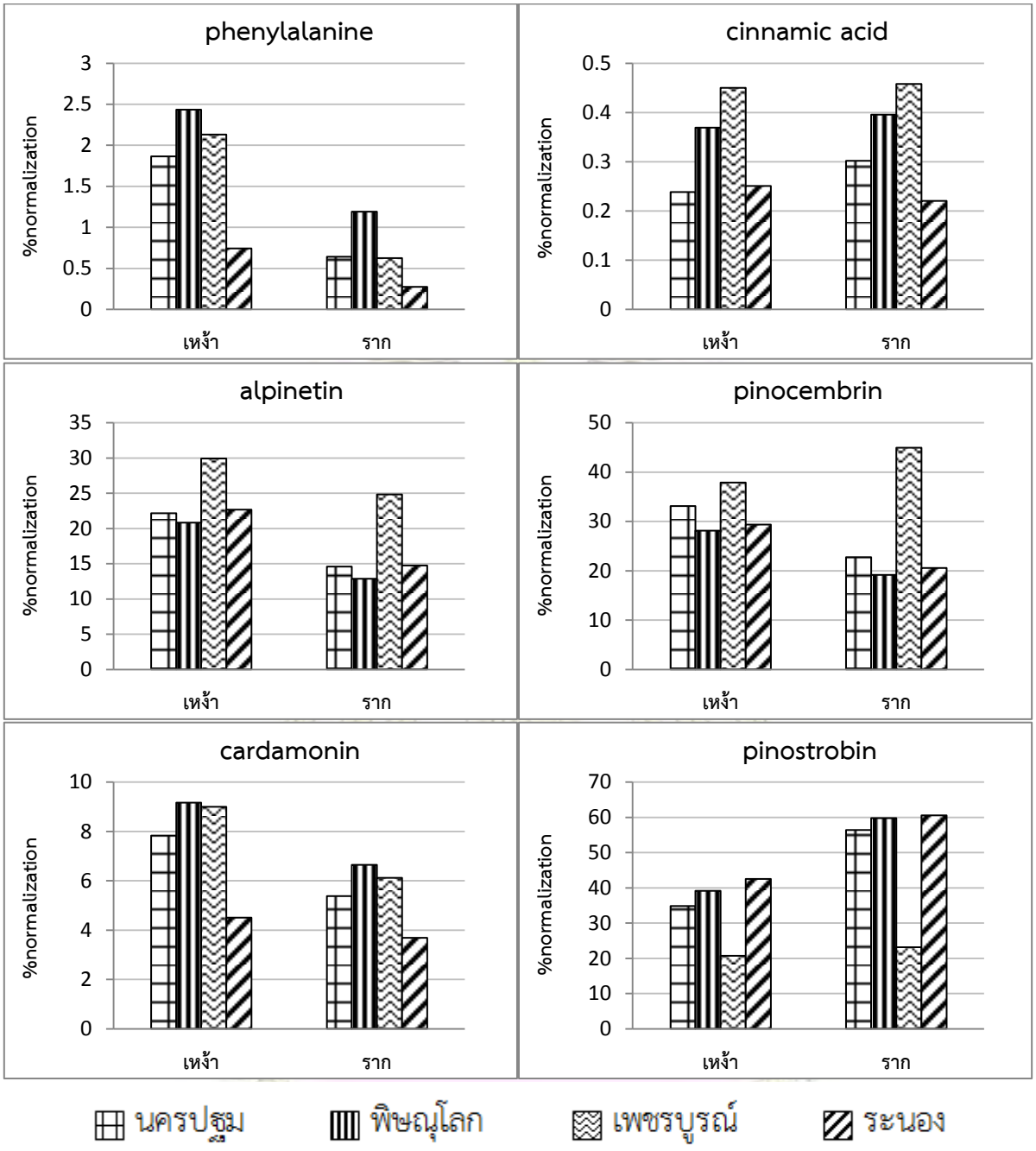
ชื่อสาร	สมการเส้นตรง	R^2
Phenylalanine	y = 1.0023x + 0.0021	1.0000
cinnamic acid	y = 0.0677x - 0.0007	1.0000
Alpinetin	y = 0.0114x + 0.0006	1.0000
Pinocembrin	y = 0.0151x + 0.0002	1.0000
Cardamonin	y = 0.0144x - 0.0005	1.0000
Pinostrobin	y = 0.0436x + 0.0017	1.0000

จากตารางที่ 3.8 จะเห็นได้ว่ากระชาย 2 ส่วนนี้มีปริมาณสารแตกต่างกัน โดยส่วนเหง้ามีปริมาณสารมากกว่าส่วนรากในทุกจังหวัด และมีปริมาณสาร pinostrobin มากที่สุดตามด้วย pinocembrin, alpinetin, cardamonin, phenylalanine และ cinnamic acid ตามลำดับ ยกเว้นในจังหวัดเพชรบูรณ์ที่มีปริมาณสาร pinocembrin และ alpinetin มากกว่า pinostrobin โดยมีปริมาณสาร pinocembrin มากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารของแต่ละส่วนในแต่ละจังหวัด จะเห็นได้ว่าถึงแม้จะเป็นกระชายส่วนเดียวกัน แต่ถ้ามาจากแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกัน ปริมาณสารที่พบก็จะแตกต่างกัน ซึ่งอาจจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของแหล่งเพาะปลูก อาหารที่ได้รับ อุณหภูมิ แสงแดดหรือเวลาในการเก็บเกี่ยว

ตารางที่ 3.8 ปริมาณสารตั้งต้นของฟลาโวนอยด์ 2 ชนิดและฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดในกระชายเหลือง

ชื่อสาร	ปริมาณสารในกระชายเหลืองส่วนเหง้า (mg/kg wet weight)				ปริมาณสารในกระชายเหลืองส่วนราก (mg/kg wet weight)			
	นครปฐม	พิษณุโลก	เพชรบูรณ์	ระนอง	นครปฐม	พิษณุโลก	เพชรบูรณ์	ระนอง
phenylalanine	50.4 ± 5.6	59.5 ± 7.8	38.7 ± 4.4	14.6 ± 0.9	8.5 ± 0.3	12.5 ± 2.1	6.4 ± 0.4	2.8 ± 0.1
cinnamic acid	6.4 ± 0.4	9.0 ± 1.0	8.2 ± 0.6	4.9 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.7 ± 0.2	2.2 ± 0.2
alpinetin	599 ± 39	509 ± 68	543 ± 55	445 ± 23	194 ± 14	134 ± 13	254 ± 14	151 ± 11
pinocembrin	895 ± 28	687 ± 86	686 ± 58	577 ± 21	302 ± 17	201 ± 32	461 ± 31	210 ± 9
cardamonin	212 ± 26	224 ± 30	164 ± 23	88.4 ± 5.6	71.3 ± 2.6	69.7 ± 9.7	62.7 ± 4.3	37.7 ± 3.3
pinostrobin	940 ± 40	951 ± 68	375 ± 26	835 ± 14	750 ± 42	623 ± 37	237 ± 7	619 ± 19

และนำค่าความเข้มข้นที่ได้จากตาราง ก.5 – ก.8 ไปหาค่า %normalization เฉลี่ย ได้ตามตาราง ก.9 เมื่อสร้างแผนภูมิเปรียบเทียบปริมาณสารระหว่างส่วนเหง้าและรากในแต่ละจังหวัด จะได้ดังรูปที่ 3.3

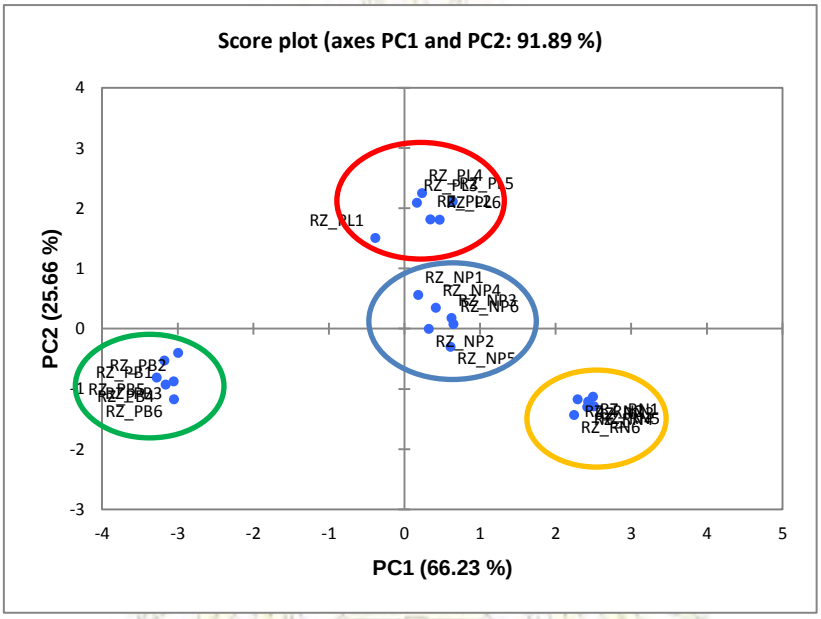


รูปที่ 3.3 แผนภูมิเปรียบเทียบปริมาณสารระหว่างส่วนเหง้าและรากจากจังหวัดต่าง ๆ

จากแผนภูมิในรูปที่ 3.3 จะเห็นได้ว่าปริมาณสารส่วนใหญ่ในส่วนเหง้ามีมากกว่าในส่วนราก ยกเว้น cinnamic acid และ pinostrobin และเมื่อเทียบปริมาณสารในส่วนเดียวกันแต่มาจากต่างแหล่งเพาะปลูก จะไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ของปริมาณสารต่าง ๆ ได้ จึงนำไปประมวลผลด้วยวิธีเคโมเมทริกซ์ต่อไป

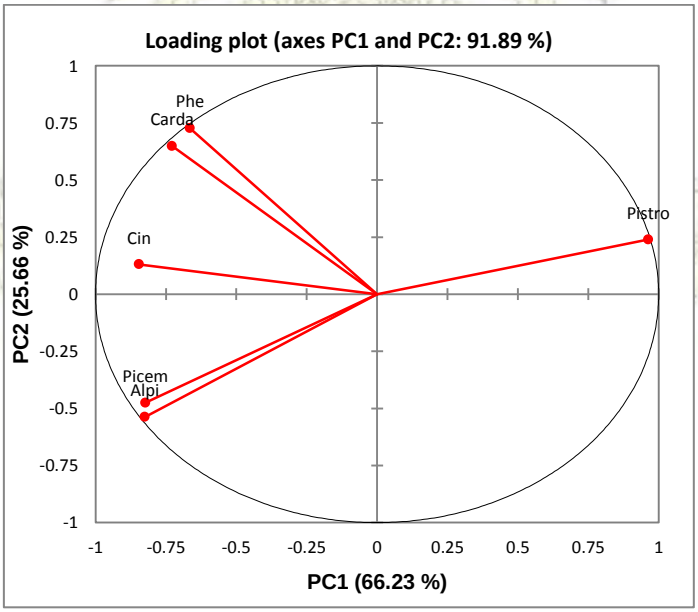
3.5 การประมวลผลด้วยเคโมเมทริกซ์

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างกระชายส่วนเหง้า (rhizome) และส่วนราก (rootlet) จาก 4 แหล่งเพาะปลูก โดยนำค่าความเข้มข้นที่ได้จากตาราง ก.5 – ก.8 มาคำนวณ %normalization และนำไปประมวลผลด้วยเคโมเมทริกซ์ชนิด PCA โดยโปรแกรม XLSTAT2017 สามารถแบ่งกระชายส่วนเหง้าได้ 4 กลุ่ม และส่วนรากได้ 4 กลุ่มเช่นกัน ได้แก่ กลุ่มจังหวัดนครปฐม พิษณุโลก เพชรบูรณ์ และระนอง แสดงดังรูปที่ 3.4 – 3.9



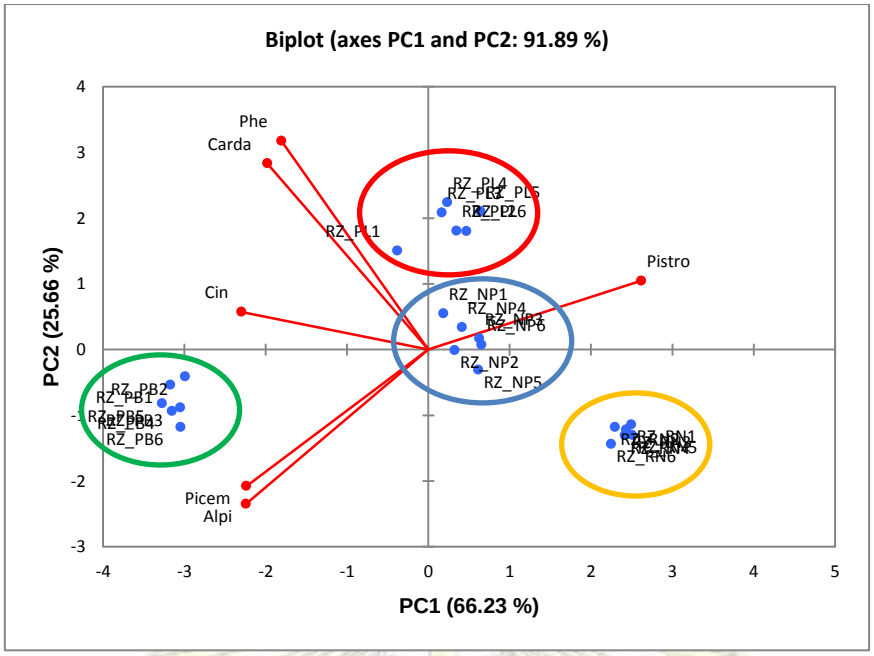
RZ = rhizome
NP = นครปฐม
PL = พิษณุโลก
PB = เพชรบูรณ์
RN = ระนอง

รูปที่ 3.4 กราฟแสดงผล PCA ของการจัดกลุ่มกระชายส่วนเหง้าจากทั้ง 4 แหล่งเพาะปลูก

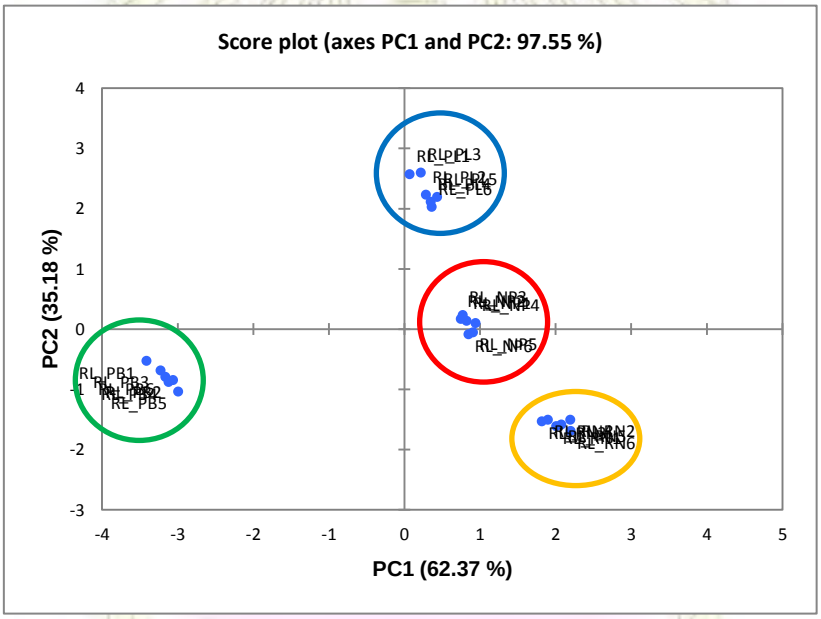


Phe = phenylalanine
Carda = cardamonin
Cin = cinnamic acid
Picem = pinocembrin
Alpi = alpinetin
Pistro = pinostrobin

รูปที่ 3.5 กราฟแสดงผล PCA ของสารระเหยยากที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของตัวอย่างกระชายส่วนเหง้าจากแต่ละแหล่งเพาะปลูก

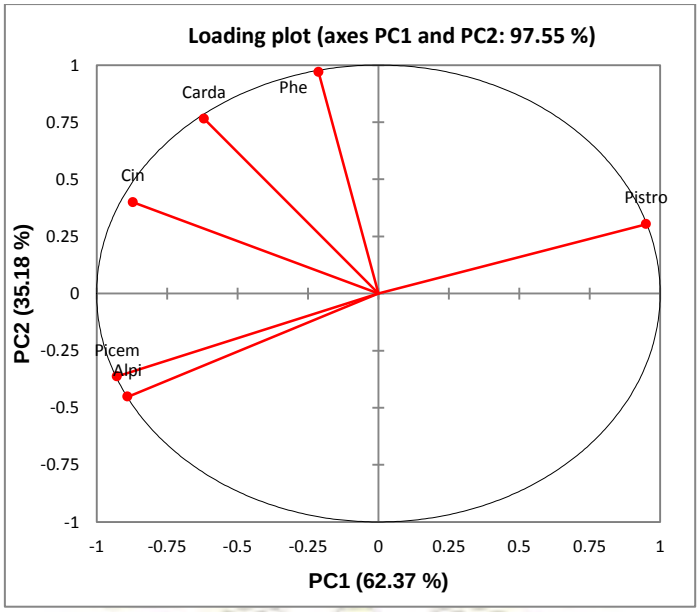


รูปที่ 3.6 กราฟแสดงผล PCA ของการจัดกลุ่มกระชายส่วนเหง้าและสารระเหยยากที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของตัวอย่างกระชายส่วนเหง้าจากแต่ละแหล่งเพาะปลูก



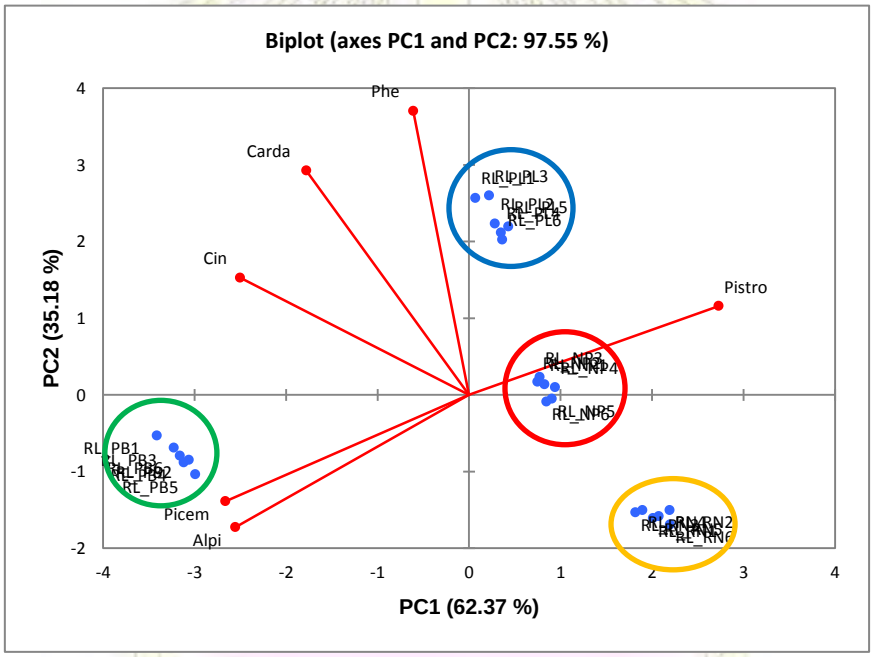
RL = rootlet
NP = นครปฐม
PL = พิษณุโลก
PB = เพชรบูรณ์
RN = ระนอง

รูปที่ 3.7 กราฟแสดงผล PCA ของการจัดกลุ่มกระชายส่วนรากจากทั้ง 4 แหล่งเพาะปลูก



Phe = phenylalanine
Carda = cardamonin
Cin = cinnamic acid
Picem = pinocembrin
Alpi = alpinetin
Pistro = pinostrobin

รูปที่ 3.8 กราฟแสดงผล PCA ของสารระเหยยากที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของตัวอย่างกระชายส่วนราก จากแต่ละแหล่งเพาะปลูก



รูปที่ 3.9 กราฟแสดงผล PCA ของการจัดกลุ่มกระชายส่วนรากและสารระเหยยากที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของตัวอย่างกระชายส่วนรากจากแต่ละแหล่งเพาะปลูก

จากรูปที่ 3.4 – 3.9 จะเห็นได้ว่าทั้งส่วนเหง้าและส่วนรากสามารถแบ่งกลุ่มของกระชายตัวอย่างได้เป็น 4 กลุ่มอย่างชัดเจนตามแหล่งเพาะปลูก แสดงว่ากระชายแต่ละแหล่งเพาะปลูกมีปริมาณสารสำคัญแตกต่างกัน

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารประกอบฟลาโวนอยด์หลัก 4 ชนิดและสารตั้งต้นหลักของฟลาโวนอยด์ 2 ชนิดออกจากกันด้วยเทคนิค UHPLC-MS/MS เพื่อนำไปหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมถึงสารตั้งต้นของฟลาโวนอยด์ในกระชายเหลืองที่มีแหล่งเพาะปลูกแตกต่างกัน 4 จังหวัด โดยสกัดตัวอย่างกระชาย 1 กรัมด้วยตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ (ในอัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้ภาวะของการวิเคราะห์ด้วย UHPLC-MS/MS ดังนี้ คือ ใช้เฟสเคลื่อนที่ระบบเกรเดียนท์ของกรดฟอร์มิกในน้ำ 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร และกรดฟอร์มิกในอะซิโตไนไตรล์ 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีด 2 ไมโครลิตร เมื่อพิจารณากราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน พบว่า ให้ค่า R-squared เท่ากับ 1 แสดงว่าวิธีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์นี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ดี โดยมีขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) 0.0047 – 0.042 และ 0.014 – 0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าร้อยละ 52 ของข้อมูลร้อยละการกลับคืนของการสกัด และร้อยละ 85 ของข้อมูลส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ อยู่ในช่วงของเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จากผลการวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ในกระชายพบว่า กระชายแต่ละส่วนมีปริมาณสารแตกต่างกัน โดยส่วนเหง้ามีปริมาณสารมากกว่าส่วนราก 1.3 - 6.0 เท่า โดยที่ปริมาณ pinostrobin > pinocembrin > alpinetin > cardamonin ยกเว้นเพชรบูรณ์ที่ pinocembrin > alpinetin > pinostrobin > cardamonin นอกจากนี้ยังพบสารตั้งต้นของฟลาโวนอยด์ โดยที่ phenylalanine > cinnamic acid ปริมาณของฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากกว่าปริมาณสารตั้งต้นดังกล่าว 30 - 200 เท่า และจากการประมวลผลด้วย PCA สามารถแบ่งกระชายเหลืองได้เป็น 4 กลุ่มตามแหล่งเพาะปลูกได้แก่ นครปฐม พิษณุโลก เพชรบูรณ์ และระนอง แสดงว่ากระชายที่มาจากแหล่งเพาะปลูกที่ต่างกัน จะมีปริมาณสารแตกต่างกัน สาเหตุอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมในการเพาะปลูก อาหารที่ได้รับ อุณหภูมิ แสงแดดหรือระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว ซึ่งปัจจัยเหล่านี้น่าจะมีส่วนสำคัญในการกำหนดปริมาณสารสำคัญในกระชาย หากสามารถควบคุมปัจจัยต่าง ๆ เพื่อให้ปริมาณสารสำคัญเหล่านั้นมีมากขึ้น จะเป็นประโยชน์อย่างมากทั้งในทางโภชนาการและทางเภสัชวิทยา

เอกสารอ้างอิง

1. http://www.doctor.or.th/article/detail/1321 (accessed Aug 21, 2016)
2. http://frynn.com/กระชาย (accessed Aug 21, 2016)
3. http://www.vcharkarn.com/vcafe/52382 (accessed Dec 18, 2016)
4. Nagy, K.; Jakab, A.; Pollreisz, F.; Bongiorno, D.; Ceraulo, L.; Averna, M. R.; Noto, D.; Vékey, K. Analysis of Sterols by High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Combined with Chemometrics. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2433-2440.
5. Kovács, Z.; Dinya, Z.; Antus, S. LC-SSI-MS Techniques as Efficient Tools for Characterization of Nonvolatile Phenolic Compounds of a Special Hungarian Wine. *J. Chromatogr. Sci.* **2004**, *42*, 125-129.
6. Trakoontivakorn, G.; Nakahara, K.; Shinmoto, H.; Takenaka, M.; Kameyama, M. O.; Ono, H.; Yoshida, M.; Nagata, T.; Tsushida, T. Structural Analysis of a Novel Antimutagenic Compound, 4-Hydroxypanduratin A, and the Antimutagenic Activity of Flavonoids in a Thai Spice, Fingerroot (Boesenbergia pandurata Schult.) Against Mutagenic Heterocyclic Amines. *J. Agric. Food Chem*. **2001**, *49*, 3046-3050.
7. Magiera, S.; Zareba, M. Chromatographic Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in Lycium barbarum L. and Evaluation of Antioxidant Activity. *Food Anal. Methods*. **2015**, *8*, 2665-2674.
8. Trautvetter, S.; Speer, I. K.; Speer, K. Confirmation of Phenolic Acids and Flavonoids in Honeys by UPLC-MS. *Apidologie*. **2009**, *40*, 140-150.
9. Ng, T. L. M.; Karim, R.; Tan, Y. S.; Teh, H. F.; Danial, A. D.; Ho, L. S.; Khalid, N.; Appleton, D. R.; Harikrishna, J. A. Amino Acid and Secondary Metabolite Production in Embryogenic and Non-Embryogenic Callus of Fingerroot Ginger (*Boesenbergia rotunda*). *PLoS ONE*. **2016**, *11*, 1-19.
10. http://www.lcresources.com/resources/getstart/2c01.htm **(**accessed Mar 20, 2016)
11. https://en.wikipedia.org/wiki/Triple_quadrupole_mass_spectrometer (accessed Mar 20, 2016)

12. http://sakioki.exteen.com/20090303/k-me-gc-ms (accessed Mar 20, 2016)
13. ผศ.ดร.คเณศ วงษ์ระวี. **บทที่ 4 การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสำรวจ (Unsupervised Pattern Recognition)** (เอกสารประกอบการสอน). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
14. Rukayadi, Y.; Zainin, N. S.; Lau, K. Y.; Zakaria, M.; Son, R.; Abdull Razis, A. F. Antibacterial Activity of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. A. Extract Against *Escherichia coli*. *Int. Food Res. J.* **2013**, *20*, 3319-3323.
15. Mahmood, A. A.; Mariod, A. A.; Abdelwahab, S. I.; Ismail, S.; Bayaty, F. A. Potential Activity of Ethanolic Extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Rhizomes Extract in Accelerating Wound Healing in Rats. *J. Med. Plants Res.* **2010**, *4*, 1570-1576.
16. Khalid, N.; Tan, B. C.; Tan, S. K.; Wong, S. M.; Ata, N.; Rahman, N. A. Distribution of Flavonoids and Cyclohexenyl Chalcone Derivatives in Conventional Propagated and In Vitro-Derived Field-Grown *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. *J. Ophthalmol*. **2015**, *2015*, 1-7.
17. Sukari, M. A.; Ching, A. Y. L.; Wah, T. S.; Lian, G. E. C.; Rahmani, M.; Khalid, K. Characterization of Flavonoid Derivatives from *Boesenbergia rotunda* (L.). *Malaysian J. Anal. Sci.* **2007**, *11*, 154-159.
18. Tewtrakul, S.; Subhadhirasakul, S.; Puripattanavong, J.; Panphadung, T. HIV-1 Protease Inhibitory Substances from the Rhizomes of *Boesenbergia pandurata* Holtt. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2003**, *25*, 503-508.
19. Khalid, N.; Yusuf, N. A.; Annuar, M. S. M. Existence of Bioactive Flavonoids in Rhizomes and Plant Cell Cultures of *Borsenbergia rotunda* (L.) Mansf. Kulturpfl. *Aust. J. Crop Sci*. **2013**, *7*, 730-734.
20. Olivieri, A. C. Practical Guidelines for Reporting Results in Single- and Multi-Component Analytical Calibration: A Tutorial. *Anal. Chim. Acta*. **2015**, *868*, 10-22.
21. Jettanajit, A; Nhujak, T. Determination of Mycotoxins in Brown Rice Using QuEChERS Sample Preparation and UHPLC–MS-MS. *J. Chromatogr. Sci*. **2016**, *54*, 720-729.

22. Klinsunthorna, N.; Petsoma, A.; Nhujak, T. Determination of Steroids Adulterated in Liquid Herbal Medicines Using QuEChERS Sample Preparation and High-Performance Liquid Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **2011**, *55*, 1175-1178.

ภาคผนวก ก

ตาราง ก.1 พารามิเตอร์ทั้งหมดของสารละลายมาตรฐาน 6 ชนิดและ IS จากการทำ MS optimization

ชื่อสาร	โหมด	มวลโมเลกุล	precursor ion	product ion	collision energy	Abundance
3-amino-4-methylbenzoic acid (IS)	positive	151.06	152.1	76.9	62	464,556
				92.9	62	395,091
				50.9	62	204,887
				106.9	62	273,796
	negative	151.06	150.1	150	1	49
phenylalanine	positive	165.08	166.1	119.9	9	157,735
				76.9	41	85,484
				102.9	33	74,174
				50.9	60	36,392
	negative	165.08	164.1	146.9	9	1,487
				102.9	13	978
cinnamic acid	positive	148.05	149.1	38.9	49	849
				65	21	766
				120.9	17	370
				76.9	37	921
	negative	148.05	147	-	-	-
alpinetin	positive	270.09	271.1	166.9	17	919,540
				68.9	60	104,727
				123.9	45	142,213
				270	9	80
	negative	270.09	269.1	64.9	53	9,701
				164.9	21	18,856
				226.9	17	17,090
				93.8	37	11,823

ชื่อสาร	โหมด	มวลโมเลกุล	precursor ion	product ion	collision energy	Abundance
pinocembrin	positive	256.07	257.1	152.9	21	213,299
				102.8	33	108,599
				76.9	60	96,685
				131	17	92,949
	negative	256.07	255.1	65	56	11,762
				212.8	56	26,214
				40.8	56	13,908
				62.9	56	8,020
cardamonin	positive	270.09	271.1	166.9	21	1,321,921
				68.9	60	194,270
				123.9	45	194,731
				151.9	37	164,757
	negative	270.09	269.1	93.8	33	43,106
				225.9	17	36,949
				253.9	13	2,793
				121.8	25	39,968
pinostrobin	positive	270.09	271.1	167	17	187119
				76.9	57	96569
				103	29	92605
				131	13	73327
	negative	270.09	269.08	93.9	33	2544
				65	37	868
				164.9	21	1878
				148	29	55

ตาราง ก.2 ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในสารตัวอย่างกระชายเพื่อใช้หาค่า recovery

ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่เติม (mg/L)			
	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4
phenylalanine	0.10	0.25	0.50	1.00
cinnamic acid	0.05	0.125	0.25	0.50
alpinetin	0.50	1.25	2.50	5.00
pinocembrin	2.00	5.00	10.00	20.00
cardamonin	0.50	1.25	2.50	5.00
pinostrobin	2.50	6.25	12.50	25.00

ตาราง ก.3 ค่า recovery ที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนเหง้าของกระชาย

ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่เติม (mg/L)	ครั้งที่	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)	ความเข้มข้น blank (mg/L)	recovery (%)
phenylalanine	0.10	1	0.56	0.48	82
		2	0.61		136
		3	0.56		88
	0.25	1	0.76		116
		2	0.79		128
		3	0.73		102
	0.50	1	1.05		114
		2	1.05		114
		3	1.14		134
	1.00	1	1.50		102
		2	1.49		101
		3	1.49		101

ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่เติม (mg/L)	ครั้งที่	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)	ความเข้มข้น blank (mg/L)	recovery (%)
cinnamic acid	0.05	1	0.13	0.10	78
		2	0.16		125
		3	0.15		99
	0.125	1	0.21		92
		2	0.22		100
		3	0.21		88
	0.25	1	0.29		77
		2	0.31		87
		3	0.30		83
	0.50	1	0.52		85
		2	0.52		86
		3	0.51		83
alpinetin	0.50	1	5.30	5.07	47
		2	5.53		93
		3	5.42		71
	1.25	1	6.46		111
		2	6.78		137
		3	6.06		80
	2.50	1	6.82		70
		2	7.36		92
		3	7.47		96
	5.00	1	10.36		106
		2	10.40		107
		3	10.57		110

ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่เติม (mg/L)	ครั้งที่	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)	ความเข้มข้น blank (mg/L)	recovery (%)
pinocembrin	2.00	1	13.25	11.96	65
		2	13.73		89
		3	13.39		71
	5.00	1	18.56		132
		2	20.02		161
		3	18.40		129
	10.00	1	25.72		138
		2	26.59		146
		3	27.06		151
	20.00	1	38.10		131
		2	38.17		131
		3	38.15		131
cardamonin	0.50	1	2.23	2.00	45
		2	2.42		83
		3	2.40		80
	1.25	1	3.68		134
		2	3.87		150
		3	3.62		130
	2.50	1	5.18		127
		2	5.36		134
		3	5.41		136
	5.00	1	7.45		109
		2	7.36		107
		3	7.49		110

ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่เติม (mg/L)	ครั้งที่	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)	ความเข้มข้น blank (mg/L)	recovery (%)
pinostrobin	2.50	1	9.47	6.77	108
		2	9.86		124
		3	9.86		124
	6.25	1	14.05		117
		2	15.36		137
		3	13.88		114
	12.50	1	20.57		110
		2	22.26		124
		3	23.76		136
	25.00	1	32.88		104
		2	33.18		106
		3	33.14		105

ตาราง ก.4 ค่า recovery ที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนรากของกระชาย

ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่เติม (mg/L)	ครั้งที่	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)	ความเข้มข้น blank (mg/L)	recovery (%)
phenylalanine	0.10	1	0.22	0.09	122
		2	0.22		122
		3	0.22		121
	0.25	1	0.39		119
		2	0.36		106
		3	0.39		118
	0.50	1	0.67		114
		2	0.64		109
		3	0.62		106
	1.00	1	1.08		98
		2	0.98		89
		3	1.05		95

ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่เติม (mg/L)	ครั้งที่	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)	ความเข้มข้น blank (mg/L)	recovery (%)
cinnamic acid	0.05	1	0.07	0.04	57
		2	0.07		63
		3	0.07		55
	0.125	1	0.14		84
		2	0.14		84
		3	0.15		91
	0.25	1	0.25		84
		2	0.25		86
		3	0.25		86
	0.50	1	0.49		90
		2	0.47		85
		3	0.48		89
alpinetin	0.50	1	2.19	1.68	102
		2	2.28		120
		3	2.27		118
	1.25	1	3.17		119
		2	2.97		103
		3	3.02		107
	2.50	1	4.40		109
		2	4.30		105
		3	4.02		94
	5.00	1	6.06		88
		2	5.87		84
		3	5.96		86

ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่เติม (mg/L)	ครั้งที่	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)	ความเข้มข้น blank (mg/L)	recovery (%)
pinocembrin	2.00	1	6.90	3.69	160
		2	7.24		177
		3	7.11		171
	5.00	1	11.90		164
		2	11.06		147
		3	11.50		156
	10.00	1	16.54		128
		2	15.50		118
		3	15.64		119
	20.00	1	22.89		96
		2	21.42		89
		3	21.90		91
cardamonin	0.50	1	1.31	0.83	96
		2	1.36		105
		3	1.20		74
	1.25	1	2.48		132
		2	2.29		117
		3	2.38		124
	2.50	1	3.52		107
		2	3.57		106
		3	3.39		102
	5.00	1	5.83		100
		2	5.79		99
		3	5.80		99

ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่เติม (mg/L)	ครั้งที่	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)	ความเข้มข้น blank (mg/L)	recovery (%)
pinostrobin	2.50	1	9.04	6.10	118
		2	9.09		120
		3	8.99		115
	6.25	1	13.22		114
		2	12.71		106
		3	13.18		113
	12.50	1	19.89		110
		2	19.97		111
		3	19.36		106
	25.00	1	29.35		93
		2	28.76		91
		3	29.94		95

ตาราง ก.5 ความเข้มข้นของสารในกระชายเหลือง 2 ส่วน จากจังหวัดนครปฐม

ส่วนที่ใช้	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)						ความเข้มข้นเฉลี่ย (mg/L)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	
เหง้า	phenylalanine	0.597	0.484	0.502	0.521	0.498	0.423	0.504
	cinnamic acid	0.060	0.063	0.066	0.067	0.069	0.060	0.064
	alpinetin	6.219	5.707	5.679	6.407	6.383	5.556	5.992
	pinocembrin	9.252	8.885	8.655	9.196	9.097	8.588	8.946
	cardamonin	2.437	1.988	1.922	2.439	1.836	2.088	2.118
	pinostrobin	9.356	8.824	9.456	9.892	9.752	9.121	9.400
ราก	phenylalanine	0.078	0.087	0.084	0.086	0.086	0.088	0.085
	cinnamic acid	0.036	0.041	0.040	0.038	0.042	0.043	0.040
	alpinetin	1.756	1.953	1.791	1.935	2.090	2.089	1.936
	pinocembrin	2.863	2.944	2.875	3.012	3.145	3.285	3.021
	cardamonin	2.437	1.988	1.922	2.439	1.836	2.088	0.713
	pinostrobin	6.925	7.401	7.126	7.641	7.986	7.896	7.496

ตาราง ก.6 ความเข้มข้นของสารในกระชายเหลือง 2 ส่วน จากจังหวัดพิษณุโลก

ส่วนที่ใช้	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)						ความเข้มข้นเฉลี่ย (mg/L)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	
เหง้า	phenylalanine	0.697	0.599	0.615	0.618	0.587	0.456	0.595
	cinnamic acid	0.107	0.089	0.092	0.089	0.080	0.081	0.090
	alpinetin	6.134	5.007	5.170	5.217	4.985	4.008	5.087
	pinocembrin	8.232	6.986	6.923	6.887	6.631	5.546	6.867
	cardamonin	2.412	2.123	2.369	2.527	2.312	1.685	2.238
	pinostrobin	9.904	9.621	9.682	9.825	9.877	8.135	9.507
ราก	phenylalanine	0.142	0.130	0.145	0.130	0.111	0.090	0.125
	cinnamic acid	0.039	0.038	0.043	0.044	0.040	0.041	0.041
	alpinetin	1.426	1.439	1.384	1.448	1.258	1.111	1.344
	pinocembrin	2.386	2.207	2.141	2.101	1.692	1.541	2.011
	cardamonin	0.818	0.755	0.739	0.694	0.624	0.548	0.697
	pinostrobin	6.323	6.352	6.498	6.590	6.023	5.581	6.228

ตาราง ก.7 ความเข้มข้นของสารในกระชายเหลือง 2 ส่วน จากจังหวัดเพชรบูรณ์

ส่วนที่ใช้	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)						ความเข้มข้นเฉลี่ย (mg/L)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	
เหง้า	phenylalanine	0.430	0.387	0.320	0.360	0.436	0.390	0.387
	cinnamic acid	0.087	0.076	0.075	0.079	0.089	0.083	0.082
	alpinetin	6.030	5.210	4.728	5.052	6.107	5.467	5.432
	pinocembrin	7.349	6.511	6.102	6.517	7.615	7.082	6.863
	cardamonin	1.945	1.713	1.425	1.454	1.835	1.442	1.636
	pinostrobin	4.065	3.774	3.393	3.508	3.965	3.780	3.748
ราก	phenylalanine	0.062	0.064	0.059	0.061	0.070	0.067	0.064
	cinnamic acid	0.051	0.046	0.046	0.045	0.045	0.047	0.047
	alpinetin	2.446	2.584	2.383	2.425	2.710	2.704	2.542
	pinocembrin	4.278	4.701	4.337	4.422	4.837	5.071	4.608
	cardamonin	0.609	0.642	0.606	0.580	0.620	0.705	0.627
	pinostrobin	2.359	2.441	2.276	2.278	2.408	2.428	2.365

ตาราง ก.8 ความเข้มข้นของสารในกระชายเหลือง 2 ส่วน จากจังหวัดระนอง

ส่วนที่ใช้	ชื่อสาร	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)						ความเข้มข้นเฉลี่ย (mg/L)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6	
เหง้า	phenylalanine	0.133	0.145	0.137	0.148	0.153	0.156	0.146
	cinnamic acid	0.047	0.051	0.050	0.049	0.047	0.051	0.049
	alpinetin	4.215	4.539	4.310	4.408	4.391	4.858	4.454
	pinocembrin	5.517	5.822	5.696	5.686	5.774	6.139	5.772
	cardamonin	0.906	0.966	0.876	0.825	0.819	0.910	0.884
	pinostrobin	8.149	8.406	8.313	8.265	8.384	8.576	8.349
ราก	phenylalanine	0.027	0.028	0.028	0.031	0.028	0.027	0.028
	cinnamic acid	0.022	0.022	0.025	0.024	0.022	0.021	0.022
	alpinetin	1.538	1.393	1.623	1.590	1.548	1.365	1.509
	pinocembrin	2.115	2.096	2.223	2.139	2.078	1.949	2.100
	cardamonin	0.386	0.376	0.409	0.392	0.386	0.314	0.377
	pinostrobin	6.161	6.252	6.304	6.285	6.308	5.826	6.189

ตาราง ก.9 ความเข้มข้น normalization ของสารในกระชายเหลือง 2 ส่วน จากแต่ละจังหวัด

ส่วน	จังหวัด	ความเข้มข้น normalization (%)					
		phenylalanine	cinnamic acid	alpinetin	pinocembrin	cardamonin	pinostrobin
เหง้า	นครปฐม	1.864	0.238	22.156	33.118	7.830	34.794
	พิษณุโลก	2.434	0.369	20.809	28.122	9.159	39.107
	เพชรบูรณ์	2.131	0.450	29.907	37.835	8.995	20.683
	ระนอง	0.741	0.251	22.650	29.367	4.498	42.494
ราก	นครปฐม	0.640	0.301	14.554	22.733	5.371	56.401
	พิษณุโลก	1.188	0.395	12.857	19.153	6.646	59.761
	เพชรบูรณ์	0.623	0.458	24.793	44.916	6.114	23.096
	ระนอง	0.274	0.220	14.748	20.533	3.685	60.540

ตาราง ก.10 พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ยและอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกเฉลี่ยของสารในกระชายเหลืองที่สกัดด้วยสารละลายต่าง ๆ (n = 3)

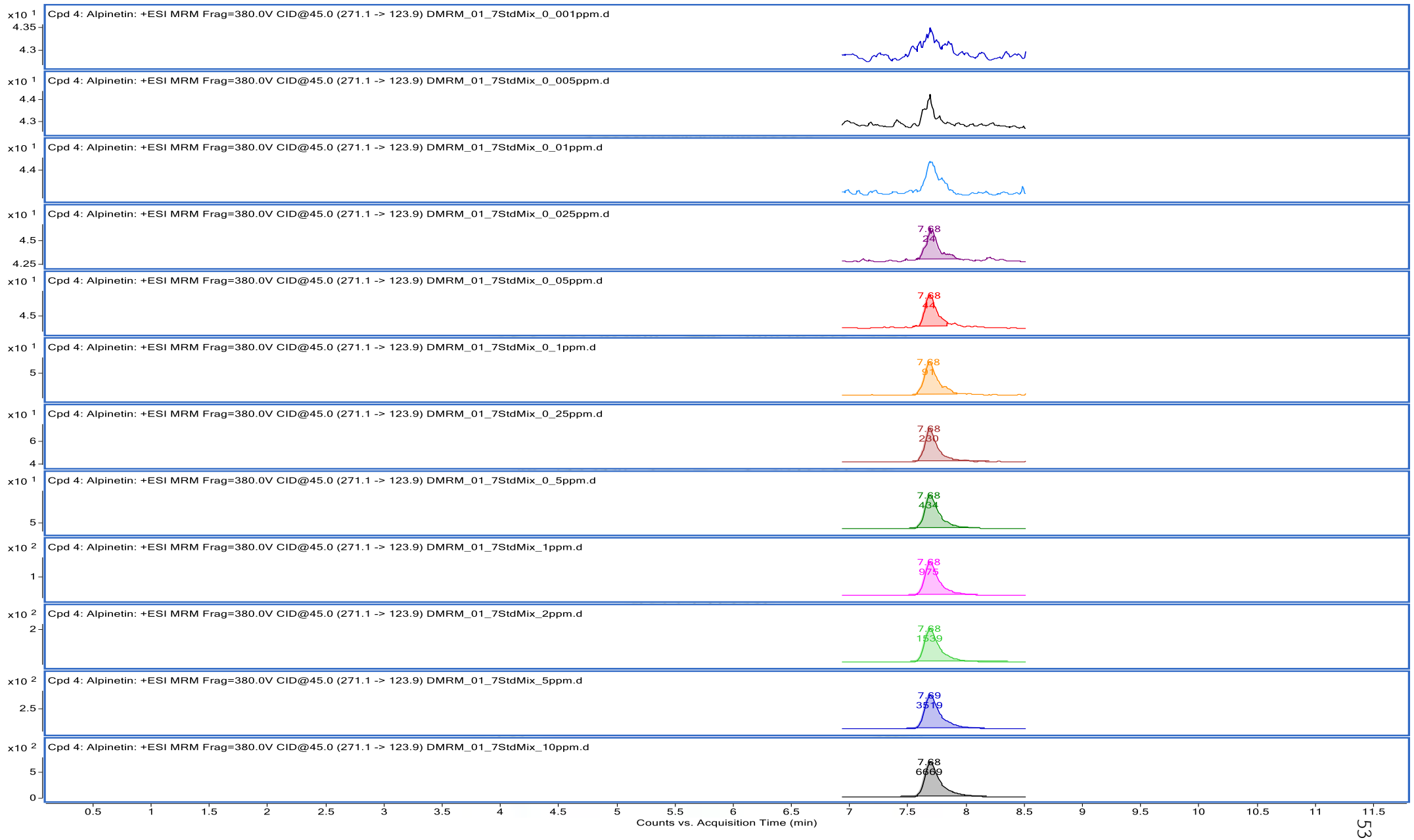
ส่วนที่ใช้	ชื่อสาร	average peak area			average area ratio		
		H_2O	50/50 MeOH/H_2O	MeOH	H_2O	50/50 MeOH/H_2O	MeOH
เหง้า	phenylalanine	21000	19087	15695	0.4802	0.4305	0.3506
	cinnamic acid	590	232	196	0.0136	0.0052	0.0044
	alpinetin	1276	2432	4577	0.0291	0.0549	0.1026
	pinocembrin	2066	5720	12508	0.0471	0.1293	0.2804
	cardamonin	131	988	3880	0.0030	0.0223	0.0869
	pinostrobin	3916	24328	54507	0.0893	0.5488	1.2220
	IS	43817	44357	45056	1.0000	1.0000	1.0000
ราก	phenylalanine	4672	3566	3227	0.1047	0.0793	0.0714
	cinnamic acid	159	110	99	0.0036	0.0024	0.0023
	alpinetin	798	1158	1672	0.0179	0.0258	0.0370
	pinocembrin	1346	2783	4493	0.0302	0.0619	0.0996
	cardamonin	70	475	1162	0.0016	0.0106	0.0257
	pinostrobin	2578	16143	29440	0.0579	0.3588	0.6514
	IS	44840	44970	45350	1.0000	1.0000	1.0000

ภาคผนวก ข

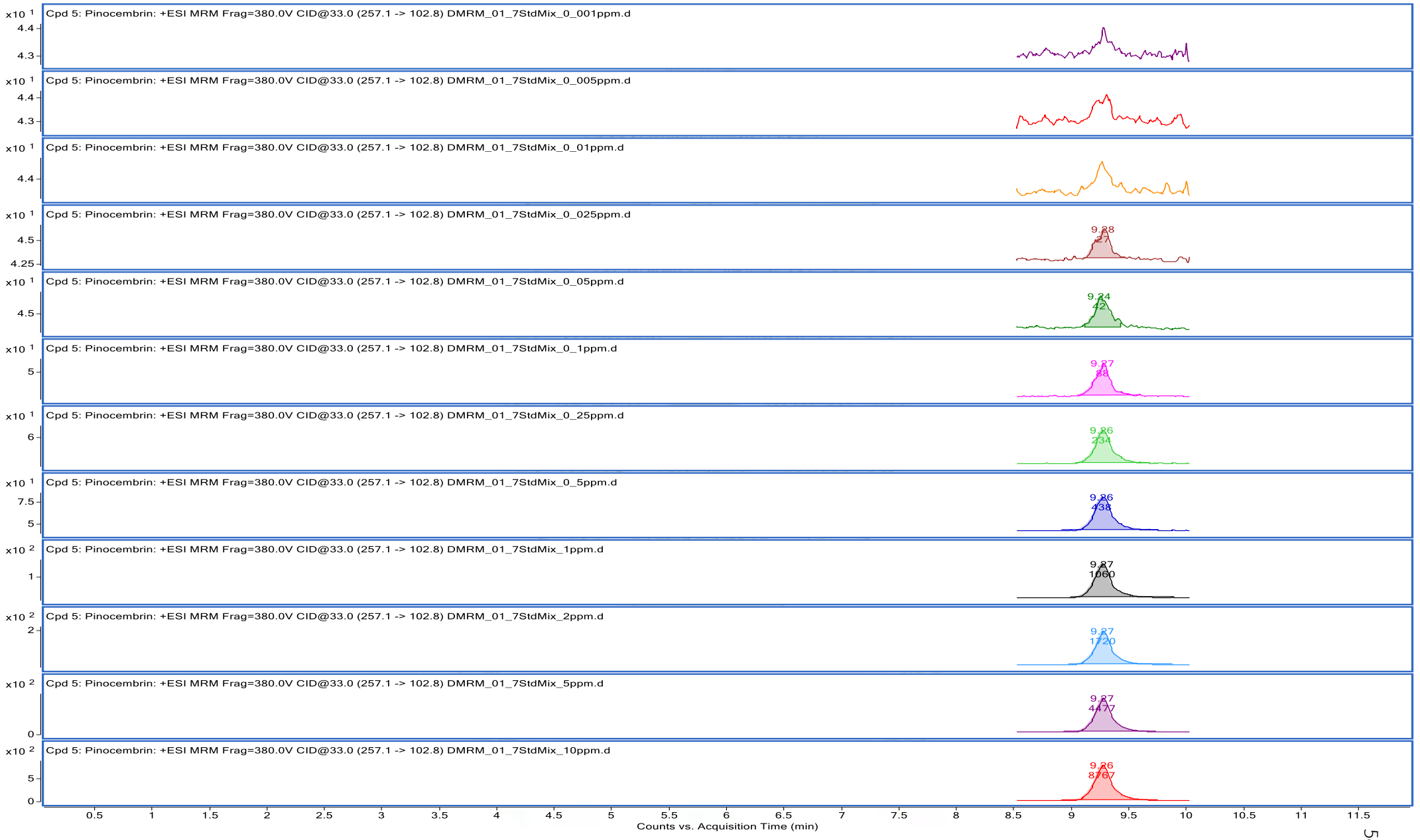
รูป ข.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน phenylalanine โดย product ion m/z = 119.9 ความเข้มข้น 0.001 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูป ข.2 โครมาโทแกรมของสารละลาย internal standard โดย product ion m/z = 76.9 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

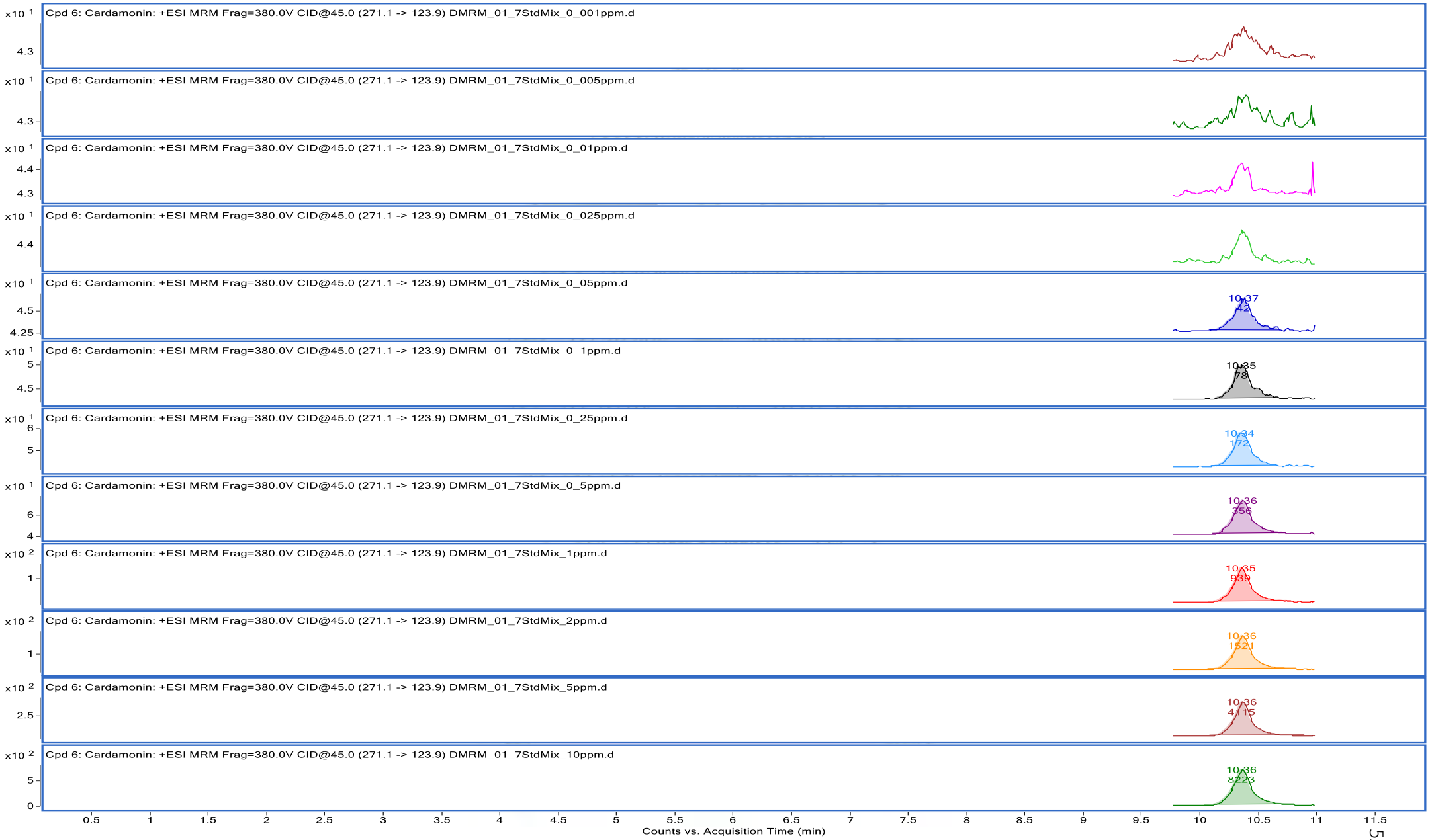
รูป ข.3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน cinnamic acid โดย product ion m/z = 76.9 ความเข้มข้น 0.001 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูป ข.4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน alpinetin โดย product ion m/z = 123.9 ความเข้มข้น 0.001 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

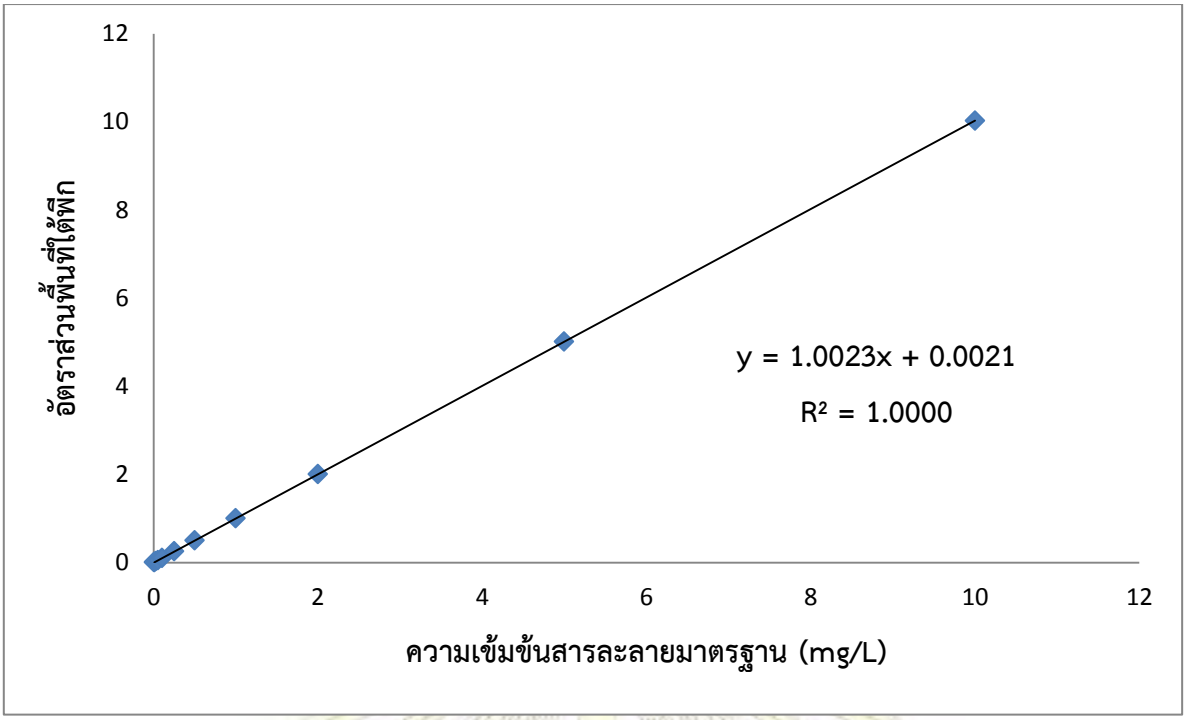


รูป ข.5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน pinocembrin โดย product ion m/z = 102.8 ความเข้มข้น 0.001 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

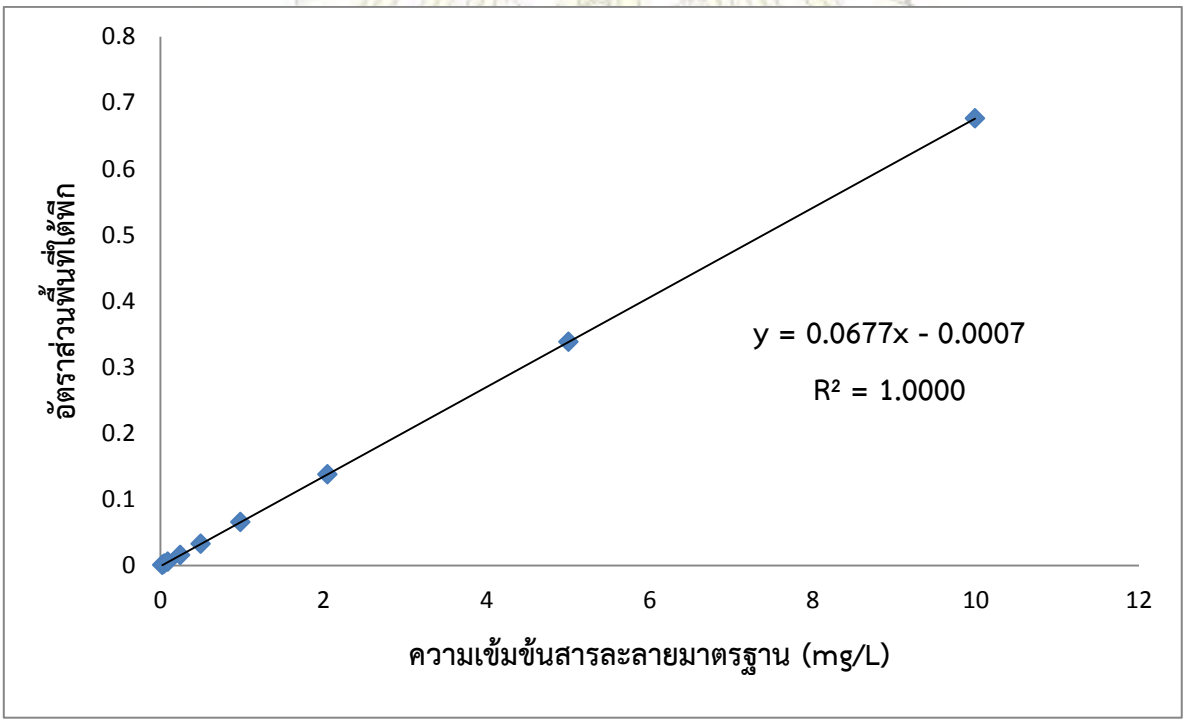


รูป ข.6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน cardamonin โดย product ion m/z = 123.9 ความเข้มข้น 0.001 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

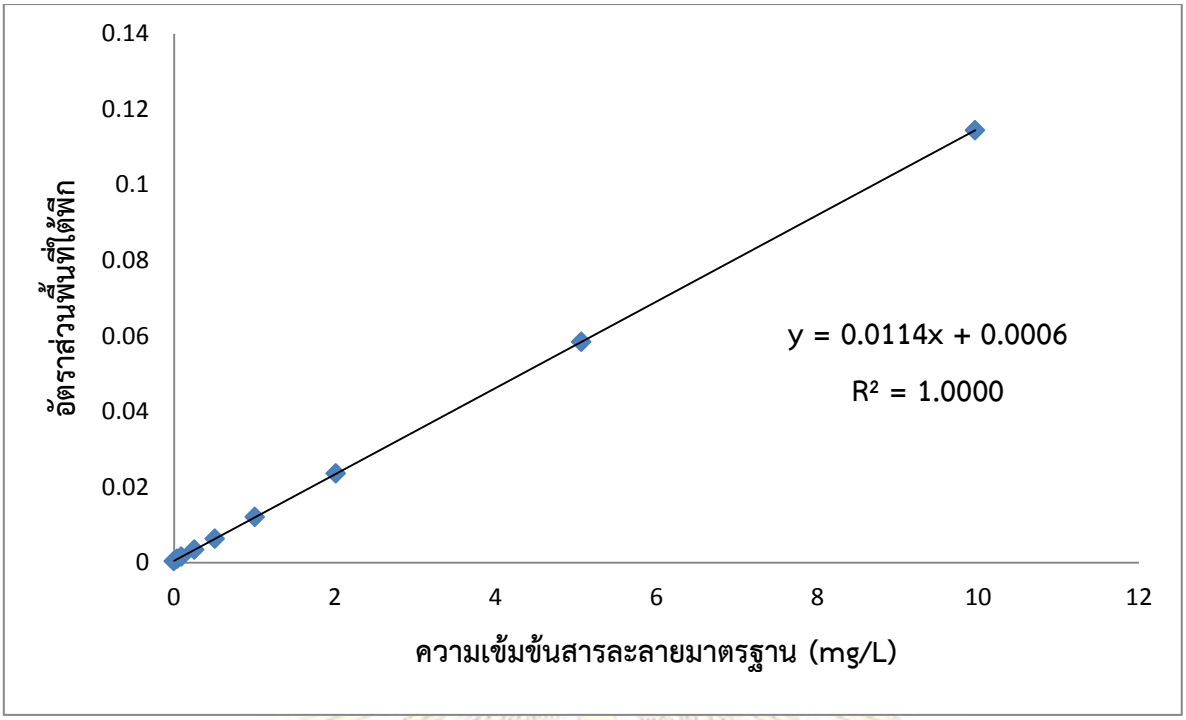
รูป ข.7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน pinostrobin โดย product ion m/z = 103.0 ความเข้มข้น 0.001 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตร



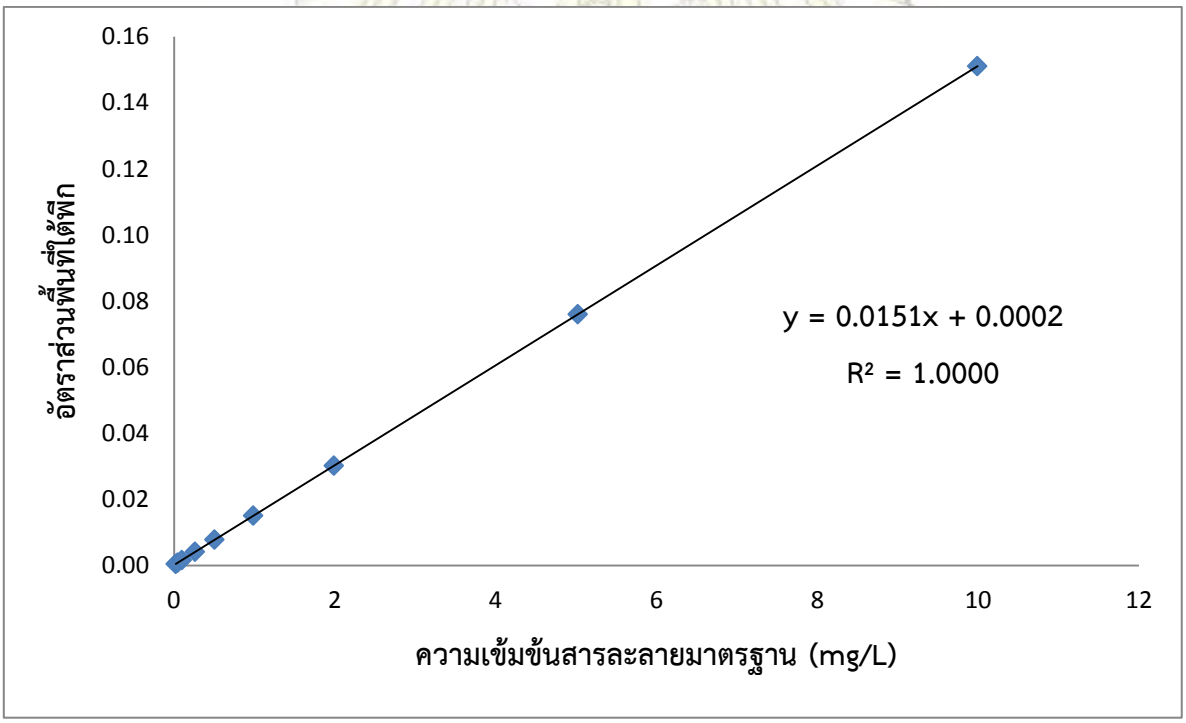
รูป ข.8 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน phenylalanine



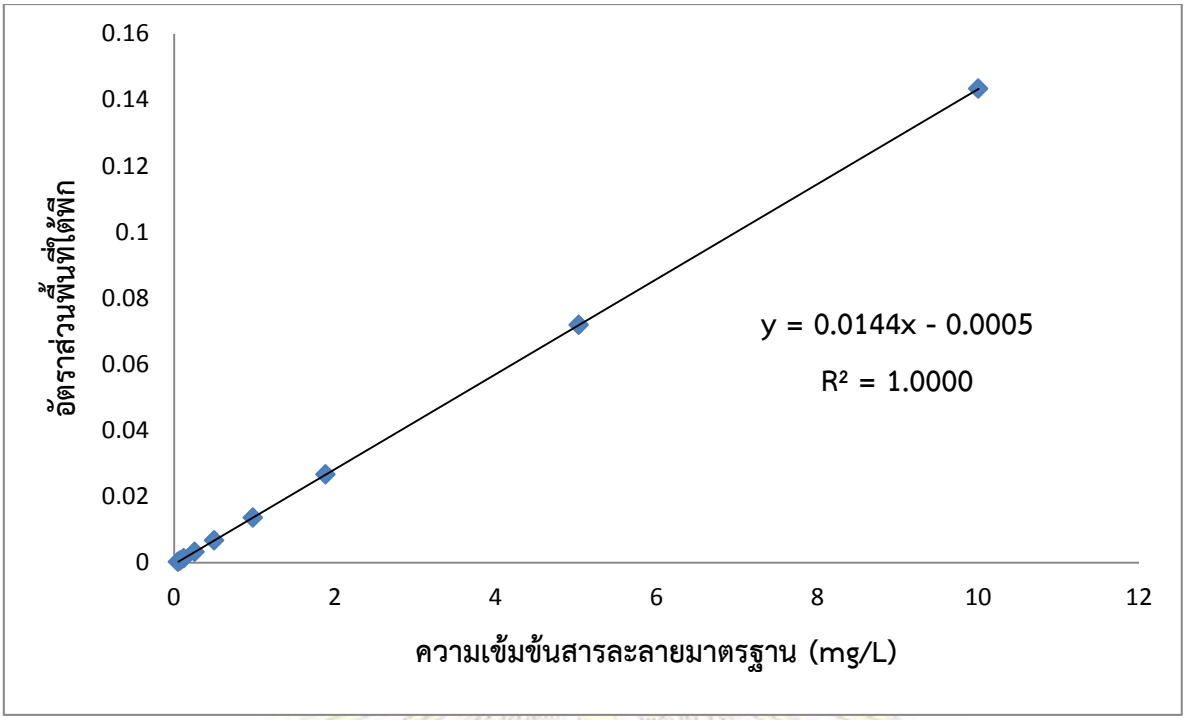
รูป ข.9 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน cinnamic acid



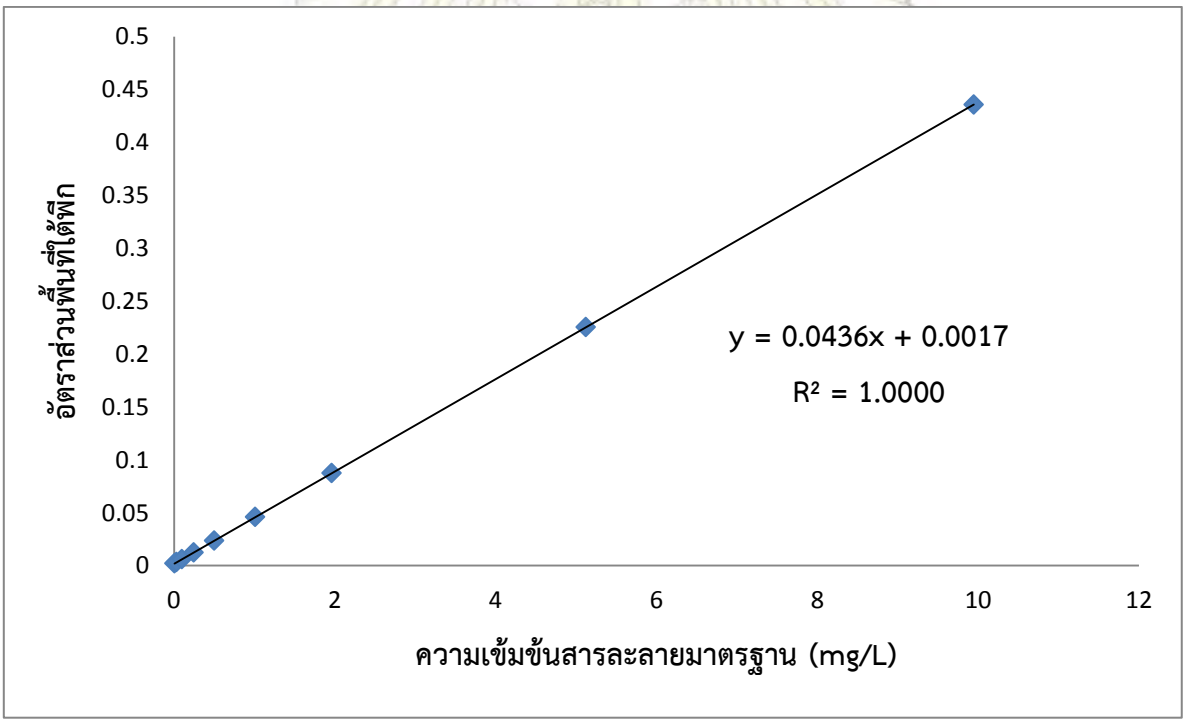
รูป ข.10 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน alpinetin



รูป ข.11 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน pinocembrin



รูป ข.12 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน cardamonin



รูป ข.13 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน pinostrobin

ประวัติผู้วิจัย

นายณัฐกิตติ์ ชื่นชูธรรม เกิดเมื่อวันที่ 27 เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2537 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนทวีธาภิเศก จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2555 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 81 ซอยประชาธิปก 2 แขวงวัดกัลยาณ์ เขตธนบุรี จังหวัดกรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10600 อีเมล nattakit1234@hotmail.com