การแยกและการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก (Ferulic acid) ในข้าวกล้องงอก ด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Isolation and Determination of Ferulic acid in Germinate brown rice by HPLC

กัญญา มงคลโภชน์ E-mail kmkanya@kmitl.ac.th

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในข้าวกล้องงอกด้วยการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย องค์ประกอบของกรดเฟอร์รูลิกจะถูกแยกด้วยระบบ HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวี ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ใช้คอลัมน์ HiQSil C_{18} HS อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโทไนไทรล์ : กรดอะซิติก 2 % 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที จากกราฟมาตรฐานช่วงความเข้มข้น 10-50 ppm ได้สมการเชิงเส้นและสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของกราฟมาตรฐานเป็นดังนี้ y = 67028x+24831 R^2 = 0.9993 ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ข้าวกล้องงอกพันธุ์ดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง และเสาไห้ คือ 14.73 13.74 และ 14.67 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ การวิเคราะห์เชิงปริมาณกรดเฟอร์รูลิกโดยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐาน (External Standard Method) และการวิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน (Standard Addition Method)ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจที่ 99 %*(P<0.01)*

คำสำคัญ : ข้าวกล้องงอก, กรดเฟอร์รูลิก, HPLC

Abstract

This methods are studies content ferulic acid in Germinated Brown Rice was extracted with ethyl acetate. Ferulic acid components were separated by isocratic reverse phase HPLC and quantified with a Turnable Absorbance detector at 310 nm. Separation performed Stationary phase on HiQSil C_{18} HS column. Mobile phase were used Acetronitrile : 2% Acetic acid 15 :85 (v/v) at flow rate 1.0 mL/min. The standard calibration curve obtained at range was 10-50 ppm. The linear regression equation and Coefficient of Determination at calibration curve was y = 67028x+24831 R^2 = 0.9993. The mean content ferulic acid in Dawk-Mali 105, Red Jasmine and Sao Hai Germinated Brown Rice were 14.725 13.739 and 14.669 mg/100 g, respectively. In quantitative analysis of total ferulic acid between the external standard method and standard addition method do not give significantly different value at 99 % *(P<0.01)* confidence interval.

Keyword (S) : Germinated Brown Rice, Ferulic acid, HPLC

บทนำ

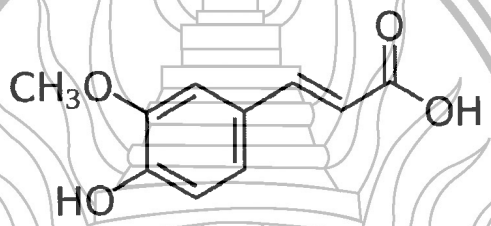
ข้าวกล้องงอก (germinate brown rice : GBR) คือข้าวกล้องที่ผ่านกระบวนการงอกในระยะเวลาสั้นๆ โดยนำข้าวกล้องมาแช่น้ำในระดับอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมประมาณ 30-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22-24 ชั่วโมง จนส่วนของจมูกข้าวงอกมีความยาวประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร แล้วจึงนำไปลดความชื้น โดยเมล็ดธัญพืชงอก เช่น ข้าวบาเลย์

ข้าวสาลี และข้าวจ้าว จะสร้างเอนไซม์ hydrolytic ย่อยสลายแป้ง โพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้งและโปรตีน ทำให้มีโอลิโกแซคคาไรด์และกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น ซึ่งจะช่วยให้ข้าวกล้องงอกหุงง่ายขึ้น มีรสชาติดีขึ้น เนื้อสัมผัสนุ่มและมีสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเพิ่มขึ้น (Ohtsubo *et al.*, 2005)

กรดเฟอร์รูลิก (Ferulic acid) เป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทสารประกอบฟีนอล พบในผนังเซลล์โดยจะอยู่ร่วมกับสารประกอบลิกโนเซลลูโลส ซึ่งช่วยให้ผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรง

สมบัติทางเคมีของกรดเฟอร์รูลิก

กรดเฟอร์รูลิก มีชื่อ IUPAC คือ E-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl) prop-2-enoic acid มีสูตรเคมีคือ $C_{10}H_{10}O_4$ มีมวลโมเลกุล 194.184 g/mol การละลายของกรดเฟอร์รูลิกสามารถละลายได้ดีในเมทานอล เอทานอล และไดเอทิลพทาเลท แต่ไม่ละลายในเบนซีน มีจุดหลอมเหลวที่ 168-172 °C (Wikipedia, 2011)



รูปที่ 1 โครงสร้างของกรดเฟอร์รูลิก

คุณสมบัติที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของกรดเฟอร์รูลิก

เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลดพลาสมาโคเลสเตอรอล (Kayahara, 2004) ลดการดูดซับโคเลสเตอรอลในร่างกาย ระงับกระบวนการสร้างเม็ดสี (Kayahara and Tsukahara, 2000) การประยุกต์ใช้แก้โรคเบาหวาน ป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็ง การเสื่อมของกระดูกของผู้อยู่ในสภาวะหมดประจำเดือน และความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน ในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก เพื่อนำสารสกัดที่ได้นำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอุตสาหกรรมอื่น ดังนั้นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือความเที่ยงและความแม่นยำของการวิเคราะห์เพื่อให้ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง(HPLC) เป็นเทคนิคที่ให้ความแม่นยำสูงในการวิเคราะห์ด้วยคุณสมบัติที่กล่าวมา ผู้วิจัยจึงได้นำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิจัยครั้งนี้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกและสกัดสารประกอบฟีนอลกรดเฟอร์รูลิก ในตัวอย่างข้าวกล้องงอก
2. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารกรดเฟอร์รูลิก โดยวิธี HPLC แล้วสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอื่นได้

วิธีการวิจัย

1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1.1 การเตรียมสต๊อกสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก 100 mg/L ชั่งกรดเฟอร์รูลิก 0.01 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายในเมทา นอลเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตรเก็บในภาชนะทึบแสงและเก็บไว้ในตู้เย็น

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก 10, 20, 30, 40 และ 50 mg/L ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก 100 mg/L มา 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตรเก็บในภาชนะทึบแสง โดยเก็บไว้ในตู้เย็น

2. การสกัดกรดเฟอร์รูลิกจากตัวอย่างข้าวกล้องงอก (Ohtsubo *et al.*, 2005) ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของข้าวกล้องงอกประมาณ 2 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ นำไปปั่นกวนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องปั่นกวนยี่ห้อ IKA® รุ่น C-MAG HS7 ประเทศเยอรมัน ด้วยสารละลายเฮกเซน ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นาน 2 ชั่วโมง กรองสารละลายออก นำข้าวมาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 mol/L ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปั่นกวนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำส่วนที่ได้ปรับ pH ให้เป็น 2 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 mol/L นำมาสกัดด้วยเอทิล แอซิเตท ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ซ้ำ 3 ครั้ง เก็บส่วนบนที่สกัดได้มาระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนยี่ห้อ EYELA รุ่น SB-651 ประเทศญี่ปุ่น เมื่อตัวทำละลายที่ใช้สกัดระเหยหมดนำมาละลายด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง Nylon ขนาด 0.45 µm เก็บใส่ขวด Vial ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก ด้วยเทคนิค HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ เตรียมสารละลายอะซิโทไนไทรล์และสารละลายกรดแอซิติกเข้มข้น 2% ที่อัตราส่วน 10 : 90 และ 15 : 85 และ 20 :80 ปริมาตรโดยปริมาตร เพื่อใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ แล้วนำสารละลายที่เตรียมได้ไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ จากนั้นนำไปไล่อากาศที่ละลายอยู่ด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที เพื่อกำจัดออกซิเจนที่อาจทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ จึงจะนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกโดยใช้ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

3.1 ศึกษาหาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ ทดสอบหาสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายอะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% ที่อัตราส่วน 10 : 90 และ15 : 85 และ 20 :80 ปริมาตรโดยปริมาตร ด้วยคอลัมน์ C-18 5.0 ไมโครเมตร 4.6 x 150 มิลลิเมตร โดยใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมต

3.2 ศึกษาหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ นำสารละลายอะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% ที่ได้จากการทดสอบขั้นต้นข้อ 3.1 มาทดสอบหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยทดสอบอัตราการไหลที่ 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร จากนั้นเลือกสภาวะที่ให้การแยกที่ดีที่สุดมาใช้ในการวิเคราะห์กรดเฟอร์รูลิก

4. ประเมินผลทดสอบทางความใช้ได้ของวิธี

4.1 การทำกราฟมาตรฐาน ฉีดสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกที่ความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้คือ ช่วง 10-50mg/L ปริมาตร 10 ไมโครลิตรเข้าสู่ระบบ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโทไนไทรล์ : สารละลายกรดแอซิติกเข้มข้น 2% ทำการตรวจวัดที่สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.2 ซึ่งตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูลิก ดูช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟ หาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) และขีดจำกัดการตรวจวัดของกรดเฟอร์รูลิกจากกราฟมาตรฐาน

4.2 การศึกษาความเที่ยง (Precission) การนำสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกที่ความเข้มข้น 100 mg/L นำมาตรวจวัดซ้ำ 5ครั้ง ในช่วงเวลาต่างกัน ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโทไนไทรล์ : สารละลายกรดแอซิติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร แล้วคำนวณหา % Relative Standard Deviation (% RSD)

4.3 การศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ ศึกษาโดยการตรวจวัดปริมาณกรดเฟอร์รูลิกด้วยวิธี spiked sample เตรียมตัวอย่างสอง

ชุดการทดลองโดยชุดการทดลองแรกเติมสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ชุดการทดลองที่สองไม่ต้องเติมสารละลายมาตรฐาน ทำการสกัดตามข้อ 2 คำนวณหาร้อยละของการคืนกลับ (% recovery)

% recovery = (ความเข้มข้นของ spiked sample - ความเข้มข้นของตัวอย่าง)/ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป

5. การวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก ตัวอย่างข้าวกล้องงอกและข้าวกล้องนำมาศึกษา 3พันธุ์ คือ ข้าวดอกมะลิ 105 ข้าวหอมมะลิแดง และข้าวเสาไห้ ใช้วิธีการสกัด การเตรียมเป็นสารละลาย และการวิเคราะห์เช่นเดียวกันในทุกพันธุ์ตามข้อ 2

5.1 การวิเคราะห์โดยเทคนิค External standard นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 2 มาตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ซึ่ง HPLC ยี่ห้อ Waters รุ่น 486 ประเทศเยอรมัน ที่สภาวะเหมาะสมจากการศึกษาข้อ 3 ใช้ปริมาตรที่ฉีดวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร วิเคราะห์ผลที่ได้และเทียบหาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่ได้จาก 4.1

5.2 การวิเคราะห์โดยเทคนิค Standard addition

1. ปิเปตสารตัวอย่างจากข้อ 2 มา ปริมาตรละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตรจำนวน 4 ขวดวัดปริมาตร

2. เติมสารละลายมาตรฐาน 100 mg/L ลงไป 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรใบที่ 2-4 ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของกรดเฟอร์รูลิกที่เติมลงในขวดใบที่ 2-4 เท่ากับ 2 4 และ 6 mg/L ตามลำดับ

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตามสภาวะที่ได้จากการศึกษาข้อ 3 คือเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร ฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก

4. คำนวณหาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก

ผลการทดลอง

1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก ด้วยเทคนิค HPLC ที่มีตัวตรวจวัดเป็นยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์

1.1 ศึกษาหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

ศึกษาหาอัตราการไหลที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก โดยใช้สัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่สารละลายอะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร

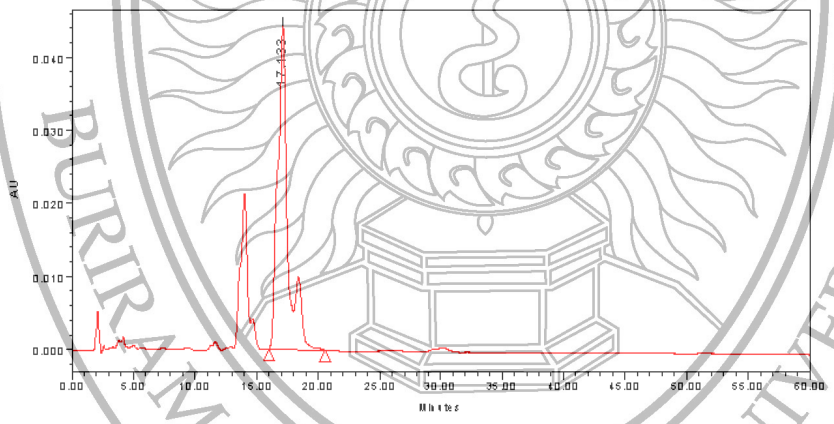
จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้สารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกทดสอบหาอัตราการไหลที่ 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก คือ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งเป็นอัตราการไหลที่เหมาะสมเนื่องจากมีเวลารีเทนชันเร็วกว่าอัตราการไหลที่ 0.6 และ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ดังตารางที่ 1

ตาราง 1 ค่าเวลารีเทนชัน (Retention time) ในการแยกสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกที่อัตราส่วนต่าง ๆ

อัตราส่วนของสารละลาย อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% (ปริมาตรโดยปริมาตร)	อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	เวลารีเทนชัน (นาที)
15 : 85	0.6	28.309
15 : 85	0.8	21.142
15 : 85	1.0	17.184

1.2 ศึกษาหาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่

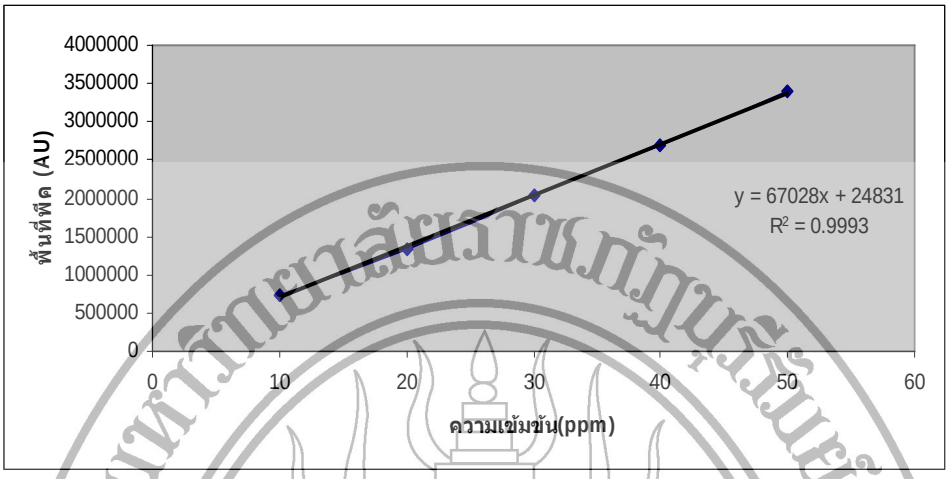
จากการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการแยกสารละลายตัวอย่างคือ อัตราส่วน อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร จากในรูปที่ 2 ได้ผลการแยกที่เวลารีเทนชันที่ (Tr) 17.133 โดยอัตราส่วน 10 : 90 เมื่อทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างจะถูกชะออกจากคอลัมน์เร็วทำให้การแยกสารตัวอย่างไม่ดี (Tr= 15.52 นาที) และอัตราส่วน 20 : 80 เมื่อทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างจะถูกชะออกจากคอลัมน์เร็วทำให้เกิดการแยกที่ไม่สมบูรณ์ (Tr= 9.41 นาที) ลักษณะดังกล่าวเกิดจากการเคลื่อนที่ยังไม่เหมาะสมเพียงพอ



รูปที่ 2 แสดงโครมาโทแกรมของกรดเฟอร์รูลิกตัวอย่างข้าวดอกมะลิ 105 กล้องงอก โดยเฟสเคลื่อนที่อะซิโทไนไทรล์ : แอซิติกเข้มข้น2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

2. การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก

นำสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 1 มาสร้างกราฟมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกโดยทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้น 10-50 mg/L ในเฟสเคลื่อนที่อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดเฟอร์รูลิก ช่วงความเข้มข้น 10-50 mg/L

จากกราฟสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก รูปที่ 2 คำนวณค่าสัมประสิทธิการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9993 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้

3. ศึกษาความเที่ยง (Precission) ของวิธีวิเคราะห์ ศึกษาโดยการนำสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกเข้มข้น 100 mg/L ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น 2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ซ้ำ 5 ครั้ง ได้ค่า 99.37, 98.03, 99.09, 100.48 และ 101.60 mg/L % RSD เท่ากับ 1.37 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (% RSD ไม่ควรเกินร้อยละ 2.0)

4. ศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ ศึกษาโดยการตรวจวัดปริมาณกรดเฟอร์รูลิกด้วยวิธี spiked sample คำนวณร้อยละการคืนกลับ (% recovery) 98 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (% recovery จะต้องอยู่ระหว่าง 85-115 %)

5. การวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก

5.1 การวิเคราะห์โดยเทคนิคการสร้างกราฟมาตรฐาน (External Standard Method) นำตัวอย่างข้าวกล้องงอกที่ผ่านการสกัดตามหัวข้อ 2 ที่สภาวะการทดลองที่ใช้เฟสเคลื่อนที่อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ปริมาตรในการฉีดวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลที่ได้เทียบหาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกจากกราฟมาตรฐาน โดยการฉีดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (n = 3)

ตาราง 2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกด้วยเทคนิค External Standard Method

ตัวอย่าง ข้าว	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกเฉลี่ย (มิลลิกรัม/ตัวอย่าง100 กรัม)
ดอกมะลิ 105	14.73
หอมมะลิแดง	13.74
เสาไห้	14.67

5.2 การวิเคราะห์โดยเทคนิคการเติมสารมาตรฐาน (Standard Addition Method)

นำสารละลายที่เตรียมได้จากหัวข้อ 5.2 ที่สภาวะการทดลองที่ใช้เฟสเคลื่อนที่อะซิโทไนไทรล์ : กรดแอซิติกเข้มข้น2% 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตร และอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร วัดพื้นที่พีคและเขียนกราฟระหว่างพื้นที่พีคกับปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงไปในปริมาณต่างๆ เพื่อหาปริมาณของกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก

ตาราง 3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกทั้ง 2วิธี

ตัวอย่าง ข้าวกล้องงอก	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก	
	External Standard Method	Standard Addition Method
ดอกมะลิ 105	14.04±0.09	16.36±0.03
หอมมะลิแดง	16.00±0.24	20.51±0.62
เสาไห้	15.06±0.82	16.36±0.03

นำผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอกไปทดสอบโดยทั้ง2 วิธี เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างวิธีวิเคราะห์ แสดงผลดังตารางที่ 4

ตาราง 4 ผลการวิเคราะห์ t-test ในตัวอย่างข้าวกล้องงอก ที่ระดับความมั่นใจ 99%*(P<0.01)*

ตัวอย่าง ข้าวกล้องงอก	ปริมาณกรดเฟอร์รูลิก (มิลลิกรัม/100กรัม)					
	External Standard			Standard Addition		
	Mean	SD	%RSD	Mean	SD	%RSD
ดอกมะลิ 105	14.04	0.09	0.62	16.36	0.03	0.18
หอมมะลิแดง	16.00	0.24	1.53	20.51	0.62	3.0
เสาไห้	15.06	0.82	5.47	16.36	0.03	0.18

จากผลการคำนวณ t-test ที่คำนวณได้ (t_{cal}) น้อยกว่าค่า จากตาราง (t_{table}) แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก ทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจ 99% % *(P<0.01)*

สรุปผลการวิจัย

สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกด้วยเทคนิค HPLC คือ ใช้เฟสเคลื่อนที่ สารละลายอะซิโทไนไทรล์ : กรดอะซิติกเข้มข้น 2 % 15 : 85 ปริมาตรโดยปริมาตรอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ทำให้กรดเฟอร์รูลิกมีเวลาอยู่ในคอลัมน์นานเพียงพอที่จะทำให้การแยกวิเคราะห์เป็นไปอย่างสมบูรณ์ (t_R = 17นาที) การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกในช่วงความเข้มข้น 10-50 mg/L มีสมการเชิงเส้น y = 67028x + 24831 และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของกราฟมาตรฐาน เท่ากับ 0.9993 พบว่าปริมาณกรดเฟอร์รูลิกต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้(LOD) เท่ากับ 1.4995 mg/L และปริมาณกรดเฟอร์รูลิกต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้(LOQ) เท่ากับ 4.9985 mg/L

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกในตัวอย่างข้าวกล้องงอก 3 สายพันธุ์ คือ ดอกมะลิ105 หอมมะลิแดง และเสาไห้ โดยเทคนิคสร้างการสร้างกราฟมาตรฐาน (External Standard Method) พบปริมาณกรดเฟอร์รูลิกของข้าวกล้องงอกพันธุ์ ดอกมะลิ105 หอมมะลิแดง และเสาไห้ คือ 14.73 13.74 และ 14.67 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง100 กรัม ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกโดยเทคนิคสร้างการสร้างกราฟมาตรฐาน และ เทคนิคการเติมสารมาตรฐาน นำไปทดสอบโดยวิธี t-test โดยการคำนวณ t-test ซึ่งค่า t_c ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่า t จากตาราง แสดงว่าแต่ละวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิกไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจที่ 99 % *(P<0.01)*

ข้อเสนอแนะ

1.ควรทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดเฟอร์รูลิก โดยวิธี HPLC ก่อนเพื่อช่วยประหยัดเวลาเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดเฟอร์รูลิก ในตัวอย่างข้าวกล้องงอก

2.ปริมาณกรดเฟอร์รูลิกที่สกัดได้จากข้าวกล้องงอก อาจนำไปทำให้บริสุทธิ์เพื่อสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ หรืออุตสาหกรรมอื่นได้

เอกสารอ้างอิง

Kayahara, H. (2004). **Germinated Brown Rice**. Department of Sciences of Functional Foods. Shinshu University, Japan.

Kayahara, H., & Tsukahara, K. (2000). **Flavor,health, and nutrition quality of pre-germinated brown rice**. International Chemical Congress of Pacific Basin Societies in Hawaii.

Ohtsubo, K., Suzuki, K., Yasui, Y., & Kasumi, T. (2005). Bio-functional components in the processed pre-germinated brown rice by a twin-screw extruder. **Journal of Food Composition and Analysis**, 18, 303-316.

Wikipedia. (2011). **Ferulic acid** . Retrieved July 10,2011. from http://en.wikipedia.org.wiki/ferulic _acid