ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์คุณภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน (Pearson, 1981)

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย indigo carmine ละลาย indigo carmine 1.5 กรัมในน้ำ 1 ลิตร ที่มีกรดกำมะถันเข้มข้นละลายอยู่ 50 มิลลิลิตร สารละลายนี้ 25 มิลลิลตร จะทำปฏิกิริยาโดยการไตรชั่นพอดีได้สีชมพูอ่อน กับสรละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต ความเข้มข้น 0.008 โมล่าร์ จำนวน 4 มิลลิลิตร (ตรวจสอบความเข้มข้นของสารละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาแนตโดยการไตรเตรตกับกรดออกซาลิค)
2. สารละลายเจลาติน 25 กรัม แช่ไว้ในสารละลายเกลือแกงที่อิ่มตัวนาน 1 ชั่วโมง อุ่นจนกระทั่งเจลาตินละลาย ทำให้เย็นแล้วปรับปริมาตรสารละลายเจลาตินให้ครบ 1 ลิตรด้วยสารละลายเกลือแกงที่อิ่มตัว
3. สารละลาย acid sodium chloride เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 25 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเกลือแกงที่อิ่มตัว 975 มิลลิลิตร

วิธีการคำนวณ

ปริมาตรสารละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ใช้ในการไตเตรชั่นกับแทนนิน = (A - 4.0) – (B - 4.5)

4.0 และ 4.5 เป็นค่า blank ของสารละลาย A และ B ตามลำดับ คำนวณหาปริมาณแทนนินต่อน้ำหนักแห้งโดย

1 มิลลิลิตร สารละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต ความเข้มข้น 0.008 โมลาร์ ทำปฏิกิริยาสมมูลย์พอดีกับแทนนิน 0.001664 กรัม

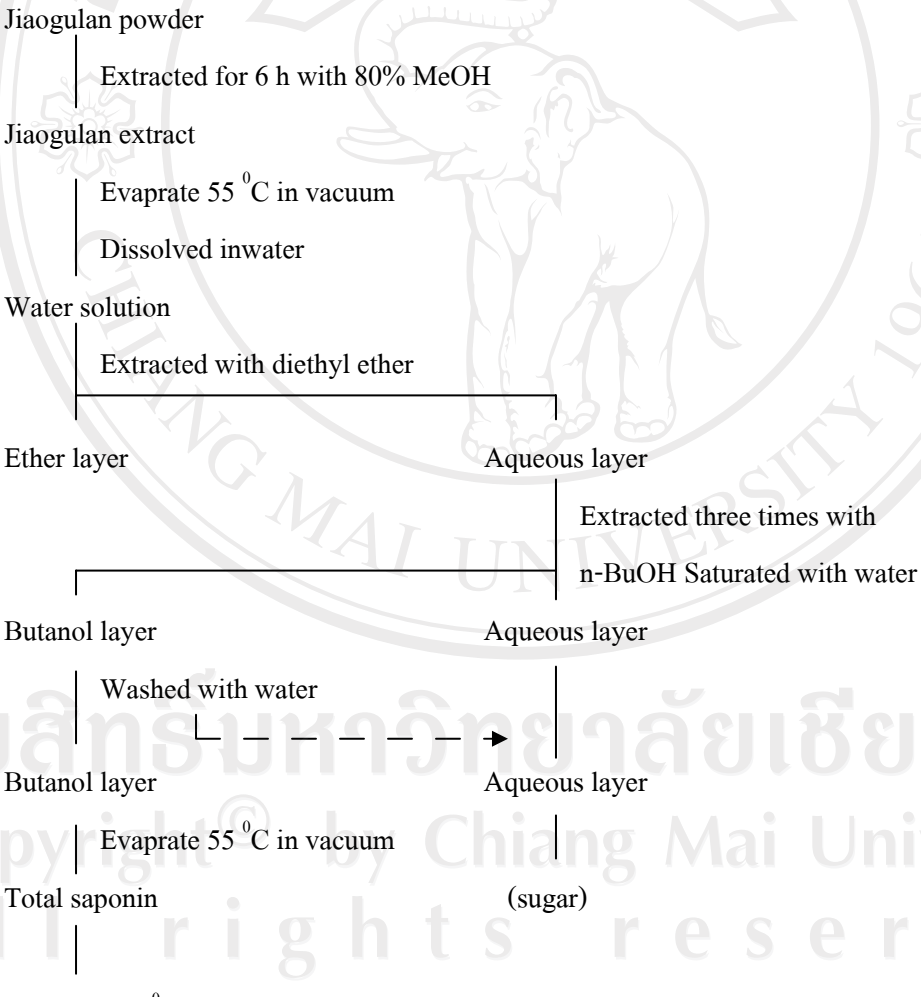
หมายเหตุ ในการวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน ควรลดสัดส่วนของชาตัวอย่าง และสารเคมีที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนลงเหลือ 5:1 เพื่อเป็นการประหยัดสารเคมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณ yield

ชั่งผงสมุนไพรจำนวน 10 กรัม ลงในบีกเกอร์เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แบ่งสารสกัดที่ได้ มา 20 มิลลิลิตร นำไประเหยให้แห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 ^{0}C จนมีน้ำหนักที่คงที่จึงนำไปคำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณสารสกัด

การวิเคราะห์ปริมาณซาโปนินทั้งหมด (ดัดแปลงจากสถาบันวิจัยสมุนไพร, 2538 และ Kwon *et al*., 2003)

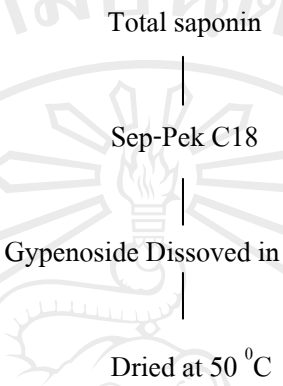


ภาพผนวก ก-1 การวิเคราะห์ปริมาณซาโปนินทั้งหมด

(**ที่มา :** ดัดแปลงจากสถาบันวิจัยสมุนไพร, 2538 และ Kwon *et al*., 2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณจีเพนโนไซด์ทั้งหมด (ดัดแปลงจากสถาบันวิจัยสมุนไพร, 2538 และ Kwon *et al*., 2003)



ภาพผนวก ก-2 การวิเคราะห์ปริมาณจีเพนโนไซด์ทั้งหมดทั้งหมด
(**ที่มา :** ดัดแปลงจากสถาบันวิจัยสมุนไพร, 2538)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์จินเซนโนไซด์ Rb1 ด้วย HPLC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ซาโปนิน ในเจียวกู้หลานโดย High performance Liquid Chromatography (HPLC) (ดัดแปลงจาก Wu *et al*., 2001)

ชั่งผงสมุนไพรจำนวน 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ แล้วเติม 80% เมทานอล จำนวน 200 มิลลิลิตร สกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดนำมาระเหยที่ 55 ^{0}C เพื่อระเหยเอาเมทานอลออก จากนั้นนำสารสกัดมาสกัดไขมันออกด้วย diethyl ether หลังจากการสกัดใช้กรวยแยก ether ออก ส่วนสารสกัดที่ได้นำมาสกัดด้วย n-BuOH saturated with water 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยที่อุณหภูมิ 55 ^{0}C ส่วนที่เหลือจากการระเหยนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร บรรจุลงใน Sep-Pak C-18 ล้างส่วนที่ไม่ต้องการใน Sep-Pak C-18 ออก ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร จากนั้นล้างด้วย 50% เมทานอล จำนวน 5 มิลลิลิตร และ 60% เมทานอล จำนวน 2 มิลลิลิตรตามลำดับ และในขั้นตอนสุดท้าย ให้ล้างด้วยเมทานอล100% จำนวน 3 มิลลิลิตร นำสารละลายเมทานอลที่ได้มาทำแห้งโดยวิธี Freez dry (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2538)

การเตรียมสารมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์ HPLC

ชั่งสารมาตรฐาน 0.0025 กรัม ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล HPLC grade เป็น 25 มิลลิลิตร เป็น stock 100 ppm จากนั้นเจือจางลงเป็น 20, 40 , 60 และ 80ppm

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ HPLC

ชั่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ 0.0040 กรัม ละลายในเมทานอล HPLC grade 1 มิลลิลิตร

วิธีการ ฉีดตัวอย่าง จำนวน 10 ไมโครลิตรเข้า Column Dimonsil18,5□m 250x4.6 mm และอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 1.5 มิลลิลิตร/นาที ใช้เวลาทั้งหมด 18 นาที โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็น gradient ที่เวลา 0-5นาที acetonitrile 30-45%, น้ำ 70-55% เวลา 5-10 นาที acetonitrile 45-60%, น้ำ 55-40% เวลา 10-12 cetonitrile 60%, น้ำ 40% เวลา 12-18 cetonitrile 30, น้ำ 70% ตรวจสอบโคมาโตแกรมโดยใช้ Photodiode-array multiwavelenght detector ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 203 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การเปิดเครื่องเตรียมวิเคราะห์ด้วย HPLC

1.1 เปิดปุ่ม power, เปิด degas

- ที่ pump ถ้าติดลบ กด back จนเจอ Zero Adj แล้ว Enter แล้วกด CE
- การ perge line เริ่มจาก หมุน drain valve ทวนเข็ม 180^0C
- กด Conc เพื่อเลือก line ที่จะ Perge เลือกที่ละ line แล้วกด Enter
- เมื่อ Perge เสร็จแล้วปิด Drain valve
- กด Func เพื่อปรับ flow rate ขึ้นครั้งละ 0.1 ml/min

1.2. เปิด Detector, System controller และ Computer

1.3. เข้าไปที่ Icon LC เลือก 1 คือ detecter PDA

1.4. File, open method ที่เราใช้

- Clickที่ insument on/off
- ดูที่ pump flow rate ต้องปรับเป็น 0 ก่อน ค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึง floe rate ที่เราใช้
- Detecter off
- ดูหน้าต่างอื่นให้เรียบร้อย
- กลับมาที่ Pump window เช็คให้เรียบร้อย แล้ว Click ที่ Download (ปรับ Flow rate ขึ้นแต่ละครั้งต้อง download)
- หลังจากนั้น feed mobile phase เข้า Column โดยเริ่มจาก acetonitile 100% แล้วค่อยๆลดความเข้มข้นลง เป็น acetonitile: น้ำ 30: 70
- Detecter on

1.5. รอจน base line คงที่ ล้างเข็มและ sample loop จนสะอาด หลังจากนั้นเริ่มฉีดตัวอย่าง

1.6. โดย Click ที่ icon single start ตั้งชื่อ Floder, OK

1.7. แล้ว inject (การฉีดตัวอย่างห้ามมีฟองอากาศ) และล้าง Sample loop ทุกครั้งด้วยเมทานอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การ Integrate Peak และการใส่ชื่อสาร

2.1 Click เลือก LC Quant. Browser ที่หน้า Assistant bar

2.2 Click ปุ่ม Select Browse folder เพื่อเข้าไปเลือก folder ของ Data file

2.3 Click เลือก folder ที่ Project folder select จะปรากฏ Data file ทีหน้า Project in

2.4 Click ที่ Layout และเลือก New Browsing File

2.5 Double click ซ้ายที่ Data file หรือ click ซ้ายที่ Data file ค้างไว้และลาก mount ไปด้านขวามือ แล้วปล่อย mount

2.6 Click ที่ Method เลือก Data Analysis Parameter

2.7 ที่หน้า Parameter Integration ปรับค่า Width, slope, Drift ตามความเหมาะสม

2.8 หน้า Parameter Identification ใส่ค่า ตามรูปด้านล่าง

2.9 หน้า Parameter Quantitative ใส่ค่าดังนี้

- Quantitative Method : External Standard
- Calibration Curve

# of Calib. Levels: ใส่จำนวนความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

Curve Fit Type: Linear (Calibration Curve เป็นเส้นตรง)

Zero: Force Through (Calibration Curve ผ่านศูนย์)

Unit: หน่วยความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

2.10 หน้า Parameter Performance ที่ Column Length: ใส่ความยาวของ Column แล้ว กด OK

2.11 Click Edit ที่หน้า Compound table View แล้วใส่ค่าในตารางดังนี้

Name : ใส่ชื่อของสาร

Ret. Time: ใส่เวลาของสาร (Retention time)

Conc. : ใส่ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ตามระดับความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก

2.12 Click View ที่หน้า Compound table View

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การสร้าง Calibration Curve ของสารมาตรฐาน

3.1 Click Modify Calibration Curve ที่หน้า Assistant bar

3.2 Click ที่ icon ของ Data File

3.3 ที่หน้า Project in Click ซ้ายที่ Data file ค้างไว้ และลาก mount ให้ปลายลูกศรอยู่ที่ Level ของความเข้มข้นที่ต้องการ จึงปล่อย mount (ในกรณีที่มีการทำ Standard repeat ให้ดึง Data file ใส่ใน level เดียวกัน)

3.4 Click File แล้ว Save Method File จากนั้นกด Yes

4. การทำ Sample Analysis

วิธีการคำนวณสารตัวอย่างผ่าน Calibration Curve ของสารมาตรฐาน

4.1 เปิดหน้า LC Quant Browser

4.2 เปิด File>Open Method File ที่มี Calibration Curve ของสารมาตรฐาน

4.3 เปิด Data File ของ Sample > Click ซ้ายที่ Data File ค้างไว้แล้วลาก mount ไปด้านขวามือ

4.4 Data ของ Sample จะถูกคำนวณผ่าน calibration curve ของ Method นั้น และแสดงผลในหน้า Quantitative Result View

5. การ Print report

วิธีการรายงานผล มี 2 วิธี

5.1 การรายงานผลแบบทีละ Sample โดยใช้ mount click ซ้าย ที่หน้าตารางของ Data fileจนปรากฏแถบสีน้ำเงิน

File> Print Quant. Report for Current Data แล้ว Print

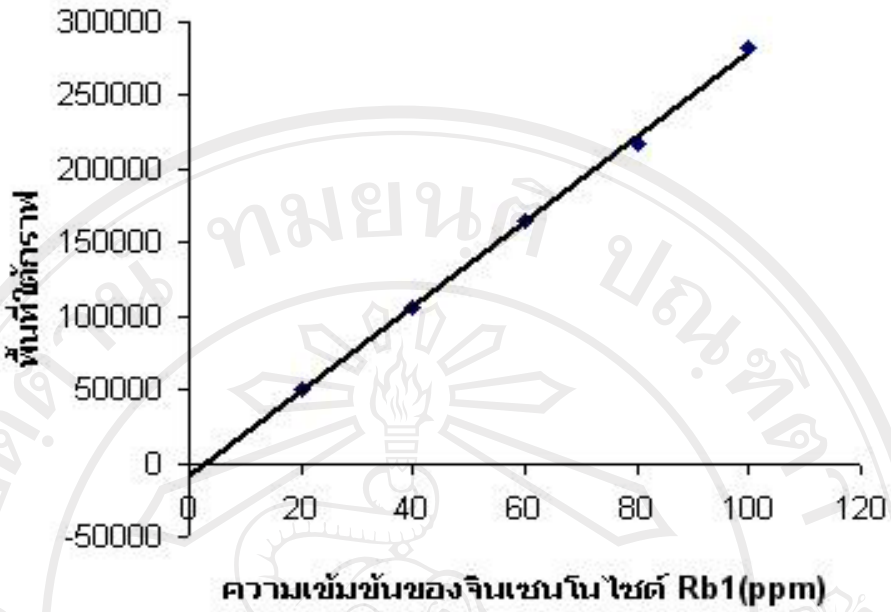
5.2 การรายงานผลแบบทีละหลาย Sample หรือทั้งตารางโดย Click File>Print Table แล้ว Print

6. การ Print Calibration curve

6.1 Click ที่ Modify Calibration Curve

6.2 Click File >Print Image แล้ว Print

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ ข-1 กราฟมาตรฐานจินเซนโนไซด์ Rb1 Y = 2758.64X (R^2=0.9992)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค
รูปภาพเครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ ค-1 การอบแห้งใบเจียวกู้หลานด้วยตู้อบแบบถาดหมุน

ภาพ ค-2 การสกัดด้วยวิธี Conventional method

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ ค-3 เครื่องไมโครเวฟ (Microwave)

ภาพ ค-4 เครื่องความดันสูงยิ่ง (High pressure)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ ค-5 การแยกชั้นของบิวทานอลและน้ำ

ภาพ ค-6 การระเหยบิวทานอลโดยเครื่อง Rotary evaporator

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ ค-7 การแยกสารจีเพนโนไซด์โดยใช้ Sep-Pek

ภาพ ค-8 สารละลายจีเพนโนไซด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวณัฏฐวี สิทธิไกรพงษ์
วัน เดือน ปีเกิด	25 กรกฎาคม 2525
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2543 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสุระนารีวิทยา จังหวัดนครราชสีมา
	พ.ศ. 2547 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพายัพ จังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved