บทที่ 1
บทนำ

1.1 บุนนาค

บุนนาค[1-5] เป็นพันธุ์ไม้ท้องถิ่นของไทย และเอเชียเขตร้อน อยู่ในวงศ์ Guttiferae เช่นเดียวกับสารภี และมะดัน พบตามป่าชื้น ถิ่นกำเนิดอยู่ที่ประเทศอินเดีย และ มาเลเซีย เป็นไม้เนื้อแข็งที่มีคุณค่ามาก ใช้ในงานก่อสร้างได้ทุกประเภท เรือนยอดคล้ายรูปเจดีย์ ใบดกทึบ ยอดอ่อนสีแดง สวยงามมาก ดอกใหญ่สีขาว 4 กลีบ มีเกสรสีเหลือง เป็นกระจุกใหญ่อยู่ตรงกลาง ดอกบานเต็มที่มีขนาดใหญ่ 5-7 ซม. ขยายพันธุ์โดยวิธีตอนกิ่ง หรือเพาะเมล็ด เกสรดอกบุนนาคใช้ผสมทำยาหอมบำรุงหัวใจ แก้ร้อนในกระหายน้ำ เป็นยาชูกำลัง น้ำมันจากเมล็ดใช้จุดตะเกียงและทำเครื่องสำอาง บุนนาคสามารถปลูกได้นานเป็นร้อยปีขึ้นไป แต่ว่าการเจริญเติบโตช้า บุนนาคได้ชื่อว่าเป็นต้นไม้ใหญ่ดอกสวยงามและหอม นอกจากนี้ยังได้รับการยกย่องว่าเป็นไม้ที่มีใบสวยงามอีกด้วย

1.1.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์[1-5]

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Mesua ferrea* Linn.

วงศ์ Guttiferae

ชื่ออังกฤษ Iron Wood, Indian Rose Chestnut.

ชื่ออื่น ๆ ก๊าก่อ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) ก้ำก่อ (ฉาน-แม่ฮ่องสอน) ปะนาคอ (ปัตตานี) นาคบุตร (ใต้) สารภีดอย (เชียงใหม่)

ลักษณะทั่วไป ไม้ต้นขนาดกลางถึงใหญ่ สูงประมาณ 10 – 15 เมตร ลำต้นตรง ยอดอ่อนสีแดง รูปทรงพุ่มของต้นเป็นรูปสามเหลี่ยมโคนกว้าง ปลายยอดเป็นรูปแหลม **ใบ**เดี่ยว หนาทึบ ใบยาวเรียวแคบเป็นรูปหอก ท้องใบมีสีนวลอมเทาเป็นมัน ใบกว้าง 3-4 ซ.ม. ยาว 7-12 ซ.ม. **ดอก**เดี่ยว หรือออกเป็นกระจุก 2-3 ดอก ดอกใหญ่ กลีบดอกสีขาวนวลบาง มีกลิ่นหอม เกสรตัวผู้สีเหลืองมีเป็นจำนวนมาก กลีบรองดอกหนาแข็ง และ จะคงทนอยู่จนเป็นผล **ผล**รูปไข่แข็ง

ส่วนที่ใช้ ดอกที่เริ่มบาน ผล เมล็ด

สารสำคัญ น้ำมันหอมระเหย มีชื่อว่า "Oil of Nagkeshar" และมีสารที่ให้ ความขม 2 ชนิด ชนิดหนึ่งมีชื่อว่า mesuol มีจำนวน 1%[2] อีก ชนิดหนึ่งชื่อ mesuone

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.2 สรรพคุณทางยา

มีการนำส่วนต่างๆ ของต้นบุนนาคมาเป็นส่วนผสมในยาแผนโบราณ โดยมีสรรพคุณดังนี้

เกสรดอก[2] : ใช้ผสมทำยาลมบำรุงหัวใจ เป็นยาฝาดสมานบำรุงธาตุ เข้าเครื่องหอม ยาแก้ไอ ขับเสมหะ และใช้ขับลม ใช้ในสูตรยาแผนโบราณของไทย เช่น เกสรทั้ง 5 เกสรทั้ง 7 และเกสรทั้ง 9 ซึ่งเกสรทั้ง 5 ประกอบด้วย มะลิ พิกุล สารภี บุนนาค บัวหลวง เกสรทั้ง 7 เหมือน เกสรทั้ง 5 เพิ่ม จำปา กระดังงาไทย และ เกสรทั้ง 9 เหมือน เกสรทั้ง 7 เพิ่ม ลำเจียก ลำดวน

ผล : มีฤทธิ์ขับเหงื่อ และฝาดสมาน

เมล็ด[3] : บีบให้น้ำมัน ใช้ทาแก้โรคผิวหนัง และโรคปวดข้อ

ใบ : ใช้เป็นยาพอกเพื่อรักษาอาการอักเสบ

เปลือก และราก : ใช้เป็นยารักษาโรคกระเพาะอาหารอักเสบ หลอดลมอักเสบ และเป็นยาบำรุงกำลัง

อื่นๆ : แก้ร้อนในกระหายน้ำ เป็นยาชูกำลัง น้ำมันจากเมล็ด ใช้จุดตะเกียง ทำเครื่องสำอาง น้ำมันที่กลั่นออกจากดอก ใช้แต่งกลิ่นสบู่ ใช้รวมกับน้ำมันจันทร์ (Sandal wood oil)

รูป 1.1 ส่วนประกอบของต้นบุนนาค *(Mesua ferrea* Linn.)

ก. ต้น

ข. ดอก และเกสร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพ

น้ำมันหอมระเหยจากเกสรตัวผู้ มีฤทธิ์เป็นยาถ่ายพยาธิ ได้แก่ พยาธิตัวตืด และ พยาธิปากขอ ส่วนน้ำมันจากเมล็ดบุนนาค (seed oil) มีฤทธิ์ต้านโรคหอบหืด

สาร Mesuol and Mesuone[6,7] ที่แยกได้จากบุนนาคมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่างๆ ได้แก่ *Staphyloccocus aureus* (ต้านได้มากที่สุด), *Escherichia coli, Eberthella typhosa, Vibrio cholerae, Bacillus friedlanderi* และ *Mycobacterium phlei* น้ำมันจากเมล็ดของบุนนาคมีฤทธิ์ต้าน *Staphyloccocus aureus* ขณะที่น้ำมันจากเปลือกมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเกือบทั้งหมดจากที่ศึกษา และสารสกัดจากเกสรบุนนาคที่สกัดจากเอทานอล ไม่มีฤทธิ์ต้าน *Bacillus subtilis, Staphyloccocus aureus, Salmonella typhi, Escherichia coli* และ *Agrobacterium tumefaciens*

น้ำมันหอมระเหยจากผลของบุนนาค มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (anti-fungal) ต่างๆ[8] ได้แก่ *Trichophyton terrestre, T. tonsurans, T. mentagrophytes, Histoplasma capsulatumsp, Cryptococcus neoformans, Microsporum mycetomi, M. gypseum, Aspergillus flavus, A. niger, A. oryzae, A. nidulans, Sporotrichum schenckii, Epidermophyton floccosum, Fusarium oxysporum* และ *Curvularia lunata.*

สารสกัดจากเกสรบุนนาคที่สกัดด้วย 50% เอทานอล ไม่มีฤทธิ์ต้าน *Cryptococcus albicans, C. neoformans, Trichophyton mentagrophytes, Microsporum canis* และ *Aspergillus niger* น้ำมันหอมระเหยจากเกสรตัวผู้มีฤทธิ์ต้าน *Cryptococcu tropicalis* ส่วนน้ำมัน (oil) จากเมล็ดและ เปลือก Mesuone และ Mesuol จากบุนนาค ไม่มีฤทธิ์ต้าน *Cryptococcus lunata, Aspergillus niger, Helminthosporium sativum* และ *Alternaria solani*

Xanthones[9] ที่พบใน *Calophyllum inophyllum* และ *Mesua ferrea* (บุนนาค) คือ dehydrocycloguanandin (DCG), calophyllin-B (CPB), jacareubin (JR), 6-deoxy jacareubin (DJR), mesuaxanthone-A (MXA), mesuaxanthone-B (MXB) และ euxanthone (EX) เมื่อทดลองกับสัตว์ พบว่าผลิตภัณฑ์ xanthones ทั้งหมด ช่วยลดการหย่อนยานของกล้ามเนื้อ ลดความกังวล ลดความตึงของกล้ามเนื้อ มีผลต่อ pentobarbitone เวลาหลับ และ ether anaerthesia ในหนู ทั้งนี้ ไม่พบ xanthones ที่มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวด ลดไข้ และ anticonvulsant รวมทั้งไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อระบบหลอดเลือดเลี้ยงหัวใจ ในกบและสุนัข xanthones ทั้งหมดออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของเนื้อเยื่อที่บุในช่องท้อง และในปากของหนู โดย JR และ DJR มีฤทธิ์ต้านแผลเปื่อยพุพองมีหนอง ในหนู

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ของ *Cassia fistula* และ *Mesua ferrea* (บุนนาค) พบว่าสารสกัดหยาบของทั้งคู่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 14 ชนิด และเชื้อรา 6 ชนิด ในระดับดี[10]

4-Alkyl และ 4-Phenyl-5,7-dihydroxycoumarins จากดอกบุนนาค มีฤทธิ์ต้านโปรโตซัว (antiprotozoal) เล็กน้อย และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย[11]

น้ำมันหอมระเหย จากส่วนสกัดชั้นเมทานอล ของดอกบุนนาค มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเซลล์เม็ดเลือดขาว และ มีฤทธิ์เล็กน้อยในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtitis*, และ *Pseudomonas aeruginosa*[12]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

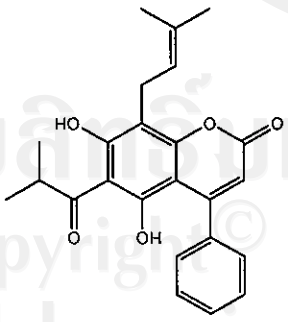
1.1.4 องค์ประกอบทางเคมี

จากรายงานการศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีที่พบในบุนนาค *(Mesua ferrea)* พบว่าเป็นกลุ่มสารดังต่อไปนี้

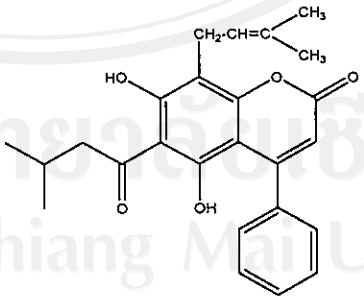
ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) และ น้ำมันหอมระเหย (Essential oils)[13-14]

- กรดไขมัน (fatty acids) ที่พบในเมล็ดบุนนาค ได้แก่ palmitic (8.2%), stearic (15.8%), Oleic (55.4%), linoleic (19.6%) และ arachidic acid (1.0%)
- ผลของบุนนาคให้ essential oil (0.5% w/v)
- เกสรตัวผู้ ประกอบด้วย α-pinene, β-pinene, และ γ-pinene
- น้ำมันจากเปลือกต้นบุนนาค (bark oil) พบ *(E)* - α –bisabolene (31.3%) และ α –selinene (12.2%)
- น้ำมันจากใบบุนนาค (leaves oil) พบ α-copaene (19.3%) และ β -caryophyllene (18.8%)
- น้ำมันจากตา และดอกของบุนนาค (bud and flower oils) ประกอบด้วย α - Copaene (28.7%)

Coumarins : Mesuol[15, 16] และ Mammeisin[17] พบในเมล็ดของบุนนาค



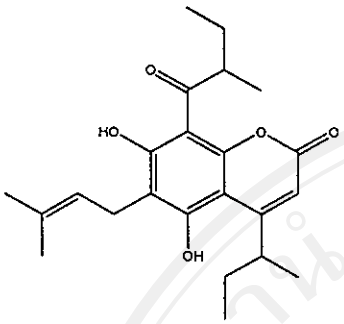
Mesuol

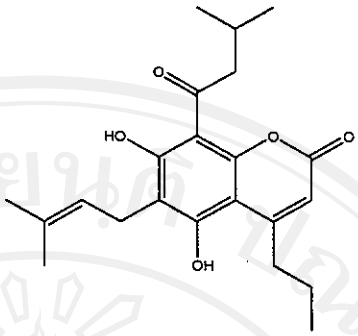


Mammeisin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

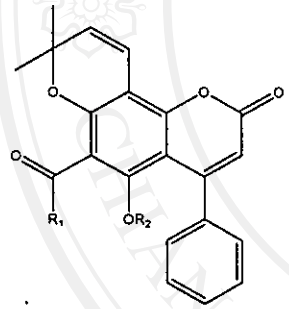
Ferruol-A[18] และ Mammein แยกได้จากเปลือกลำต้น ของบุนนาค





Ferruol-A Mammein

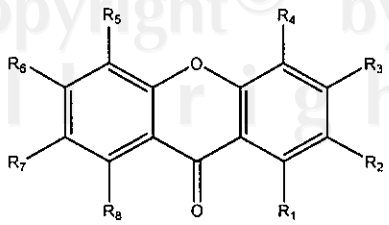
Mesuagin[16,19] และ Mesuarin[16] พบในน้ำมันจากเมล็ด จากเปลือก และท่อนไม้ของบุนนาค



Mesuagin (R_1 = i-C_3H_7, R_2 = H)

Mesuarin (R_1 = i-C_3H_7, R_2 = CH_3)

Xanthones : โครงสร้างหลักของสารกลุ่ม xanthone ดังนี้

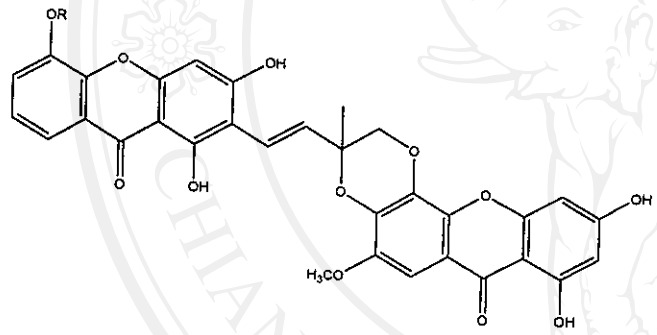


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Mesuaxanthone-A[20], Mesuaxanthone-B[20], Euxanthone[16], 1,5-dihydroxyxanthone, Euxanthone 7-methylether และ Ferxanthone[22-23] พบในแก่นไม้ของบุนนาค

- Mesuaxanthone-A (R_1=R_5=OH, R_3=OCH_3, R_2=R_4=R_6=R_7=R_8=H)
- Mesuaxanthone-B (R_1=R_5=R_6=OH,R_2=R_3=R_4=R_7=R_8=H)
- Euxanthone (R_1=R_7=OH, R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=R_8=H)
- 1,5-dihydroxyxanthone (R_1=R_5=OH, R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=R_8=H)
- Euxanthone 7-methylether (R_1=OH,R_7=OCH_3,R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=R_8=H)
- Ferxanthone (R_1=R_3=OCH_3, R_5=R_6=OH, R_2=R_4=R_7=R_8=H)

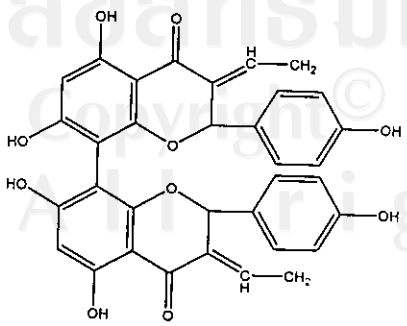
Dimeric xanthones[24] : Mesuferrol-A และ Mesuferrol-B พบในเปลือกบุนนาค



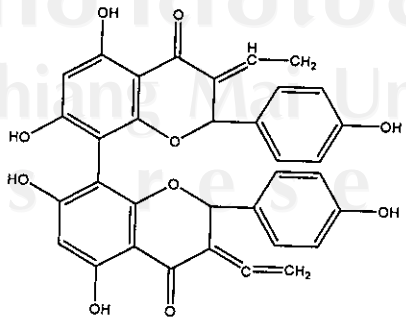
Mesuferrol-A (R=H)

Mesuferrol-B (R=CH_3)

Biflavanones[25]: Mesuaferrone-A และMesuaferrone-B พบในเกสรตัวผู้ของดอกบุนนาค



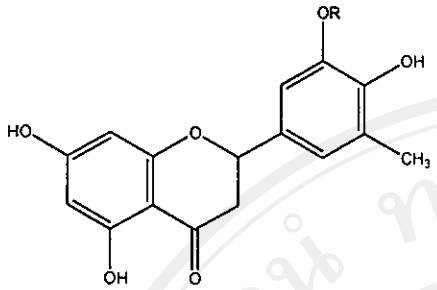
Mesuaferrone-A



Mesuaferrone-B

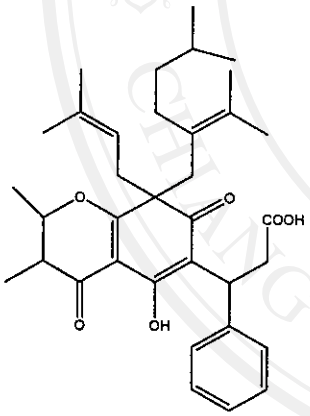
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Flavanone glycoside[26] : Mesuein พบในใบบุนนาคโดยการสกัดจากเมทานอล

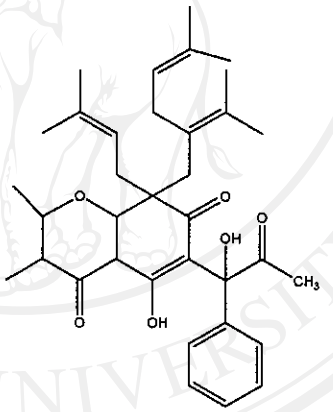


Mesuein (R = rhamnose-galactose)

Cyclohexadienone derivatives : Mesuanic acid[27] และ Mesuaferrol[28] พบในเกสรบุนนาค



Mesuanic acid



Mesuaferrol

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

1.2.1 โครมาโทกราฟีคอลัมน์ (Column chromatography)[29-30]

โครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคการแยกสาร โดยอาศัยการกระจายตัวของสารที่ต่างกันในสองวัฏภาค คือ วัฏภาคคงที่ (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) โครมาโทกราฟีคอลัมน์ อาศัยความแตกต่างของสารที่ต้องการแยกในการถูกดูดซับด้วยวัฏภาคคงที่ เรียกว่า ตัวดูดซับ มักใช้ silica gel (SiO_2), alumina (Al_2O_3), calcium carbonate ($CaCO_3$), cellulose หรือ florisil (fluorinated silicone polymer) และการชะด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ เรียกว่า ตัวทำละลายหรือตัวชะ ตัวดูดซับจะถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ซึ่งเป็นหลอดแก้วยาวที่มี stopcock สารตัวอย่างจะถูกทำให้อยู่ในรูปของเหลวแล้วนำเข้าสู่คอลัมน์ทางด้านบนจากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายชะลงมาแล้วเก็บสารละลายทางด้านล่างของคอลัมน์ ในกรณีที่ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ จะใช้ตัวชะที่มีสภาพขั้วต่ำชะก่อน แล้วจึงค่อยๆ เพิ่มสภาพขั้วของตัวชะ สารตัวอย่างจะถูกแยกภายในคอลัมน์ โดยสารที่มีสภาพขั้วต่ำจะถูกดูดซับโดยตัวดูดซับในคอลัมน์ได้น้อยและเคลื่อนที่ลงมาได้เร็ว ส่วนที่มีสภาพขั้วสูงจะถูกดูดซับโดยตัวดูดซับในคอลัมน์ได้ดี และเคลื่อนที่ลงมาได้ช้า จำเป็นต้องเพิ่มสภาพขั้วของตัวชะมากขึ้น เพื่อชะสารออกมาจากคอลัมน์

นอกจากนี้ยังมีโครมาโทกราฟีคอลัมน์อีกประเภทหนึ่งคือ เจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี (Gel filtration chromatography) ซึ่งเป็นการแยกตามขนาดของสารที่ต่างกัน โดยตัวดูดซับจะเป็นของแข็งที่มีรูพรุนพวกเจล (gel) เช่น sephadex สารตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่กว่าขนาดรูพรุนของเจล จะไม่สามารถเข้าไปในรูพรุนของเจลได้ และจะเคลื่อนที่ลงมาได้อย่างรวดเร็ว ส่วนสารที่มีขนาดเล็ก จะสามารถเข้าไปในรูพรุนของเจล และใช้เวลานานในการเคลื่อนที่ลงมาด้านล่าง ทำให้สามารถแยกสารที่มีขนาดแตกต่างกันได้

1.2.2 โครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin layer chromatography)

หลักการของโครมาโทกราฟีผิวบางมีความคล้ายคลึงกับโครมาโทกราฟีคอลัมน์ คือ ใช้ความสามารถในการดูดซับในตัวดูดซับที่แตกต่างกันของสาร สิ่งที่แตกต่างกันคืออุปกรณ์ และวิธีการตรวจสอบ โดยโครมาโทกราฟีผิวบางจะใช้ตัวดูดซับที่มีลักษณะเป็นแผ่นบางเคลือบอยู่บนของแข็งรองรับ (solid support) เช่น แก้ว หรือ แผ่นอะลูมิเนียม สารตัวอย่างจะถูกทำให้เป็นจุดเล็กๆ บน chromatoplate โดยการ spot ด้วย capillary แล้วนำ chromatoplate นั้นไปจุ่มในอ่างตัวทำละลาย ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่สู่ด้านบนของ chromatoplate แล้วเกิดการแยกบนแผ่น chromatoplate การตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารสามารถดูด้วยตาเปล่าหากเป็นสารมีสี แต่ถ้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารไม่มีสีสามารถทำให้เห็นได้โดยการส่องภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ultra violet : UV) หากเป็นสารที่มีหมู่อะโรมาติก หรือนำไปทำปฏิกิริยากับสารที่ทำให้เกิดสีบน chromatoplate เช่น พ่นด้วยกรดฟอสโฟโมลิบดิก แล้วเป่าด้วยลมร้อน เป็นต้น

1.2.3 ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)[31-32]

ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography) หรือ ไฮเพรชเชอร์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) หรือ โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เป็นเครื่องมือที่ใช้ช่วยในการวิเคราะห์ชนิด และปริมาณของสารประกอบที่อยู่ในรูปของเหลว สามารถวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative Analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative Analysis) ได้เป็นอย่างดี โดยสามารถใช้กับงานด้านต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง เช่น ในการวิเคราะห์อาหาร ยา ยาฆ่าแมลง ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม เป็นต้น โดยทั่วไปสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ ในระดับไมโครกรัม (ug) หรือละเอียดถึงระดับ พิโคกรัม (pg) เมื่อเลือกหน่วยตรวจวัดได้เหมาะสม

HPLC เป็นเทคนิคการแยกสารผสมโดยใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (High Pressure Pump) สูบของเหลวหรือตัวทำละลาย ซึ่งทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) พาสารตัวอย่าง ที่ถูกฉีดเข้าไปในช่องฉีดสาร (Injector) เคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่เป็นวัฏภาคคงที่ (Stationary Phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (Column) สารผสมที่ถูกแยกออกแล้วเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาในเวลาที่ต่างกัน ผ่านเข้าสู่เครื่องวัด (Detector) สัญญาณที่ตรวจวัดได้อยู่ในรูปของสัญญาณไฟฟ้า ตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ จะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ (Recorder) แสดงผลออกมา เรียกว่า โครมาโทแกรม (Chromatogram) ประกอบด้วยพีค (peak) ของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารผสม ระบบ HPLC โดยทั่วไปประกอบด้วยส่วนต่างๆ ที่สำคัญ และหน้าที่ของสารนั้นๆ ดังนี้

1. ระบบของเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย

1.1 ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir) เป็นขวดสำหรับใส่สารตัวอย่างที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ในทางวิเคราะห์ขวดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่นี้ควรมีขนาดบรรจุประมาณ 1 ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 ระบบปั๊ม (pumping system) ใน HPLC มีความต้านทานค่อนข้างสูงในการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ขนาดเล็กของเฟสคงที่จึงจำเป็นต้องใช้ความดันสูงเพื่อดันเฟสคงที่ให้ไหลไปและยังช่วยในการทำ gradient elution

1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดัน (pressure gauge) ทำหน้าที่บอกความดันของเฟสเคลื่อนที่ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ ความดันนี้จะเป็นสิ่งบอกว่ามีการอุดตันหรือไม่ หรือ การทำงานปั๊มล้มเหลวหรือไม่ นอกจากนี้การทราบความดันของเครื่องจะช่วยให้การปรับพารามิเตอร์ต่างๆ เป็นไปอย่างเหมาะสมที่สุด

2. ระบบการผ่านสารตัวอย่างเข้าไปยังคอลัมน์ (injection system)

การผ่านสารตัวอย่างเข้าไปในคอลัมน์ HPLC นั้น มีความสำคัญค่อนข้างมากต่อการแยกสาร ทั้งนี้เนื่องจากสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ ควรอยู่ในลักษณะที่เป็นแถบที่แคบมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ ปัจจุบันนี้นิยมใช้วาล์วที่ประกอบด้วยวง stainless steel ที่สามารถใช้งานได้ที่ความดันสูงถึง 5000-6000 psi โดยที่ไม่เกิดการรั่วไหล

3. เครื่องตรวจวัด (Detector)

เครื่องตรวจวัดในอุดมคติของ HPLC สมัยใหม่ควรมีลักษณะดังนี้

- มีความไวสูง และให้สัญญาณตอบรับ (response) ที่คาดคะเนได้
- ให้สัญญาณตอบรับได้กับสารทุกชนิด
- ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ และอัตราเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่
- เชื่อถือได้ และง่ายต่อการใช้งาน
- ความสัมพันธ์ของความเข้มข้น และสัญญาณตอบรับของเครื่องตรวจวัดควรมีสภาพเชิง เส้น (Linearity) ในช่วงกว้าง
- ไม่ทำลายสารตัวอย่าง
- ให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพวิเคราะห์สำหรับพีคที่ต้องการตรวจสอบ

เครื่องตรวจวัดในปัจจุบันที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ รีแฟรคโทมิเตอร์ ดีเทคเตอร์ (refractometer detectors) และ UV-VIS โดยรีแฟรคโทมิเตอร์ เป็น ดีเทคเตอร์ ที่ซึ่งตรวจวัดค่าดัชนีหักเหของตัวชะที่เป็นผลมาจากสารที่แยกออกมาจากคอลัมน์ ดังนั้นจึงเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง แต่เทคนิคนี้ไม่เหมาะกับการทำ gradient elution นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิด้วย โดยทั่วไปสามารถตรวจวัดสารที่มีความเข้มข้น 1-10 ppm ส่วน ยูวี-วิซิเบิล ดีเทคเตอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(UV-VIS Detector) เป็นเครื่องตรวจวัดที่อาศัยหลักการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง เครื่องชนิดนี้เป็นเครื่องที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางใน HPLC เพราะเครื่องตรวจวัดชนิดนี้มีลักษณะพิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหล และอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างมีความไวสูงต่อสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่

4. คอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์ (Analytical column)

โดยทั่วไปคอลัมน์จะทำจากหลอดสแตนเลสที่ภายในบรรจุ Stationary Phase ที่อยู่บนตัว support หรือ adsorbent ซึ่งโดยทั่วไปมีใช้สามแบบคือ

1. Microporous particles ซึ่งโครงสร้างภายในเป็นร่างแหที่ยอมให้เฉพาะโมเลกุลขนาดเล็กเท่านั้นผ่านรูได้

2. Macroporous particles มีรูพรุนขนาดใหญ่ที่ยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ผ่านได้ดีเท่ากับโมเลกุลเล็ก

3. Pellicular particles เป็น inert core ที่มี stationary Phase bond อยู่ที่ผิวภายนอก ถ้าใช้สำหรับ Liquid-Liquid system โดยทั่วไป Stationary Phase จะเป็นของเหลวที่มีขั้ว แต่ถ้าใช้ Stationary Phase ที่ไม่มีขั้วซึ่งนิยมใช้กันมากในการแยกสารประกอบอินทรีย์นั้น เรียกว่า reversed-phase liquid-liquid chromatography หรือ Reversed-Phase Bonded Phase Chromatograghy (RP-BPC)

ความนิยมของ RP-BPC นั้นเนื่องจากสาเหตุต่อไปนี้

1. สามารถนำมาใช้แยกพวก nonionic, ionic และสารประกอบที่แตกตัวเป็นไอออนได้

2. มีความเสถียรแต่ควรระวังเกี่ยวกับการควบคุม pH ของเฟสเคลื่อนที่

3. เฟสเคลื่อนที่ที่นิยมใช้ เช่น น้ำ มีราคาถูก และหาได้ง่าย

4. ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ค่อนข้างนิยมใช้กันมาก คือ เมทานอล ซึ่งราคาไม่แพงมากนัก และมีความบริสุทธิ์สูง

5. สามารถทำนายลำดับของการที่สารจะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ เพราะว่า retention time จะเพิ่มขึ้นตามสมบัติของสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ

6. สมดุลที่เกิดขึ้นในคอลัมน์จะเร็ว ทำให้เหมาะกับการนำเอาไปใช้ใน gradient elution

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้คอลัมน์ชนิด Hypersil ODS 5 μm ขนาด 4.0 x 150 mm (Hewlett Packard, Germany) และ PREP-ODS ขนาด 20.0 x 250 mm (Hewlett Packard, Germany) ซึ่งภายในคอลัมน์บรรจุเฟสคงที่ชนิด n-$C_{18}H_{37}$ ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในงาน Reversed-Phase ซึ่งเป็นเทคนิค RP-BPC ที่อาศัยสมบัติของเฟสคงที่ที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) (โดยทั่วไปเฟสคงที่นั้นจะมีหมู่ octadecyl หรือ octyl silane functional group) และ เฟสเคลื่อนที่ใช้ตัวทำละลายมีขั้ว เช่น น้ำ ผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น เมทานอล หรือ อะซีโทไนไทรล์

1.2.4 เพรพาเรทีฟ ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (Preparative HPLC)[29-30]

Preparative HPLC คือ เทคนิคแบบใหม่ทางเคมีวิเคราะห์เทคนิคหนึ่ง ซึ่งพัฒนามาจากระบบ analytical HPLC มีประโยชน์ในการแยกสารประกอบผสมออกจากกันแต่แยกได้ในปริมาณที่มากกว่า analytical HPLC เทคนิคนี้มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว และเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เนื่องจาก preparative HPLC มีข้อดีเหนือกว่า separation techniques อื่นๆ หลายประการคือ

1. ทำได้ง่ายกว่า TLC หรือ LC แบบดั้งเดิม

2. เกิดการแยกเร็วกว่า separation techniques อื่นๆ สามารถใช้ในการแยกองค์ประกอบของสารผสมออกจากกันอย่างสมบูรณ์ ในเวลาเป็นนาที แต่ถ้าใช้เทคนิคอื่นอาจต้องใช้เวลาเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน

3. เทคนิคนี้สามารถใช้แยกสารได้เป็นมิลลิกรัมขึ้นไป ในการแยกแต่ละครั้งสามารแยกสารในช่วง 0.5-50 กรัม และใช้เวลาในการแยก 5-30 นาที ถ้าทำการแยกติดต่อกันจะแยกสารบริสุทธิ์ได้เป็นหลายร้อยกรัมต่อวัน

4. สารที่แยกโดยวิธี preparative HPLC จะมีความบริสุทธิ์สูงกว่าสารที่แยกโดยเทคนิคอื่นๆ ของโครมาโทกราฟี ดังนั้นการใช้เทคนิคนี้ในการทำให้สารมีความบริสุทธิ์ถึง 99% ทำได้ง่ายมาก

5. ทางเศรษฐกิจและการประหยัดเวลา บริษัทผลิตเครื่องมือ เช่น Waters Associates ได้ออกแบบ disposable silica column สำหรับใช้กับ preparative HPLC เทคนิคนี้แทบจะไม่ต้องใช้เวลาในการเตรียมคอลัมน์เลย ใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อย และลดเวลาที่ใช้ในการแยกแต่ละครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เงื่อนไขของการใช้ preparative HPLC

ปัจจัยสำคัญที่ควรคำนึงถึงในการใช้เครื่องมือ preparative HPLC คือ การเลือกตัวทำละลาย loading และ gradient elution ก่อนที่จะใช้ HPLC ในการแยกสารประกอบผสมจะต้องเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเสียก่อน เมื่อทราบอัตราส่วนของตัวทำละลายแต่ละชนิด ในตัวทำละลายผสมที่ใช้เป็น mobile phase ซึ่งทำให้เกิดการแยก ได้ผลดี และทราบปริมาณสารที่จะต้องใช้ในกรณีที่เรามี analytical HPLC ถ้าเราทราบภาวะการทดลองที่เหมาะสมสำหรับแยกสารที่เราจะศึกษาแล้ว เราอาจนำภาวะที่ใช้กับ analytical HPLC ไปใช้กับ preparative HPLC ได้โดยตรง

ในปัจจุบันนี้เราอาจใช้ preparative HPLC ในการแยกสารที่มีปริมาณ 5-10 กรัม ได้โดยง่าย แต่เครื่องมือ preparative HPLC ราคาแพงจึงไม่เหมาะสมสำหรับผู้ที่ใช้เพียงบางครั้งบางคราว อายุของคอลัมน์จะหมดเมื่อใช้ในการทดลอง 20-40 ครั้ง ข้อดีที่สำคัญของ preparative HPLC คือ ได้ผลรวดเร็วใช้เวลา 20 นาที แยกได้ดีและสมบูรณ์ สามารถทำ recycle ได้ มี loading capacity สูงและให้ความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง จึงสามารถใช้ในการทำให้สารบริสุทธิ์ในปริมาณมาก 100-200 กรัมโดยทำ recycle ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม

ความจำเป็นที่ผู้ใช้ preparative HPLC ต้องการคือ ต้องการประหยัดตัวทำละลายที่ใช้ในการ equilibrate หรือล้างคอลัมน์แบบ preparative ซึ่งมีขนาดใหญ่ ผลที่ได้จากการใช้ preparative column มีความแม่นยำไม่ดี และประสบปัญหาอื่นคือ ไม่สามารถทำความสะอาดคอลัมน์ได้อย่างสมบูรณ์ นักวิเคราะห์บางคนอาจต้องการประหยัดราคาของตัวทำละลายที่ใช้โดยการใช้ตัวทำละลายที่มีราคาถูก การทำเช่นนี้ไม่เป็นผลดีเลย เพราะว่าถ้ายิ่งใช้ตัวทำละลายที่มีเกรดไม่ดีก็ยิ่งจะมีปริมาณของสิ่งเจือปนมากขึ้นเท่านั้น ซึ่งจะพอกพูนอยู่ในคอลัมน์ ทำให้การแยกสารผสมไม่ได้ผล การใช้ analytical column ในการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมก่อนที่จะใช้ preparative column ย่อมเป็นวิธีที่ประหยัดตัวทำละลายได้มาก

เราสามารถรักษาคอลัมน์ให้ใช้ได้นานๆ โดยใช้ protector column (guard column) ซึ่งต่อระหว่างระบบ injection analytical หรือ preparative column guard column ทำหน้าที่เสมือนเป็น "final filter" ช่วยในการจับสิ่งเจือปนซึ่งส่วนใหญ่มีในสารตัวอย่าง และยังช่วยกรองเอาสิ่งเจือปนออกจาก mobile phase ที่สกปรกด้วย

ในการทำ preparative separations จะต้องป้อนสารตัวอย่างผสมปริมาณค่อนข้างมากเข้าไปในคอลัมน์ วิธีที่ดีที่สุดคือ ในการแยกสารผสมตัวอย่างจะต้องฉีดสารตัวอย่างปริมาณน้อยที่สุดเท่าที่จะสามารถเพื่อควบคุม resolution การฉีดสารตัวอย่างมากเกินไปเข้าไปใน analytical หรือ preparative column จะทำให้ผลการแยกไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ ดังนั้นในการทำ preparative

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

separation จะเห็นว่า loading capacity มีความสัมพันธ์กับการละลายของสารตัวอย่างเช่นเดียวกันกับปริมาณของ packing ในคอลัมน์

สารตัวอย่างที่จะแยกจะต้องละลายได้ดีใน mobile phase จะต้องไม่ใช้ตัวทำละลายที่มี eluting strength สูงกว่าของ mobile phase ในการละลายสารที่จะวิเคราะห์ เพราะว่าจะทำให้ column equilibration เปลี่ยนไป ควรใช้ตัวทำละลายที่มี eluting strength น้อยกว่าของ mobile phase ในการละลายสารตัวอย่าง ในกรณีนี้สารตัวอย่างจะถูก banded อยู่บน inlet bed ของคอลัมน์ ก่อนที่จะเริ่มมี elution เกิดขึ้น เทคนิคนี้นิยมใช้ในการทำ preparative separations เพราะว่าจะให้ resolution สูงเป็นพิเศษ

การแยกสารผสมโดยวิธี preparative HPLC ก่อนอื่นจะต้องทราบถึงปัญหาและจุดมุ่งหมายของงานที่ต้องการวิเคราะห์ ในกรณีที่สารตัวอย่างมีองค์ประกอบที่ซับซ้อน อาจจะต้องนำมา clean up ด้วยเทคนิคง่ายๆ เสียก่อน เช่น อาจใช่วิธีตกผลึกใหม่ หรือกลั่นเพื่อให้สารตัวอย่างมีความบริสุทธิ์มากขึ้น แล้วศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกโดยวิธี HPLC เพื่อเก็บองค์ประกอบที่แยกได้ไว้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

1.2.5 แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography :GC)[31-32]

แก๊สโครมาโทรกราฟีเป็นเทคนิคของการวิเคราะห์สารทางโครมาโทกราฟีที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการแยกสารที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นแก๊สเฟสที่อุณหภูมิหนึ่งได้ การแยกจะเกิดขึ้นเมื่อสารตัวอย่างอยู่ในสภาวะแก๊สเฟสผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ (โดยทั่วไปจะให้ความร้อนในช่วง 50-300 °C) บรรจุเฟสคงที่ โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ หรือ แก๊สพา (carrier gas) สารตัวอย่างจะถูกแยกออกจากกันโดยขึ้นอยู่กับการกระจายตัวในแก๊สเฟส ระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสคงที่ที่เป็นของเหลว (liquild phase) ฉาบอยู่บนของแข็ง แบ่งได้เป็น 2 วิธี ถ้าเฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็งจะเรียกว่า แก๊ส-ของแข็งโครมาโทกราฟี (gas-solid chromatography : GSC) ส่วนใหญ่แล้ววิธีนี้ไม่ค่อยได้รับความนิยม เพราะใช้แยกเฉพาะสารที่เป็นแก๊ส หรือสารที่เป็นโมเลกุลเล็กเท่านั้น และถ้าเฟสที่อยู่กับที่เป็นของเหลว จะเรียกว่า แก๊ส-ของเหลวโครมาโทกราฟี (gas-liquid chromatography : GLC)

ข้อจำกัดของสารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ทาง GLC คือสารตัวอย่างจะต้องระเหยกลายเป็นไอได้ในช่วงอุณหภูมิที่อยู่ในคอลัมน์ โดยส่วนใหญ่แล้วจะใช้ได้กับสารที่ไม่เกิดการแตกตัวเป็นไอออนที่มีขนาดเล็กและกลาง (C_1-C_{25}) สารอินทรีย์ (ทั้งของแข็งและของเหลว) และสารพวก organometallic แต่ไม่สามารถใช้ได้กับเกลือของสารอินทรีย์ หรือเกลือของสารอนินทรีย์ และสารพวก macromolecules รวมทั้งสารพวก biological polymers ด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.6 แมสสเปกโทรเมตรี (Mass Spectrometry, MS)

แมสสเปกโทรเมตรี เป็นเทคนิคที่สามารถใช้ศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับ โครงสร้าง และมวลโมเลกุลของสาร โดยอาศัยการทำให้โมเลกุลนั้นเกิดการแตกตัวเป็นไอออน กล่าวคือสารตัวอย่างที่อยู่ในสภาพแก๊สจะถูกยิงด้วยอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง โดยทั่วไปพลังงานที่ใช้นี้จะอยู่ในช่วง 5-70 eV (1 eV = 23.06 Kcal/mol) ในการวิเคราะห์สารโดยแมสสเปกโทรมิเตอร์นั้น จะต้องทำสารตัวอย่างให้เป็นไอ จากนั้นทำให้เป็นไอออน ไอออนที่เกิดขึ้นจะถูกแยกออกจากกันตามค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio หรือ m/z) ที่แตกต่างกันแล้วส่งไปยังเครื่องตรวจวัด และเครื่องบันทึก

1.2.7 แก๊สโครมาโทกราฟี - แมสสเปกโทรเมตรี (Gas Chromatography - Mass Spectrometry : GC-MS)

การใช้ Mass Spectrometer เป็นตัวตรวจวัดสำหรับ GC ทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถยืน-ยัน หรือระบุโครงสร้างทางเคมีของสารที่ผ่านการแยกด้วยระบบ GC ได้แน่นอนกว่าตัวตรวจวัดชนิดอื่นๆ ของ GC นอกจาก Mass Spectrum จะแสดงเอกลักษณ์เฉพาะของสารประกอบแต่ละชนิด ยังสามารถให้ข้อมูลน้ำหนักโมเลกุล สูตรโครงสร้าง และ ประเภทของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ ในทำนองเดียวกันเมื่อต่อระบบ GC เข้ากับ MS ทำให้สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีองค์ประกอบซับซ้อนได้ โดยไม่ต้องทำการแยกองค์ประกอบเหล่านั้นให้บริสุทธิ์ก่อนนำเข้าวิเคราะห์ด้วย MS ทั้งนี้เทคนิคโครมาโทกราฟีทำหน้าที่เป็นระบบนำสารเข้าของ MS และทำหน้าที่แยกองค์ประกอบของสารตัวอย่างในขณะเดียวกัน

เนื่องจากในเทคนิค GC สารที่วิเคราะห์จะต้องอยู่ในสภาวะแก๊ส เช่นเดียวกับในระบบของ MS ที่สารถูกวิเคราะห์ต้องสามารถระเหยเป็นโมเลกุลในสภาวะแก๊ส (gas phase molecule) ได้ ดังนั้นจึงทำให้การต่อ GC เข้ากับระบบของ MS ทำได้ไม่ยากนัก อย่างไรก็ตามการที่กระบวนการ ionisation และ fragmentation ของ MS ต้องอยู่ในสภาวะสุญญากาศ ทำให้ต้องมีการกำจัด carrier gas ที่มาจาก GC ออกไป โดยเฉพาะเมื่อใช้คอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ ซึ่งต้องใช้ปริมาณของ carrier gas มาก และเกินขีดความสามารถของระบบทำสุญญากาศ (vacuum system) ของ MS ที่จะสามารถกำจัดออกไปได้ ดังนั้นจึงต้องมีตัวกลางระหว่าง GC กับ MS ที่ทำหน้าที่กำจัด carrier gas บางส่วนออกไป เรียกว่า GC-MS Interface

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.8 ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry : LC-MS)

LC เป็นเทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่ใช้ของเหลวเป็น mobile phase ดังนั้นเมื่อต่อ LC เข้ากับ MS ของเหลวที่ผ่านการแยกด้วย LC ไม่สามารถถูกนำเข้าไปใน ion source ของ MS ได้ทันที เพราะ ion source มักทำงานในสภาวะอุณหภูมิสูง และความดันต่ำมาก ของเหลวเพียงเล็กน้อยจะระเหยให้แก๊สปริมาณมากเกินขีดจำกัดของระบบสุญญากาศของ MS ที่สามารถกำจัดได้ ดังนั้นจึงต้องมีระบบจัดการที่สามารถกำจัด mobile phase ของ LC ก่อนที่จะนำสารที่ถูกแยกจาก LC เข้าไปใน ion source ของ MS ระบบตัวกลางที่เชื่อมต่อระหว่าง LC และ MS เรียกว่า LC-MS Interface ซึ่งมีพัฒนาการเรื่อยมาตั้งแต่ประมาณปี ค.ศ 1958 จนถึงปัจจุบัน ทำให้มี LC-MS Interface มากมายหลายแบบ เช่น Direct liquid introduction (DLI), Moving-belt (MB), Particle beam (PB), Fast atom bombardment (FAB) and continuous flow fast atom bombardment (CF-FAB), Thermospray (TS), Matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI) และ Atmospheric pressure ionisation (API) ซึ่งมี 2 แบบ คือ Electrospray ionisation (ESI) และ Atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) สำหรับในการทดลองนี้ใช้ LC-MS Interface แบบ Atmospheric pressure ionisation-Electrospray ionization (API- ESI) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำให้สารตัวอย่างที่ออกมาจากระบบ LC เกิดเป็นไอออนได้โดยการทำให้ของเหลวอยู่ในสภาพเป็นละอองเล็กๆ และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงในการทำให้เกิดการเหนี่ยวนำเป็นประจุของโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่ภายในละอองของเหลวเล็กๆ นี้ ดังนั้นโมเลกุลของสารตัวอย่างจึงถูกทำให้อยู่ในสภาวะเป็นไอออน ซึ่งอาจเป็นไอออนบวก หรือ ไอออนลบก็ได้ จากนั้นเมื่อให้ความร้อนแล้วทำให้ตัวทำละลายระเหยออกจากละอองเล็กๆ เหล่านี้ จนขนาดของมันเล็กลงมากในขณะที่จำนวนไอออนมีอยู่เท่าเดิม ในที่สุดจึงเกิดแรงผลักกันของประจุภายในละอองที่มีขนาดเล็กลง ทำให้ไอออนของสารตัวอย่างแตกออกมาอยู่ในสภาวะแก๊ส หรือสรุปได้ว่าเป็นเทคนิคที่ทำให้เกิดไอออนของสารตัวอย่างในสารละลายและเปลี่ยนไปเป็นไอออนในสภาวะแก๊ส โดยเกิดขึ้นภายใต้ความดันบรรยากาศ อย่างไรก็ตาม LC-MS Interface ทุกแบบต้องมีคุณสมบัติคือ กำจัดของเหลวที่เป็น LC mobile phase ออกไป และสามารถเปลี่ยนโมเลกุลของสารที่ต้องการวิเคราะห์ซึ่งอยู่ในสภาวะสารละลาย (molecules in solution) ให้กลายเป็นไอออนในสภาวะแก๊ส (ions in gas phase) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ LC-MS Interface ส่วนใหญ่ทำหน้าที่เป็นทั้งตัวเชื่อมต่อ (interface) และ ion source ในขณะเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.9 อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared spectroscopy, IR)

อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็วสำหรับการหาหมู่ฟังก์ชันของสาร จากการเกิดอันตรกิริยาของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นในช่วงรังสีอินฟราเรด (2 μm – 50 μm) โดยรังสีอินฟราเรดจะทำให้พันธะในอะตอม หรือ กลุ่มอะตอมของสารเกิดการสั่นในลักษณะต่างๆ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความยาวพันธะ หรือ มุมพันธะ ซึ่งแต่ละชนิดพันธะจะมีช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับการสั่นเป็นค่าแน่นอน ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะของแต่ละพันธะที่สามารถนำมาเปรียบเทียบได้

เทคนิค IR สเปกโทรสโกปีให้ประโยชน์มากในการใช้ตรวจหาหมู่ฟังก์ชัน โดยเฉพาะหมู่ไฮดรอกซิล และ หมู่คาร์บอนิลของสารประกอบอินทรีย์ สารประกอบอนินทรีย์ และสารประกอบ organometallic ข้อมูลจาก สเปกโทรสโกปี ประเภทนี้ เมื่อใช้ประกอบกับข้อมูลจากสเปกโทรสโกปีประเภทอื่นๆ ก็จะทำให้หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบต่างๆ ได้

1.2.10 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)

โดยปกติ นิวเคลียสของอะตอมจะมีการหมุน ทำให้เกิดสนามไฟฟ้า และสนามแม่เหล็กที่เรียกว่า magnetic dipole ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของแต่ละธาตุ สำหรับนิวเคลียสของไอโซโทปที่มี nuclear spin quantum number เท่ากับ ½ เช่น ^{1}H, ^{13}C และ ^{15}N เมื่อนำไปวางในสนามแม่เหล็กจะทำให้เกิดการวางตัวในสนามแม่เหล็กภายในมีทิศทาง 2 แนว คือ ในแนวขนานกับทิศทาง สนามแม่เหล็กภายนอก เป็นผลให้มีพลังงานต่ำลง และในแนวตรงข้ามกับทิศทางสนามแม่เหล็กภายนอก เป็นผลให้มีพลังงานเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใดที่มีการให้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่เหมาะสมนิวเคลียสที่อยู่ในระดับพลังงานต่ำจะดูดกลืนพลังงาน และเปลี่ยนการหมุนไปอยู่ในระดับพลังงานสูง ปรากฏการณ์เช่นนี้ เรียกว่า resonance โดยทั่วไป ความถี่ของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงคลื่นวิทยุ (radio wave) ดังนั้นจึงเรียกเทคนิคนี้ว่า Nuclear magnetic resonance พลังงานของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่ทำให้เกิด resonance นั้นขึ้นอยู่กับความแรงของสนามแม่เหล็กภายนอก และ คุณลักษณะของนิวเคลียส เช่น โปรตอนที่มีสิ่งแวดล้อมแตกต่างกัน จะมีความถี่ของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่ทำให้เกิด resonance แตกต่างกัน และมีลักษณะสัญญาณแตกต่างกัน ซึ่งเป็นค่าเฉพาะตัว และสามารถนำมาเปรียบเทียบหรืออ้างอิงได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับเทคนิค NMR ที่ใช้ในการทดลองนี้ ประกอบด้วย 1D NMR (^{1}H NMR ^{13}C NMR และ DEPT) และ 2D NMR (COSY HMQC และ HMBC) ซึ่งมีรายละเอียดของการพิจารณาแต่ละเทคนิคดังนี้

- ^{1}H NMR ในการวิเคราะห์ ^{1}H NMR Spectrum สิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณา คือ ค่า Chemical shift (δ, ppm) เพื่อดูว่าโปรตอนเกาะอยู่กับคาร์บอนหมู่ใดบ้าง เนื่องจากโปรตอนแต่ละชนิดจะเกิดเรโซแนนซ์ที่ตำแหน่งต่างกัน ค่า integration เพื่อหาจำนวนโปรตอนของพีคแต่ละกลุ่ม ลักษณะของพีค เพื่อตรวจสอบดูว่ามีโปรตอนชนิดใดบ้าง เช่น ในกรณีของ H ที่อยู่บน C พีคส่วนใหญ่จะคมชัด แต่ถ้าอยู่บนเฮเทอโรอะตอม (N หรือ O) พีคที่ได้ค่อนข้างจะกว้าง และบางครั้งอาจซ่อนอยู่ใต้ base line การแยกของพีค (peak splitting) เนื่องจากสปิน (spin) ของนิวคลีไอข้างเคียงเกิดอันตรกิริยากัน หรือเกิดการ coupling ไม่ว่านิวคลีไอข้างเคียงจะเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างกัน จำนวนการแยกของพีคขึ้นกับจำนวนของนิวคลีไอข้างเคียง ค่า coupling constant (J, Hz) เพื่อตรวจสอบดูว่าโปรตอนใดบ้างที่เกิดอันตรกิริยาซึ่งกันและกัน โดยดูจากค่า J ซึ่งต้องเท่ากัน

- ^{13}C NMR พารามิเตอร์ที่มีประโยชน์ คือ ค่า Chemical shift (δ, ppm) ส่วนค่าอินทิกรัลนั้นไม่ได้แสดงถึงจำนวนของคาร์บอน แต่สามารถนับจำนวนของคาร์บอนได้จากจำนวนของพีค ค่า Chemical shift ที่สำคัญ จะสามารถบอกลักษณะของคาร์บอนในโมเลกุลได้ ดังนี้ Alkane (δ 0-50) Alkyne (δ 70-90) alkene (δ 100-150) Aromatic (δ 110-150) Nitrile (δ 115-125) Carbonyls (δ 150-200) เป็นต้น

- DEPT (DEPT 90 และ DEPT 135) ประโยชน์ที่สำคัญของการทำ DEPT Experiment คือ ทำให้ทราบลักษณะของคาร์บอนว่าเป็น C, CH, CH_2 หรือ CH_3 กล่าวคือ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง ^{13}C NMR Spectrum กับ DEPT 135 Spectrum ก็จะทำให้ทราบว่ามี C อยู่กี่ตัว และ CH_2 กี่ตัว ทั้งนี้เนื่องจาก DEPT 135 จะไม่เห็นสัญญาณของ Quaternary (C) และให้สัญญาณ CH_2 กับหัว และเมื่อพิจารณาร่วมกลับ DEPT 90 ก็จะทำให้ทราบว่ามี CH อยู่กี่ตัว ส่วนสัญญาณที่เหลือก็คือ CH_3

- COSY เป็น 2D NMR ที่แสดงการคู่ควบกัน ระหว่าง โปรตอน กับ โปรตอน ที่อยู่ข้างเคียงกันในโมเลกุล ส่วน HMQC จะใช้สำหรับ พิจารณาการคู่ควบกันระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนที่เชื่อมต่อกัน และสำหรับ HMBC จะแสดงข้อมูลการเชื่อมต่อกันของคาร์บอน โดยจะแสดงผลการคู่ควบระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนที่อยู่ห่าง 2-4 พันธะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 ที่มา และความสำคัญของปัญหาที่นำไปสู่การค้นคว้าวิจัย

พืชสมุนไพรได้รับความสนใจอย่างมากในอดีตจนถึงปัจจุบัน พืชสมุนไพรมีบทบาทในการดูแลด้านสุขภาพของผู้บริโภคทั้งในแง่ของการป้องกันและการรักษาโรคต่างๆ ดังนั้น จึงมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพืชสมุนไพรทั้งในด้านการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เพื่อเพิ่มความเชื่อถือได้ให้กับผู้ใช้ รวมทั้งเป็นข้อมูลที่อาจประยุกต์ในอุตสาหกรรมยาต่อไป ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่า บุนนาค เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยามากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของดอก เกสร และน้ำมันหอมระเหย โดยมีการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีมาบ้างแล้ว อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในบุนนาค จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น พบว่า ส่วนสกัดจากเกสร และกลีบดอก กับฐานรองดอกบุนนาค มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เช่น มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (Anti-TB) และต้านเชื้อมาเลเรีย (Anti-malarial) ในระดับที่น่าสนใจ (ตาราง 1.1) ดังนั้นจึงเลือกที่จะศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมี และแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนต่างๆ ของดอกบุนนาค เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญต่อไป

ตาราง 1.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากดอกบุนนาค[33]

ส่วนของพืช	ส่วนสกัด	Bioactivities (EC_{50} : μg/ml)					
		Anti-TB (MIC)	Anti-malarial	Vero Cell	Cytotoxicity		
					KB	BC	NCI-H187
เกสร	Hexane	50	Inactive	14.0	18.23	7.65	8.3
	EtOAc	50	Inactive	31.1	Inactive	10.42	13.4
	MeOH	200	Inactive	>50	Inactive	Inactive	Inactive
ดอก+	Hexane	50	Inactive	46.0	Inactive	Inactive	14.9
ฐานรองดอก	EtOAc	50	4.6	44.4	Inactive	Inactive	Inactive
	MeOH	200	Inactive	>50	Inactive	Inactive	Inactive

(Anti-TB = ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค, Vero Cell = ความเป็นพิษต่อเซลล์ดี, KB = ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุข้างแก้ม, BC = ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม, NCI-H187 = ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมี และแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนต่างๆ ของดอกบุนนาค *(Mesua ferrea)* เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (Anti-TB) และ ฤทธิ์ต้านเชื้อมาเลเลีย (Anti-Malarial)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved