โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในเห็ดด้วยเทคนิคอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี

Determination of Phenolic Acids in Mushrooms by Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

ชื่อนิสิต นางสาวอิสญาภรณ์ พุทธสา

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2558

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในเห็ดด้วยเทคนิคอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี

Determination of Phenolic Acids in Mushrooms by Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

โดย

นางสาวอิสญาภรณ์ พุทธสา

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง การวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในเห็ดด้วยเทคนิคอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี

โดย นางสาวอิสญาภรณ์ พุทธสา

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนูญ หนูจักร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พุทธรักษา วรานุศุภากุล)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 11 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2559

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในเห็ดด้วยเทคนิคอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวอิสญาภรณ์ พุทธสา เลขประจำตัว 5533175523

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนูญ หนูจักร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระกรดฟีนอลิกในเห็ด ได้แก่ กรดเฟอรูลิก กรดโปรโตคาเทคชูอิก กรดคลอโรจีนิก กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดคาเฟอิก กรดซิแนพพิก และกรดพาราคูมาริก ด้วยเทคนิคอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี (UHPLC-MS/MS) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์มวลชนิดทริเปิลควอดรูโพล และภาวะของ UHPLC คือ เฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนท์ของกรดฟอร์มิกในน้ำ 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร และกรดฟอร์มิกในเมทานอล 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที และคอลัมน์ symmetry shield RP-18 ขนาด 2.1×150 mm, 3.5 µm จากการใช้การเลือกวิเคราะห์เฉพาะไอออนต่างๆกันด้วยวิธี multiple reaction monitoring พบว่า ขีดจำกัดของวิธีตรวจวัดอยู่ในช่วง 0.055-1.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดของวิธีตรวจวัดเชิงปริมาณอยู่ในช่วง 0.16-5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง พบว่าเห็ดชนิดเดียวกันแต่มาจากพื้นที่ปลูกที่แตกต่างกัน มีชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลิกที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม กรดฟีนอลิกสามชนิดที่พบมากในเห็ด คือ กรดพาราคูมาริก กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดโปรโตคาเทคชูอิก

คำสำคัญ: อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี, กรดฟีนอลิก

Title Determination of Phenolic Acids in Mushrooms by Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Student name Itsayaporn Puttasa ID 5533175523

Advisor name Associate Professor Dr. Thumnoon Nhujak

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2015

Abstract

In this work, quantitative determination of seven antioxidant phenolic acids in mushrooms, including protocatechuic acid, chlorogenic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, sinapic acid, ferulic acid and *p*-coumaric acid was carried out by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using a triple quadrupole mass analyzer and the following UHPLC conditions: gradient elution mobile phase of 0.1% v/v formic acid in water : 0.1% v/v formic acid in methanol, flow rate of 0.3 mL/min and symmetry shield RP-18 column size 2.1×150 mm, 3.5 µm. Using a multiple reaction monitoring mode for quantitative analyses of different ions, results show the method detection limit and the method quantitation limit in ranges of 0.055-1.7 and 0.16-5.0 mg/kg, respectively. In real sample analysis, the same mushroom species from different cultivated area were found to contain some different types and amounts of phenolic acids. However, the three major phenolic acids in the mushrooms are *p*-coumaric, *p*-hydroxybenzoic, and protocatechuic acids.

Keywords: Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Phenolic acids

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์และความช่วยเหลืออย่างดีจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนูญ หนูจักร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง สำหรับคำแนะนำต่างๆ ความช่วยเหลือในด้านความสะดวกในเรื่องของเครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นในการทำงานวิจัย อีกทั้งยังสละเวลาช่วยเหลือในการทำรายงานวิจัยฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พุทธรักษา วรานุศุภากุล ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบและสละเวลาในการตรวจแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย สามารถนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการทำงานวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เปิดโอกาสและอนุมัติเงินสนับสนุนในการทำงานวิจัยโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ และขอขอบพระคุณพี่ๆนิสิตปริญญาโทหลายๆท่านที่ให้คำปรึกษาแนะนำตลอดงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณครอบครัวที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจที่ดีเสมอมา และขอบคุณเพื่อนๆ รวมทั้งผู้ที่มิได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.3 วัตถุประสงค์	4
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎี	5
2.1 กรดฟีนอลิก	5
2.2 อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี (UHPLC-MS/MS)	6
บทที่ 3 การทดลอง	14
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	14
3.2 สารเคมี	15
3.3 การเตรียมสารละลาย	15
3.4 การวิเคราะห์ด้วย UHPLC-MS/MS	17
3.5 การหาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)	17
3.6 การเตรียมตัวอย่าง	19
บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์ผลการทดลอง	20
4.1 การหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการแยกกรดฟีนอลิกด้วย UHPLC-MS/MS	20
4.2 สภาวะที่ใช้ในการแยกกรดฟีนอลิกด้วย UHPLC-MS/MS	21

หน้า

4.3 การหาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) 24
4.4 การวิเคราะห์ตัวอย่าง 26
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 28
เอกสารอ้างอิง 29
ภาคผนวก ก 31
ภาคผนวก ข 38
ประวัติผู้วิจัย 53

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ส่วนประกอบของเครื่อง UHPLC-MS/MS	7
2.2	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ Isocratic elution	8
2.3	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ Gradient elution	8
2.4	six-port injection valve	9
2.5	แผนภาพของ Triple quadrupole	12
2.6	channel electron multiplier detector	13
4.1	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน 7 ชนิด	22
4.2	ลำดับการแยกของสารมาตรฐานผสม 7 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	22
4.3	โครมาโทแกรมยืนยัน retention time ของกรดเฟอรูลิก	23

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	โครงสร้าง สูตรโมเลกุลและมวลโมเลกุลของกรดฟีนอลิกที่ใช้ในการศึกษา	5
4.1	พารามิเตอร์ของสารละลายมาตรฐาน 7 ชนิดที่เลือกจากตาราง ก.1 เพื่อนำไปใช้ในการแยกกรดฟีนอลิก	20
4.2	อัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ต่อเวลา	21
4.3	พารามิเตอร์ต่างๆ ของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ: slope, intercept และ R^2	24
4.4	ค่า LOD, LOQ, MDL และ MQL ที่ได้จากความเข้มข้นต่ำสุด 4 ความเข้มข้นจาก calibration curve	25
4.5	สมการเส้นตรงของกราฟสอบเทียบของสารละลายมาตรฐาน	26
4.6	ปริมาณกรดฟีนอลิก 7 ชนิดในเห็ดนางรมหลวงและเห็ดเข็มทอง	27

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

เห็ดเป็นส่วนประกอบในการปรุงอาหารหลายชนิด เป็นอาหารที่คนคุ้นเคยและชื่นชอบ เนื่องจากเห็ดมีรสชาติดี มีประโยชน์ มีหลายชนิดให้เลือกรับประทาน และมีสรรพคุณทางยา แต่ไม่ใช่เห็ดทุกชนิดที่มีประโยชน์ เห็ดมีพิษที่รับประทานแล้วทำให้เสียชีวิตก็พบได้ คุณค่าทางอาหารและโภชนาการของเห็ดแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ด เห็ดอุดมไปด้วยโปรตีนซึ่งมีคุณภาพดีกว่าในผัก แต่ก็ยังเป็นโปรตีนที่ไม่สมบูรณ์บางส่วน เมื่อเทียบกับเนื้อสัตว์ มีวิตามินและเกลือแร่ แต่ไขมันต่ำ ส่วนประกอบหลักเป็นกรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต และไฟเบอร์[1] เห็ดที่มีการวิเคราะห์ว่ามีสรรพคุณทางยานั้น ส่วนใหญ่เป็นเห็ดที่คนนำมาปรุงอาหารได้ง่าย เช่น เห็ดหอม เห็ดเข็มทอง เห็ดนางฟ้า เห็ดฟาง เห็ดโคน เห็ดหูหนู เห็ดหลินจือ เป็นต้น จากสรรพคุณทั้งหมดที่กล่าวมานี้ หลายงานวิจัยได้ศึกษาสารสำคัญต่างๆในเห็ดด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคและพัฒนาให้เป็นสารสำคัญในยารักษาโรค มีรายงานสรรพคุณของเห็ดออรินจิหรือเห็ดนางรมหลวง ที่มีผลในการเพิ่มภูมิคุ้มกัน ป้องกันภาวะไขมันในเลือดสูง ปกป้องตับจากสารพิษ ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเนื้องอก[2] เห็ด *Agaricus bisporus* (white button mushroom; WBM) หรือที่รู้จักกันในชื่อเห็ดแชมปิญอง หรือเห็ดกระดุม เป็นเห็ดที่มีใยอาหารและสารต้านอนุมูลอิสระสูง อุดมไปด้วยวิตามินซี วิตามินดี วิตามิน B12 โฟเลต และพอลิฟีนอล ซึ่งมีผลในการป้องกันและรักษาโรคหัวใจ และโรคเบาหวาน[3]

สารสกัดสำคัญในเห็ดที่มีฤทธิ์ทางเภสัชในการต้านอนุมูลอิสระ คือสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก ใช้ป้องกันและรักษาโรค เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านไวรัส ต้านการแพ้ และการอักเสบ เป็นต้น[4] ด้วยเห็ดมีประโยชน์ที่มากมาย Reis F. S. และคณะ[5] จึงตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในเห็ด 5 ชนิด ได้แก่ *Agaricus bisporus* (white), *Agaricus bisporus* (brown), *Pleurotus ostreatus* (oyster), *Pleurotus eryngii* (king oyster) และ *Lentinula edodes* (shiitake) โดยพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระในเห็ดแต่ละชนิดมีปริมาณไม่เท่ากัน Palacios I. และคณะ[6] ได้วิเคราะห์หา

ปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แพร่หลายในการตรวจวัดปริมาณสารสำคัญในเห็ด โดยตัวอย่างเห็ดที่ใช้วิเคราะห์เป็นเห็ดที่ปลูกในประเทศสเปน นอกจากนี้ Barros L. และคณะ[7] ได้วิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนอลิก 5 ชนิด ได้แก่ กรดพาราคูมาริก กรดโปรโตคาเทคชูอิก กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดวานิลิก 2 ไอโซเมอร์ ในเห็ด 16 ชนิด ซึ่งเป็นเห็ดที่ปลูกในประเทศโปรตุเกส โดยใช้เทคนิค HPLC-DAD-ESI/MS พบว่าปริมาณกรดฟีนอลิกแต่ละชนิดในเห็ดแต่ละชนิด มีปริมาณที่แตกต่างกัน จากงานวิจัยหลายๆ งานข้างต้นนั้น เห็ดที่นำมาวิเคราะห์นั้นเป็นเห็ดที่หาได้จากในประเทศที่ทำการวิจัยนั้นๆ บางชนิดมีเพาะปลูกในหลายประเทศรวมถึงประเทศไทย แต่บางชนิดเป็นเห็ดประจำท้องถิ่นเฉพาะในประเทศที่ทำการวิจัย

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจตรวจวัดหาปริมาณกรดฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในเห็ด โดยใช้อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี (UHPLC-MS/MS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง ตรวจวัดสารได้ในปริมาณต่ำๆ และวิเคราะห์ปริมาณสารที่ไม่สามารถแยกพีกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ด้วยเทคนิค HPLC ธรรมดาได้ โดยศึกษาในเห็ดที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นของประเทศไทย มีการปลูกในหลายจังหวัด คือ เห็ดเข็มทอง (*Flammulina velutipes*) และเห็ดนางรมหลวง (*Pleurotus eryngii*) โดยเห็ดชนิดหนึ่งๆจะนำมาจากพื้นที่ปลูก 3 จังหวัดที่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาปริมาณกรดฟีนอลิกที่แตกต่างกันในเห็ดชนิดเดียวกันแต่ต่างพื้นที่ปลูก

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กรดฟีนอลิกเป็นอนุพันธ์ของกรดเบนโซอิกและกรดซินนามิก มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็ง สารต้านการอักเสบ และอื่นๆ Muszynska B. และคณะ[8] จึงศึกษากรดฟีนอลิกทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ในการวิเคราะห์เห็ดจากไฟลัม Basidiomycota ได้แก่ เห็ดขอนต้นสน (*Armillaria mellea*) เห็ดบรูนซบ (*Boletus badius*) เห็ดตับเต่า (*Boletus edulis*) เห็ดมันปู (*Cantharellus cibarius*) เห็ดฟานสีส้ม (*Lactarius deliciosus*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) ผลการวิเคราะห์คือได้พบกรดเหล่านี้ในเห็ด คือ กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดพาราคูมาริก กรดเฟอรูลิก กรดซิแนพพิก กรดวานิลิก กรดโปรโตคาเทคชูอิก และกรดซินนามิก โดยปริมาณที่พบแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของเห็ด โดยปริมาณกรดฟีนอลิกทั้งหมดพบตั้งแต่ 6.00 mg/kg ในเห็ดขอนต้นสน จนถึง 48.25 mg/kg ในเห็ดบรูน-ซบ ส่วนกรดโปรโตคาเทคชูอิกพบมากในเห็ดบรูนซบ กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิกและกรดซิแนพพิก

พบมากในเห็ดนางรม กรดซินนามิกพบมากในเห็ดบรูนซบ ส่วนกรดที่เหลือคือ กรดวานิลิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอรูลิก พบได้ในเห็ดบางชนิดเท่านั้น ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของกรดฟีนอลิกในเห็ดในเห็ดแต่ละชนิด

Palacios I. และคณะ[6] ทำการหาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในเห็ดรับประทานได้ 8 ชนิด ในประเทศสเปน ได้แก่ เห็ดแชมปิญองหรือเห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*) เห็ดตับเต่า (*Boletus edulis*) เห็ดเซนต์จอร์จ (*Calocybe gambosa*) เห็ดมันปู (*Cantharellus cibarius*) เห็ดแตรดำ (*Craterellus cornucopioiders*) เห็ดมาร์ช (*Hygrophorus marzuolus*) เห็ดฟานสีส้ม (*Lactarius deliciosus*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) โดยการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดใช้การทดสอบ Folin-Ciocalteau และการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดใช้การทดสอบจากปฏิกิริยาการเปลี่ยนสี (Colorimetric reaction) แต่การหาความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกแต่ละชนิดที่พบในเห็ดซึ่งเกี่ยวข้องกับงานวิจัยฉบับนี้ หาความเข้มข้นโดยใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ได้รายงานชนิดกรดฟีนอลิกที่พบ คือ กรดคาเฟอิก กรดคลอโรจีนิก กรดพาราคูมาริก กรดเฟอรูลิก กรดแกลลิก กรดเจนทิสิก กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดโฮโมเจนทิสิก และกรดโปรโตคาเทคชูอิก โดยกรดโฮโมเจนทิสิก คือกรดฟีนอลิกที่พบว่ามีมากที่สุดในเห็ดทุกชนิด แต่ปริมาณที่พบแตกต่างกันไปตามชนิดของเห็ด และกรดที่พบในเห็ดทุกชนิด คือ กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดโฮโมเจนทิสิก กรดแกลลิก และกรดโปรโตคาเทคชูอิก นอกจากนี้ยังตรวจพบฟลาโวนอยด์ 2 ชนิด คือ ไมริเซติน และไพโรแกลลอล อีกด้วย

Barros L. และคณะ[7] วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในเห็ดโปรตุเกส 16 ชนิด โดยการสกัดด้วยเมทานอล และใช้เทคนิค HPLC-DAD-ESI/MS โดยตรวจไม่พบสารฟลาโวนอยด์ แต่พบกรดฟีนอลิก 5 ชนิดคือ กรดพาราคูมาริก กรดโปรโตคาเทคชูอิก กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดวานิลิก 2 ไอโซเมอร์ โดยกรดฟีนอลิกที่พบว่ามีปริมาณมากที่สุดในเห็ดคือ กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก

Nowacka N. และคณะ[9] ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในเห็ดจากประเทศโปแลนด์ โดยการสกัดด้วยเอทานอลและใช้เทคนิค LC-ESI-MS/MS พบกรดโปรโตคาเทคชูอิก กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดวานิลิก กรดซาลิซิลิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และกรดเฟอรูลิก โดยสารส่วนใหญ่ที่พบในเห็ดโปแลนด์นี้คือกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก

Kim M. และคณะ[10] ทำการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของเห็ดรับประทานได้ 5 ชนิดและเห็ดที่ใช้เป็นยาอีก 5 ชนิดในเกาหลี โดยใช้เทคนิคเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์

ลิควิดโครมาโทกราฟี สารประกอบฟีนอลิกที่ตรวจวัดได้ในการวิเคราะห์นี้พบถึง 28 ชนิด และความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกเฉลี่ยรวมทั้งหมดเท่ากับ 326 µg/g ความเข้มข้นเฉลี่ยในเห็ดรับประทานได้เท่ากับ 147 µg/g และความเข้มข้นเฉลี่ยในเห็ดที่ใช้เป็นยาเท่ากับ 477 µg/g การวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ได้ความเข้มข้นฟลาโวนอยด์เฉลี่ยรวมทั้งหมดเท่ากับ 49 µg/g ความเข้มข้นเฉลี่ยในเห็ดรับประทานได้เท่ากับ 22 µg/g และความเข้มข้นเฉลี่ยในเห็ดที่ใช้เป็นยาเท่ากับ 76 µg/g จะเห็นได้ว่าเห็ดที่ใช้เป็นยามีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเห็ดที่รับประทานได้

Lin J. และคณะ[11] ทำการศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยการหาปริมาณกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในเห็ดนางรมหลวงหรือที่รู้จักกันดีในชื่อ เห็ดออรินจิ (*Pleurotus eryngii*) ที่อายุเก็บเกี่ยวต่างกัน คือ 10 วัน 12 วัน และ 15 วัน โดยการสกัดด้วยเอทานอลและเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ได้ผลคือการเก็บเกี่ยววันที่ 10 ให้ปริมาณกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากที่สุด เมื่อเวลาผ่านไปเป็นวันที่ 12 และ 15 ปริมาณที่พบกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จะลดลงตามลำดับ เพราะฉะนั้นเวลาในการเก็บเกี่ยวกมีผลต่อปริมาณสารสำคัญในเห็ดอีกด้วยเช่นกัน

1.3 วัตถุประสงค์

ตรวจวัดปริมาณกรดฟีนอลิกในเห็ดด้วยอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี (UHPLC-MS/MS)

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1. หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดฟีนอลิกด้วย UHPLC-MS/MS
2. ตรวจความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์
3. เลือกเห็ดแต่ละชนิดจาก 3 จังหวัดที่แตกต่างกัน และหาปริมาณกรดฟีนอลิกในเห็ด

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

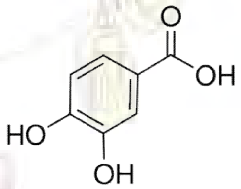
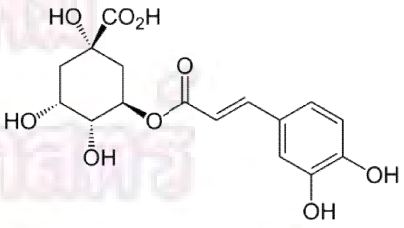
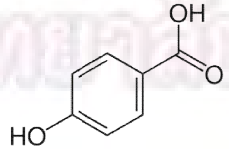
1. มีความรู้ความเข้าใจในองค์ประกอบและหลักการทำงานของ UHPLC-MS/MS
2. สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมและวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนอลิกในเห็ดได้

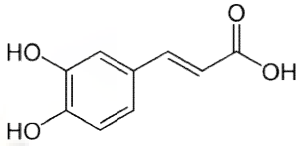
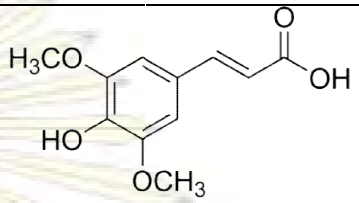
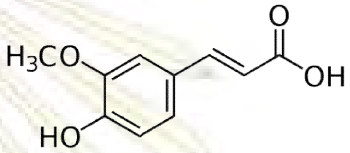
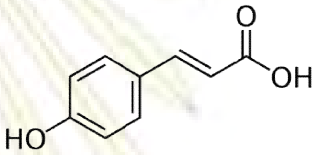
บทที่ 2
ทฤษฎี

2.1 กรดฟีนอลิก[12]

กรดฟีนอลิก คือสารประกอบฟีนอล มีมากมายหลายชนิดและมีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน เป็นสารที่มีวงแหวนอะโรมาติกทีมีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ และมีหมู่กรดคาร์บอก-ซิลิก 1 หมู่ พบได้ในพืชผักและผลไม้ ปริมาณที่พบจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช วิธีการปลูก โดยมีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพ มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระคือสารที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระก่อตัวขึ้น โดยจะทำการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ และหยุดการก่อตัวใหม่ของอนุมูลอิสระ ช่วยซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดจากตัวอนุมูลอิสระที่ไปทำลายเซลล์ต่างๆในร่างกาย ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระช่วยในการป้องกันโรคต่างๆได้ดี เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจและโรคหลอดเลือดสมองได้ เป็นต้น เนื่องจากเห็ดเป็นพืชที่มีกรดฟีนอลิกหลายชนิดและบางชนิดพบในปริมาณสูง งานวิจัยนี้จึงได้วิเคราะห์กรดฟีนอลิกในเห็ด 7 ชนิด มีโครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 โครงสร้าง สูตรโมเลกุลและมวลโมเลกุลของกรดฟีนอลิกที่ใช้ในการศึกษา

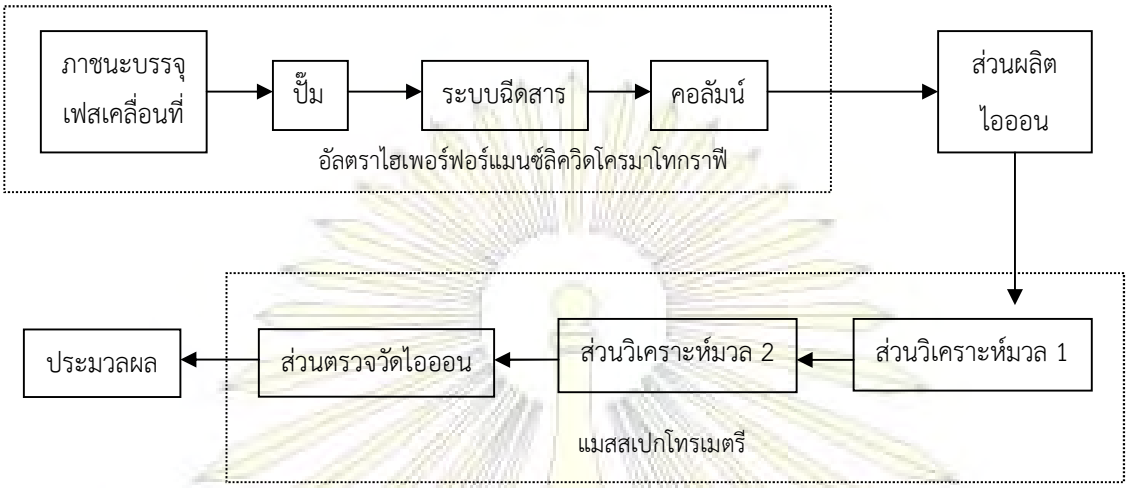
ชื่อสาร	สูตรโมเลกุล	มวลโมเลกุล	โครงสร้าง
กรดโปรโตคาเทคชูอิก	$C_7H_6O_4$	154.03	
กรดคลอโรจีนิก	$C_{16}H_{18}O_9$	354.1	
กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก	$C_7H_6O_3$	138.03	

ชื่อสาร	สูตรโมเลกุล	มวลโมเลกุล	โครงสร้าง
กรดคาเฟอิก	$C_9H_8O_4$	180.04	
กรดซิแนพพิก	$C_{11}H_{12}O_5$	224.07	
กรดเฟอรูลิก	$C_{10}H_{10}O_4$	194.06	
กรดพาราคูมาริก	$C_9H_8O_3$	164.05	

2.2 อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี (UHPLC-MS/MS)

อัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี เป็นเทคนิคควบคู่กันระหว่างการแยกสารด้วยอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี โดยใช้หลักการแยกตามคุณสมบัติทางเคมีของสารแต่ละชนิด เช่น มีขั้ว (polar) ไม่มีขั้ว (non polar) ความเป็นกรดเบส และอาศัยสมดุลระหว่างเฟสคงที่ (stationary phase) ซึ่งมีสถานะเป็นของแข็งที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เป็นตัวทำละลายนำพาสารเข้าและออกจากคอลัมน์ และแมสสเปก-โทรมิเตอร์ ซึ่งใช้หลักการทำให้สารเกิดการแตกตัวเป็นไอออนและวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) โดยรูปแบบการแตกตัวของสารเป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิด สามารถบอกโครงสร้างทางเคมีของสารได้ จึงเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ในการวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ผลที่ต้องการปริมาณต่ำถึงระดับส่วนในพันล้านส่วน (ppb) ได้ดีอีกด้วย แผนภาพการทำงานของ UHPLC-MS/MS แสดงในรูป 2.1

บัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบของเครื่อง UHPLC-MS/MS

หลักการและทฤษฎีอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (UHPLC)[13]

UHPLC เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยสมดุลของเฟส 2 เฟส คือเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยเฟสเคลื่อนที่จะเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปชะสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าคอลัมน์ ซึ่งมีเฟสคงที่ที่เป็นของแข็งบรรจุอยู่ หลักการและทฤษฎีเหมือนกับเทคนิค HPLC แต่ UHPLC เป็นการพัฒนาเทคนิค HPLC ในส่วนของอนุภาคสารที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์หรือที่เรียกว่าเฟสคงที่ให้มีขนาดเล็กลง และคอลัมน์มีขนาดสั้นลง ทำให้ใช้สารในการวิเคราะห์น้อยลง เวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์จึงสั้นลง ทำให้ลักษณะฐานพีกแคบเกิดการแยกที่ดีขึ้น จากการที่อนุภาคเฟสคงที่ในคอลัมน์มีขนาดเล็กลง ทำให้เครื่อง UHPLC ต้องการแรงดันเพื่อขับเคลื่อนเฟสเคลื่อนที่ที่สูงกว่าเครื่อง HPLC จึงต้องใช้ pump ที่มีความแข็งแรง ทนต่อสภาพความดันสูง ซึ่ง UHPLC นี้สามารถทนแรงดันได้สูงสุดถึง 1,200 bar จากเดิมเพียง 400 bar ทำให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น เวลาในการวิเคราะห์จึงน้อยลง

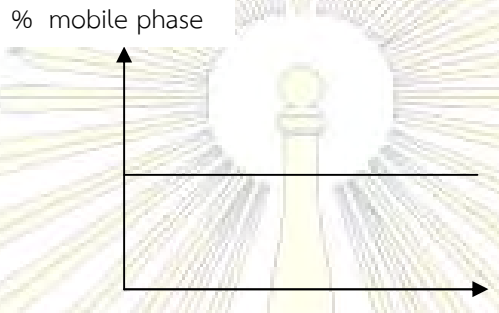
องค์ประกอบของเครื่องมือในอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี[14]

1. เครื่องสูบฉีดของเหลว (pump)

เนื่องจากอนุภาคของเฟสคงที่ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์มีขนาดเล็กมาก ทำให้เกิดความดันในคอลัมน์สูงและต้านการไหลของเฟสเคลื่อนที่ จึงจำเป็นต้องใช้ pump ความดันสูง เพื่อผลักการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลผ่านคอลัมน์ นอกจากนี้ pump ยังทำหน้าที่ควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบแยกได้ 2 วิธี คือ

1.1 การผ่านเฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติก (Isocratic elution)

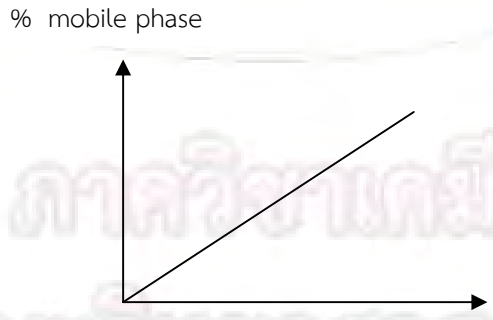
เป็นการใช้เฟสเคลื่อนที่ชนิดเดียวหรือหลายชนิดที่มีอัตราส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่คงที่ตลอดการทดลอง เป็น pump ชนิด Isocratic pump



รูปที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ Isocratic elution

1.2 การผ่านสารละลายแบบเกรเดียนท์ (Gradient elution)

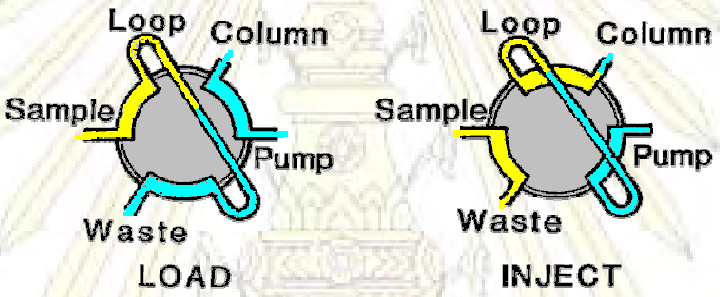
เป็นการใช้เฟสเคลื่อนที่มากกว่า 1 ชนิด ที่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในระหว่างการวิเคราะห์ เป็นวิธีที่เหมาะในการแยกสารผสมที่มีสมบัติในการละลายแตกต่างกันมาก สามารถแยกได้ดีกว่าแบบ Isocratic elution โดยในงานวิจัยนี้ใช้การผ่านสารละลายแบบเกรเดียนท์ ใช้ pump ชนิด Binary pump ที่มีการผสมเฟสเคลื่อนที่แบบ high pressure mixing ซึ่งจะสูบฉีดเฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิดเข้ามาผสมกันภายใต้ความดันสูง ก่อนผ่านเข้าคอลัมน์



รูปที่ 2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่กับเวลาในระบบ Gradient elution

2. ระบบฉีดสาร (Injection system)

การฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์มีความสำคัญต่อการแยกสาร เนื่องจากสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าคอลัมน์ควรอยู่ในลักษณะที่มีแถบแคบที่สุดเท่าที่จะทำได้ และไม่รบกวนการไหลของเฟสเคลื่อนที่ โดยในงานวิจัยนี้ใช้การฉีดสารระบบ autosampler สำหรับความดันสูงสุด 1200 bar ที่ฉีดสารด้วยความเร็วและมีความแม่นยำสูง โดยฉีดสารเข้าไปใน six-port injection valve ดังรูปที่ 2.4 ที่ควบคุมการหมุนด้วยมอเตอร์ความเร็วสูง เมื่อฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในท่อพักสารตัวอย่าง (sample loop) ซึ่งมีปริมาตรคงที่ จากนั้นมอเตอร์จะหมุนให้เฟสเคลื่อนที่ไล่ของเหลวทั้งหมดลงสู่คอลัมน์



รูปที่ 2.4 six-port injection valve[15]

3. คอลัมน์ (Column)

คอลัมน์ที่ใช้สำหรับงานวิจัยนี้ เป็นคอลัมน์ที่ทำจากสแตนเลส มีความยาว 15 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ 2.1 มิลลิเมตร เฟสคงที่ภายในคอลัมน์มีหลายประเภท ได้แก่ normal phase, reversed phase, ion-pairing, ion-exchange และ size-exclusion เป็นต้น ในที่นี้เฟสคงที่เป็นชนิด reversed phase ซึ่งเป็นที่นิยมสำหรับการวิเคราะห์ด้วย UHPLC เป็นการใช้เฟสคงที่ที่ไม่มีสภาพขั้ว ในที่นี้คือ C-18 และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีสภาพขั้วสูง ในที่นี้ใช้น้ำและเมทานอล ลำดับการชะคือ สารที่มีขั้วมากจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ก่อน เนื่องจากมีความสามารถในการละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้สูงกว่า

หลักและทฤษฎีแมสสเปกโทรเมตรี[16]

หลักของเทคนิคนี้ คือการเปลี่ยนรูปโมเลกุลของสารตัวอย่างให้กลายเป็นไอออนและมีประจุบวก ซึ่งถ้าหากมีพลังงานมากพอไอออนที่เกิดขึ้นนี้อาจแตกตัวกลายเป็นไอออนย่อยๆได้ต่อไปอีก จากนั้นจึงทำการแยกและตรวจวัดไอออนต่างๆที่เกิดขึ้นตามค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio

หรือ m/z) ของไอออนเหล่านั้น และบันทึกข้อมูลที่ได้จากการตรวจวัดนี้ในรูปของแมสสเปกตรัมของสารตัวอย่าง ซึ่งก็คือกราฟแสดงผลที่มีแกน x เป็นปริมาณ (สัมพัทธ์) ของไอออนแต่ละชนิดที่เกิดขึ้น และมีแกน y เป็นค่ามวลต่อประจุของไอออนเหล่านั้น เทคนิคแมสสเปกโทรเมตรีเป็นเทคนิคที่มีการทำลายสารตัวอย่างไปในกระบวนการทำให้เกิดเป็นไอออน แต่เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวในการตรวจวัดสูงมาก ทำให้วิเคราะห์สารตัวอย่างใช้ปริมาณสารตัวอย่างที่ต่ำมาก

องค์ประกอบของเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ที่ใช้เป็นเครื่องตรวจวัดเมื่อต่อกับอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (UHPLC-MS/MS)

1. ระบบนำเข้าสารตัวอย่าง (Inlet system)

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

2. ส่วนผลิตไอออน (Ion source)

   เป็นส่วนที่ให้พลังงานที่สูงเพียงพอกับสารตัวอย่าง เพื่อให้เกิดไอออไนเซชันกลายเป็นไอออนโมเลกุล (molecule ion) หรือ parent ion โดยไอออนโมเลกุลที่เกิดขึ้นนี้ ถ้ามีพลังงานสะสมสูงกว่าพลังงานพันธะก็จะเกิดการแตกของพันธะภายในไอออนโมกุล กลายเป็นไอออนย่อยๆ (fragment ion) หรือ daughter ion ที่มีขนาดเล็กลงกว่าเดิม ไอออนย่อยๆที่เกิดขึ้นนี้หากยังมีพลังงานสูงอยู่ สามารถเกิดการแตกตัวไปเป็นไอออนย่อยลงไปได้อีก จากนั้นไอออนต่างๆที่เกิดขึ้นจากส่วนผลิต ไอออนนี้จะถูกส่งผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (Mass analyzer) ส่วนผลิตไอออนในปัจจุบันมีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายมี 2 วิธีคือ

   2.1 Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)

   เป็นการทำให้สารตัวอย่างเกิดเป็นไอออนในขณะที่สารอยู่ในสภาวะแก๊สที่ความดันบรรยากาศ โดยสารตัวอย่างจะกลายเป็นไอโดยการพ่นแก๊สร้อนซึ่งใช้แก๊สไนโตรเจน หรือเรียกว่า neubulizer gas เมื่อละอองของสารตัวอย่างเข้าสู่ส่วนผลิตไอออน ตัวทำละลายที่มีปริมาณมากกว่าจะชนกับเข็มที่มีศักย์ไฟฟ้าพลังงานสูง ทำให้เกิดเป็นรีเอเจนต์ไอออน (ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งไอออนบวกและไอออนลบขึ้นอยู่กับโหมดการวิเคราะห์ที่เลือกใช้) โดยที่รีเอเจนต์ไอออนที่เกิดขึ้นจะชนกับสารตัวอย่าง ทำให้เกิดไอออนของสารตัวอย่าง จากนั้นไอออนเพียงส่วนหนึ่งเท่านั้นจะถูกดึงดูดให้เคลื่อน

ที่ผ่านช่องเล็กๆ (skimmer) เข้าไปสู่ส่วนวิเคราะห์มวล เทคนิคนี้ใช้ได้ดีกับสารตัวอย่างที่ไม่ได้อยู่ในรูปที่เกิดเป็นไอออนในสารละลาย และสารตัวอย่างที่ค่อนข้างไม่มีขั้ว

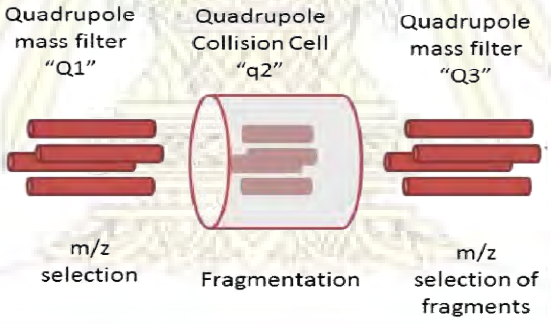
2.2 Electrospray Ionization (ESI)

เป็นเทคนิคผลิตไอออนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ การผลิตไอออนด้วยเทคนิคนี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่อยู่ในรูปของไอออนในตัวทำละลาย โดยเมื่อสารละลายออกจากระบบของ UHPLC จะเข้าสู่หลอดแคพิลลารี ซึ่งจะมีการให้ค่าศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงประมาณ 3000 v ทำให้ ณ บริเวณนี้เกิดเป็นสนามไฟฟ้าที่มีความแรงมาก เมื่อสารละลายผ่านออกจากปลายหลอดแคพิลลารี จึงมีลักษณะเป็นหยดของเหลวที่มีประจุอยู่ที่ผิว และเมื่อเกิดการระเหยของหยดของเหลวจะทำให้หยดของเหลวมีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ ประจุจะเข้าใกล้กันมากขึ้นเกิดการแตกกระจายเป็นไอออน สำหรับเทคนิค ESI เรามารถเลือกที่จะวิเคราะห์ไอออนบวกหรือไอออนลบก็ได้ ถ้าเลือกวิเคราะห์ไอออนบวก (positive mode) ไอออนบวกเท่านั้นที่จะผ่านเข้าไปยังส่วนตรวจวัดในทางกลับกันถ้าต้องการวิเคราะห์ไอออนลบ (negative mode) ไอออนลบเท่านั้นที่จะวิ่งไปยังส่วนตรวจวัด

3. ส่วนวิเคราะห์มวล (Mass analyzer)

หน้าที่ของส่วนวิเคราะห์มวล คือ การวิเคราะห์ค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของอนุภาคที่ส่งมาจากส่วนผลิตไอออน โดยทำการแยกไอออนตามค่า m/z ของไอออนนั้น ส่วนวิเคราะห์มวลมีหลายประเภท เช่น Quadrupole, Time of flight (TOF), Magnetic sector (Double focusing), Ion trap และ Ion cyclotron resonance (ICR) ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะ Quadrupole ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นเครื่องวิเคราะห์มวลที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะมีขนาดกะทัดรัด ราคาไม่สูง การใช้งานค่อนข้างง่าย อีกทั้งมีความทนทานและความเร็วในการวิเคราะห์สูง Quadrupole ประกอบด้วยแท่งโลหะกลม 4 แท่งที่เชื่อมต่อกันทางไฟฟ้า วางตัวขนานกัน ดังรูปที่ 2.5 เริ่มจากการโฟกัสไอออนด้วย ion optic ให้เคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในบริเวณช่องตรงกลางระหว่างแท่งโลหะทั้ง 4 การแยกไอออนทำโดยการปรับค่าสนามไฟฟ้าภายในบริเวณช่องตรงกลางของแท่งโลหะเหล่านี้ ทำให้ไอออนที่มี m/z เฉพาะค่าหนึ่งๆเท่านั้นที่สามารถเคลื่อนที่ผ่านออกไปยังส่วนตรวจวัดได้ ในงานวิจัยนี้ใช้ส่วนวิเคราะห์มวลแบบ Triple quadrupoles (TQ) ซึ่งประกอบด้วย quadrupole ทั้งหมด 3 หน่วย โดย quadrupole

หน่วยแรก (Q1) ทำหน้าที่เป็นแมสสเปกโทรมิเตอร์ตัวที่ 1 (MS1) เพื่อคัดเลือกไอออนตั้งต้น (precursor ion) ที่ต้องการศึกษาส่งต่อไปยัง quadrupole หน่วยที่สอง (Q2) ซึ่งทำหน้าที่เป็น collision cell เหนี่ยวนำให้เกิดการแตกตัวของไอออน โดยไม่มีการแยกมวลของไอออนแต่อย่างใด เรียกกระบวนการนี้ว่า collision induced dissociation (CID) และไอออนย่อยที่เกิดจากการแตกตัวจาก Q2 จะถูกส่งต่อไปยัง quadrupole หน่วยที่สาม (Q3) ซึ่งทำหน้าที่เป็น MS2 เพื่อวิเคราะห์ไอออนย่อยที่เกิดขึ้นเหล่านี้ นอกจากนี้การวิเคราะห์สารด้วยระบบ Triple quadrupole สามารถทำได้หลายรูปแบบขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงาน ในงานวิจัยนี้เลือกวิเคราะห์แบบ multiple reaction monitoring (MRM) 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

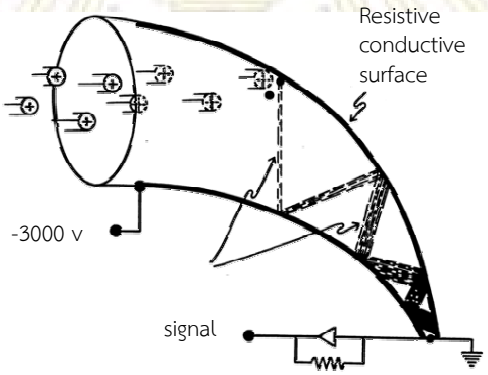


รูปที่ 2.5 แผนภาพของ Triple quadrupoles[17]

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ส่วนตรวจวัด (Detector)

continuous dynode electron multiplier detector เรียกกันทั่วไปว่า channel electron multiplier (CEM) หรือ channeltron มีลักษณะเป็นหลอดแก้วรูปกรวย ดังแสดงในรูป 2.6 เมื่อไอออนที่ผ่านส่วนวิเคราะห์มวลจะตกกระทบที่ผิวภายในของ detector และเกิดการปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาจำนวนหนึ่ง อิเล็กตรอนเหล่านี้จะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้าภายใน detector ให้วิ่งไปชนผนังบริเวณที่มีศักย์ไฟฟ้าสูงขึ้นที่อยู่ถัดไป ทำให้เกิดการปลดปล่อยอิเล็กตรอนมากขึ้น เกิดการเพิ่มจำนวนของอิเล็กตรอนจากการเคลื่อนที่สะท้อนผนังไปมา มีการขยายสัญญาณอย่างต่อเนื่องไปจนถึงขั้วแอโนดที่อยู่ทางตอนปลาย ซึ่งที่จุดนี้สัญญาณอิเล็กตรอนหรือสัญญาณไฟฟ้าจะถูกตรวจวัดและแปรให้อยู่ในรูปของแมสสเปกตรัม



รูป 2.6 channel electron multiplier detector

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 เครื่อง UHPLC-MS/MS (Ultra high performance liquid chromatograph-tandem mass spectrometer)

- เครื่องสูบฉีดของเหลว Agilent 1290 Binary pump
- ระบบฉีดสารตัวอย่าง Agilent 1290 Infinity autosampler
- ส่วนวิเคราะห์มวล Agilent 6490 Triple quadrupole

3.1.2 คอลัมน์ symmetry shield RP 18 (2.1×150 mm, 3.5 µm)

3.1.3 เครื่องชั่ง (moldel XS, Mettler Toledo)

3.1.4 ไมโครปิเปต ขนาด 2-20, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร (Eppendorf, Germany)

3.1.5 disposable syringe 3 มิลลิลิตร (Nipro)

3.1.6 เครื่องเขย่าสาร (Vortex genie 2, scientific industrial)

3.1.7 เครื่อง ultrasonic steri-cleaner

3.1.8 เครื่องปั่นละเอียด

3.1.9 ขวดกำหนดปริมาตร 250 มิลลิลิตร

3.1.10 บีกเกอร์ขนาด 150 และ 250 มิลลิลิตร

3.1.11 กระบอกตวงขนาด 25 มิลลิลิตร

3.1.12 หัวดูดสำหรับไมโครปิเปต (Sorenson, Bioscience, Inc.)

3.1.13 disposable syringe filter (Nylon, 13 mm, 0.2 µm)

3.1.14 vial 12×32mm, 9 mm (Vertical chromatography Co.,Ltd.)

3.1.15 ขวดเก็บสารขนาด 20 มิลลิลิตร

3.1.16 โหลมีฝาปิด

3.1.17 ขวดบรรจุเฟสเคลื่อนที่ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.1.18 กระดาษกรองเบอร์ 42 (Whatman)

3.2 สารเคมี

3.2.1 น้ำบริสุทธิ์ (milli-q)

3.2.2 เมทานอล LC-MS reagent (J.T.Baker)

3.2.3 กรดฟอร์มิก analytical reagent grade (Fisher scientific, UK)

3.2.4 กรดโปรโตคาเทคชูอิก (ChromaDex)

3.2.5 กรดคลอโรจีนิก (Aldrich chemistry)

3.2.6 กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก (Aldrich chemistry)

3.2.7 กรดเฟอรูลิก (Aldrich chemistry)

3.2.8 กรดคาเฟอิก (Sigma life science)

3.2.9 กรดซิแนพพิก (Aldrich chemistry)

3.2.10 กรดพาราคูมาริก (Sigma life science)

3.3 การเตรียมสารละลาย

3.3.1 สารละลายเฟสเคลื่อนที่กรดฟอร์มิกในน้ำ milli-q 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร

นำน้ำ milli-q เติมลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร และปิเปตกรดฟอร์มิกเข้มข้นจำนวน 250 ไมโครลิตรลงไป ปรับปริมาตรด้วยน้ำ milli-q จนถึงขีดกำหนดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน บรรจุลงในขวดบรรจุเฟสเคลื่อนที่

3.3.2 สารละลายเฟสเคลื่อนที่กรดฟอร์มิกในเมทานอล 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร

นำเมทานอลเติมลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร และปิเปตกรดฟอร์มิกเข้มข้นจำนวน 250 ไมโครลิตรลงไป ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนถึงขีดกำหนดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน บรรจุลงในขวดบรรจุเฟสเคลื่อนที่

3.3.3 สารละลายมาตรฐานกรดฟีนอลิกความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชั่งกรดฟีนอลิก 7 ชนิด อย่างละ 10 มิลลิกรัม แยกภาชนะ ได้แก่ กรดคลอโร-จีนิก กรดเฟอรูลิก กรดโปรโตคาเทคชูอิก กรดซิแนพพิก กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดคาเฟอิก และกรดพาราคูมาริก โดยละลายกรดเฟอรูลิกและกรดโปรโตคาเทคชูอิกในเมทานอล:น้ำ อัตราส่วน 50:50 ปริมาณ 10 มิลลิตร ส่วนกรดที่เหลือละลายในเมทานอล 10 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บสารละลายในขวดเก็บสารขนาด 20 มิลลิลิตร

3.3.4 สารละลายมาตรฐานกรดฟีนอลิก ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อทำ MS Optimization

ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ 3.3.3) จำนวน 20 ไมโครลิตร ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร และปิเปตเมทานอลปริมาตร 980 ไมโครลิตร เติมลงไป ได้ปริมาตรรวมเป็น 1000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ทำซ้ำจนครบ 7 สารละลายมาตรฐาน

3.3.5 สารละลายมาตรฐานกรดฟีนอลิกผสม 7 ชนิด (mix standard solution) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ 3.3.3) ของกรดฟีนอลิกทั้ง 7 ชนิด มาชนิดละ 20 ไมโครลิตร ลงใน vial เดียวกัน จากนั้นปิเปตเมทานอลเติมลงไปอีก 860 ไมโครลิตร ได้ปริมาตรรวมเป็น 1000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร

3.3.6 สารละลายมาตรฐานกรดฟีนอลิกผสม 7 ชนิด ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.50 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง (calibration curve)

3.3.6.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดฟีนอลิกผสม 7 ชนิด ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ 3.3.5) ปริมาตรต่างๆลงใน vial แล้วเติมเมทานอลเพื่อให้ปริมาตรรวมเป็น 1000 ไมโครลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานกรดฟีนอลิกผสม 7 ชนิด ความเข้มข้น 0.10, 0.50, 1.00, 2.50 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร

3.3.6.2 เนื่องจากขีดจำกัดปริมาตรของไมโครปิเปต การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดฟีนอลิกผสม 7 ชนิด ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 จึงต้องเตรียมจากความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ 3.3.6.1) โดยปิเปตมา 10 และ 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงใน vial เติมเมทานอลจนมีปริมาตรรวม 1000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร

3.4 การวิเคราะห์ด้วย UHPLC-MS/MS

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย UHPLC-MS/MS มีดังนี้

ปริมาตรสารที่ฉีด	:	2 ไมโครลิตร
อัตราการไหล	:	0.3 มิลลิลิตรต่อนาที
อุณหภูมิคอลัมน์	:	30 องศาเซลเซียส
คอลัมน์	:	symmetry shield RP 18 (2.1×150 mm, 3.5 µm)
อุณหภูมิแก๊ส N_2	:	200 องศาเซลเซียส
เฟสเคลื่อนที่	:	กรดฟอร์มิกในน้ำ 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร กับกรดฟอร์มิกในเมทานอล 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร
ส่วนผลิตไอออน	:	electrospray ionization (ESI) ผลิตทั้งประจุบวกและลบ (โหมด positive และ negative)
ส่วนวิเคราะห์มวล	:	โหมด multiple reaction monitoring (MRM)

3.5 การหาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)[18]

3.5.1 ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve)

งานวิจัยนี้หาปริมาณกรดฟีนอลิกในเห็ดตัวอย่างด้วยวิธี External standard calibration โดยนำสารมาตรฐานกรดฟีนอลิกผสม 7 ชนิด มาจำนวน 7 ความเข้มข้น (จากข้อ 3.3.6) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค UHPLC-MS/MS และสร้างกราฟมาตรฐานขึ้น ให้แกน y แสดงข้อมูลพื้นที่ใต้พีก (peak area) และแกน x แสดงความเข้มข้นของสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)

2.5.2 ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)

นำกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดฟีนอลิกช่วงความเข้มข้นต่ำสุด 4 ความเข้มข้นคือ 0.01-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้นกรดเฟอรูลิกและกรดคาเฟอิกใช้ความเข้มข้นช่วง 0.05-1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดซิแนพพิกใช้ความเข้มข้นช่วง 0.5-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มาใช้ในการคำนวณตามสูตร

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

ความหมายของตัวแปร $S_{x/y}$, A, h_0 และ I ดูได้ในภาคผนวก ก.

3.5.3 ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

วิธีทำเหมือนข้อ 3.5.2 แต่เปลี่ยนสูตรคำนวณเป็น

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

3.5.4 ขีดจำกัดของวิธีตรวจวัด (Method detection limit, MDL)

นำค่า LOD ที่คำนวณได้จากข้อ 3.5.2 คูณด้วย dilution factor จะได้ค่า MDL ออกมา ซึ่งในที่นี้ใช้เห็ดตัวอย่าง 2 กรัม ละลายในเมทานอล 10 มิลลิลิตร ทำให้ dilution factor เท่ากับ 5

3.5.4 ขีดจำกัดของวิธีตรวจวัดเชิงปริมาณ (Method quantitation limit, MQL)

นำค่า LOQ ที่คำนวณได้จากข้อ 3.5.3 คูณด้วย dilution factor เท่ากับ 5 จะได้ค่า MQL ออกมา

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 การเตรียมตัวอย่าง

3.6.1 การเลือกเห็ด

เลือกเห็ดมา 2 ชนิด คือ เห็ดนางรมหลวงและเห็ดเข็มทอง โดยเห็ด 1 ชนิดจะนำมาจากแหล่งเพาะปลูก 3 แหล่งที่แตกต่างกัน คนละจังหวัด

3.6.2 การสกัดเห็ด

1) นำเห็ดมาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง

2) หั่นเห็ดเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปปั่น

3) ชั่งเห็ด 2 กรัม ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง นำใส่ในโหลที่มีฝาปิด (ได้ 3 โหล)

4) เติมเมทานอลปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในโหลจนครบทั้ง 3 โหล ปิดฝาทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

5) กรองเห็ด เก็บสารละลายที่ได้ นำเห็ดใส่โหลเหมือนเดิม เติมเมทานอลอีก 5 มิลลิลิตร (ทำทั้ง 3 โหล)

6) นำโหลเห็ดไป sonicated เป็นเวลา 30 นาที

7) กรองเห็ดอีกครั้ง เก็บสารละลายที่ได้รวมกับข้อ 5) ใส่ขวดเก็บสารปริมาตร 20 มิลลิลิตร

8) บรรจุสารละลายในข้อ 7) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน disposable syringe ที่มี filter (Nylon, 13 mm, 0.2 μm)

9) ฉีดสารผ่าน filter ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC-MS/MS

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลองและการวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการแยกกรดฟีนอลิกด้วย UHPLC-MS/MS

วิธีการที่ใช้ในการหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมคือ MS Optimaization หรือการหามวลของไอออนที่เหมาะสมต่อการแยกสารด้วยเทคนิค UHPLC-MS/MS โดยใช้โปรแกรม MassHunter Optimizer พารามิเตอร์ที่ต้องการเพื่อนำไปใช้ในการแยกกรดฟีนอลิก คือ precursor ion, product ion และ collision energy ทำการวิเคราะห์ไอออน 2 โหมด คือ negative และ positive ได้ค่าต่างๆ ทั้งหมดดังตาราง ก.1 จากนั้นทำการเลือกค่า precursor ion, product ion และ collision energy ที่เหมาะสม โดยดูจากค่า abundance เลือก product ion ที่ให้ค่า abundance สูง เพื่อประโยชน์ในการวิเคราะห์ปริมาณของสาร จะให้พีกที่มีพื้นที่ใต้พีกสูง เหมาะกับการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ และเลือกค่า abundance อีกค่าหนึ่งที่มีค่าใกล้เคียงกันเพื่อเป็นการยืนยันสารละลายมาตรฐาน ผลการเลือกพารามิเตอร์ที่เหมาะสม แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 พารามิเตอร์ของสารละลายมาตรฐาน 7 ชนิด ที่เลือกจากตาราง ก.1 เพื่อนำไปใช้ในการแยกกรดฟีนอลิก

ชื่อสาร	โหมด	มวลโมเลกุล	precursor ion	product ion	collision energy	abundance
กรดโปรโตคาเทคชูอิก	negative	154.03	153.02	108.8	9	12511
กรดคลอโรจีนิก	positive	354.1	355.11	162.8	5	12112
				88.9	60	4911
กรดพาราไฮดรอกซี-เบนโซอิก	negative	138.03	137.02	93	9	11322
				65	33	548
กรดคาเฟอิก	positive	180.04	181.05	162.9	5	2500
	negative	180.04	179.03	134.9	13	9120
กรดซิแนพพิก	positive	224.07	225.08	207	1	14853
				175	9	6564

ชื่อสาร	โหมด	มวลโมเลกุล	precursor ion	product ion	collision energy	abundance
กรดเฟอรูลิก	positive	194.06	195.07	176.8	5	12884
				144.9	13	4570
กรดพาราคูมาริก	negative	164.05	163.04	118.9	13	13095
				92.8	37	1459

เลือก product ion จากทุกๆสารมาตรฐานมา 2 ค่า เพื่อทำปริมาณวิเคราะห์และยืนยันสาร ยกเว้นกรดโปรโตคาเทคชูอิกที่เลือกเพียงค่าเดียว คือ product ion m/z = 108.8 เนื่องจากค่าอื่นๆมี abundance ที่ต่ำมาก เมื่อนำค่าไปใช้ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดสารละลายได้ (ไม่มีสัญญาณ) อีกทั้งกรดโปรโตคาเทคชูอิกในเห็ดนั้นมีปริมาณที่สูง และไม่เกิดการรบกวนจากสารอื่น ได้ baseline ที่เรียบ ดังนั้นการเลือก product ionเพียงค่าเดียว ก็สามารถระบุกรดโปรโตคาเทคชูอิกได้

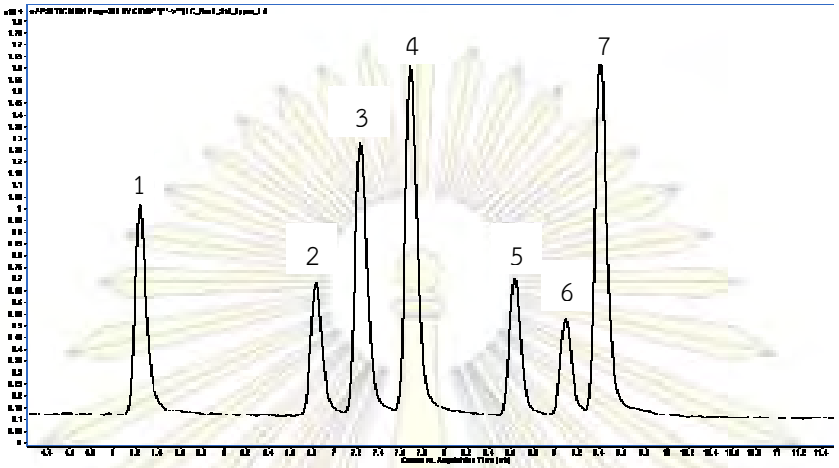
4.2 สภาวะที่ใช้ในการแยกกรดฟีนอลิกด้วย UHPLC-MS/MS

ในการแยกกรดฟีนอลิกทั้ง 7 ชนิด ปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่อง UHPLC-MS/MS คือ 2 ไมโครลิตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คือ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้เฟสเคลื่อนที่แบบเดียวกับการหากรดฟีนอลิกในเห็ดด้วยเทคนิค LC-ESI-MS/MS[9] คือกรดฟอร์มิกในเมทานอล 0.1% โดยมวลต่อปริมาตร (%v/v) : กรดฟอร์มิกในน้ำ 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (%v/v) และผ่านเฟสเคลื่อนที่แบบ gradient elution เพื่อประสิทธิภาพการแยกที่สมบูรณ์ จึงต้องทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ ณ เวลาต่างๆ หลายรูปแบบได้ผลเป็นโครมาโทแกรมดังรูป ข.1-ข.4 และได้อัตราส่วนสุดท้ายที่เหมาะสมที่สุดแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1

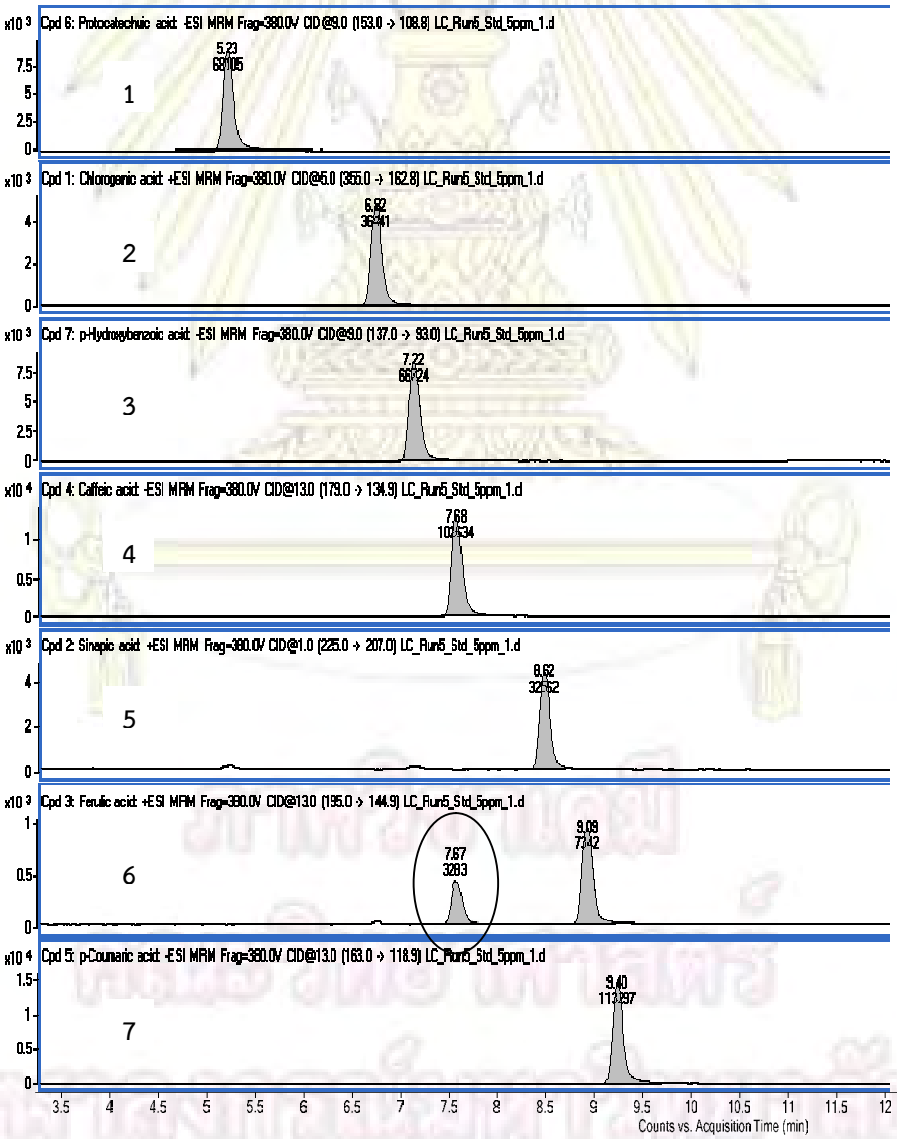
ตารางที่ 4.2 อัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ต่อเวลา

เวลา	กรดฟอร์มิกในเมทานอล 0.1% v/v	กรดฟอร์มิกในน้ำ 0.1% v/v
0.00	10	90
12.00	70	30
13.00	100	0
14.50	100	0
15.00	10	90
16.00	10	90

ผลการแยกสารละลายมาตรฐาน 7 ชนิด โดยใช้สภาวะดังกล่าว ได้โครมาโทแกรมดังนี้



รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน 7 ชนิด



รูปที่ 4.2 ลำดับการแยกของสารมาตรฐานผสม 7 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากโครมาโทแกรม รูป 4.2 สรุปลำดับการแยกและ retention time (t_R) ของสารละลายมาตรฐาน 7 ชนิด ได้ดังนี้

พีคที่ 1 : กรดโปรโตคาเทคชูอิก t_R = 5.23 นาที

พีคที่ 2 : กรดคลอโรจีนิก t_R = 6.82 นาที

พีคที่ 3 : กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก t_R = 7.22 นาที

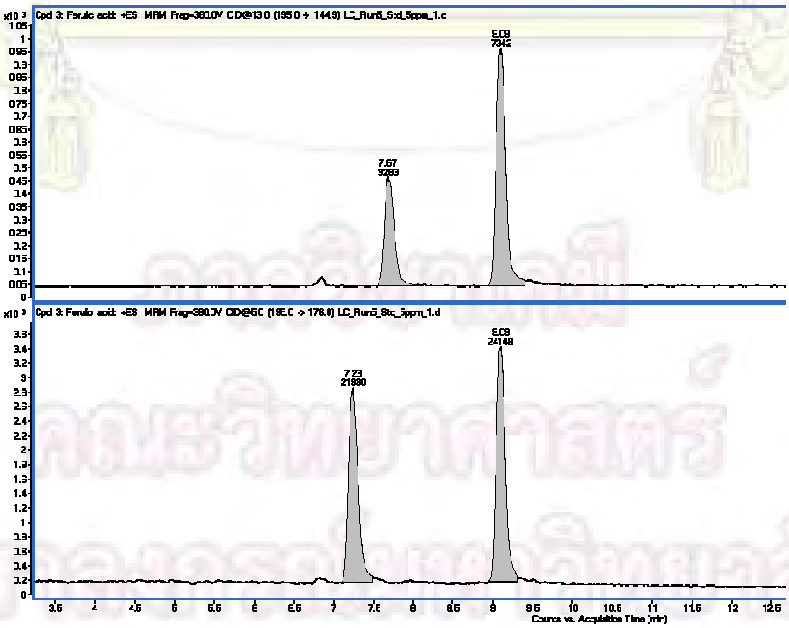
พีคที่ 4 : กรดคาเฟอิก t_R = 7.68 นาที

พีคที่ 5 : กรดซิแนพพิก t_R = 8.62 นาที

พีคที่ 6 : กรดเฟอรูลิก t_R = 9.09 นาที

พีคที่ 7 : กรดพาราคูมาริก t_R = 9.40 นาที

จากรูปที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าพีกของกรดเฟอรูลิกมี 2 พีก (โครมาโทแกรมลำดับที่ 6) โดยพีกที่วงไว้ เป็นพีกที่คาดว่าจะมาจากสารอื่น โดยมี retention time ตรงกับกรดคาเฟอิก เนื่องมาจากการเลือก product ion ของกรดเฟอรูลิก ไปตรงกับ fragment ที่เกิดขึ้นจริงบางส่วน ของกรดคาเฟอิกที่ผสมอยู่ด้วยกัน ยืนยันได้โดยโครมาโทแกรมที่ใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพ ดังรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าพีกที่มี retention time ตรงกันมีพีกเดียวคือที่ 9.09 นาที อีกพีกที่ตรวจวัดได้ไม่ตรงกัน ซึ่งเกิดจากการรบกวนของสารอื่นในสารละลายมาตรฐานที่ผสมกันอยู่ นอกจากนี้ยังทำการยืนยันโดยการฉีดกรดเฟอรูลิกเดี่ยวๆเพื่อดู retention time ได้ผลออกมาคือมีพีกเดียวที่ตำแหน่ง 8.99 นาที ซึ่ง retention time ใกล้เคียงกันกับกรดเฟอรูลิกในสารผสมมาตรฐาน โดยห่างกัน 0.1 นาที แสดงในรูป ข.5



รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมยืนยัน retention time ของกรดเฟอรูลิก

4.3 การหาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

จากโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานทั้ง 7 ชนิด คือกรดโปรโตคาเทคชูอิก กรดเฟอรูลิก กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดพาราคูมาริก กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก และกรดซิแนพพิก ในรูป ข.6-ข.19 นำมาหาค่า LOD, LOQ, MDL และ MQL โดย IUPAC[18] ได้ยกเลิกการหาค่า LOD และ LOQ แบบเก่าที่หาได้จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ความสูงสัญญาณเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน (signal-to noise ratio) และความสูงสัญญาณเป็น 10 เท่าของสัญญาณรบกวน ตามลำดับ โดยได้นิยามใหม่ดังสูตรจากข้อ 3.5.2 และ 3.5.3 ซึ่งตัวแปรต่างๆหาได้โดยใช้ฟังก์ชัน LINEST ในโปรแกรม Microsoft office excel และรายละเอียดสูตรคำนวณแสดงในภาคผนวก ก ผลการหาค่า LOD, LOQ, MDL และ MQL แสดงในตารางที่ 4.4

เมื่อได้ขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) นำมาสร้างกราฟสอบเทียบของสารละลายมาตรฐาน 7 ชนิด ได้กราฟสอบเทียบดังแสดงในรูป ข.20-ข.26 และได้พารามิเตอร์ต่างๆ ของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ตามตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 พารามิเตอร์ต่างๆ ของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ : slope, intercept และ R^2

ขนิดกรดฟีนอลิก	ช่วงความเข้มข้น (mg/L)	slope	intercept	R^2
โปรโตคาเทคชูอิก	0.05-5.00	13557 ± 105	$(0.9 \pm 2.5) \times 10^{-2}$	0.9998
พาราไฮดรอกซีเบนโซอิก	0.05-5.00	13366 ± 164	$(4.8 \pm 3.8) \times 10^{-2}$	0.9994
พาราคูมาริก	0.05-5.00	22303 ± 234	$(6.2 \pm 5.4) \times 10^{-2}$	0.9996
คลอโรจีนิก	0.10-5.00	7049 ± 181	$(-4.8 \pm 4.6) \times 10^{-2}$	0.9980
เฟอรูลิก	0.50-5.00	1388 ± 29	$(1.6 \pm 0.8) \times 10^{-2}$	0.9992
คาเฟอิก	0.50-5.00	20824 ± 164	$(-6.5 \pm 4.7) \times 10^{-2}$	0.9999
ซิแนพพิก	1.00-5.00	7220 ± 108	$(-31.4 \pm 3.6) \times 10^{-2}$	0.9998

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 ค่า LOD, LOQ, MDL และ MQL ที่ได้จากความเข้มข้นต่ำสุด 4 ความเข้มข้นจาก calibration curve

ชนิดสารละลายมาตรฐาน	ช่วงความเข้มข้น (mg/L)	slope	$S_{x/y}$	h_0	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	MDL (mg/kg)	MQL (mg/kg)
กรดโปรโตคาเทคชูอิก	0.01-0.50	13602 ± 97	37.9	0.177	0.011	0.033	0.055	0.16
กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก	0.01-0.50	14068 ± 106	41.7	0.177	0.012	0.035	0.060	0.18
กรดพาราคูมาริก	0.01-0.50	23961 ± 263	103	0.177	0.017	0.050	0.085	0.25
กรดคลอโรจีนิก	0.01-0.50	6324 ± 138	54.0	0.177	0.034	0.10	0.17	0.50
กรดเฟอรูลิก	0.05-1.00	1600 ± 58	44.5	0.292	0.11	0.35	0.55	1.8
กรดคาเฟอิก	0.05-1.00	20889 ± 815	622	0.292	0.12	0.36	0.60	1.8
กรดซิแนพพิก	0.50-5.00	7073 ± 159	558	0.413	0.34	1.0	1.7	5.0

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์

4.4 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์เห็ด 2 ชนิด คือ เห็ดนางรมหลวงและเห็ดเข็มทอง โดยเห็ดแต่ละชนิดนั้นนำมาจากแหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกัน 3 จังหวัด และสกัดซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้เห็ด 2 กรัม ต่อเมทานอล 10 มิลลิลิตร เพื่อหาพื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย (ข้อมูลแสดงในตาราง ก.2-ก.7) มาคำนวณหาปริมาณกรดฟีนอลิก 7 ชนิด โดยใช้สมการเส้นตรงตามตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 สมการเส้นตรงของกราฟสอบเทียบของสารละลายมาตรฐาน

ชนิดสารละลายมาตรฐาน	สมการเส้นตรง	R^2
กรดโปรโตคาเทคชูอิก	y = 13557x + 89.37	0.9998
กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก	y = 13366x + 482.3	0.9994
กรดพาราคูมาริก	y = 22303x + 623.5	0.9996
กรดคลอโรจีนิก	y = 7049x – 478.5	0.9980
กรดเฟอรูลิก	y = 1388x +162.8	0.9992
กรดคาเฟอิก	y = 20824x – 645.1	0.9999
กรดซิแนพพิก	y = 7220x – 3137	0.9998

ผลการคำนวณหาปริมาณกรดฟีนอลิกในเห็ดทั้ง 2 ชนิดในหน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงในตาราง 4.6 จะเห็นได้ว่าในเห็ดนางรมหลวงทั้ง 3 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบกรดเฟอรูลิก กรดคาเฟอิก และกรดซิแนพพิก ในเห็ดเข็มทองก็ตรวจไม่พบกรดทั้ง 3 ชนิดนี้เช่นกัน ยกเว้น เห็ดเข็มทองตัวอย่างที่ 2 เท่านั้นที่ตรวจพบกรดคาเฟอิก แต่ก็มีปริมาณต่ำกว่า MDL ส่วนกรดอีก 4 ชนิดที่เหลือ กรดโปรโตคา-เทคชูอิก กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดพาราคูมาริก พบในเห็ดเกือบทุกตัวอย่าง ขณะที่กรดคลอโรจีนิกพบแค่ในเห็ดนางรมหลวงตัวอย่างที่ 1 และเห็ดเข็มทองตัวอย่างที่ 2 เท่านั้น จะเห็นได้ว่าถึงแม้จะเป็นเห็ดชนิดเดียวกันก็ตาม แต่ถ้ามาจากพื้นที่ปลูกที่แตกต่างกัน ชนิดและปริมาณกรดฟีนอลิกที่พบก็จะแตกต่างกันไป ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมในการโตของเห็ด ทั้งอาหารที่ได้รับ อุณหภูมิ หรือเวลาในการเก็บเกี่ยว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 ปริมาณกรดฟีนอลิก 7 ชนิดในเห็ดนางรมหลวงและเห็ดเข็มทอง

ชนิดกรดฟีนอลิก	ปริมาณกรดฟีนอลิก (mg/kg) ในเห็ดนางรมหลวง			ปริมาณกรดฟีนอลิก (mg/kg) ในเห็ดเข็มทอง		
	ตัวอย่างที่ 1 : ระยอง	ตัวอย่างที่ 2 : เชียงใหม่	ตัวอย่างที่ 3 : ปทุมธานี	ตัวอย่างที่ 1 : สมุทรสาคร	ตัวอย่างที่ 2 : สระบุรี	ตัวอย่างที่ 3 : ปทุมธานี
โปรโตคาเทคชูอิก	1.67 ± 0.08	0.40 ± 0.03	0.16 ± 0.04	ตรวจไม่พบ	0.16 ± 0.05	ตรวจไม่พบ
พาราไฮดรอกซีเบนโซอิก	0.22 ± 0.04	0.24 ± 0.03	ตรวจไม่พบ	0.09 ± 0.05[a]	0.77 ± 0.01	0.87 ± 0.01
พาราคูมาริก	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0.06 ± 0.02[b]	0.58 ± 0.09	0.12 ± 0.06[a]	0.76 ± 0.03
คลอโรจีนิก	0.43 ± 0.03[a]	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0.47 ± 0.03[a]	ตรวจไม่พบ
เฟอรูลิก	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ
คาเฟอิก	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	0.33 ± 0.01[b]	ตรวจไม่พบ
ซิแนพพิก	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ

a: อยู่ระหว่าง MDL และ MQL

b: ต่ำกว่า MDL

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารละลายมาตรฐานกรดฟีนอลิก 7 ชนิด ออกจากกัน ด้วยเทคนิค UHPLC-MS/MS เพื่อนำไปหาชนิดและปริมาณกรดฟีนอลิกในเห็ดนางรม หลวง และเห็ดเข็มทอง ที่ปลูกจากคนละจังหวัด โดยสกัดเห็ด 2 กรัม ด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร ใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ กรดฟอร์มิกในน้ำ 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร และกรดฟอร์มิกในเมทานอล 0.1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร ระบบเกรเดียนท์อีลูชัน อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที

เมื่อพิจารณากราฟสอบเทียบของสารละลายมาตรฐาน พบว่า กราฟให้ค่าสหสัมพันธ์เชิงเส้นมากกว่า 0.995 แสดงว่าวิธีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์กรดฟีนอลิกทั้ง 7 ชนิด มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ดีในช่วงที่สร้างกราฟ มีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) อยู่ในช่วง 0.011-0.34 และ 0.033-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นคำนวณค่าขีดจำกัดของวิธีตรวจวัด (MDL) ได้จากค่า LOD ได้ค่าอยู่ในช่วง 0.055-1.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และคำนวณค่าขีดจำกัดของวิธีตรวจวัดเชิงปริมาณ (MQL) ได้จาก LOQ ค่าที่ได้อยู่ในช่วง 0.16-5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ผลการวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในเห็ดพบว่า ถึงแม้จะเป็นเห็ดชนิดเดียวกัน แต่ปลูกในคนละพื้นที่ ปริมาณและชนิดกรดฟีนอลิกที่พบมีความแตกต่างกันอย่างระบุได้ แสดงว่านอกจากพันธุกรรมของเห็ดแล้ว สภาพแวดล้อมในการปลูกและเจริญเติบโตมีส่วนสำคัญอย่างมากในการกำหนดสาระสำคัญต่างๆ ในเห็ด อย่างเช่นกรดฟีนอลิกที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ สามารถนำไปสกัดทำยาได้ ดังนั้นการจะนำสารสำคัญในเห็ดไปใช้เป็นประโยชน์ทั้งทางโภชนาการและทางเภสัช จะต้องมีการศึกษาวิจัย ควบคุมการปลูกและโตของเห็ดด้วย

นอกจากกรดฟีนอลิก 7 ชนิดข้างต้นแล้ว ยังมีกรดฟีนอลิกชนิดอื่นๆอีก ที่อาจพบได้ในเห็ดบางชนิด ถ้าสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกได้ อาจได้รับข้อมูลเพิ่มเติมใหม่ๆ ที่สามารถนำเห็ดบางชนิดไปใช้ประโยชน์ได้เพิ่มมากขึ้น นอกจากกรดฟีนอลิกแล้ว ยังพบฟลาโวนอยด์ในเห็ดซึ่งมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้อีกเช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

1. Abugri, D. A.; McElhenney, W. H. Extraction of Total Phenolic and Flavonoids from Edible Wild and Cultivated Medicinal Mushrooms as Affected by Different Solvents. *J. Nat. Prod. Plant Resour.* **2013**, *3,* 37-42.
2. Zhang, A.; Li, X.; Xing, C.; Yang, J.; Sun, P. Antioxidant Activity of Polysaccharide Extracted from *Pleurotuseryngii* Using Response Surface Methodology. *Int. J. Biol. Macromol*. **2014**, *65*, 28-32.
3. Jeong, S. C.; Jeong, Y. T.; Yang, B. K.; Islam, R.; Koyyalamudi S. R.; Pang, G.; Cho, K. Y.; Song, C. H. White Button Mushroom (*Agaricus bisporus*) Lowers Blood Glucose and Cholesterol Levels in Diebetic and Hypercholesterolemic Rats. *Nutr. Res.* **2010**, *30,* 49-56.
4. Jiang, T.; Luo, Z.; Ying, T. Fumigation with Essential Oils Improves Sensory Quality and Enhanced Antioxidant Ability of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes)*. *Food Chem.* **2015**, *172*, 692-698.
5. Reis, F. S.; Martins, A.; Barros, L.; Ferreira, I. C. F. R. Antioxidant Properties and Phenolic Profile of the Most Widely Appreciated Cultivated Mushrooms: A Comparative Study between In vivo and In vitro Samples. *Food Chem Toxical.* **2012**, *50,* 1201-1207.
6. Palacios, I.; Lozano, M.; Moro, C.; D'Arrigo, M.; Rostagno, M. A.; Martinez, J. A.; Garcia-Lafuente, A.; Guillamon, E.; Villares, A. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds Occurring in Edible Mushrooms. *Food Chem.* **2011**, *128*, 674-678.
7. Barros, Li.; Duenos, M.; Ferreira, I. C. F. R.; Baptista, P.; Santos-Buelga, C. Phenolic Acids Determination by HPLC-DAD-ESI/MS in Sixteen Different Pertuguese Wild Mushrooms Species. *Food Chem Toxical.* **2009**, *47*, 1076-1079.
8. Muszynska, B.; Sulkowska-Ziaja, K.; Ekiert, H. Phenolic Acids in Selected Edible Basidiomycota Species: *Armillaria mellea, Boletus badius, Boletus edulis, Cantharellus cibarius, Lactarius deliciosus* and *Pleurotus ostreatus. Acta Sci. Pol.* **2013**, *12*, 107-116.

9. Nowacka, N.; Nowak, R.; Drozd, M.; Olech, M.; Los, R.; Malm, A. Analysis of Phenolic Constituents, Antiradical and Antimicrobial Activity of Edible Mushrooms Growing Wild in Poland. *Food Sci. Technol.* **2014**, *59*, 689-694.
10. Kim, M.; Seguin, P.; Ahn, J.; Kim, J.; Chun, S.; Kim, E.; Seo, S.; Kang, E.; Kim, S.; Park, Y.; Ro, H.; Chung, I. Phenolic Compound Concentration and Antioxidant Activities of Edible and Medicinal Mushrooms from Korea. *J. Agr. Food Chem.* **2008**, *56,* 7265-7270.
11. Lin, J.; Liu, C.; Chen, Y.; Hu, C.; Juang, L.; Shiesh, C.; Yang, D. Chemical Composition Antioxidant and Anti-inflammatory Properties for Ethanolic Extracts from *Pleurotus eryngii* Fruiting Bodies Harvested at Different Time. *Food Sci. Technol.* **2014**, *55,* 374-382.
12. http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compound (accessed April 9, 2016)
13. http://share.psu.ac.th/blog/science-equipment/30037 (accessed April 9, 2016)
14. วัชรี ชาตกิตติคุณรงค์. *โครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง*. พิมพ์ครั้งที่ 2: สำนักพิมพ์รามคำแหง, 2544.
15. http://lcresources.com/resources/getstart/2c01.htm (accessed April 9, 2016)
16. ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง และณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์. *แมสสเปกโทรเมตรี.* กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2553.
17. http://en.wikipedia.org/wiki/Triple-quadrupole_mass_spectrometer (accessed April 9, 2016)
18. Olivieri, A. C. Practical Guidelines for Reporting Results in Single-and Multi-Component Analytical Calibration: A tutorial. *Anal. Chim. Acta.* **2015**, *868,* 10-22.

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การคำนวณ LOD และ LOQ

จากข้อ 3.5.2 $S_{x/y}$ คือ The residual standard deviation

A คือ ความชันของกราฟสอบเทียบ

I คือ จำนวนสารที่นำมาทำ calibration curve

h_0 คือ The leverage for the blank sample

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

เมื่อ $\bar{c}_{cal}$ คือ ความเข้มข้นเฉลี่ยของสารมาตรฐานที่นำมาทำ calibration curve

c_i คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่นำมาทำ calibration curve

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ก.1 พารามิเตอร์ทั้งหมดของสารละลายมาตรฐาน 7 ชนิด จากการทำ MS Optimization

ชื่อสาร	โหมด	มวลโมเลกุล	precursor ion	product ion	collision energy	abundance
กรดโปรโตคาเทคชูอิก	positive	154.03	155.04	118.8	29	402
				136.9	5	537
				97.7	29	47
	negative	154.03	153.02	108.8	9	12511
				60.4	1	44
กรดคลอโรจีนิก	positive	354.1	355.11	162.8	5	12112
				88.9	60	4911
				116.9	45	1977
				134.8	41	1702
	negative	354.1	353.09	190.9	5	4518
				84.9	41	354
				197.4	1	44
กรดพาราไฮดรอกซี-เบนโซอิก	positive	138.03	139.04	121	1	426
				88.8	17	50
				106.9	5	395
	negative	138.03	137.02	93	9	11322
				65	33	548
กรดคาเฟอิก	positive	180.04	181.05	162.9	5	2500
				88.9	29	1963
				110.1	37	48
				38.9	60	462
	negative	180.04	179.03	134.9	68	9120

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อสาร	โหมด	มวลโมเลกุล	precursor ion	product ion	collision energy	abundance
กรดซิแนพพิก	positive	224.07	225.08	207	1	14853
				90.9	29	6267
				65	45	3411
				175	9	6564
	negative	224.07	223.06	93.1	25	1758
				192.9	9	2078
				208	1	2360
				121	21	1188
กรดเฟอรูลิก	positive	194.06	195.07	88.9	33	6842
				176.8	5	12884
				144.9	13	4570
				116.9	21	3555
	negative	194.06	193.05	134	13	973
				177.8	9	624
กรดพาราคูมาริก	positive	164.05	165.06	146.9	5	9137
				90.9	25	6033
				64.9	45	3182
				118.9	17	4219
	negative	164.05	163.04	118.9	13	13095
				92.8	37	1459
				92.3	37	55

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ก.2 เห็ดนางรมหลวง ตัวอย่างที่ 1 จากจังหวัดระยอง

ชนิดกรดฟีนอลิก	พื้นที่ใต้พีกในการสกัด			พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
โปรโตคาเทคชูอิก	4755	4370	4716	4614	0.334
พาราไฮดรอกซีเบนโซอิก	1169	957	1098	1075	0.044
กรดพาราคูมาริก	nd	nd	nd	-	-
คลอโรจีนิก	177	104	85	122	0.085
กรดเฟอรูลิก	nd	nd	nd	-	-
กรดคาเฟอิก	nd	nd	nd	-	-
กรดซิแนพพิก	nd	nd	nd	-	-

nd = not detected

ตาราง ก.3 เห็ดนางรมหลวง ตัวอย่างที่ 2 จากจังหวัดเชียงใหม่

ชนิดกรดฟีนอลิก	พื้นที่ใต้พีกในการสกัด			พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
โปรโตคาเทคชูอิก	1209	1171	1097	1159	0.079
พาราไฮดรอกซีเบนโซอิก	1138	1199	1070	1136	0.049
กรดพาราคูมาริก	nd	nd	nd	-	-
คลอโรจีนิก	nd	nd	nd	-	-
กรดเฟอรูลิก	nd	nd	nd	-	-
กรดคาเฟอิก	nd	nd	nd	-	-
กรดซิแนพพิก	nd	nd	nd	-	-

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ก.4 เห็ดนางรมหลวง ตัวอย่างที่ 3 จากจังหวัดปทุมธานี

ชนิดกรดฟีนอลิก	พื้นที่ใต้พีกในการสกัด			พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
โปรโตคาเทคชูอิก	514	643	444	534	0.033
พาราไฮดรอกซีเบนโซอิก	nd	nd	nd	-	-
กรดพาราคูมาริก	839	951	907	899	0.012
คลอโรจีนิก	nd	nd	nd	-	-
กรดเฟอรูลิก	nd	nd	nd	-	-
กรดคาเฟอิก	nd	nd	nd	-	-
กรดซิแนพพิก	nd	nd	nd	-	-

ตาราง ก.5 เห็ดเข็มทอง ตัวอย่างที่ 1 จากจังหวัดสมุทรสาคร

ชนิดกรดฟีนอลิก	พื้นที่ใต้พีกในการสกัด			พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
โปรโตคาเทคชูอิก	nd	nd	nd	-	-
พาราไฮดรอกซีเบนโซอิก	698	575	848	707	0.017
กรดพาราคูมาริก	3454	2791	3366	3204	0.116
คลอโรจีนิก	nd	nd	nd	-	-
กรดเฟอรูลิก	nd	nd	nd	-	-
กรดคาเฟอิก	nd	nd	nd	-	-
กรดซิแนพพิก	nd	nd	nd	-	-

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ก.6 เห็ดเข็มทอง ตัวอย่างที่ 2 จากจังหวัดสระบุรี

ชนิดกรดฟีนอลิก	พื้นที่ใต้พีกในการสกัด			พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
โปรโตคาเทคชูอิก	623	578	380	527	0.032
พาราไฮดรอกซีเบนโซอิก	2554	2497	2499	2517	0.152
กรดพาราคูมาริก	1460	1005	1060	1175	0.025
คลอโรจีนิก	219	164	148	177	0.093
กรดเฟอรูลิก	nd	nd	nd	-	-
กรดคาเฟอิก	729	693	721	714	0.065
กรดซิแนพพิก	nd	nd	nd	-	-

ตาราง ก.7 เห็ดเข็มทอง ตัวอย่างที่ 3 จากจังหวัดปทุมธานี

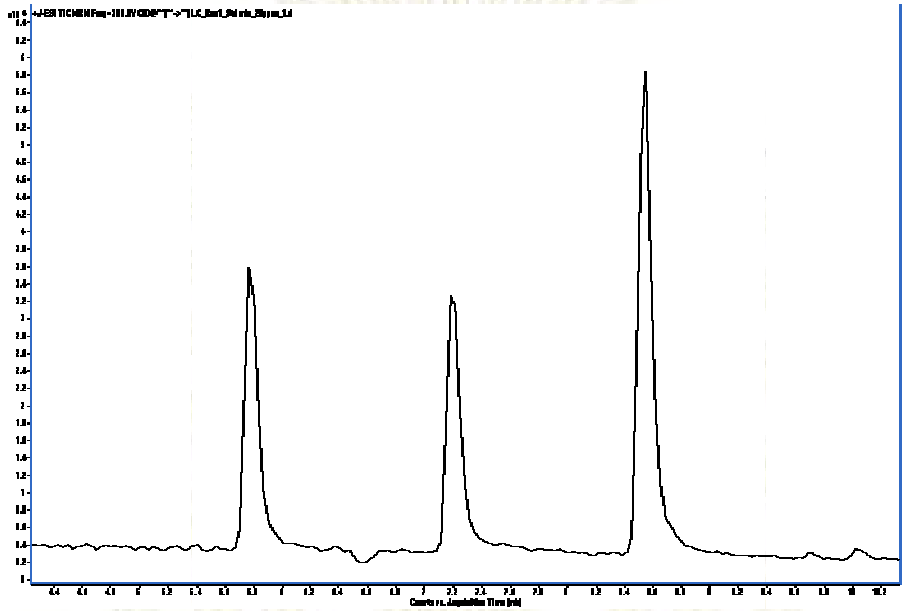
ชนิดกรดฟีนอลิก	พื้นที่ใต้พีกในการสกัด			พื้นที่ใต้พีกเฉลี่ย	ความเข้มข้นที่ได้ (mg/L)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
โปรโตคาเทคชูอิก	nd	nd	nd	-	-
พาราไฮดรอกซีเบนโซอิก	2778	2834	2796	2803	0.174
กรดพาราคูมาริก	4198	3942	3964	4035	0.153
คลอโรจีนิก	nd	nd	nd	-	-
กรดเฟอรูลิก	nd	nd	nd	-	-
กรดคาเฟอิก	nd	nd	nd	-	-
กรดซิแนพพิก	nd	nd	nd	-	-

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

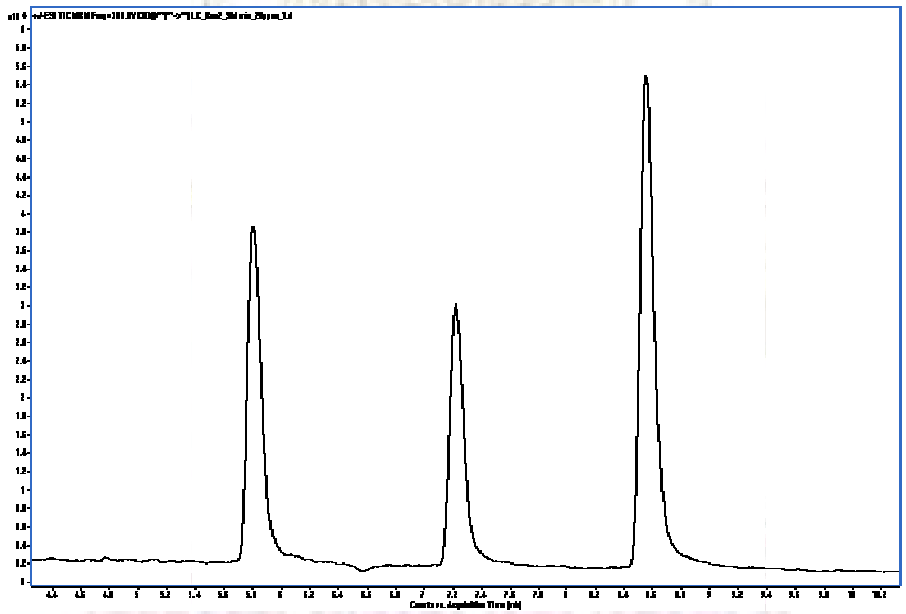
ภาคผนวก ข

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

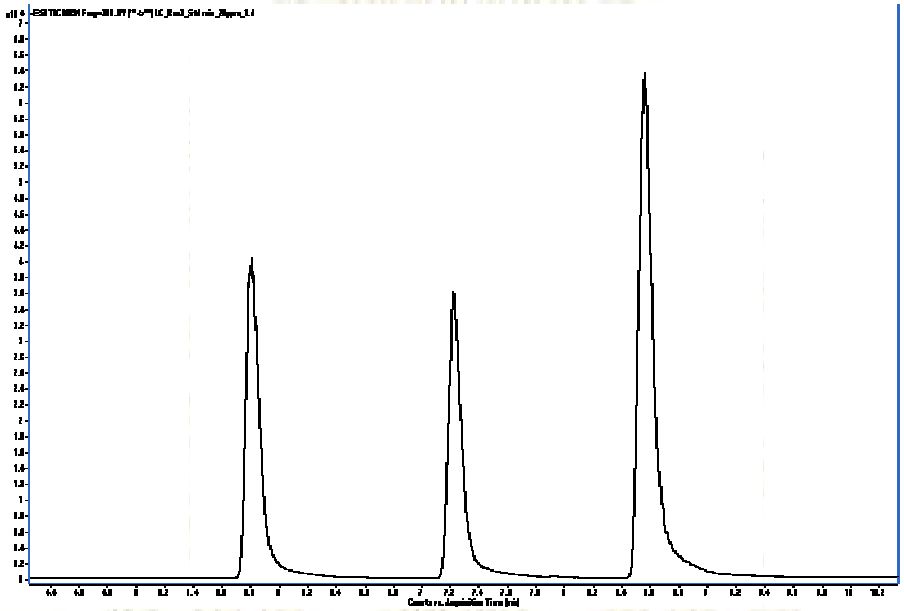
ภาคผนวก ข



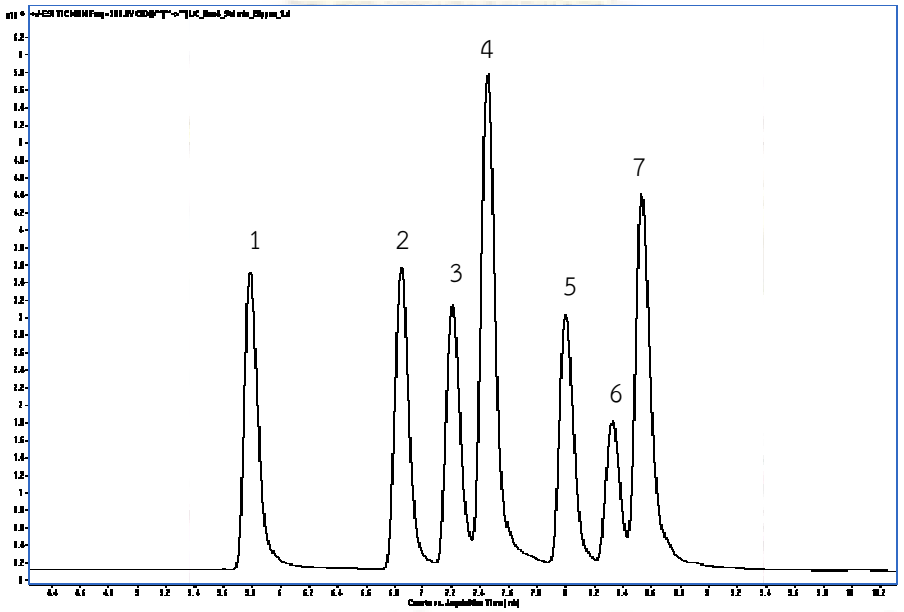
รูป ข.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม 7 ชนิด ในการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ต่อเวลา ระหว่างกรดฟอร์มิกในน้ำ 0.1% v/v : กรดฟอร์มิกในเมทานอล 0.1% v/v ครั้งที่ 1



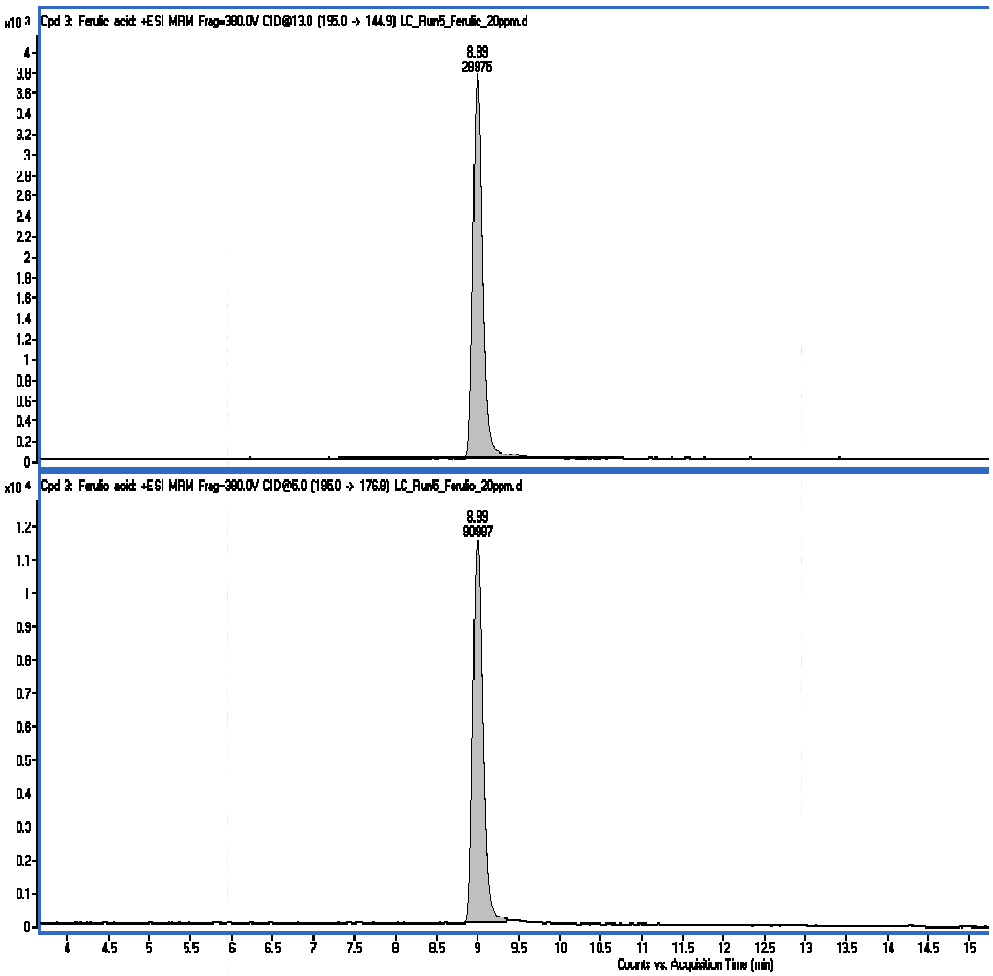
รูป ข.2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม 7 ชนิด ในการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ต่อเวลา ระหว่างกรดฟอร์มิกในน้ำ 0.1% v/v : กรดฟอร์มิกในเมทานอล 0.1% v/v ครั้งที่ 2



รูป ข.3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม 7 ชนิด ในการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ต่อเวลา ระหว่างกรดฟอร์มิกในน้ำ 0.1% v/v : กรดฟอร์มิกในเมทานอล 0.1% v/v ครั้งที่ 3

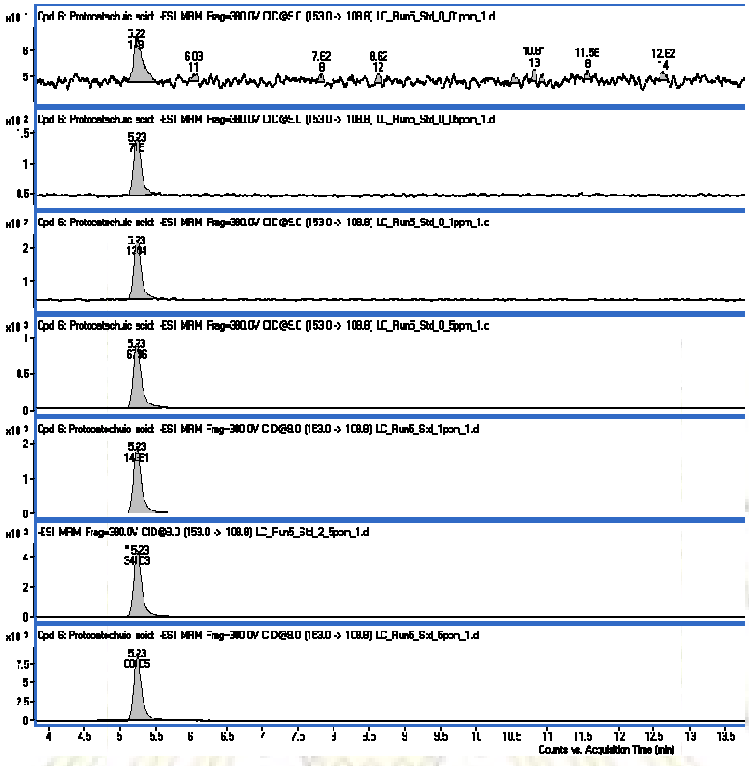


รูป ข.4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม 7 ชนิด ในการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ต่อเวลา ระหว่างกรดฟอร์มิกในน้ำ 0.1% v/v : กรดฟอร์มิกในเมทานอล 0.1% v/v ครั้งที่ 4

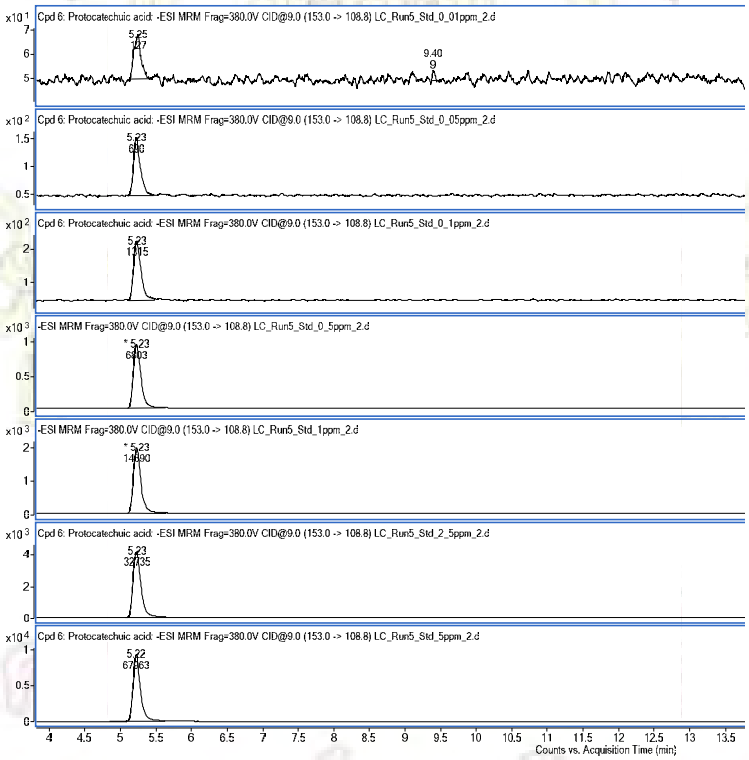


รูป ข.5 โครมาโทแกรมของกรดเฟอรูลิก

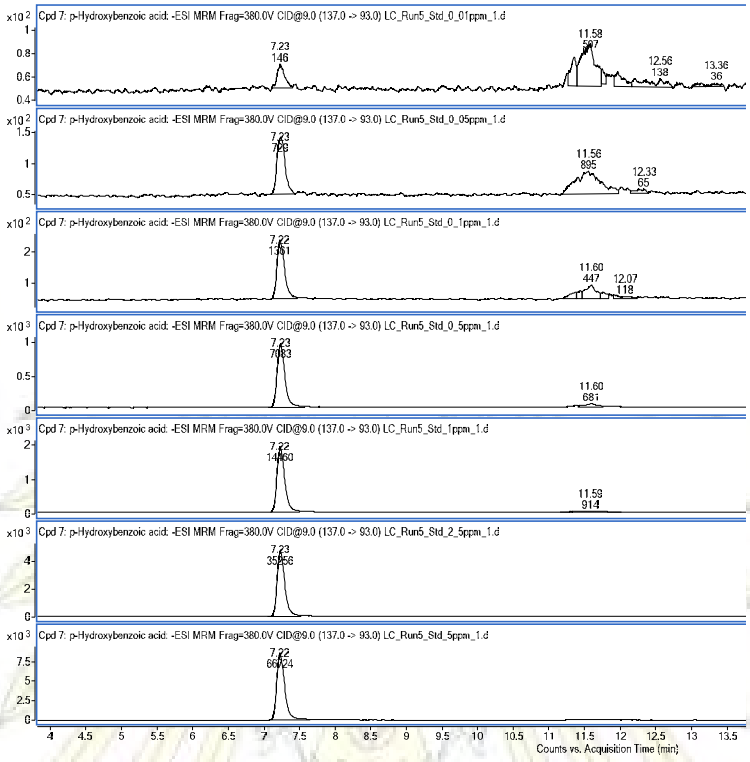
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



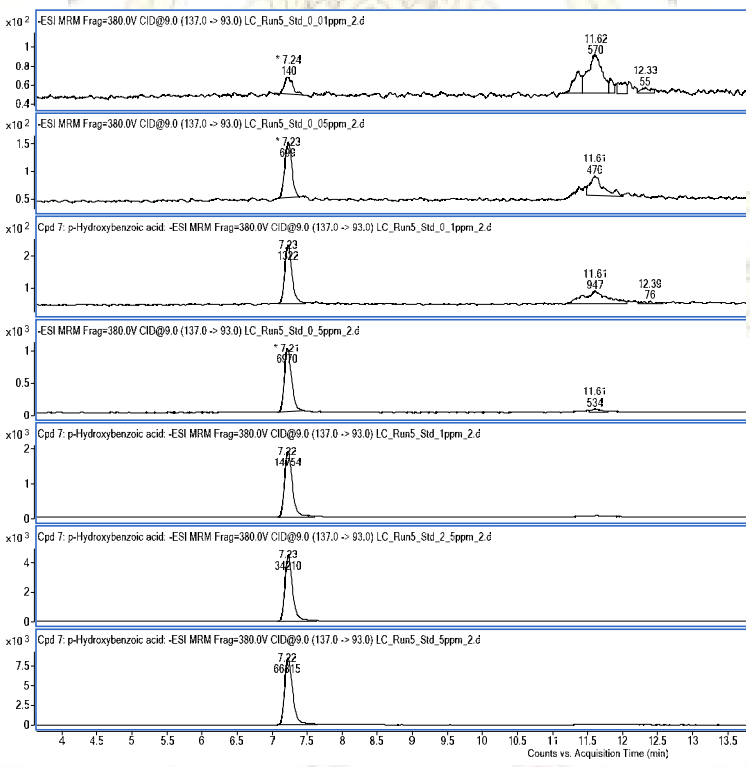
รูป ข.6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดโปรโตคาเทคชูอิก product ion m/z = 108.8 ความเข้มข้น 0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 1



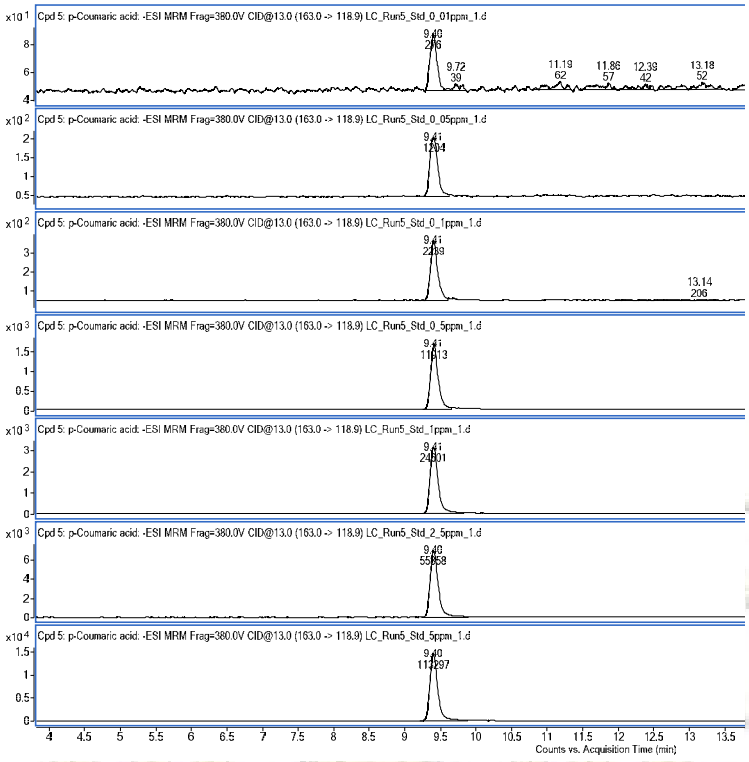
รูป ข.7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดโปรโตคาเทคชูอิก product ion m/z = 108.8 ความเข้มข้น 0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 2



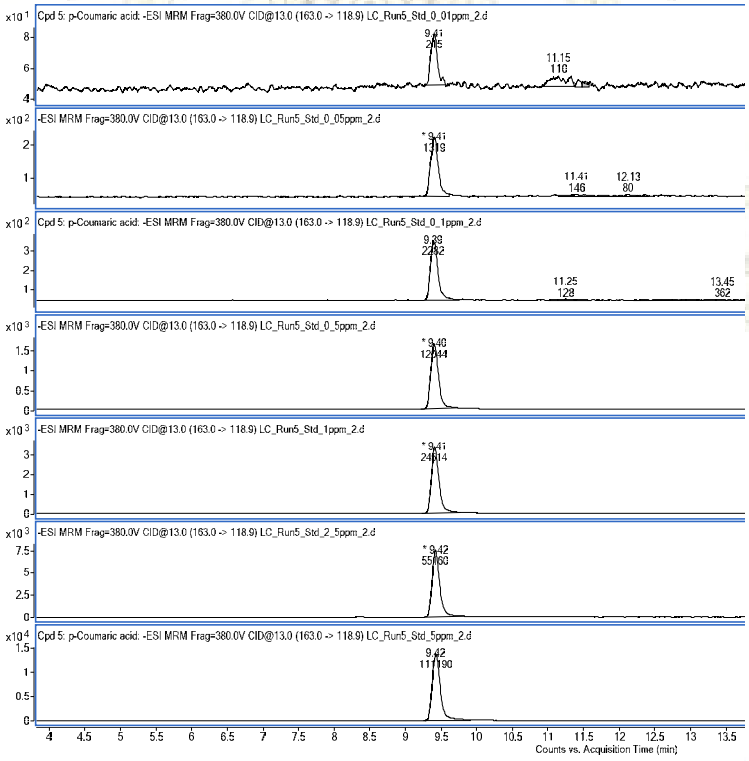
รูป ข.8 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก product ion m/z = 93.0 ความเข้มข้น 0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 1



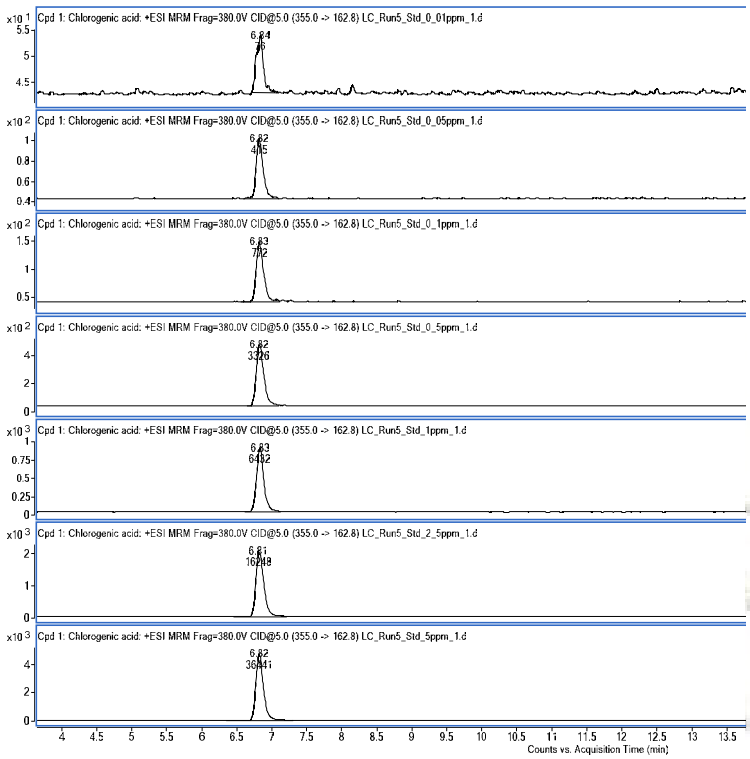
รูป ข.9 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก product ion m/z = 93.0 ความเข้มข้น 0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 2



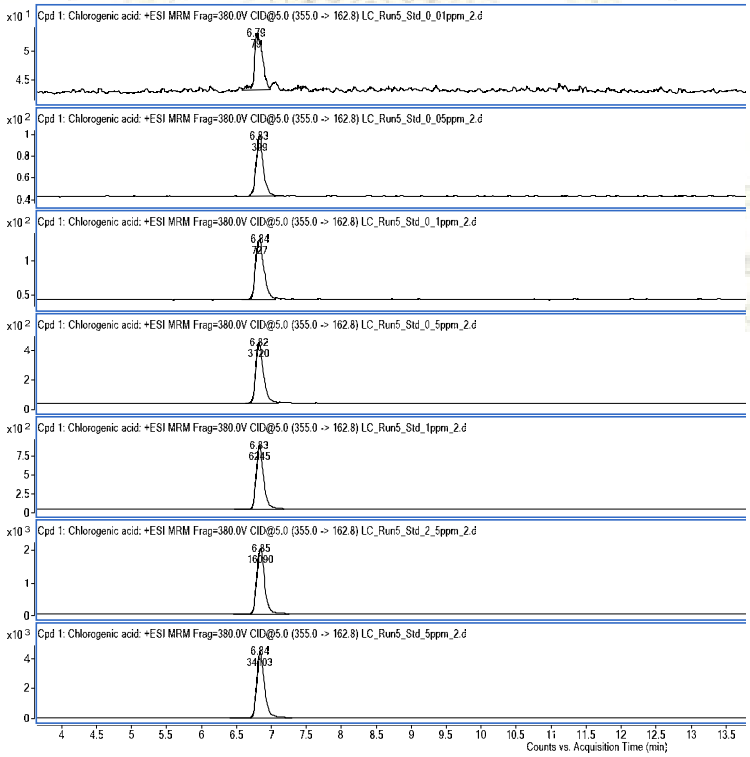
รูป ข.10 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดพาราคูมาริก product ion m/z = 118.9 ความเข้มข้น 0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 1



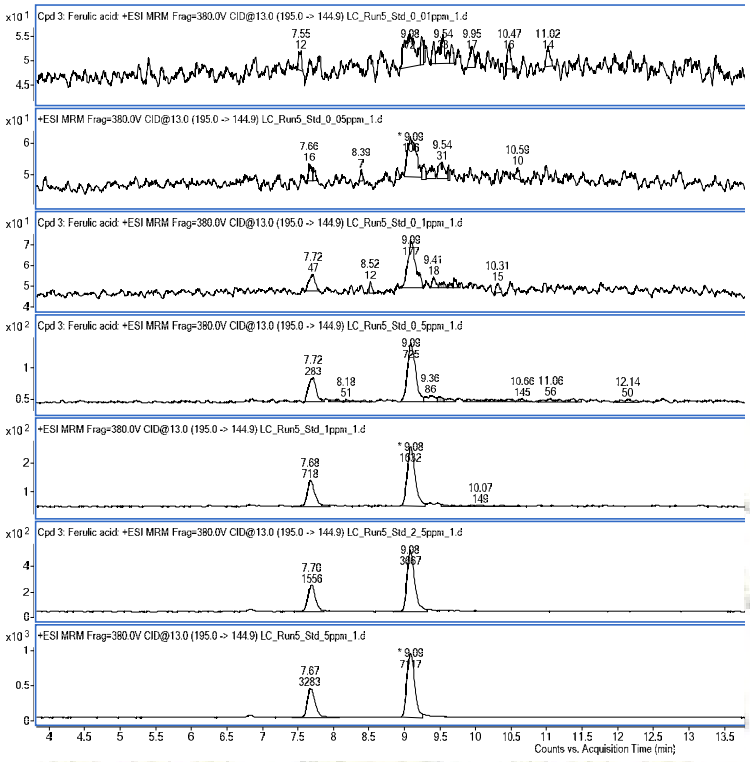
รูป ข.11 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดพาราคูมาริก product ion m/z = 118.9 ความเข้มข้น 0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 2



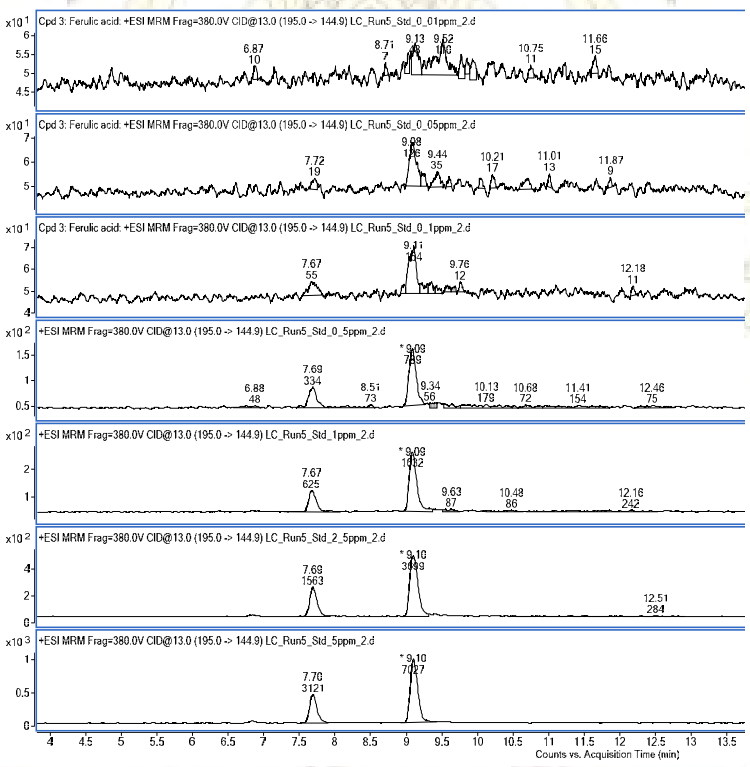
รูป ข.12 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก product ion m/z = 162.8 ความเข้มข้น 0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 1



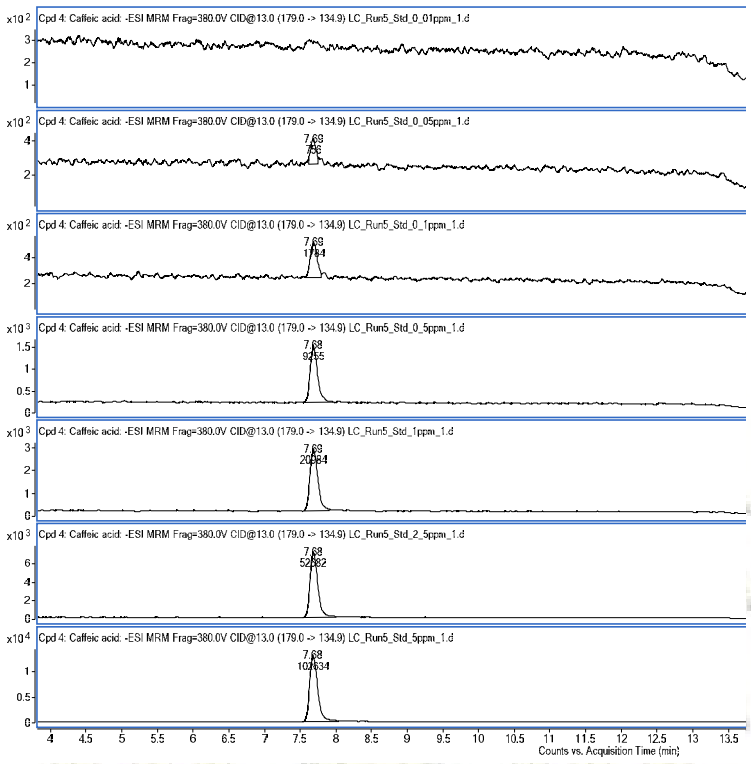
รูป ข.13 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก product ion m/z = 162.8 ความเข้มข้น 0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 2



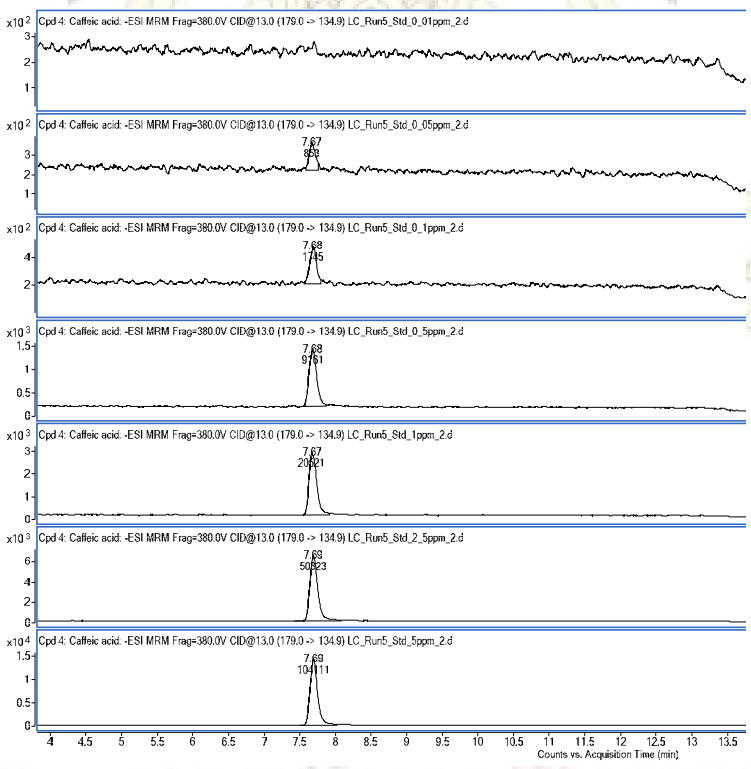
รูป ข.14 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอรูลิก product ion m/z = 144.9 ความเข้มข้น 0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 1



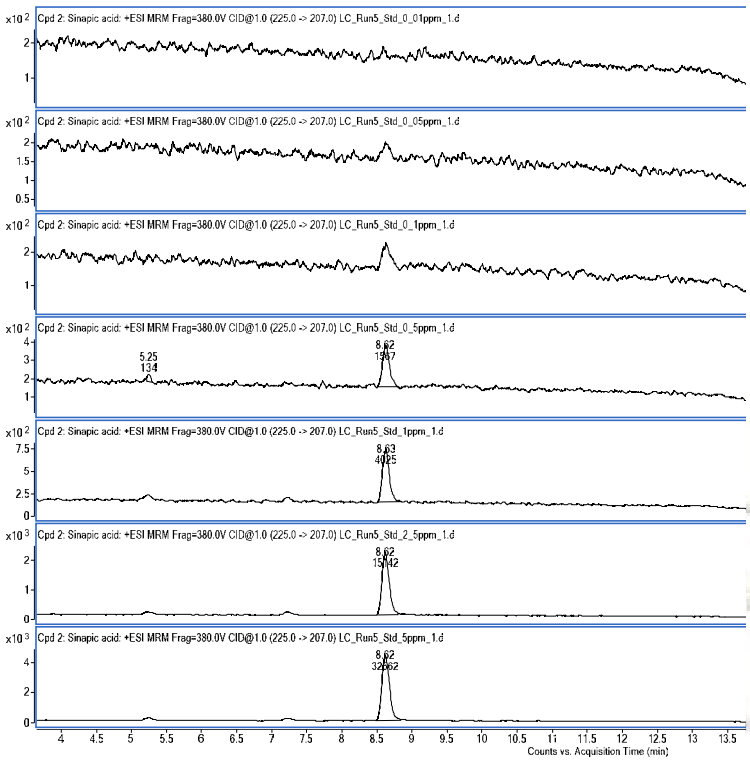
รูป ข.15 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอรูลิก product ion m/z = 144.9 ความเข้มข้น 0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 2



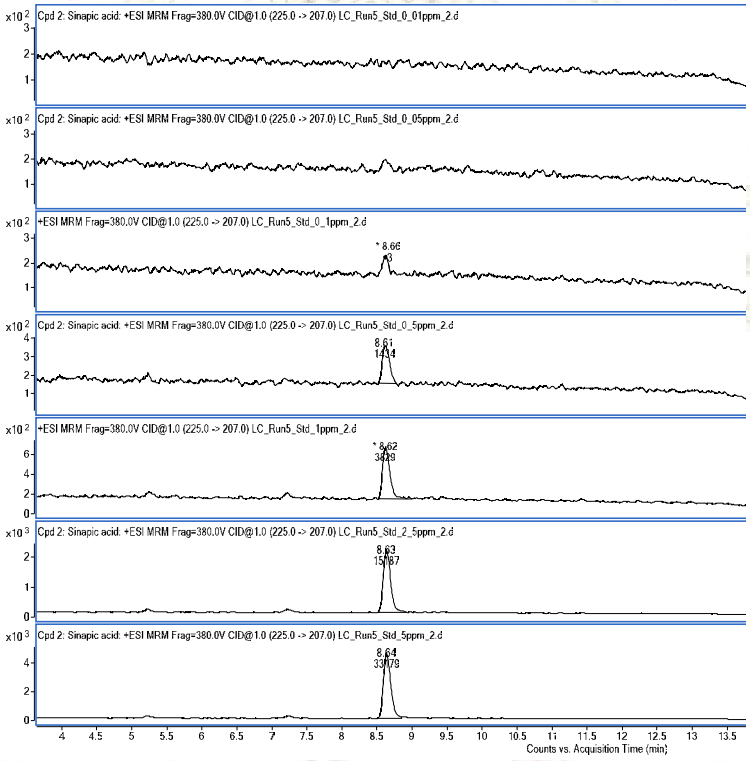
รูป ข.16 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดคาเฟอิก product ion m/z = 134.9 ความเข้มข้น 0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 1



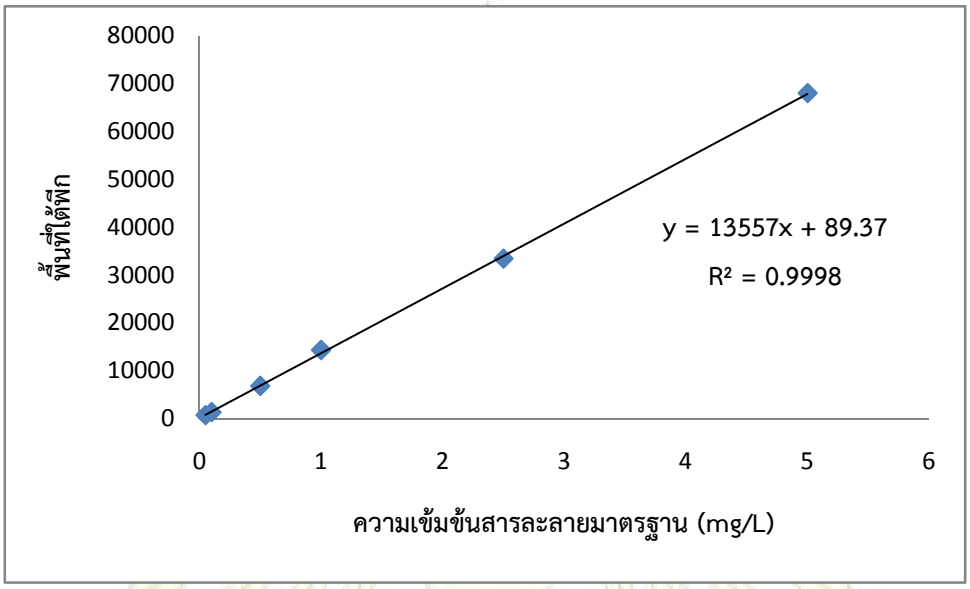
รูป ข.17 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดคาเฟอิก product ion m/z = 134.9 ความเข้มข้น 0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 2



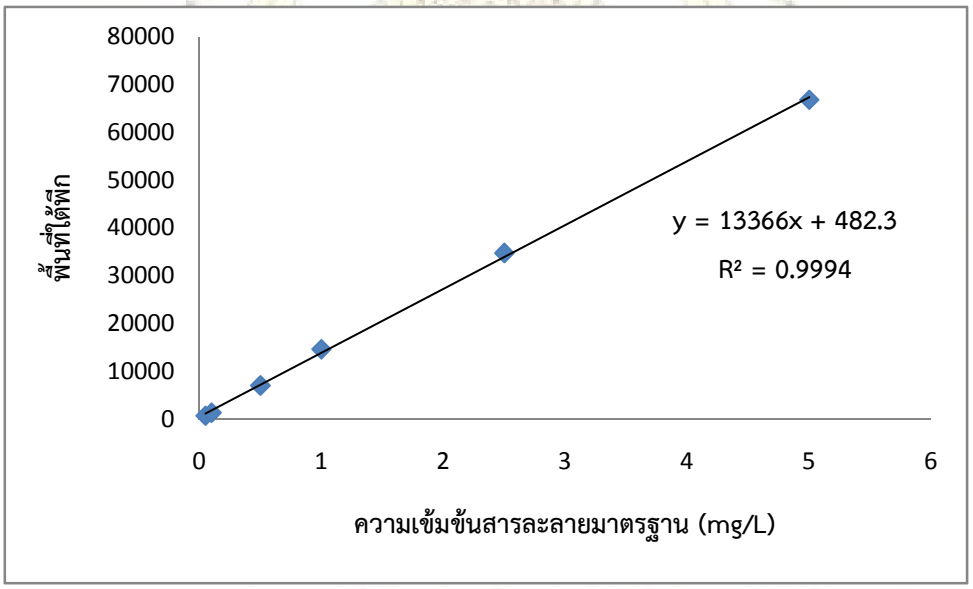
รูป ข.18 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดซิแนพพิก product ion m/z = 207.0 ความเข้มข้น 0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 1



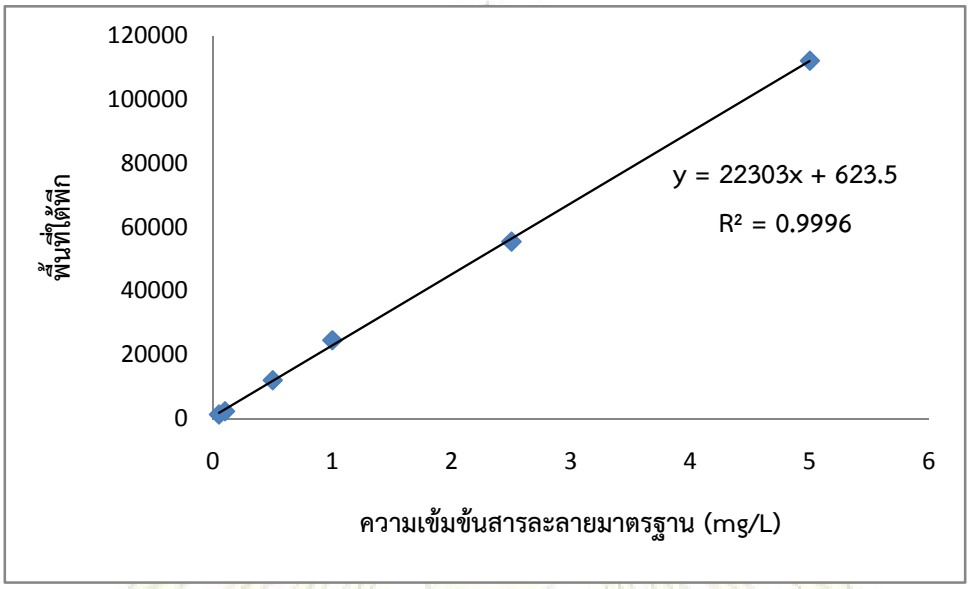
รูป ข.19 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดซิแนพพิก product ion m/z = 207.0 ความเข้มข้น 0.01-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 2



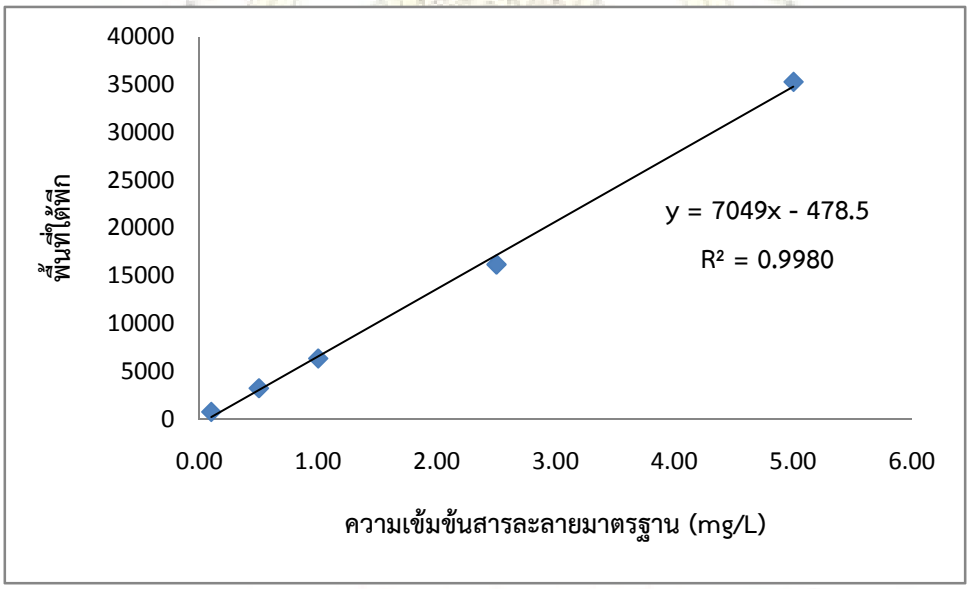
รูป ข.20 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดโปรโตคาเทคชูอิก



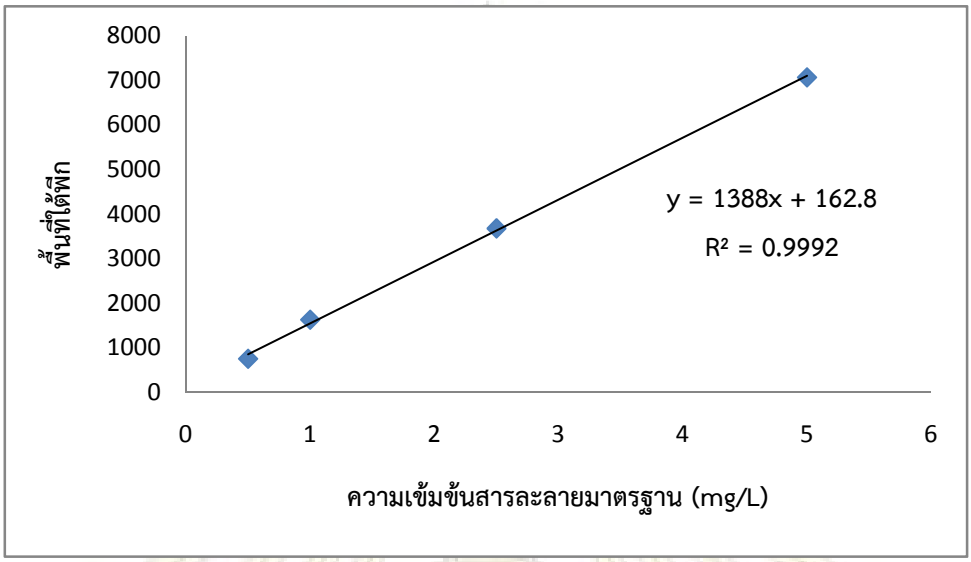
รูป ข.21 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก



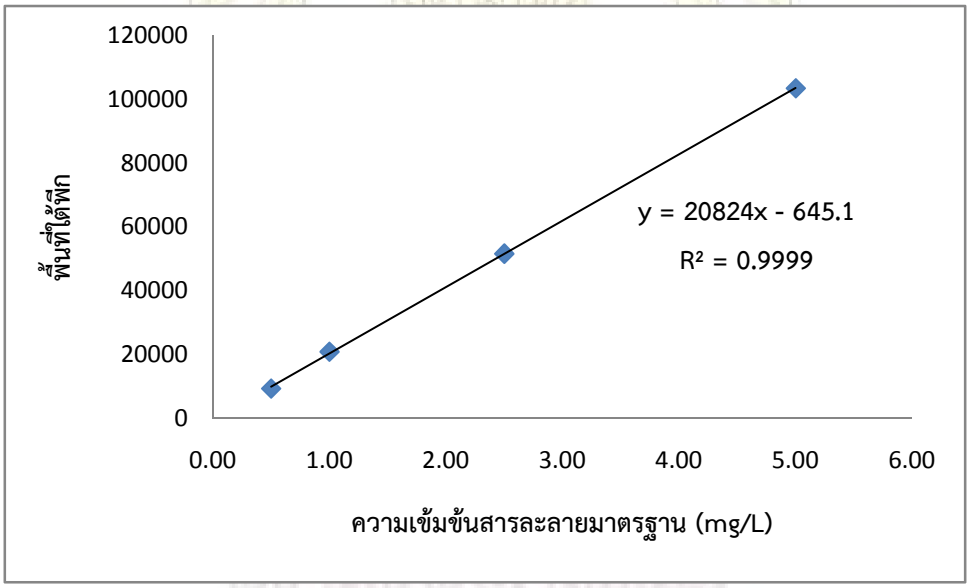
รูป ข.22 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดพาราคูมาริก



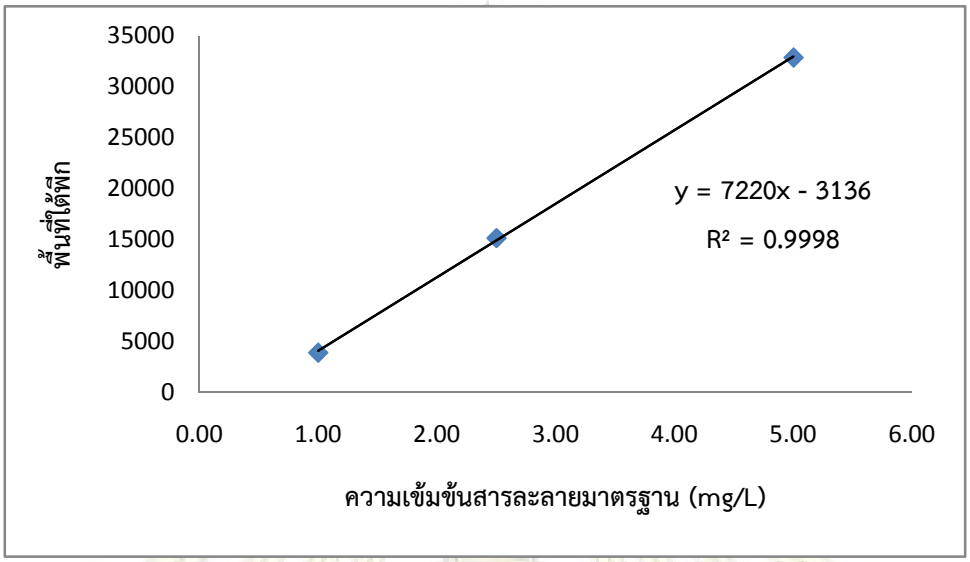
รูป ข.23 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก



รูป ข.24 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดเฟอรูลิก



รูป ข.25 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดคาเฟอิก



รูป ข.26 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดซิแนพพิก

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวอิสญาภรณ์ พุทธสา เกิดเมื่อวันที่ 3 เดือนธันวาคม พ.ศ. 2535 ที่จังหวัดสมุทรปราการ สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนราชประชาสมาสัย ฝ่ายมัธยม รัชดาภิเษก ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดสมุทรปราการ เมื่อปีการศึกษา 2554 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร-บัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 85/342 ซอยประชาอุทิศ 79 แขวงทุ่งครุ เขตทุ่งครุ กรุงเทพมหานคร 10140

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย