การสกัดด้วยด่างและการวิเคราะห์กรดเฟรูลิกอิสระในข้าวโพดหวาน
Alkaline Extraction and Analysis of Free Ferulic Acid in Sweet Corn

วรพรรณ พรมศิลา[1] กรรณิการ์ ศรีสมบูรณ์[1] และจิริสุดา ญาณไพศาล[1]

Received: July, 2015; Accepted: September, 2015

บทคัดย่อ

กรดเฟรูลิก (Ferulic acid) เป็นสารฟีนอลิกหลักในข้าวโพดหวาน มีฤทธิ์ทางชีวภาพและมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นการสกัดกรดเฟรูลิกอิสระออกจากข้าวโพดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการสกัดกรดเฟรูลิกอิสระในอุตสาหกรรม งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะของการสกัดกรดเฟรูลิกอิสระ (Free Ferulic Acid, FA) ในข้าวโพดหวานผ่านปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสด้วยด่าง (Hydrolysis Alkaline Extraction) และวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เชื่อมต่อเครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (HPLC-UV Method) โดยศึกษาสภาวะการสกัดกรดเฟรูลิกด้วยด่าง ได้แก่ ความเข้มข้นของด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 1.0 - 4.0 โมลาร์ อุณหภูมิการสกัด (อุณหภูมิห้อง -150 องศาเซลเซียส) และเวลาในการสกัดระหว่าง 30 - 150 นาที พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดเฟรูลิกได้ดีที่สุด คือ การสกัดในสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 3.0 โมลาร์ ในเวลา 120 นาที ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟรูลิกโดยใช้ชนิดของเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างเมทานอลต่อกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในอัตราส่วน 30 ต่อ 70 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์พบค่าความแม่นยำอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 2.4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับร้อยละ 117.3 และจากกลุ่มตัวอย่างพบปริมาณของกรดเฟรูลิกอิสระสูงสุดเท่ากับ 7.55 มิลลิกรัมต่อข้าวโพดหวาน 1.0 กรัม จากงานวิจัยจะเห็นได้ว่าการสกัดกรดเฟรูลิกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นวิธีที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก และได้ผลที่ยอมรับได้ สามารถเป็นแนวทางในการสกัดกรดอิสระเพื่อประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ : ข้าวโพดหวาน; สารประกอบโพลีฟีนอล; สารต้านอนุมูลอิสระ; การสกัด; สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

[1] *ภาควิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ*
E - mail : worapan.p@rmutk.ac.th

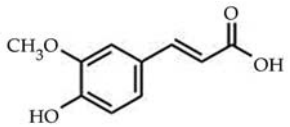
Abstract

Ferulic acid is a phenolic compound in sweet corn. It has a bioactive and an anti-oxidant properties. Then, the extraction of free ferulic acid (FA) was utilized for industries. The work was to study an extraction of FA in sweet corn via alkaline hydrolysis extraction and to determine by High performance liquid chromatography connected to UV detection (HPLC-UV method). The alkaline extraction and HPLC conditions were investigated. The concentrations of NaOH (1.0 - 4.0 M), extraction temperatures as 30 - 150°C and extraction times as 30 - 150 min were studied. Using an alkaline solution is to release FA, when an optimal condition of hydrolysis was obtained as 3.0 M NaOH at 120°C for 120 min extraction time. A HPLC condition was performed using a methanol and 1% acetic acid mixture with ratio of 30 : 70. The LOD was found as 2.4 mg/l. The repeatabilities for intraday and interday were satisfied, while a recovery was acceptable as 117.3%. A maximum amount of FA was found as 7.55 mg per gram of sweet corn. The work was presented an easy, uncomplicated and acceptable method for extraction of FA. It is useful for application in industries.

Keywords: *Zea mays Line var.* Rugosa; Polyphenolic Compound; Anti-Oxidant; Extraction; Bioactive

บทนำ

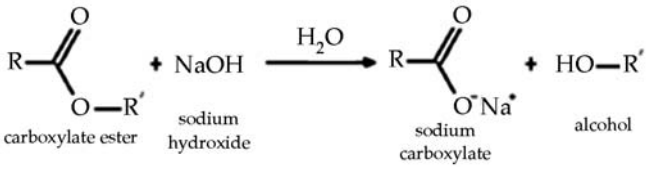
ข้าวโพดหวาน (*Zea mays* L.) เป็นพืชที่ปลูกได้ตลอดปีในทุกสภาพอากาศ เป็นธัญพืชที่เราพบเห็นได้ทั่วไป จนทำให้หลายคนมองไม่เห็นคุณประโยชน์ที่หลากหลาย เพราะไม่เพียงแต่ประโยชน์เพื่อการบริโภคสด ข้าวโพดหวานยังถูกแปรรูปเป็นข้าวโพดกระป๋องเพื่อการส่งออก หรือเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง หรือแม้แต่มีการกำหนดเป็นมาตรฐานเพื่อประโยชน์ของการส่งเสริมและพัฒนาการส่งออกตามมาตรฐาน มกษ 1512-2554 (Thai Agricultural Standard (TAS), 2011) ข้าวโพดหวานมีสารต้านอนุมูลอิสระ (Anti-Oxidant) ที่สำคัญคือ กรดเฟรูลิก (Ferulic Acid) (Harakotr, B. et al., 2015) กรดเฟรูลิกมีชื่อตามระบบมาตรฐาน (IUPAC name) คือ (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl) prop-2-enoic acid จัดเป็นพฤกษเคมี (Phytochemicals) กลุ่มพอลีฟีนอล (Polyphenol Compound) ที่สามารถเกิดได้เองตามธรรมชาติโดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์จากกรดคาเฟอิก (Caffeic Acid) กรดเฟรูลิกมีสูตรทางเคมี คือ $C_{10}H_{10}O_4$ และมีสูตรโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl Group) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดเฟรูลิก

ประโยชน์ของกรดเฟรูลิกนอกจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ยังสามารถต้านการอักเสบ (Anti-Imflamatory) ยับยั้งการทำงานของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด (Anti-Microbial Activity) รวมถึงยับยั้งการเกิดมะเร็ง (Anti-Cancer Effect) ในลำไส้ใหญ่และผิวหนังได้ กรดเฟรูลิกพบในพืชที่มีเมล็ดหลายชนิด (เช่น ข้าว ข้าวสาลี เมล็ดของกาแฟ ถั่วลิสง และข้าวโพด เป็นต้น) และผลไม้ (เช่น สัปปะรด แอปเปิ้ล และส้ม เป็นต้น) (Wichaipong, P., 2010) ปริมาณที่พบจะแตกต่างกันตั้งแต่ 5 - 50 กรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งกรดเฟรูลิกที่พบในพืชนี้ไม่ได้อยู่ในรูปกรดอิสระ แต่อยู่ในรูปสารประกอบเอสเทอร์ (Ester-Linkage Ferulic Acid) และอีเทอร์ (Ether-Linkage Ferulic Acid) รวมกับโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในผนังเซลล์ของพืชและเมล็ดพืช มีส่วนช่วยเพิ่มความแข็งแรงของเซลล์ สำหรับในข้าวโพดหวานนั้นจะพบกรดเฟรูลิก บริเวณเปลือกหุ้มเมล็ดทั้งในรูปอิสระและเอสเทอร์ (Kokkaew, H. et al., 2014) จากการรายงานปริมาณกรดเฟรูลิกในข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียว พบปริมาณกรดเฟรูลิกเฉลี่ย 0.930 - 2.485 ไมโครโมลต่อตัวอย่างข้าวโพด 100 กรัม (Nunant, N. et al., 2009) และในข้าวโพดต้มที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิสูงและใช้เวลาต้มนานจะพบปริมาณกรดเฟรูลิกอิสระมากขึ้น (Wichaipong, P., 2010)

การสกัดกรดเฟรูลิกอิสระที่มีประสิทธิภาพต้องสามารถสลายพันธะเอสเทอร์และอีเทอร์เพื่อแยกให้ได้กรดในรูปกรดอิสระออกมามากที่สุด ซึ่งวิธีการสกัดมีหลายวิธี เช่น การสกัดแบบแบ่งส่วน (Partial Extraction) ร่วมกับตัวทำละลายเมทานอลในการสกัดกรดเฟรูลิกในรำข้าว พบปริมาณกรดเฟรูลิก 0.38 มิลลิกรัมต่อรำข้าว 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) (Sawetavong, C. et al., 2010) หรือการสกัดแบบอัลตราซาวนด์ (Ultrasonic Extraction) ร่วมกับตัวทำละลายเอทานอลในการสกัดกรดเฟรูลิกในสมุนไพรจีน พบว่าสภาวะการสกัดที่เหมาะสมจะต้องใช้อัตราส่วนตัวทำละลายเอทานอล ปริมาตร 8 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม (Can, Q. et al., 2009) ซึ่งการสกัดทั้งสองวิธีมีข้อเสียคือใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ดังนั้น จึงมีการใช้คลื่นอัลตราซาวนด์กับการสกัดด้วยด่าง เพื่อลดเวลาการสกัดและตัวทำละลายอินทรีย์ (Mellina, D. R. S. et al., 2011) และต่อมามีการศึกษาวิธีการสกัดด้วยด่างแบบแช่หลีกเลี่ยงการใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์แบบอัลตราซาวนด์ ซึ่งภายใต้สภาวะด่างที่เหมาะสมนั้น ด่างจะเปลี่ยนเอสเทอร์ให้อยู่ในรูปกรดอิสระโดยผ่านปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส (Hydrolysis) ปฏิกิริยาดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

การสกัดด้วยสารละลายด่าง NaOH ที่ความเข้มข้น 1.0 - 4.0 โมลาร์ สกัดที่อุณหภูมิห้องหรือต่ำกว่าเรียกว่าการสกัดแบบ Mild Alkaline Hydrolysis ซึ่งการสกัดแบบนี้อาจใช้เวลาในการสกัดนานถึง 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะการสกัดสามารถทำลายเฉพาะพันธะเอสเทอร์เท่านั้น ขณะที่พันธะอีเทอร์จะไม่สลาย (Mellina, D. R. S. et al., 2011) เช่น การสกัดกรดเฟรูลิกในข้าวโพดโดยใช้ NaOH ที่ความเข้มข้น 0.2 - 2.0 นอร์แมล ใช้เวลาในการสกัด 1 - 24 ชั่วโมง (Paolo, T. et al., 2008) แต่ถ้าทำการสกัดด้วยด่างที่ความเข้มข้นสูงขึ้นและใช้อุณหภูมิการสกัดสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เรียกว่า

การสกัด Hot Alkaline Hydrolysis การสกัดนี้ใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่าแบบแรก (1 - 6 ชั่วโมง ขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้) ภายใต้สภาวะการสกัดสามารถทำลายทั้งพันธะเอสเทอร์และอีเทอร์ เช่น สกัดแยกกรดเฟรูลิกอิสระโดยใช้ด่างเข้มข้น 4.0 โมลาร์ อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส ใช้เวลาการสกัดเพียง 2 ชั่วโมง (Noor, H. M. S. et al., 2011) หรือการสกัดด้วยด่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟรูลิกในเมล็ดธัญพืชด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้นร้อยละ 2.0 ที่ 120 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการสกัด 90 นาที (Mussatto, S. L. et al., 2007) และเมื่อแยกกรดเฟรูลิกอิสระออกจากตัวอย่างแล้ว การวิเคราะห์ตรวจวัดปริมาณส่วนใหญ่จะใช้เทคนิคโครมาโมกราฟีชนิด RP-HPLC โดยใช้ระบบของเฟสเคลื่อนที่ต่าง ๆ กัน เช่น การใช้เฟสเคลื่อนที่ระหว่างเมทานอลกับกรดฟอสฟอริก (Buronov, A. U. et al., 2009) หรือการใช้ระบบของเฟสเคลื่อนที่ผสมระหว่างเมทานอลกับกรดฟอร์มิกในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟรูลิกอิสระ (Free Ferulic Acid) และใช้เฟสเคลื่อนที่ผสมระหว่างเมทานอลต่อโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) ในการวิเคราะห์กรดเฟรูลิกรวม (Total Ferulic Acid) (Guang, H. L. et al., 2007) หรือการใช้เฟสเคลื่อนที่ของเมทานอลกับ Trifluoroacetic Acid ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดเฟรูลิกในฟางข้าวโดย (Noor, H. M. S. et al., 2011) หรือการใช้เฟสเคลื่อนที่อะซิโตรไนไตร์และกรดฟอร์มิกในการวิเคราะห์กรดข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียว (Nunant, N. et al., 2009) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการสกัดกรดเฟรูลิกอิสระในข้าวโพดหวานด้วยด่างผ่านปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดเฟรูลิกอิสระในข้าวโพดหวานด้วยด่าง และวิเคราะห์ปริมาณกรดอิสระด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวด้วยเฟสเคลื่อนที่เมทานอลต่อกรดอะซิติก ซึ่งข้อมูลที่ได้อาจใช้เป็นแนวทางในการแยกกรดอิสระเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารหรือเครื่องสำอางต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่ใช้ในการสกัดกรดเฟรูลิกอิสระด้วยด่าง (NaOH) ในข้าวโพดหวาน
2. เพื่อศึกษาชนิดของระบบเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการตรวจวัดกรดเฟรูลิกอิสระจากข้าวโพดหวานด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี (RP-HPLC)
3. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการสกัดแยกกรดเฟรูลิกอิสระในอุตสาหกรรม

วิธีดำเนินการทดลอง

1. อุปกรณ์การทดลองและสารเคมี

1.1 เครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) บริษัท Waters รุ่น W 600-717-2424 ประเทศสหรัฐอเมริกาต่อกับเครื่องตรวจวัดยูวี วิสิเบิล บริษัท Waters รุ่น 2489

1.2 ชุดกรองเมมเบรน บริษัท Waters

1.3 อ่างอัลตราโซนิก (Ultrasonic Bath) บริษัท Elma รุ่น D-78224 ประเทศเยอรมนี

1.4 เตาให้ความร้อนแบบแม่เหล็ก

1.5 กรดเฟรูลิก (Ferulic Acid, AR Grade) บริษัท SIGMA ประเทศเยอรมนี

1.6 เมทานอล (HPLC Grade) บริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ

1.7 กรดอะซิติก (Acetic Acid, AR Grade) บริษัท MERCK ประเทศเยอรมนี

1.8 น้ำปราศจากไอออน (Mili Q water)

1.9 ตัวอย่างข้าวโพดหวานชนิดดิบ ซึ่งสุ่มเก็บตัวอย่างจากตลาดคลองเตย กรุงเทพมหานคร

2. วิธีการทดลอง

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดเฟรูลิกที่ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งกรดเฟรูลิก 0.0388 กรัม แล้วทำการปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

2.2 การเก็บตัวอย่างข้าวโพดหวานชนิดดิบจากร้านค้า 3 ร้านในตลาดคลองเตย กรุงเทพมหานคร นำมาแกะเอาเฉพาะส่วนเมล็ดข้าวโพด ผสมรวมเป็นกลุ่มตัวอย่างเดียวกัน จากนั้นนำไปบดให้ละเอียด

2.3 ชั่งข้าวโพดหวานที่บดแล้วน้ำหนักจำนวน 5 กรัม แล้วนำไปสกัดในสารละลายด่าง (โดยดัดแปลงสภาวะการสกัดจากงานวิจัยอ้างอิงของ Mussatto, S. I. et al., 2007 และ Noor, H. M. S. et al., 2011) ศึกษาการสกัดในสารสะลายด่างที่ความเข้มข้น 1.0 - 4.0 โมลาร์ อุณหภูมิการสกัดตั้งแต่อุณหภูมิห้อง -150 องศาเซลเซียส และเวลาในการสกัด 30 - 150 นาที

2.4 เมื่อได้ตัวอย่างของแต่ละสภาวะ นำตัวอย่างกรองผ่านผ้าขาวบางเอาเฉพาะสารละลายซึ่งจะได้สารละลายสีเหลือง จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง เตรียมตัวอย่างซ้ำข้อ 2.3 อีก 2 ครั้ง

2.5 ก่อนการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC กรองตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2.4 ผ่านกระดาษกรองเมมเบรน (Membrane Filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนฉีดเข้าระบบ HPLC

2.6 การทดสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) โดยแสดงข้อมูลทางสถิติ ดังนี้

1) การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) โดยดูค่าสัมประสิทธิการตัดสินใจ (Coefficient of Variance, R^2) จากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดเฟรูลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (5 10 25 50 100 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร) กับพื้นที่พีกโดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับ คือ ค่า $R^2 \geqslant 0.99$

2) การหาขีดจำกัดในการวิเคราะห์ LOD (Limit of Detection) และขีดจำกัดในการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำ LOQ (Limit of Quantitation) และโดยนำสารละลายมาตรฐานกรดเฟรูลิกที่มีความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่พีกปรากฏ) นำมาวิเคราะห์จำนวน 7 ครั้ง แล้วคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดย LOD = $_{\text{yintercepn}}$ + 10SD และ LOQ = y_{intercep} +3SD

3) การหาความแม่นยำทำการวิเคราะห์ทดสอบโดยนำสารละลายมาตรฐานกรดเฟรูลิกที่ความเข้มข้นแน่นอน 50 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาใส่ในตัวอย่างแล้วทำการวิเคราะห์โดยทำการวิเคราะห์ 5 ซ้ำ แล้วคำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%Relative Standard Deviation, %RSD) ค่าที่ยอมรับได้ควรอยู่ในเกณฑ์ %RSD $\leqslant$ 10.0

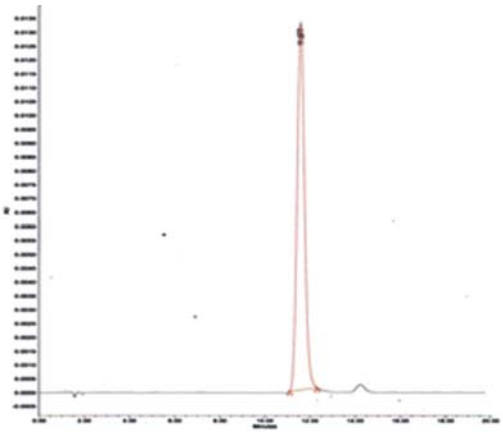
4) การตรวจสอบการวิเคราะห์ความถูกต้อง (Accuracy) โดยเติมสารละลายมาตรฐานกรดเฟรูลิกความเข้มข้นคือ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ แล้วนำค่าความเข้มข้นที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการกลับคืน (%recovery) ซึ่งผลที่ได้ควรจะอยู่ในช่วงร้อยละ 100 ± 20 โดยคำนวณตามสมการ

$$\%\text{recovery} = \frac{(\text{ค่าตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน} - \text{ค่าตัวอย่างที่ไม่เติม})}{\text{ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม}} \times 100 \qquad (1)$$

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การหาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

การเลือกใช้ระบบของเฟสเคลื่อนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการแยกในเทคนิค RP-HPLC การศึกษาได้เลือกใช้เมทานอลเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากงานวิจัยที่กล่าวมามักเลือกใช้เมทานอลเป็นส่วนใหญ่ อีกทั้งมีราคาถูกกว่าสารชนิดอื่น (เช่น อะซิโตรไนไตร์) โดยการศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่หนึ่งสารละลายผสมเมทานอลกับน้ำ ชนิดที่สองสารละลายผสมเมทานอลกับอะซิติก ร้อยละ 1 และชนิดที่สามสารละลายผสมเมทานอลกับกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 2 ซึ่งพบว่าสารละลายผสมเมทานอลกับอะซิติกร้อยละ 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ดีที่สุด มีความแรงเพียงพอในการตรวจวัดกรดเฟรูลิก จากนั้นศึกษาที่อัตราส่วนของสารละลายผสม พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมคือเมทานอลต่อกรดอะซิติกร้อยละ 1 อัตราส่วน 30 ต่อ 70 ซึ่งที่อัตราส่วนนี้ลดปริมาตรการใช้เมทานอลเกรด HPLC เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Sawetvong, C. (Sawetvong, C. et al., 2010) และที่สภาวะดังกล่าวให้พีกที่มีลักษณะแคบสัญญาณของ Base Line ต่ำสัญญาณมีความเสถียร เรียบสม่ำเสมอ เมื่อเทียบกับสภาวะอื่นที่ศึกษา นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเบื้องต้น พบว่าไม่มีพีกจากสารอื่นรบกวนตำแหน่งพีกของกรดเฟรูลิกที่เวลา 10 นาที (เนื่องจากพีกของสารอื่นรบกวนปรากฏในช่วง 6 - 8 นาทีแรกของการวิเคราะห์) โครมาโทแกรมสารมาตรฐานกรดเฟรูลิกภายใต้เฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดเฟรูลิกเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเฟสเคลื่อนที่สารละลายผสมเมทานอลต่อกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 อัตราส่วน 30 ต่อ 70

2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธี

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีโดยทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของสารละลายกรดเฟรูลิกมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5 - 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบความเป็นเส้นตรงเป็นไปตามสมการ y = 13807x-19931 มีค่าสัมประสิทธิการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9932 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 2.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) เท่ากับ 4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และการทดสอบความเที่ยงของวิธีโดยแสดงเป็นค่าร้อยละความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (%RSD) ของพื้นที่ใต้พีก (Peak Area) และเวลาที่สารถูกหน่วง (Retention Time) พบค่าที่ได้มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 10.0 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ

3. ผลของความเข้มข้นของด่าง

ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยเริ่มใช้การสกัดแบบ Mild Hydrolysis Extraction ที่ความเข้มข้นของด่าง 1.0 - 4.0 โมลาร์ โดยใช้ปริมาณตัวอย่าง 5.0 กรัมต่อปริมาตรสารละลายด่าง 100 มิลลิลิตร ทำการสกัดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องได้ผลการทดลองดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อปริมาณกรดเฟรูลิก

ความเข้มข้นของ NaOH (โมลาร์)	เวลาในการสกัด (นาที)	อุณหภูมิในการสกัด (องศาเซลเซียส)	ค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดเฟรูลิกที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อ 1.0 กรัม - ตัวอย่าง)
1.0	30	ห้อง	0.83 ± 0.03
2.0			1.97 ± 0.56
3.0			5.50 ± 1.05
4.0			5.53 ± 0.90

ภายใต้สภาวะที่ศึกษาการสกัดตามสภาวะที่กำหนดพบว่า ความเข้มข้นของด่างเพิ่มขึ้นจะได้กรดเฟรูลิกอิสระออกมาได้มากขึ้นเป็นไปตามสมมติฐาน เนื่องจากความแรงของด่างที่เพิ่มขึ้นจะช่วยเพิ่มความสามารถในการสลายพันธะเอสเทอร์และอีเทอร์ได้กรดอิสระได้มากขึ้น ซึ่งสภาวะที่สกัดกรดเฟรูลิกที่เลือกใช้ คือ การสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3.0 โมลาร์ (แทนการใช้ 4.0 โมลาร์ เพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมี) และจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยด่างแบบแช่นี้เป็นวิธีการสกัดที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องจัดตั้งอุปกรณ์เหมือนการสกัดแบบ Sohklet หรือ Sonication (Guang, H. L., 2007) แต่สามารถสกัดกรดเฟรูลิกอิสระออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพไม่แพ้วิธีการสกัดแบบอื่น

4. ผลของเวลาในการสกัด

ศึกษาผลเวลาในการสกัดต่อปริมาณกรดที่ได้ในช่วงการสกัด 30 - 150 นาที โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3.0 โมลาร์ สกัดที่อุณหภูมิห้องได้ผลการทดลองดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลของเวลาในการสกัดต่อปริมาณกรดเฟรูลิก

เวลาในการสกัด (นาที)	ความเข้มข้นของ NaOH (โมลาร์)	อุณหภูมิในการสกัด (องศาเซลเซียส)	ค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดเฟรูลิกที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อ 1.0 กรัม - ตัวอย่าง)
30	3.0	ห้อง	0.86±0.03
60			1.97±0.55
90			2.16±0.26
120			5.53±0.90
150			5.11±1.31

จากการศึกษาผลของเวลาต่อปริมาณกรดที่สกัดได้ พบว่าปริมาณกรดเฟรูลิกที่สกัดได้เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการสกัด แต่จะคงที่ที่ 120 นาที ปริมาณกรดไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 150 นาที ดังนั้น เลือกใช้เวลาในการสกัด 120 นาที ซึ่งแสดงว่าภายใต้สภาวะของการศึกษาเวลา 120 นาที สามารถสกัดกรดอิสระออกได้หมด

5. ผลของอุณหภูมิในการสกัด

ศึกษาอุณหภูมิในการสกัด อุณหภูมิห้องถึง 150 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3.0 โมลาร์ เวลาในการสกัด 120 นาที ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลของอุณหภูมิในการสกัดต่อปริมาณกรดเฟรูลิก

อุณหภูมิในการสกัด (องศาเซลเซียส)	ความเข้มข้นของ NaOH (โมลาร์)	เวลาในการสกัด (นาที)	ค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดเฟรูลิกที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อ 1.0 กรัม - ตัวอย่าง)
อุณหภูมิห้อง (30)	3.0	120	2.16 ± 0.25
60			5.11 ± 0.03
90			5.44 ± 0.74
120			5.53 ± 0.90
150			ตรวจไม่พบ

จากการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิห้องได้ปริมาณกรดไม่สูงมาก แต่จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ และมีค่าคงที่ที่ 60 - 120 องศาเซลเซียส ซึ่งการได้ปริมาณกรดเฟรูลิกที่ใกล้เคียงกัน แสดงว่าการสกัดด้วยด่างที่ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์นี้สามารถใช้ช่วงอุณหภูมิในการสกัดได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แต่ไม่ควรเกิน 150 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับจุดเดือดของกรดเฟรูลิก เพราะอาจทำให้

กรดเฟรูลิกเกิดการสลายตัว อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เลือกใช้อุณหภูมิที่ 120 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สามารถสกัดกรดเฟรูลิกออกมาได้มากที่สุด และอุณหภูมิดังกล่าวใกล้เคียงกับงานวิจัยของมหาวิทยาลัยคอร์เนลที่รายงานในวารสารการเกษตรและโภชนเคมี สมาคมเคมีของอเมริกัน รายงานว่าที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่สกัดกรดเฟรูลิกในข้าวโพดได้ดีที่สุด (Rattanakan. W, 2015)

6. การวิเคราะห์ปริมาณและการทดสอบความถูกต้องของวิธี

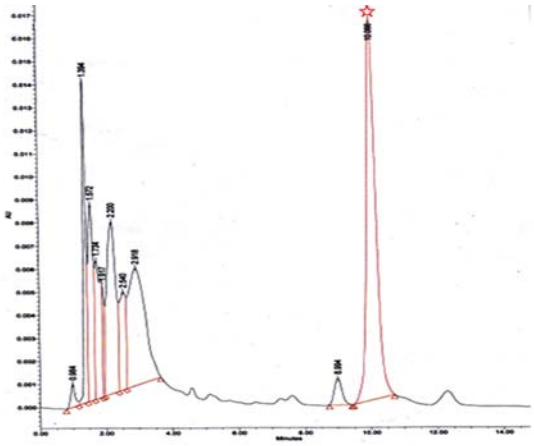
จากการที่ศึกษาพบปริมาณกรดเฟรูลิกอิสระในกลุ่มตัวอย่างข้าวโพดที่สุ่มเก็บจากตลาดคลองเตย อยู่ในช่วง 0.83 - 7.55 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 1.0 กรัม ซึ่งคำนวณปริมาณจากสมการ

$$\text{ปริมาณกรดเฟรูริคอิสระ (มิลลิกรัมต่อกรัม)} = \frac{(\text{ความเข้มข้นที่ได้จากกราฟ (มิลลิกรัมต่อลิตร)} \times \text{ปริมาตรของตัวอย่าง(ลิตร)})}{(\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)})} \quad (2)$$

และเพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีและผลการวิจัยที่ได้ ได้แสดงค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของวิธีการวิเคราะห์ ซึ่งได้ค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 117.3 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับดังตารางที่ 4 และโครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 4

ตารางที่ 4 ผลของค่าร้อยละความถูกต้องของวิธีในรูปร้อยละการกลับคืน

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดเฟรูลิกที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าร้อยละการกลับคืน
ตัวอย่างที่เตรียมขึ้น	108.1	-
ตัวอย่างที่เตรียมขึ้น + สารละลายมาตรฐานกรดเฟรูลิก 100 มิลลิกรัมต่อลิตร	225.4	117.3



รูปที่ 4 โครมาโทแกรมของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานกรดเฟรูลิกเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สภาวะของ HPLC ดังรูปที่ 3

สรุป

จากการศึกษาการสกัดกรดเฟรูลิกอิสระในครั้งนี้ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด คือ การสกัดในสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ เวลาที่ใช้ในการสกัด 120 นาที ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์ปริมาณด้วย HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างเมทานอลต่อกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1.0 อัตราส่วน 30 ต่อ 70 อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการทดสอบมีค่าความถูกต้องและความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และสามารถสกัดกรดเฟรูลิกออกมาได้มากที่สุด นอกจากนี้จะพบว่าการสกัดด้วยด่างเป็นวิธีการสกัดกรดเฟรูลิกที่ง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถใช้ในการแยกกรดอิสระเพื่ออุตสาหกรรมต่าง ๆ ต่อไป

References

Buranov, A. U. and Mazza, G. (2009). Extraction of Purification of Ferulic Acid from Flax Shives Wheat and Corn Bran by Alkaline Hydrolysis and Pressurized Solvent. **Food Chemistry**. Vol. 115. pp. 1542-1543

Can, Q., Yongyue, S. and Jia, Q. (2009). Ultrasonic Extraction of Ferulic Acid from Angelica Sinensis. **The Cannadian Journal of Chemical Engineering**. Vol. 87. No. 4. pp. 562-567

Guang, H. L., Shi, Q. C., Kelvin, S. Y. L., Jin, Y. M. Kelvin, C. and Zhoung, Z. Z. (2007). Determination of Free and Total Available Ferulic Acid in Different Types of Chinese Angelica by High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Food and Drug Analysis**. Vol. 15. pp. 438-446

Harakotr, B., Suriharn, B., Tangwongchai, R. and Lertrat, K. (2015). Profile of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity in Waxy Corn at Different Maturation Stages. **Khon Kaen Agriculture Journal**. Vol. 43. Suppl. 1. pp. 311-316

Kokkaew, H., Srithanyarat, N. and Pitirit, T. (2014). Phenolics Flavonoids Anthocyanins and Antioxidant Contents of Baked White and Purple Waxy Corn Products. **Khon Kaen Agriculture Journal**. Vol. 42. No. 4. pp. 481-490

Mellina, D. R. S., Aline de, P. V., Jailadora da, C. C., Domingos, S. C. P., Renato, C. M. and Maria, A. C. M. (2011). Use of Ultrasound Bath in the Extraction and Quantification of Ester-Linked Phenolic Acids in Tropical Forages. **American Journal of Analytical Chemistry**. Vol. 2. pp. 344-351

Mussatto, S. I., Dragone, G. and Roberto, I. C. (2007). Ferulic and p-Coumaric Acids Extraction by Alkaline Hydrolysis Extraction Brewer's Spent Grain. **Inductrial Crops and Products**. Vol. 25. pp. 231-237

Noor, H. M. S., Mohamed, Z. M. D., Dachyyar, A., Mohammed, S. A. and Ku, S. K. I. (2011). Optimization of Alkaline Hydrolysis of Paddy Staw for Ferulic Acid Extraction. **Industrial Crops and Products**. Vol. 34. pp. 1635-1640

Nunant, N., Buaprasert, O., Sripanlom, N. and Silachan, N. (2009). **Quantification of Ferulic acid in Sweet of Corn and Waxy Corn**. A Thesis for The Bachelor Degree of Science, Science and Technology Faculty, Nakhon Pathom Rajabhat University. Access (11 June 2015). Available (http://www.scimath.org/project/show/1488)

Paolo, T., Bahar, A., Beatriz, R., Jose, M. D. and Attilio, C. (2008). Release of Ferulic Acid from Corn Cobs by Alkaline Hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**. Vol. 40. pp. 500-506

Rattanakan, W. (2015). **More Advantages of Sweet Corn than You Think**. Access (11 June 2015). Available (http://www.umarin.com/board/index.php?topic=1133.0)

Sawetavong, C., Lilitcham, S., Pavadhgul, P., Ayusuk, K. and Krinangkura, K. (2010). Partial Extraction Method for Quantifying Ferulic Acid in Rice Bran. In **Proceeding of 48th Kasetsart University Annual Conference: Agro-Industry**. pp. 530-537

Thai Agricultural Standard (TAS). (2011). **Sweet corn :TAS 1512-2011**. National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards. Ministry of Agriculture and Cooperatives

Wichaipong, P. (2010). **Ferulic Acid**. Biological Science Program. Department of Scince Service. Access (10 August 2015). Available (http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files /bsp_4_2553_ Ferulic.pdf)