

การพัฒนากระบวนการสกัดเคอร์ซีตินจากผงใบมะรุมโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง Development of Extraction Process of Quercetin from Moringa Oleifera Leaf Powder using Response Surface Methodology

สุรีวัลย์ ดวงจิตต์^{1*} ภัทธาพร สุทธิพงษ์² นิธิรัตน์ ประจันบาล² ไพจิตร ศรีธนาวัฒน์³ วรนนท์ รังสิมาวงศ์¹
ทิภาดา สามสีทอง⁴ กุสุมา จิตแสง¹ และ สุรีวัลย์ บำรุงไทย³

Sureewan Duangjit^{1*}, Pattaraporn Suttipong,² Nitirat Prajunban², Phaijit Sriyanuwat³, Worranan Rangsimawong¹,
Tipada Samseethong⁴, Kusuma Jitsaeng¹ and Sureewan Bamrungthai²

¹กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

² นักศึกษาคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

³กลุ่มวิชาชีวเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

⁴กลุ่มวิชาเภสัชกรรมคลินิก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

¹Division of Pharmaceutical Chemistry and Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University,

²Pharmacy student, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University,

³Division of Biopharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University

⁴Division of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University

*E-mail: sureewan.d@ubu.ac.th

บทคัดย่อ

ใบมะรุมเป็นส่วนหนึ่งของพืชที่เป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ กระบวนการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ มีผลเสียต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม เทคโนโลยีสีเขียว (Green technology) เป็นกระบวนการสกัดทางเลือกที่ได้รับความนิยม เนื่องจากช่วยลดปัญหาสุขภาพและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการสกัดเคอร์ซีตินจากผงใบมะรุมโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลายมาตรฐานที่ใช้ในกระบวนการสกัด สารละลายที่ไม่ใช่ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ กลีเซอริน พอลิเอทิลีนไกลคอล 400 โพรพิลีนไกลคอล และพอล็อกซาเมอร์ 407 ตัวแปรตั้งต้น (X_n) คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (X_1) ระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (X_2) ความเข้มข้นของเอทานอล (X_3) และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (X_4) และตัวแปรตอบสนอง (Y_n) คือ ปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ต่อกรัมของผงใบมะรุม ออกแบบการทดลองเป็น 3 ระดับ ผลการวิจัยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสารสกัดน้ำ คือ $X_1 = 40$ องศาเซลเซียส และ $X_2 = 60$ นาที และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสารสกัดเอทานอลคือ $X_3 = 80$ ร้อยละ และ $X_4 = 60$ นาที ความพึงพอใจสำหรับสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลเท่ากับ 0.9901 และ 0.6595 ตามลำดับ นอกจากนี้ความแม่นยำ และความน่าเชื่อถือได้รับการยืนยันด้วยการทดลองจริง พอลิเอทิลีนไกลคอล 400 หรือ พอล็อกซาเมอร์ 407 สกัดเคอร์ซีตินจากผงใบมะรุมได้มากกว่าสารสกัดน้ำ 1.14 และ 1.19 เท่า ตามลำดับ การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า polyethylene glycol 400 และ poloxamer 407 สามารถใช้เป็นตัวทำละลายทางเลือกได้

คำสำคัญ: มะรุม เคอร์ซีติน สารสกัด ตัวทำละลายสีเขียว ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

Abstract

Moringa oleifera leaves are a plant part that is an important source of antioxidants. There are adverse health and environmental effects from the use of organic solvents in the extraction process. Green technology is a popular alternative extraction process due to it reduces health problems and is environmentally friendly. The purpose of this study was to develop a process for the extraction of quercetin from moringa leaf powder using a response surface method. Water and ethanol are the standard solvents used in the extraction process. Non-organic solvents used in this study were glycerin, polyethylene glycol 400, propylene glycol, and poloxamer 407. The extraction temperature (X_1), heating time (X_2), ethanol concentration (X_3), and sonication time (X_4) were chosen as causal factors (X_n) and the response variable (Y_n) was the quercetin yield in the extract in a gram of moringa leaf powder. The experimental condition was designed in 3 levels. The results indicated that the optimum condition for the aqueous extract was $X_1 = 40^\circ\text{C}$ and $X_2 = 60$ min, and the optimum conditions were $X_3 = 80\%$ and $X_4 = 60$ min for ethanol extraction. The desirability values were 0.9901 and 0.6595 for the aqueous and ethanol extract, respectively. Moreover, the accuracy and reliability were confirmed by the experiment. The quercetin extraction of polyethylene glycol 400 and poloxamer 407 was 1.14 and 1.19 times more than the water extract, respectively. These could be summarized that polyethylene glycol 400 and poloxamer 407 can be applied as alternative solvents.

Keywords: Moringa Oleifera, Quercetin, Extraction, Green Solvent, Antioxidant

บทนำ

มะรุม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Moringa oleifera* มะรุมเป็นพืชพื้นบ้านที่มีทั่วทุกภาคของประเทศไทย เป็นสมุนไพรไทยอีกหนึ่งชนิดที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยในการพัฒนาวิธีการสกัดสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์และฟีนอลิก (Nizioł-Lukaszewska et al., 2020) มะรุมเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารสำคัญจากธรรมชาติ ได้แก่ กลุ่มวิตามิน (Vitamin C, Vitamin E) กลุ่มพอลิฟีนอล (ฟลาโวนอยด์ เช่น myricetin, quercetin and kaempferol ฟีนอลิก เช่น hydroxybenzoic acid and hydroxycinnamic acid, chlorogenic acid, caffeic acids) กลุ่มอัลคาลอยด์ (*N*, α -l-rhamnopyranosyl vincosamide, phenylacetone nitrile pyrrole marumine, 4'-hydroxyphenylethanamide- α -l-rhamnopyranoside และอนุพันธ์ของ glucopyranosyl) แทนนิน และซาโปนิน (Vergara-Jimenez et al., 2017)

ใบมะรุมเป็นส่วนหนึ่งของพืชที่เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ (Pollini et al., 2020) เคอร์ซีติน (Quercetin) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับความสนใจ การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในกระบวนการสกัดมีผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม เทคโนโลยีสีเขียว (Green technology) เป็นกระบวนการสกัดทางเลือกที่ได้รับความนิยม เนื่องจากลดปัญหาด้านสุขภาพและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เช่น การใช้น้ำร้อน ตัวทำละลายร่วม ระบบเยิ้มเหลว (Eutectic solvent) รวมถึงกระบวนการสกัดทางกายภาพ เช่น คลื่นเสียงความถี่สูง คลื่นไมโครเวฟ หรือการใช้หลายเทคนิคพร้อมกัน (Combination method) (Hamany Djande et al., 2018) อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้ตัวทำละลายที่ไม่ใช่ตัวทำละลายอินทรีย์ในกระบวนการสกัดมีการศึกษาวิจัยน้อยและส่วนใหญ่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายร่วม (Silva et al., 2022)

สารสกัดมะรุมจากใบมะรุมสามารถถูกนำไปใช้ประโยชน์ทางเภสัชภัณฑ์ด้านต่าง ๆ เช่น การต่อต้านริ้วรอย (Anti-aging) ในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัดเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการต้านริ้วรอยในทางคลินิก แต่เริ่มมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ในหลอดทดลอง เช่น การต่อต้านเอนไซม์คอลลาเจนเนส (Anti-collagenase) ต้านเอนไซม์อีลาสเทส (Anti-elastase) และต้านเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (Anti-hyaluronidase) (Xu et al., 2022) ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ของสารสกัดมะรุมจำเป็นต้องสกัดสารสำคัญที่สนใจด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมหรือตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกัน (Like dissolves like) เคอร์ชิตินมีค่าการละลายน้ำเท่ากับ 4.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Bhagawan et al., 2017) หรือละลายน้ำได้ในช่วง 2.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 666 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิ 25 และ 140 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Srinivas et al., 2010) และค่าการละลายในเอทานอลเท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Mathiyalagan and Mandal, 2021) เพื่อพัฒนากระบวนการสกัดเคอร์ชิตินจากผงใบมะรุมให้ได้สารสำคัญในปริมาณสูง ผู้วิจัยเลือกใช้ใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลายมาตรฐานในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการสกัดเคอร์ชิตินจากผงใบมะรุม

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการสกัดเคอร์ชิตินจากผงใบมะรุมโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง ตัวทำละลายที่เลือกใช้คือน้ำและเอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายมาตรฐานสำหรับใช้ในกระบวนการสกัด ปัจจัยที่ต้องการศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (Temperature; X_1) ระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (Heating time; X_2) ความเข้มข้นของเอทานอล (Ethanol; X_3) ระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication time; X_4) โดยกำหนดให้เป็นตัวแปรต้น (X_n) และตัวแปรตอบสนอง (Y_n) คือ ปริมาณเคอร์ชิตินที่สกัดได้ โดยออกแบบทดลอง 4 ปัจจัย 3 ระดับ โดยแบ่งเป็นการศึกษาแยกกันอย่างเป็นอิสระระหว่างการใช้ใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลาย ร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการสกัด

วิธีการวิจัย

การออกแบบสภาวะสำหรับสกัดสารสำคัญจากผงใบมะรุมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง ตัวแปรต้น (Causal factors; X_n) ที่ต้องการศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (Temperature; X_1) ระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (Heating time; X_2) ความเข้มข้นของเอทานอล (Ethanol; X_3) ระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication time; X_4) ดังแสดงในตารางที่ 1 ตัวแปรตอบสนอง (Response variables; Y_n) ได้แก่ ปริมาณเคอร์ชิตินที่สกัดได้ (ไมโครกรัมต่อกรัมของผงใบมะรุม) กำหนดให้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ สภาวะที่สามารถสกัดปริมาณเคอร์ชิตินได้สูงที่สุด (Maximum) และมีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วงปกติ (In range)

ซึ่งผงใบมะรุม 1 กรัม ลงในหลอดทดลองแก้วขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำหรือเอทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ผงใบมะรุมเข้ากับตัวทำละลาย สกัดด้วยเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูงขนาด 80 เฮิร์ต ที่เวลา 60, 120 และ 180 นาที เปลี่ยนระบบน้ำทุก 60 นาที เพื่อควบคุมอุณหภูมิในกระบวนการสกัด (30 ± 2 องศาเซลเซียส) จากนั้นแยกสารสกัดและผงใบมะรุมด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที กรองด้วยหัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญเคอร์ชิตินในสารสกัดด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC)

การศึกษาคณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารสกัดผงใบมะรุม ได้แก่ ศึกษาลักษณะภายนอก สี โดยสังเกตด้วยตาเปล่า ศึกษาความเป็นกรดต่างของสารสกัดโดยเครื่อง pH meter (HORIBA รุ่น pH-33, HORIBA Advanced Techno, Co., Ltd., Japan)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญเคอร์ชิติน เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์ชิตินความเข้มข้นตั้งต้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมกราฟมาตรฐานช่วงความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สภาวะที่ใช้วิเคราะห์สารเคอร์ชิตินมีดังนี้ คอลัมน์ C18 (VetiSep™, GES C18 HPLC Column, Vertrical®, Thailand) ขนาดอนุภาคภายในคอลัมน์

5 มิลลิเมตร กว้าง 4.6 x 250 มิลลิเมตร ตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย acetonitrile และ acetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 2 ในอัตราส่วน 40 ต่อ 60 ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ปริมาณที่ฉีด 20 ไมโครลิตร ความยาวคลื่นที่ใช้ 370 นาโนเมตร เครื่องมือที่ใช้คือ HPLC (Thermo Scientific™ UltiMate 3000 UHPLC System, Waltham, MA USA)

ตารางที่ 1 กำหนดสภาวะการทดลองโดยใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลาย

สภาวะ	การสกัดด้วยน้ำ		การสกัดด้วยเอทานอล	
	อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (Temperature; X ₁) (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (Heating time; X ₂) (นาที)	ความเข้มข้นของเอทานอล (Ethanol; X ₃) (ร้อยละ)	ระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียง ความถี่สูง (Sonication time; X ₄) (นาที)
	1	40	60	50
2	40	120	50	120
3	40	180	50	180
4	60	60	65	60
5	60	120	65	120
6	60	180	65	180
7	80	60	80	60
8	80	120	80	120
9	80	180	80	180
10	60	60	65	60

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (DPPH assay) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผงใบมะรุ้ม โดยเตรียมสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน ความเข้มข้นร้อยละ 0.004 และ 0.02 ตามลำดับ โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย สร้างกราฟมาตรฐานช่วงความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH และตัวอย่างสารสกัดจากผงใบมะรุ้ม ในถาดหลุม 96 ช่อง (96-well plate) ปริมาตร 180 และ 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ เขย่า 1 นาที และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ที่ความยาว คลื่น 517 นาโนเมตร หลีกเลียงแสงสว่างตลอดการทดสอบ คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานเคอร์ซีติน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g QE/g}$) โดยคำนวณจากสมการที่ 1

$$\% \text{inhibition} = [(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100 \quad \text{สมการที่ 1}$$

โดย $\text{Abs}_{\text{control}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม และ $\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ

การทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำของสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งผงใบมะรุ้ม 1 กรัม เติมตัวทำละลายน้ำและเอทานอล 20 มิลลิลิตร สกัดสารสำคัญจากผงใบมะรุ้มที่สภาวะ $X_1 = 40$ องศาเซลเซียส, $X_2 = 60$ นาที, $X_3 =$ ร้อยละ 80, $X_4 = 60$ นาที ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญเคอร์ซีตินและเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทำนาย (Predicted value)

การสกัดสารสำคัญจากผงใบมะรุ่ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งผงใบมะรุ่ 1 กรัม ลงในหลอดทดลองแก้วขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่ไม่ใช่ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ได้แก่ กลีเซอริน (Glycerin), พอลิเอทิลีนไกลคอล 400 (Polyethylene Glycol 400; PEG 400), โพรพิลีนไกลคอล (Propylene Glycol; PG), พอล็อกซาเมอร์ 407 (Poloxamer 407; P407) ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เอทานอลร้อยละ 80 และตัวทำละลายควบคุม (Control) ได้แก่ น้ำ สกัดสารสำคัญจากผงใบมะรุ่โดยใช้เครื่องคลื่นเสียง ความถี่สูงขนาด 80 เฮิร์ต กำหนดให้ สภาวะที่เหมาะสมที่สุด (Optimal condition) 2 สภาวะ ดังนี้ (1) ควบคุมอุณหภูมิ ในกระบวนการสกัด (X_1) เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ในการสกัดด้วยความร้อน (X_2) เท่ากับ 60 นาที สำหรับสารสกัดน้ำ และ สารสกัดที่ไม่ใช่ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ และ (2) ความเข้มข้นของเอทานอล (X_3) ร้อยละ 80 ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (X_4) เท่ากับ 60 นาที โดยศึกษาผลของระยะเวลาในการสกัดที่ 60, 120 และ 180 นาที จากนั้น แยกสารสกัดและผงใบมะรุ่ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที กรองด้วยหัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญเคอร์ซินนินในสารสกัดด้วยเครื่อง HPLC

สถิติในการวิจัย ข้อมูลรายงานค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n = 3-5$) การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way Analysis Of Variance (ANOVA) ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ LSD ค่านัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 ($p \text{ value} < 0.05$)

ผลการวิจัย

การออกแบบสภาวะสำหรับสกัดสารสำคัญจากผงใบมะรุ่ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง พื้นผิวตอบสนองในภาพที่ 1ก แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (X_1) และระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (X_2) ต่อปัจจัยตอบสนองของ สารสกัดน้ำ พื้นผิวตอบสนองในภาพที่ 1ข แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอล (X_3) ระยะเวลาในการสกัด ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (X_4) ต่อปัจจัยตอบสนองของสารสกัดเอทานอล

พื้นผิวตอบสนองของความเป็นกรดต่างของสารสกัดในสภาวะต่าง ๆ มีค่าแตกต่างกันในตัวทำละลายเดียวกัน อุณหภูมิที่ใช้ ในการสกัด (X_1) และระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (X_2) เป็นตัวแปรต้นที่มีผลต่อความเป็นกรดต่างของสารสกัดน้ำ ความเข้มข้น ของเอทานอล (X_3) และระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (X_4) เป็นตัวแปรต้นที่มีผลต่อความเป็นกรดต่างของสารสกัด เอทานอล เมื่อพิจารณาพื้นผิวตอบสนองของสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลพบว่า สารสกัดน้ำมีความเป็นกรดมากกว่าสารสกัด เอทานอล เคอร์ซินนินมีความคงตัวที่ดีในสภาวะกรด ดังนั้น สารสกัดน้ำจึงมีแนวโน้มความคงตัวมากกว่าสารสกัดเอทานอล (Budipratiwi et al., 2021)

พื้นผิวตอบสนองของปริมาณเคอร์ซินนินที่สกัดได้ สารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลมีรูปแบบ (Pattern) พื้นผิวตอบสนอง ไม่แตกต่างกัน กล่าวคือปัจจัยด้านเวลา ได้แก่ ระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (X_2) และระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียง ความถี่สูง (X_4) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเคอร์ซินนินที่สกัดได้ อย่างไรก็ตาม ปัจจัยในกระบวนการสกัดทั้ง 4 ปัจจัย คืออุณหภูมิที่ใช้ ในการสกัด (X_1) และระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (X_2) เป็นตัวแปรต้นที่มีผลต่อปริมาณเคอร์ซินนินที่สกัดได้ของสารสกัดน้ำ และความเข้มข้นของเอทานอล (X_3) และระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (X_4) เป็นตัวแปรต้นที่มีผลต่อปริมาณเคอร์ซินนิน ที่สกัดได้ของสารสกัดเอทานอล จากพื้นผิวตอบสนองแสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาในการสกัดน้อยช่วยให้การสกัดเคอร์ซินนิน มีประสิทธิภาพมากขึ้น พื้นผิวตอบสนองของสารสกัดน้ำแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ได้อย่างชัดเจน เป็นอีกครั้งที่งานวิจัยนี้สนับสนุน ข้อมูลเกี่ยวกับตัวทำละลายมาตรฐาน (เอทานอล) ว่าเอทานอลร้อยละ 80 ช่วยให้การสกัดเคอร์ซินนินมีประสิทธิภาพมากที่สุด เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้าที่เลือกใช้เอทานอลร้อยละ 80 ในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากมะรุ่ (Sulastri et al., 2018)

พื้นผิวตอบสนองของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของทั้งสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลมีความสอดคล้องกับพื้นผิวตอบสนองของปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ ซึ่งเป็นความสัมพันธ์แบบเส้นตรง เนื่องจากเคอร์ซีตินมีฤทธิ์เฉพาะตัวเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

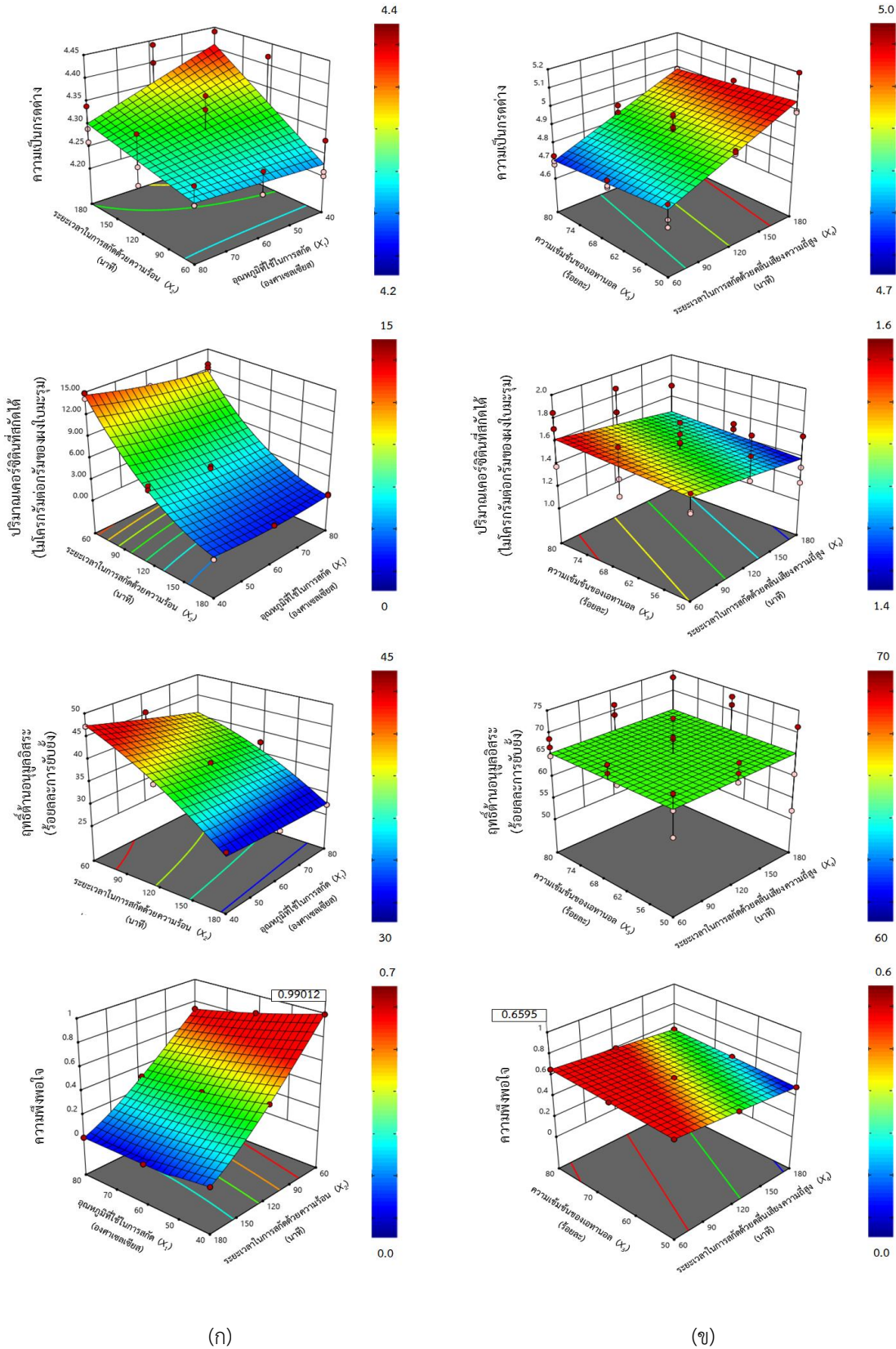
พื้นผิวตอบสนองของความพึงพอใจพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในสกัดเคอร์ซีตินได้ปริมาณสูงและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสำหรับสารสกัดน้ำคือ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (X_1) 40 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (X_2) 60 นาที และสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในสกัดเคอร์ซีตินได้ปริมาณสูงและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสำหรับสารสกัดเอทานอลคือ ความเข้มข้นของเอทานอล (X_3) ร้อยละ 80 และระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (X_4) 60 นาที โดยให้ค่าความพึงพอใจสำหรับสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลเท่ากับ 0.99012 และ 0.6595 ตามลำดับ ข้อกำหนดของแบบจำลองนัยสำคัญ

ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (p value) ของตัวแปรตอบสนองของการสกัดเคอร์ซีตินด้วยน้ำและเอทานอลแสดงในตารางที่ 2 พบว่า โมเดล (Model) ตัวแปรตอบสนองของความเป็นกรดต่าง ปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำ และโมเดลตัวแปรตอบสนองของความเป็นกรดต่างของสารสกัดเอทานอลมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) ในขณะที่ตัวแปรตอบสนองของปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำ และตัวแปรตอบสนองของสารสกัดเอทานอลมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) อยู่ในช่วง 0.8 ถึง 0.9 ซึ่งบ่งชี้ว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (X_1) ระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (X_2) ความเข้มข้นของเอทานอล (X_3) และระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (X_4) มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อตัวแปรตอบสนองของความเป็นกรดต่าง ปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเคอร์ซีตินจากผงใบมะขาม และเมื่อทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำของสภาวะที่เหมาะสมที่สุดดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าค่าจริง (Actual value) ร้อยละอคติ (% bias) และช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ได้จากการทดลอง ปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้มีค่าอคติที่มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 10 และอยู่ในช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงให้เห็นว่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทำนายด้วยโปรแกรม Design Expert[®] มีความแม่นยำ (Accuracy) และน่าเชื่อถือได้ (Reliability)

ตารางที่ 2 ข้อกำหนดของแบบจำลองนัยสำคัญ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (p value) ของตัวแปรตอบสนองของการสกัดสารเคอร์ซีตินด้วยน้ำและเอทานอล

Polynomial term	Water extraction						Ethanol extraction					
	pH		Quercetin extract		%inhibition		pH		Quercetin extract		%inhibition	
	Coefficient	p values	Coefficient	p values	Coefficient	p value	Coefficient	p values	Coefficient	p values	Coefficient	p values
Model	-	<0.0001*	-	<0.0001*	-	<0.0001*	-	<0.0001*	-	0.1957	-	-
Intercept	4.2963	-	4.1029	-	37.8324	-	4.8763	-	1.5055	-	65.5185	-
X_1 : temperature	0.06	<0.0001*	-6.3374	<0.0001*	-7.8716	<0.0001*	0.1439	<0.0001*	-0.0812	0.1014	-	-
X_2 : heating time	-0.0228	0.0557	-0.8288	<0.0001*	-1.9913	<0.0001*	-0.0294	0.0285*	0.0368	0.4488	-	-
X_1X_2	-0.0317	0.0315	0.5691	0.0005*	1.2023	0.0017*	-	-	-	-	-	-
X_1^2	-	-	2.4020	<0.0001*	-1.6388	0.0012*	-	-	-	-	-	-
X_2^2	-	-	0.4010	0.0401	0.1144	0.7990	-	-	-	-	-	-
R^2	0.5874	-	0.9927	-	0.9736	-	0.8316	-	0.1138	-	0.0000	-
Adjusted R^2	0.5398	-	0.9912	-	0.9681	-	0.8191	-	0.0482	-	0.0000	-
Predicted R^2	0.4781	-	0.9886	-	0.9596	-	0.7843	-	-0.1030	-	-0.0702	-
Adequate precision	10.4062	-	66.1918	-	37.5226	-	20.3156	-	3.6741	-	NA	-
Lack of fit	-	0.9785	-	0.0003*	-	<0.0001*	-	0.4142	-	0.7882	-	0.9483

* นัยสำคัญทางสถิติ

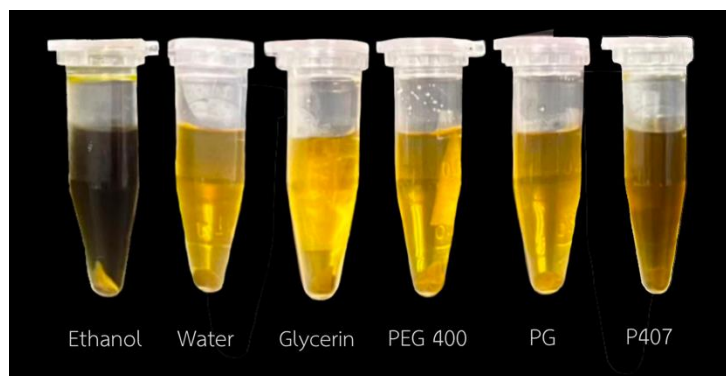


ภาพที่ 1 พื้นผิวตอบสนองของตัวแปรตอบสนอง (ก) การสกัดด้วยน้ำ และ (ข) การสกัดด้วยเอทานอล

ตารางที่ 3 ค่าทำนาย ค่าจริง ร้อยละอคติ และช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ร้อยละ ของสภาวะการสกัดสารเคอร์ซีตินด้วยน้ำ และเอทานอล

ตัวทำละลาย	สภาวะในการสกัด	ค่าทำนาย	ค่าจริง	ร้อยละอคติ	ช่วงเชื่อมั่นค่าล่าง	ช่วงเชื่อมั่นค่าบน
น้ำ	$X_1 = 40$ องศาเซลเซียส	14.64±0.48	14.64	0.43	0.00	14.12
	$X_2 = 60$ นาที					15.16
เอทานอล	$X_3 =$ ร้อยละ 80	1.62±0.20	1.65	0.24	1.81	1.46
	$X_4 = 60$ นาที					1.78

การทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำของสภาวะที่เหมาะสมที่สุดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ จากการทดลองสกัดเคอร์ซีตินจากผงใบมะรุมด้วยสารสกัดน้ำ ($X_1 = 40$ องศาเซลเซียส, $X_2 = 60$ นาที) และสารสกัดเอทานอล ($X_3 =$ ร้อยละ 80, $X_4 = 60$ นาที) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทำนาย ผลการทดลองในสภาวะจริง (Experimental condition) โดยสกัดเคอร์ซีตินจากผงใบมะรุมโดยใช้ตัวทำละลายชนิดไม่ใช่ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ กลีเซอริน พอลิเอทิลีนไกลคอล 400 โพรพิลีนไกลคอล พอล็อกซาเมอร์ 407 เปรียบเทียบกับตัวทำละลายมาตรฐาน ได้แก่ น้ำ และเอทานอลร้อยละ 80 เป็นตัวทำละลายควบคุม (Control) ผู้วิจัยคัดเลือกตัวทำละลายชนิดไม่ใช่ตัวทำละลายอินทรีย์ จากสารช่วยทางเภสัชกรรมที่มีการใช้โดยทั่วไป หาง่าย ราคาไม่แพง มีข้อมูลความปลอดภัย และมีข้อมูลคุณสมบัติพื้นฐานครบถ้วน จากผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารสกัดผงใบมะรุมที่สังเคราะห์ด้วยตาเปล่าแสดงในภาพที่ 2 ลักษณะภายนอกและสีของสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกันให้สีของสารสกัดจากผงใบมะรุมแตกต่างกัน เมื่อพิจารณาลักษณะภายนอกและสีของสารสกัดจากตัวทำละลายแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ที่เวลา 180 นาที อาจกล่าวได้ว่าปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ไม่สัมพันธ์กับสีและความเข้มข้นของสารสกัด แต่สีและความเข้มข้นของสารสกัดจะส่งผลต่อกรรมวิธีในการพัฒนาเภสัชภัณฑ์หรือเครื่องสำอางจากสารสกัดจากผงใบมะรุม ซึ่งเป็นทางเลือกสำหรับการพัฒนาเภสัชภัณฑ์จากสารสกัดเคอร์ซีตินจากผงใบมะรุมให้มีความสวยงามและน่าใช้



ภาพที่ 2 ลักษณะภายนอกของสารสกัดจากผงใบมะรุมในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

เมื่อพิจารณาคูณสมบัติความเป็นกรดต่างและปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้ในตารางที่ 4 พบว่า ความเป็นกรดต่างของตัวทำละลายเปล่าก่อนเริ่มการสกัด (0 นาที) มีความแตกต่างกันในแต่ละตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบในตัวทำละลายชนิดเดียวกัน สารสกัดเคอร์ซีตินจากผงใบมะรุมด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่เวลา 60, 120 และ 180 นาที พบว่า ความเป็นกรดต่างของตัวทำละลายเปล่าก่อนเริ่มการสกัดและตัวทำละลายหลังการสกัดที่เวลาต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากข้อมูลนี้อาจกล่าวได้ว่าปริมาณเคอร์ซีตินที่สกัดได้มีผลต่อความเป็นกรดต่างของสารสกัด

ตารางที่ 4 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารสกัดจากผงใบมะรุมในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ตัวทำละลาย	สีสารสกัด	ความเป็นกรดต่าง				ปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ที่เวลาต่าง ๆ (ไม่โครกรัมต่อกรัมของผงใบมะรุม)		
		0 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที
น้ำ (ตัวควบคุม)	สีเหลืองเข้ม	4.83±0.07	4.14±0.01	3.50±0.00	4.44±0.01	24.04±2.97	22.99±8.04	29.95±6.37
เอทานอล ร้อยละ 80	สีเขียวเข้ม	5.48±0.18	5.28±0.01	5.27±0.01	5.26±0.01	16.54±0.67	18.58±2.33	20.16±3.76*
กลีเซอริน	สีเหลือง	3.34±0.00	4.13±0.01	4.13±0.00	3.83±0.03	26.38±2.40	27.04±4.12	29.79±6.37
พอลิเอทิลีนไกลคอล 400	สีเหลืองเข้ม	1.74±0.10	3.21±0.01	4.12±0.01	3.47±0.01	26.21±1.34	29.17±1.91	34.16±3.66*
โพรพิลีนไกลคอล	สีเหลืองเข้ม	4.36±0.03	3.13±0.01	6.18±0.04	4.88±0.03	27.38±7.93	26.95±7.92	20.46±11.62
พอล็อกซาเมอร์ 407	สีเหลืองเข้ม	3.13±0.03	4.14±0.01	4.13±0.01	3.90±0.01	27.73±3.07	23.40±7.44	35.50±10.85***

* มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ที่เวลา 1 ชั่วโมง

** ปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้มากกว่าสารสกัดน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลาเดียวกัน

เมื่อพิจารณาปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ที่เวลาต่าง ๆ พบว่า ปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ที่เวลา 60 และ 120 นาที ไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ที่เวลา 60 และ 180 นาที ของตัวทำละลายเอทานอล พอลิเอทิลีนไกลคอล 400 และพอล็อกซาเมอร์ 407 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ที่เวลาเดียวกัน พบว่า ปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ของตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอลและพอล็อกซาเมอร์ 407 มากกว่าสารสกัดน้ำที่เวลา 60 และ 180 นาที ตามลำดับ ผู้วิจัยให้ข้อสังเกตว่าปริมาณเคอร์ซีดินที่สกัดได้ของสารสกัดเอทานอลร้อยละ 80 สกัดสารสำคัญได้น้อยกว่าสารสกัดน้ำ เนื่องจากเอทานอลร้อยละ 80 มีความดันไอ (Vapor pressure) สูงกว่าน้ำ อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการสกัดเคอร์ซีดิน แม้ว่าความดันไอของตัวทำละลายไม่ใช่ปัจจัยเดียวที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการสกัดสารสำคัญ แต่การลดความดันไอของตัวทำละลายเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งให้ประสิทธิภาพในการสกัดเพิ่มขึ้น (Yan et al., 2008) นอกจากนี้ สารสกัดน้ำมีความเป็นกรดมากกว่าสารสกัดเอทานอล ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อความคงตัวของเคอร์ซีดินที่แตกต่างกัน เนื่องจากเคอร์ซีดินคงตัวดีในสภาวะกรด (Budipratiwi et al., 2021) จากข้อมูลนี้เป็นประโยชน์สำหรับการใช้ตัวทำละลายทางเลือกที่ไม่ใช่ตัวทำละลายอินทรีย์ และสามารถสกัดเคอร์ซีดินจากผงใบมะรุมได้มากกว่าสารสกัดน้ำ ณ เวลาในการสกัด 180 นาที พอลิเอทิลีนไกลคอล 400 หรือ พอล็อกซาเมอร์ 407 สกัดเคอร์ซีดินจากผงใบมะรุมได้มากกว่าสารสกัดน้ำ 1.14 และ 1.19 เท่า ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่าไมเซลล์ของพอล็อกซาเมอร์ช่วยเพิ่มค่าการละลายของเคอร์ซีดินได้ (Casanova et al., 2021)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ผู้วิจัยและคณะประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีสกัดเคอร์ซีดินจากผงใบมะรุมโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จากการศึกษาพบว่า น้ำเป็นตัวทำละลายที่ปลอดภัยที่สุด แม้ว่าเคอร์ซีดินจะมีความสามารถในการละลายในน้ำได้น้อย แต่การประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารเคอร์ซีดินจากผงใบมะรุมได้ สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับน้ำในการสกัดเคอร์ซีดินจากผงใบมะรุมคือ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (X_1) 40 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการสกัดด้วยความร้อน (X_2) 60 นาที และสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในสกัดเคอร์ซีดินในสารสกัดเอทานอลคือ ความเข้มข้นของเอทานอล (X_3) ร้อยละ 80 และระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (X_4) 60 นาที ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษานี้ คือ ตัวทำละลายทางเลือกอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น กลีเซอริน พอลิเอทิลีนไกลคอล 400 โพรพิลีนไกลคอล พอล็อกซาเมอร์ 407 สามารถอ้างอิงเป็นตัวทำละลายในการสกัดเคอร์ซีดินจากผงใบมะรุมได้เช่นเดียวกับน้ำและเอทานอล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษาวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สป.อว.) ผ่านทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ปีงบประมาณ 2564 รหัสโครงการ RGNS 64-237 และทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุทยานวิทยาศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่อำนวยความสะดวกด้านสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Budipratiwi, W., Solihatus, S., Siswandono and Dwi, S. (2021). The effect of pH and cocystal quercetin-isonicotinamide on quercetin solubility and its thermodynamic. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 14(9), 4657-4661.
- Casanova, A. G., Prieto, M., Colino, C. I., Gutiérrez-Millán, C., Ruszkowska-Ciastek, B., de Paz, E., Martín, Á., Morales, A. I. and López-Hernández, F.J. (2021). A micellar formulation of quercetin prevents cisplatin nephrotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 729.
- Hamany Djande, C. Y., Piater, L. A., Steenkamp, P. A., Madala, N. E. and Dubery, I. A. (2018). Differential extraction of phytochemicals from the multipurpose tree, *Moringa oleifera*, using green extraction solvents. *South African Journal of Botany*, 115, 81-89.
- Mathiyalagan, S. and Mandal, B. K. (2021). Stability comparison of quercetin and its metal complexes and their biological activity. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(1), 7890-7902.
- Nizioł-Łukaszewska, Z., Furman-Toczek, D., Bujak, T., Wasilewski, T. and Hordyjewicz-Baran, Z. (2020). *Moringa oleifera* L. extracts as bioactive ingredients that increase safety of body wash cosmetics. *Dermatology Research and Practice*, 2020, 8197902.
- Pollini, L., Tringaniello, C., Ianni, F., Blasi, F., Manes, J. and Cossignani, L. (2020). Impact of ultrasound extraction parameters on the antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaves. *Antioxidants*, 9(4).
- Bhagawan, W. S., Atmaja, R. R. D. and Atiqah, S. N. (2017). Optimization and quercetin release test of Moringa leaf extract (*Moringa oleifera*) in gel-microemulsion preparation. *Journal of Islamic Pharmacy*, 2(2), 34-42.
- Silva, M. d., Trancoso, J., Tormen, L., Bombardelli, M. M., Corazza, M. L. and Bainy, E. M. (2022). Extraction of compounds from *Moringa oleifera* leaves using supercritical CO₂ plus ethanol as a cosolvent. *Journal of Food Process Engineering*, 45(3), e13979.
- Srinivas, K., King, J. W., Howard, L. R. and Monrad, J. K. (2010). Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dihydrate in subcritical water. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 208-218.
- Sulastri, E., Zubair, M., Anas, N., Abidin, S., Hardani, R., Yulianti, R. and A, A. (2018). Total phenolic, total flavonoid, quercetin content and antioxidant activity of standardized extract of *Moringa oleifera* leaf from regions with different elevation. *Pharmacognosy Journal*, 10, s104-s108.

- Vergara-Jimenez, M., Almatrafi, M. M. and Fernandez, M. L. (2017). Bioactive components in *Moringa oleifera* leaves protect against chronic disease. *Antioxidants (Basel)*, 6(4), 91.
- Xu, Y., Chen, G. and Guo, M. (2022). Potential anti-aging components from *Moringa oleifera* leaves explored by affinity ultrafiltration with multiple drug targets. *Frontiers in Nutrition*, 9, 854882.
- Yan, X., Yang, C., Ren, C. and Li, D. (2008). Importance of extracting solvent vapor pressure in headspace liquid-phase microextraction. *Journal of chromatography. A*, 1205, 182-185.