

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินในลูกขอมและผลมะขามป้อมและน้ำหมักของพืชทั้ง 2 ชนิด

**ผู้เขียน** นายชลยุทธ ระวีวรรณ

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

ผศ. ดร. ไชยวัฒน์ ไชยสุด	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. บุญสม เหลี้ยวเรืองรัตน์	กรรมการ
ผศ. ดร. สุนีย์ จันทรสภาว	กรรมการ

### บทคัดย่อ

ได้ประยุกต์ระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดรีเวิร์สเฟสสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบางชนิด (วิตามินซี วิตามินบี วิตามินอี และเบต้า-แคโรทีน) ในผลของลูกขอมและมะขามป้อมและน้ำหมักของพืชทั้ง 2 ชนิด โดยใช้ SPE C<sub>8</sub> cartridge แยกวิตามินที่ละลายน้ำได้ออกจากสารที่เราไม่ต้องการก่อนทำการฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการแยกวิตามินซีและวิตามินบี โดยใช้คอลัมน์ชนิด C<sub>18</sub> (Hyperclone<sup>®</sup> C<sub>18</sub>; 4.6 x 250 mm, 5µm) ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่แตกต่างกัน โดยใช้สารละลาย 2 เปอร์เซ็นต์ของกรดอะซิติก เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่สำหรับวิเคราะห์วิตามินซี ได้กราฟมาตรฐานวิตามินซี มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 5.0-800.0 และ 100.0-1000.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ( $r^2 > 0.999$ ) ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์วิตามินซีเท่ากับ 0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับ 1.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์การคืนกลับได้จากเดิมสารละลายมาตรฐานวิตามินซีลงในสารสกัดพืชทั้ง 2 ชนิดเท่ากับ  $100.37 \pm 0.51$  และ  $99.32 \pm 0.24$  ตามลำดับ

วิธีที่เสนอได้ประยุกต์ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในผลลูกขอและมะขามป้อม พบปริมาณวิตามินซีเฉลี่ยเท่ากับ 0.08 และ 0.21 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ และได้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในน้ำหมักลูกขอและมะขามป้อม ณ เวลาต่าง ๆ กัน วันที่ 0, 7, 15, 30, 45, 60, 90 วัน พบว่าวิตามินซีมีปริมาณลดลงและไม่สามารถวิเคราะห์ได้เมื่อวันที่ 90 ของการหมัก ปริมาณวิตามินซีในน้ำหมักลูกขอมีค่า 3.26 - 457.10 มิลลิกรัมต่อลิตร และในน้ำหมักลูกขอมีค่า 10.14 - 824.77 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของอะซีโทไนไตรล์ ต่อ 5 มิลลิโมล โซเดียม-1-ออกเทนซัลโฟเนต ปรับพีเอช เท่ากับ 2.5 ในอัตราส่วน 75:25 โดยปริมาตร ได้กราฟมาตรฐานสำหรับวิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินบี 3 และวิตามินบี 6 มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 10.0- 100.0, 10.0-100.0, 10.0-100.0 และ 0.50-50.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ความสัมพันธ์เชิงเส้น( $r^2$ ) มากกว่า 0.999 ค่าขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์หาวิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินบี 3 และวิตามินบี 6 เท่ากับ 0.50, 0.10, 2.00 และ 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ เท่ากับ 1.50, 0.50, 5.00 และ 0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยของวิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินบี 3 และวิตามินบี 6 ในผลลูกขอเท่ากับ  $100.08 \pm 0.27$ ,  $100.07 \pm 0.41$ ,  $99.71 \pm 0.27$  และ  $99.87 \pm 0.18$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมะขามป้อมเท่ากับ  $99.75 \pm 0.17$ ,  $100.03 \pm 0.64$ ,  $100.61 \pm 0.93$  และ  $99.18 \pm 1.41$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วิธีที่เสนอได้ประยุกต์ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบีในผลลูกขอและมะขามป้อม ในผลลูกขอพบปริมาณวิตามินบี 3 และวิตามินบี 6 เฉลี่ยเท่ากับ 0.99 และ 0.23 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และในมะขามป้อมพบปริมาณวิตามินบี 6 เท่ากับ 0.07 มิลลิกรัมต่อกรัม และได้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบีในน้ำหมักลูกขอและมะขามป้อม ณ เวลาต่าง ๆ กัน วันที่ 0, 7, 15, 30, 45, 60, 90 วัน พบว่าวิตามินบีมีปริมาณลดลงจนกระทั่งไม่สามารถวิเคราะห์ได้เมื่อวันที่ 60 ของการหมัก ปริมาณวิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินบี 3 และวิตามินบี 6 ในน้ำหมักลูกขอมีค่า 18.55-270.52, 10.39-69.22, 18.62-215.74 และ 1.77-13.14 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในน้ำหมักมะขามป้อมพบปริมาณวิตามินบี 2 วิตามินบี 3 และวิตามินบี 6 มีค่า 13.76-121.45, 67.34-897.02 และ 2.09 - 5.22 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การศึกษาความคงตัวของวิตามินในน้ำหมักลูกขอและมะขามป้อม สูตรที่มีค่าความเป็นกรดสูง (ค่าพีเอชต่ำ) จะมีผลต่อความคงตัวของวิตามินและทำให้การสลายตัวของวิตามินเกิดช้าลงในกระบวนการผลิตมีการเกิดผลพลอยได้ เช่น เอทานอล เมทานอล อะซีทัลดีไฮด์และไอโซโพรพานอล ซึ่งมีผลต่อการสลายตัวของวิตามินซี วิตามินบี1 วิตามินบี2 วิตามินบี3 และวิตามินบี6 เพราะ

วิตามินดังกล่าวมีความไวต่อสารละลายอินทรีย์ แสงและออกซิเจน ยังส่งผลต่อความคงตัวของวิตามินดังกล่าว

ได้ประยุกต์ระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดรีเวิร์สเฟสสำหรับหาปริมาณวิตามินอี และเบต้า-แคโรทีน ในผลของลูกยอและมะขามป้อมและน้ำหมักของพืชทั้ง 2 ชนิด ทำการแยกวิตามินอีและเบต้า-แคโรทีนโดยใช้คอลัมน์ชนิดซี 18 (Inersil® ODS-3; 4.6 x 250 mm, 5 $\mu$ m) โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมเอทานอล ต่อ เมทานอล โดยใช้ระบบ gradient อัตราส่วนเริ่มต้น 35:65 โดยปริมาตร ได้กราฟมาตรฐานสำหรับวิตามินอี และเบต้า-แคโรทีน มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.0-10.0 และ 1.0-10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธภาพความสัมพันธ์เชิงเส้น ( $r^2$ ) มากกว่า 0.999 ค่าขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์หาวิตามินอี และเบต้า-แคโรทีน เท่ากับ 0.01 และ 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับ 0.05 และ 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยของวิตามินอีและเบต้า-แคโรทีน ในผลลูกยอเท่ากับ  $100.20 \pm 1.58$  และ  $100.65 \pm 0.87$  เปอร์เซ็นต์และมะขามป้อมเท่ากับ  $100.15 \pm 1.31$  และ  $99.75 \pm 0.62$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วิธีที่เสนอได้ประยุกต์ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอีและเบต้า-แคโรทีน ในผลลูกยอและมะขามป้อม ในผลลูกยอพบปริมาณวิตามินอีและเบต้า-แคโรทีนเฉลี่ยเท่ากับ 0.31 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และในมะขามป้อมพบปริมาณวิตามินอีและเบต้า-แคโรทีนเฉลี่ยเท่ากับ เท่ากับ 0.04 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อกรัม วิธีที่นำเสนอนี้สามารถนำไปวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินที่เป็นองค์ประกอบของพืชสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ได้ วิธีที่เสนอมีความเที่ยงและความแม่นยำในเกณฑ์ที่ดี

**Thesis Title** Determination of Vitamins in Fruits of *Morinda citrifolia* Linn. and *Phyllanthus emblica* Linn. and Their Fermented Juices.

**Author** Mr. Chonlayut Raweewan

**Degree** Master of Science (Pharmaceutical Sciences)

**Thesis Advisory Committee**

Asst. Prof. Dr. Chaiyavat Chaiyasut	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Boonsom Liawruangrath	Member
Asst. Prof. Dr. Sunee Chansakaow	Member

**ABSTRACT**

The reverse phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) methods were described for the separation and determination of some vitamins (vitamins C, B, E and  $\beta$ -carotene) in *Morinda citrifolia* L. and *Phyllanthus emblica* L. fruits and their fermented juices. L-ascorbic acid (vitamin C) and vitamin B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> and B<sub>6</sub>) were isolated from the samples by means of a solid-phase extraction with C<sub>8</sub> AR cartridge for water-soluble vitamins. Vitamin C and vitamin B in fruits and fermented juices were separated on a Hyperclone<sup>®</sup> column C<sub>18</sub> (4.6 x 250 mm, 5 $\mu$ m) with UV detection at 210 nm and 280 nm, respectively using different mobile phases. The mobile phase system for analysis of vitamin C was 2% acetic acid. The calibration curves for vitamin C were linear over the ranges 5.0-800.0 and 100.0-1000.0  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> with  $r^2 > 0.999$ . A detection limit (S/N = 3) and quantitation limit (S/N = 10) of 0.50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> and 1.50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, respectively were obtained. The mean percentage recoveries of the spiked vitamin C in the two kinds of fruits extract were

found to be  $100.37 \pm 0.51$  and  $99.32 \pm 0.24\%$ , respectively. The proposed method has been applied to determination of vitamin C in *M. citrifolia* and *P. emblica* fruit with average contents of 0.08 and 0.21  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively. It was also applied to vitamin C determination in fermented juices of *M. citrifolia* and *P. emblica* after the 0<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 45<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> days of fermentation. It was found that the amounts of vitamin C decreased with increasing time and diminish to zero after the 90<sup>th</sup> day of fermentation. Vitamin C observed in fermented juices containing *M. citrifolia* and *P. emblica* were ranges 3.26 - 457.10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and 10.14 - 824.77  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively.

The mobile phase system for separation and determination of vitamins B was a mixture consisting of acetonitrile-5mM sodium-1-octanesulfonate (75:25, v/v) adjusted to pH 2.5 with acetic acid. The calibration curves for vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, vitamin B<sub>3</sub> and vitamin B<sub>6</sub> were linear over the ranges 10.0- 100.0, 10.0-100.0, 10.0-100.0 and 0.50-50.0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  with  $r^2 > 0.999$ . The detection limit of vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, vitamin B<sub>3</sub> and vitamin B<sub>6</sub> were 0.50, 0.10, 2.00 and 0.05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and limit of quantitation were 1.50, 0.50, 5.00 and 0.50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively. The mean percentage recoveries of the spiked vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, vitamin B<sub>3</sub> and vitamin B<sub>6</sub> in *M. citrifolia* fruit extracts were found to be  $100.08 \pm 0.27$ ,  $100.07 \pm 0.41$ ,  $99.71 \pm 0.27$  and  $99.87 \pm 0.18\%$ , respectively and in *P. emblica* fruit were found to be  $99.75 \pm 0.17$ ,  $100.03 \pm 0.64$ ,  $100.61 \pm 0.93$  and  $99.18 \pm 1.41\%$ , respectively. The proposed method has been applied to determination of vitamin B group in *M. citrifolia* and *P. emblica* fruit. It was found that vitamin B<sub>3</sub> and vitamin B<sub>6</sub> in *M. citrifolia* fruit were 0.99 and 0.23  $\text{mg.g}^{-1}$ , respectively and vitamin B<sub>6</sub> in *P. emblica* fruit was 0.07  $\text{mg.g}^{-1}$ . It was also applied to vitamin B group determination in fermented juices of *M. citrifolia* and *P. emblica* after the 0<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 45<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> days of fermentation. It was found that the amounts of vitamin B group decreased with increasing time and diminish to zero after the 60<sup>th</sup> day of fermentation. Vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, vitamin B<sub>3</sub> and vitamin B<sub>6</sub> observed in fermented juice containing *M. citrifolia* were ranges 18.55–270.52  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 10.39–69.22  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 18.62–215.74  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and 1.77–13.14  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively. Vitamin B<sub>2</sub>, vitamin B<sub>3</sub> and vitamin B<sub>6</sub> in fermented juices containing *P. emblica* were ranges 13.76–121.45  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 67.34–897.02  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and 2.09 - 5.22  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively.

The stability of fermented products were also studied. Formula with lower pH, degradation of vitamins less occurred than do the formula with higher pH. During fermentation some by-products were present (e.g. ethyl alcohol, methyl alcohol, acetaldehyde and iso-propanol). Therefore, produced organic solvents effected the stability of vitamin C, vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> and B<sub>6</sub> in product. Light and oxygen may also contribute to the stability of such vitamins.

A reverse phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method was applied to the determination of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) and  $\beta$ -carotene in *M. citrifolia* and *P. emblica* fruits and their fermented juices. The method was based on the separation of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) and  $\beta$ -carotene in fruit and fermented juices on an Inersil<sup>®</sup> ODS-3 column (4.6 x 250 mm, 5 $\mu$ m) with UV detection at 295 and 450 nm. The mobile phase system was a mixture consisting of ethanol-methanol (35:65, v/v) by gradient elution. The calibration curves for  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) and  $\beta$ -carotene were linear over the ranges 1.0-10.0 and 1.0-10.0  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> with  $r^2 > 0.999$ . The detection limit of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) and  $\beta$ -carotene were 0.01  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> and 0.01  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, respectively and limit of quantitative were 0.05 and 0.03  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, respectively. The mean percentage recoveries of the spiked  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) and  $\beta$ -carotene in *M. citrifolia* fruits extract were found to be  $100.20 \pm 1.58$  and  $100.65 \pm 0.87\%$ , respectively and in *P. emblica* fruit were found to be  $100.15 \pm 1.31$  and  $99.75 \pm 0.62\%$ , respectively. The proposed method has been applied to determination of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) and  $\beta$ -carotene in *M. citrifolia* fruit with average contents of 0.31 and 0.01  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, respectively and in *P. emblica* was found 0.04 and 0.03  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, respectively. It was also applied to  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) and  $\beta$ -carotene determinations in fermented juices of *M. citrifolia* and *P. emblica* after the 0<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 45<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> days of fermentation.  $\alpha$ -Tocopherol (vitamin E) and  $\beta$ -carotene in fermented juices were not found. The proposed RP-HPLC method was rapid, simple, very accurate and precise. The proposed method could be applied to the determination of multi-vitamin product from other medicinal plants.