Thesis Title Determination of Phenolic Compounds in Seaweed Samples by High Performance Liquid Chromatography

Author Miss Nataporn Wijit

Degree Master of Science (Chemistry)

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Mongkon Rayanakorn Chairperson
Asst. Prof. Dr. Sunanta Wangkarn Member

ABSTRACT

In this research, conditions of high performance liquid chromatography (HPLC) were optimized for the separation and simultaneous determination of some phenolic compounds, namely gallic acid, catechin, epicatechin, caffeic acid, rutin and quercetin.

In the first part of the study, brown seaweed sample was used as sample for the selection of a suitable solvent for extraction and for optimization of HPLC conditions for the separation of components in the seaweed extracts. It was found that methanol: water: hydrochloric acid (75:20:5 v/v) yielded higher extraction efficiency than methanol, methanol: water (75:25 v/v) and methanol: water: formic acid (75:20:5 v/v) in the extraction of phenolic compounds from the seaweed samples.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Optimization of the HPLC technique in this work was based on the investigation for the effects of detection wavelength, type and mobile phase composition, flow rate of the mobile phase, type and concentration of common acids, *i.e.* acetic acid and phosphoric acid, on resolution, analysis time, precision and accuracy of analysis. Six phenolic compounds were separated within 30 min, using an octadecylsilyl column in gradient elution system of acetonitrile and 0.1% acetic acid solution as the mobile phase with a flow rate of 0.6 ml min^{-1}. Injections were accomplished with a 20 μL fixed loop and the analysis was monitored at 275 nm. The detection limits of gallic acid, catechin, epicatechin, caffeic acid, rutin and quercetin were 0.04, 0.08, 0.08, 0.16, 0.02 and 0.10 ppm, respectively. The developed method offers the advantages of improvement in resolution, short analysis time and the use of less amount of common acids.

The method is applicable to simultaneous determination of phenolic compounds in seaweed samples. Among ten seaweed samples investigated, only four samples were found to contain phenolic compounds. For natural red seaweed sample, phenolic compounds were found to be gallic acid, epicatechin and quercetin in the concentration 488, 31 and 19 μg/g dry weight (DW), respectively. For commercial dry seaweeds, the concentrations of epicatechin and quercetin were found to be 2 and 9 μg/g DW, respectively. Concentrations of catechin, epicatechin, rutin and quercetin detected in natural green seaweeds were found to be 62, 4, 5 and 10 μg/g DW, respectively. In natural brown seaweeds, the concentrations of rutin and quercetin were found to be 18 and 19 μg/g DW, respectively. Phenolic compounds present in these samples were also successfully confirmed using electrospray ionization mass spectrometry.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างสาหร่ายทะเลโดยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ผู้เขียน นางสาว นทพร วิจิตร

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. มงคล รายะนาคร ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. สุนันทา วังกานต์ กรรมการ

บทคัดย่อ

ในการวิจัยนี้ได้ทำการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของ ลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (เอชพีแอลซี) สำหรับการแยกและการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกบางตัวคือ กรดแกลลิก คาเทชิน อีพิคาเทชิน กรดคาเฟอิก รูทิน และ เคอร์ซิทิน

ในการศึกษาเบื้องต้นสาหร่ายสีน้ำตาลถูกนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการหาตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการสกัดและสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการแยกสารสกัดของสาหร่ายด้วย เอชพีแอลซี พบว่าสารละลายของ เมทานอล: น้ำ: กรดไฮโดรคลอริก (75: 20:5 โดยปริมาตร) ให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดีกว่า เมทานอล เมทานอล: น้ำ (75: 25 โดยปริมาตร) และเมทานอล: น้ำ: กรดฟอร์มิก (75: 20: 5 โดยปริมาตร) ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากสาหร่าย

การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคเอชพีแอลซีในงานนี้ อาศัยการศึกษาถึงผลของความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจวัด ชนิดและอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ชนิดและความเข้มข้นของกรดที่ใช้ ได้แก่ กรดอะซิติก และกรดฟอสฟอริก ต่อค่าความสามารถในการแยกของสาร เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ ความแม่นยำ และความถูกต้องของการวิเคราะห์ พบว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารประกอบฟีนอลิกทั้ง 6 ชนิดสามารถแยกออกจากกันได้ภายในเวลา 30 นาที โดยใช้คอลัมน์ชนิดออกตะเดซิลซิลิล และเฟสเคลื่อนที่ในระบบเกรเดียนท์ซึ่งประกอบด้วยสารละลายผสมของ อะซิโตไนไทรล์ และน้ำที่มี 0.1% กรดอะซิติกเป็นเฟสเคลื่อนที่ ณ อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารที่ฉีด 20 ไมโครลิตร และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดของ กรดแกลลิก คาเทชิน อีพิคาเทชิน กรดคาเฟอิก รูทิน และ เคอร์ซิทิน มีค่า 0.04, 0.08, 0.08, 0.16, 0.02 และ 0.10 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ข้อดีของวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้คือ ค่าความสามารถในการแยกดีขึ้น ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย และการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีกรดเป็นส่วนผสมน้อย

วิธีการที่พัฒนาได้สามารถนำมาประยุกต์ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ในตัวอย่างสาหร่าย ในการวิเคราะห์โดยเทคนิคเอชพีแอลซีพบว่า ในตัวอย่างสาหร่ายธรรมชาติสีแดง สารประกอบฟีนอลิกที่ตรวจพบคือ กรดแกลลิก อีพิคาเทชิน และเคอร์ซิทิน ความเข้มข้น 488, 31 และ 19 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ สำหรับสาหร่ายแห้งสำหรับจำหน่าย พบอีพิคาเทชิน และเคอร์ซิทิน ความเข้มข้น 2 และ 9 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ คาเทชิน อีพิคาเทชิน รูทิน และเคอร์ซิทิน พบในสาหร่ายธรรมชาติสีเขียว ที่ความเข้มข้น 62, 4, 5 และ 10 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ สำหรับสาหร่ายธรรมชาติสีน้ำตาลพบ รูทิน และเคอร์ซิทิน ความเข้มข้น 18 และ 19 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ อีกทั้งยังได้ยืนยันผลที่พบสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างสาหร่าย โดยการใช้อิเล็กโทรสเปรย์ ไอออไนเซชัน แมสสเปกโทรเมทรี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved