

Received: 2 Mar 2021; Revised: 16 Mar 2021

Accepted: 23 Mar 2021

การหาปริมาณสารฟีนอลิกของว่านตะขอทอง Total phenolic content of wlantakhaotong

จตุพร แพงจักร¹ ญาดา วาฬิไล² นักรบ เจริญสุข³ กนกอร สมบัติ⁴ ปภาดา หอมจันทร์⁵
Jatuporn Pangjak¹, Yada Wapilai², Nukrob Charoensuk³, Kanokorn Sombat⁴, Paparda Homchan⁵

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกของว่านตะขอทอง ด้วยการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 % โดยการหมัก ด้วยวิธี Folin Ciocalteu Colorimetric ซึ่งใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดว่านตะขอทอง 0.0200 g มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 1.12 mg (คิดเป็นร้อยละ 1.12)

คำสำคัญ: สารฟีนอลิก

ABSTRACT

This study aimed to study total phenolic of content of wlantachaotong were determine by using Folin-Ciocalteu. Extract with 95 % ethanol by maceration method for 6 days. using gallic acid as standardizing agent. The results found that total phenolic content 1.12 mg (1.12 percentage)

KEYWORDS: total phenolic

¹ อาจารย์คณะสาธารณสุขศาสตร์ วิทยาลัยนอร์ทเทิร์น

บทนำ

ในปัจจุบันประเทศไทยมีการส่งเสริมให้ประชาชนใช้สมุนไพรในการสร้างเสริมสุขภาพ และมีการนำสมุนไพรไปบรรจุไว้ในบัญชียาหลักแห่งชาติ สำหรับสมุนไพรที่มีการใช้ 2 รูปแบบ แบบยาเดี่ยว คือการใช้สมุนไพรเดี่ยว ๆ และยาตำรับคือการใช้สมุนไพรตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป สมุนไพรส่วนมากมักได้มาจากพืช ซึ่งพืชสมุนไพรในประเทศไทยมีมากมาย ถูกนำมาพัฒนาผลิตเป็นยาสมุนไพรหลากหลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นแคปซูล สารสกัด ยา น้ำ เม็ด เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการวิจัยสารสำคัญในตัวยาสสมุนไพรรเพื่อเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา แต่ยังมีสมุนไพรอีกมากมายที่ยังไม่มีงานวิจัยรองรับเกี่ยวกับข้อมูลฤทธิ์ของสารสำคัญ นอกจากงานวิจัย สำหรับประเทศไทยมีการจัดทำโดยการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรนั้นต้องเริ่มต้นจากการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์ตามข้อกำหนดมาตรฐานของวัตถุดิบสมุนไพรที่ระบุไว้ใน Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) โดยจะทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ของเครื่องยา วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นปัจจัยสำคัญต่อการควบคุมคุณภาพสมุนไพรเพื่อให้ได้วัตถุดิบที่มีคุณภาพมาตรฐาน แต่สมุนไพรที่มีการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานใน THP มีเพียง 70 โมโนกราฟ ซึ่งขัดแย้งกับใช้สมุนไพรในการสร้างเสริมสุขภาพตามความเป็นจริง และยังมีสมุนไพรอีกมากมายที่มีการใช้มาเป็นเวลายาวนาน แต่ไม่มีข้อมูลอ้างอิงจากการวิจัย

สำหรับว่านตะขอทองเป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์เดียวกับขมิ้น มีลักษณะภายนอกทางกายภาพคล้าย ๆ กับขมิ้น ว่านตะขอทอง หรืออาจจะเรียกว่า ว่านร้อนทอง ว่านขอทอง เป็นพืชล้มลุก เหง้าใต้ดินมีลักษณะที่แตกออกคล้าย ๆ ลักษณะตะขอเป็นข้อ ๆ เนื้อในสีเหลือง สรรพคุณทางยาใช้ในการแก้พิษต่าง ๆ มักนิยมนำมาใช้ในทางเมตตามหานิยม สำหรับว่านตะขอทองยังไม่แน่ชัดว่าชื่อทางวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง หรือชื่อที่เรียกทั่วไปคืออะไร ซึ่งไม่สามารถอธิบายลักษณะที่เด่นชัดของว่านตะขอทองได้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อมาศึกษาวิจัยเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อหาปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลของว่านตะขอทอง
2. เพื่อหาปริมาณฟีนอลิกของว่านตะขอทอง

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิก (total phenolic) ที่สกัดด้วยเอทานอล (ethanol) ในว่านตะขอทอง

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

- | | |
|-----------------------------------|------------------------|
| 1. ว่านตะขอทอง | 8. ตู้อบ |
| 2. มีด | 9. 95 % Ethanol 100 ml |
| 3. เขียง | 10. Funnel |
| 4. ปีกเกอร์ (Breaker) | 11. สำลี |
| 5. เครื่องชั่ง | 12. ซ้อนแสดนเลส |
| 6. ถาดแสดนเลส | 13. Evaporating flask |
| 7. ขวดลูกชมพู่ (Erlenmeyer flask) | 14. Rotary evaporation |

วิธีการสกัดว่านตะขอทอง

ขั้นตอนในการทำ

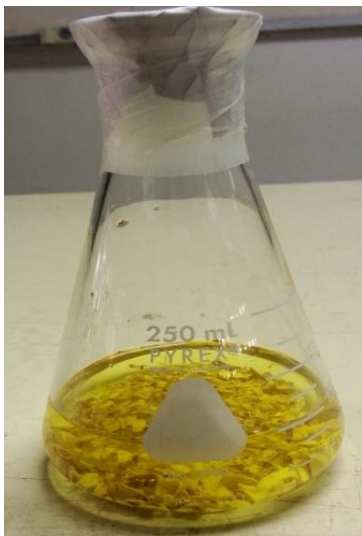
1. นำว่านตะขอทองมาล้างทำความสะอาด
2. นำมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปชั่งก่อนเข้าอบ (12.93 กรัม)
3. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศา เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที หลังอบ (3.74 กรัม)
4. นำไปหมักด้วย 95 % Ethanol 100 ml เป็นเวลา 6 วัน
5. นำสารสกัดมากรอง
6. นำมาระเหยแห้งเอา ethanol ออก ในเครื่อง Rotary evaporation



ชั่งก่อนเข้าตู้อบ



หลังจากออกจากตู้อบนำมาชั่ง



หมัก



กรองหลังจากหมัก



การระเหยแห้ง

การหาปริมาณ total phenolic content ว่านตะขอทอง

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. ว่านตะขอทองสกัด
2. Gallic acid
3. Folin – Ciocalteu reagent
4. 7 % sodium carbonates (Na_2CO_3)
5. 96 well plate
6. Microplate reader
7. Micropipette
8. Pipette tip
9. Eppendorf tube
10. breaker
11. Volumetric flask

วิธีการทดลอง

การเตรียม standard curve ของสารมาตรฐาน gallic acid

1. ชั่ง gallic acid 0.0050 g ละลายด้วยน้ำ 5 ml เป็น stock solution
2. เอาจาก stock solution มาเจือจางเป็น 7 ความเข้มข้น (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125)
3. จากนั้นดูดสารมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น 20 μ l ลง 96 well plate ความเข้มข้นละ 3 หลุม เติมสารละลาย Folin – Ciocalteu reagent 100 μ l และ 7 % sodium carbonates 80 μ l ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องและป้องกันแสง หลังจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 690 nm (Blank= น้ำกลั่น 20 μ l + Folin – Ciocalteu reagent 100 μ l และ 7 % sodium carbonates 80 μ l)
4. เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงนำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ (แกน x) และค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) แล้วหาสมการเส้นตรง

เตรียมสารสกัดว่านตะขอกทอง

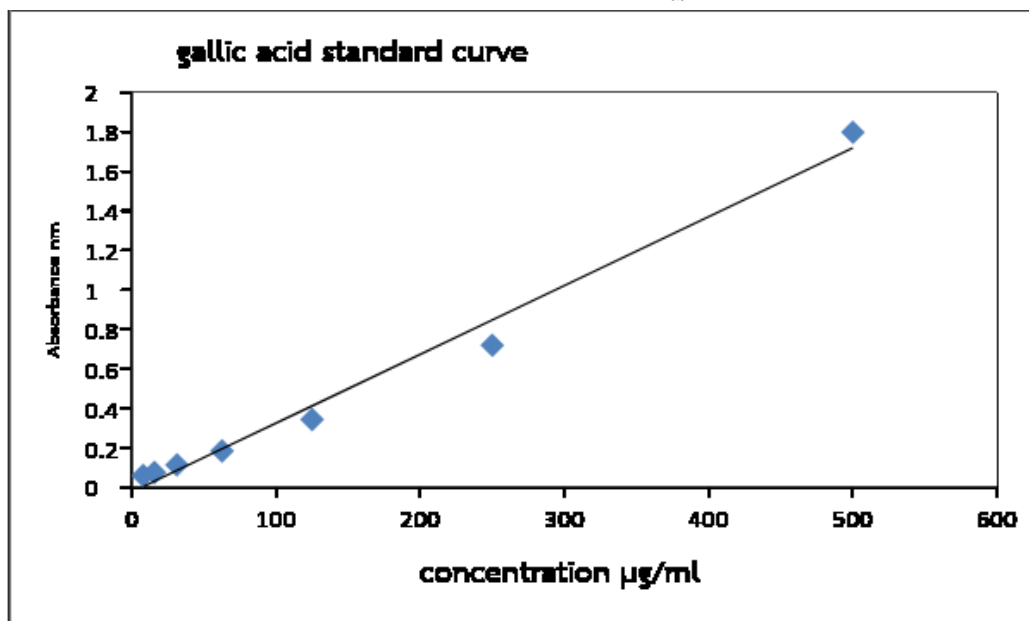
1. เจือจางสารสกัดว่านตะขอกทองเป็น 7 ความเข้มข้น (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000, 1/10000000)
2. ดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 20 μ l ลง 96 well plate ความเข้มข้นละ 3 หลุม เติมสารละลาย Folin – Ciocalteu reagent 100 μ l และ 7 % sodium carbonates 80 μ l ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องและป้องกันแสง หลังจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 690 nm (Blank= น้ำกลั่น 20 μ l + Folin – Ciocalteu reagent 100 μ l และ 7 % sodium carbonates 80 μ l)
3. หาค่าปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดที่มีในสารสกัดว่านตะขอกทอง โดยเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นว่าช่วงใดอยู่ในช่วงค่าการดูดกลืนแสงมาตรฐาน gallic acid ที่วัดได้ แล้วคำนวณค่าปริมาณฟีนอลิกในหน่วยมิลลิกรัมของ GAE (gallic acid equivalents)

สรุปผลการทดลอง

ตารางแสดงผลการทดลอง ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Gallic acid $\mu\text{g/ml}$							
	Blank	7.8125	15.625	31.25	62.5	125	250	500
A1	0.041	0.063	0.075	0.120	0.188	0.351	0.758	1.687
A2	0.042	0.058	0.075	0.111	0.181	0.362	0.68	1.823
A3	0.042	0.060	0.076	0.110	0.183	0.317	0.72	1.884
A เฉลี่ย	0.042	0.060	0.075	0.114	0.184	0.343	0.719	1.798
A เฉลี่ย - A Blank	0.000	0.018	0.033	0.072	0.142	0.301	0.677	1.756

กราฟแสดง standard curve ของสารมาตรฐาน Gallic acid



กราฟแสดงมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน (แกน x) และค่าการดูดกลืนแสง (แกน y)

ได้กราฟเส้นตรงที่มีสมการ $y = 0.003x - 0.023$ มีค่า $R^2 = 0.985$

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดว่านตะขอกทอง

ตารางแสดงผลการทดลอง ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดว่านตะขอกทองที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี serial dilution

		Serial dilution $\mu\text{g/ml}$						
	Blank	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000	1/1000000	1/10000000
A1	0.041	0.233	0.065	0.045	0.046	0.043	0.046	0.044
A2	0.042	0.244	0.063	0.043	0.04	0.04	0.05	0.043
A3	0.042	0.227	0.065	0.043	0.044	0.041	0.045	0.046
A เฉลี่ย	0.042	0.235	0.064	0.044	0.043	0.041	0.047	0.044
A เฉลี่ย- A Blank	0.000	0.193	0.022	0.002	0.001	0.001	0.005	0.002

การคำนวณปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดว่านตะขอกทองในรูป gallic acid equivalents

จากกราฟมาตรฐานได้สมการเส้นตรงคือ $y = 0.003x - 0.023$

เมื่อค่า y คือ ค่าการดูดกลืนแสง

เมื่อค่า x คือ ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)

เมื่อพิจารณาจากกราฟมาตรฐาน ใช้ความเข้มข้นที่ 1 เพราะค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.193 อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน

$$\text{แทนค่า } y = 0.193 \text{ ในสมการ } y - 0.023 = 0.003x$$

$$\text{จะได้ } (y - 0.023)/0.003 = x$$

$$X = (0.193 - 0.023)/0.003$$

$$X = 56.67 \mu\text{g/ml}$$

ที่ dilution 1/10 มีความเข้มข้นของ gallic acid $56.67 \mu\text{g/ml}$ ที่ dilution 1 มีความเข้มข้นของ gallic acid $560 \mu\text{g/ml}$ GAE หรือ 0.56 mg/ml

จะได้ว่า สารสกัดว่านตะขอกทอง 1 ml มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 0.56 mg

สารสกัดว่านตะขอกทองที่เตรียมมีปริมาตร 2 ml มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 1.12 mg

การคำนวณปริมาณสารฟีนอลิกสารสกัดว่านตะขอทองในรูปแบบ gallic acid equivalence

น้ำหนักสารที่เริ่มต้นซึ่งมา เท่ากับ 0.0200 g

สารสกัดว่านตะขอทอง 0.0200 g มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 1.12 mg

สรุปและวิจารณ์ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดว่านตะขอทอง

จากการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดว่านตะขอทองโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric ซึ่งใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐานพบว่าสารสกัดว่านตะขอทอง 0.0200 g มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 1.12 mg คิดเป็นร้อยละ 1.12

ข้อเสนอแนะ

ควรเก็บตัวอย่างงานวิจัยอย่างน้อย 6 แหล่ง เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและเปรียบเทียบ เพื่อให้ข้อมูลน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น และควรทำการศึกษาตั้งแต่เคมีกายภาพของเครื่องยา

เอกสารอ้างอิง

เกตุการ ดาจันทา, หทัยทิพย์ ร้องคำ, ทรงพรรณ สังข์ทรัพย์ และ เปรมนภา สีโสภา. (2562). ปริมาณสารประกอบฟีนอล ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของผักพื้นบ้านในจังหวัดพิษณุโลก. แก่นเกษตร 47 (ฉบับพิเศษ 1), 1541-1548.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2016). Thai Herbal Compendium on Physico-chemical Specifications Volume I. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, นงลักษณ์ เรืองวิเศษ. (2551). คุณภาพเครื่องยาไทย จากงานวิจัยสู่การพัฒนาอย่างยั่งยืน: กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์ คอนเซ็ปท์ เมดิซีน จำกัด.

ปิยพร พยัฆม. (2548). การควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพร. กองความคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา.

รัตนา อินทรานุกกรณ์. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร: กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2550

Department of Medical Sciences. (2016). Thai Herbal Pharmacopoeia 2016. Department of Medical Sciences

Wen, P., Hu, T. G., Linhardt, R.J., Liao, S.T., Wu, H. and Zou, Y.X. (2019). Mulberry: A review of bioactive compounds and advanced processing technology, Trends Food Sci. Technol. 83: 138-158.