

การหาปริมาณกรดยูโซลิกและสารต้านอนุมูลอิสระในเจก้วย

Determination ursolic acid and antioxidant in Grass jelly

(*Mesona procumbens* Hemsley.)

Danchai Kreungngern*, Anek Hale* and Boonyakrit Rattanapun*

บทคัดย่อ

กรดยูโซลิกเป็นสารที่มีประโยชน์ในการป้องกันหรือรักษาโรคเบาหวานสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดซึ่งเป็นผลดีต่อผู้ป่วยโรคเบาหวานป้องกันและรักษาการอักเสบของตับที่เกิดจากสารเคมี จากการวิเคราะห์กรดยูโซลิกในเจก้วยแห้งและผลิตภัณฑ์เจลจากเจก้วยที่ใช้วัตถุดิบจากประเทศอินโดนีเซีย และประเทศจีน พบว่าในเจก้วยแห้งจากประเทศอินโดนีเซียมีปริมาณกรดยูโซลิก 1,430 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อนำมาทำเป็นเจลเจก้วยมีปริมาณกรดยูโซลิก 2.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนเจก้วยแห้งจากประเทศจีนมีปริมาณกรดยูโซลิก 1,291 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและเมื่อนำมาทำเป็นเจลพบว่าจะมีปริมาณกรดยูโซลิก 1.99 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมนอกจากกรดยูโซลิกแล้วในเจก้วยยังมีสารประกอบที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอีกหลายชนิด เช่น กรดวานิลลิก กรดแคฟเฟอิก กรดไซรินจิก ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิดมะเร็ง สารต้านการอักเสบ และเป็นสารเพิ่มภูมิคุ้มกันและจากการวิเคราะห์ในเจก้วยแห้งจากประเทศจีนมีปริมาณกรดวานิลลิก กรดแคฟเฟอิก กรดไซรินจิก 12.18, 172.59 และ 8.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อทำเป็นเจลจะมีปริมาณเป็น 0.75, น้อยกว่า 0.02 และ 0.73 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนในเจก้วยแห้งจากประเทศอินโดนีเซีย มีปริมาณกรดวานิลลิก กรดแคฟเฟอิก กรดไซรินจิก 14.39, 453.91 และ 7.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และเมื่อทำเป็นเจลจะมีปริมาณ เท่ากับ 0.30, น้อยกว่า 0.02 และ 0.55 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

คำสำคัญ: เจก้วย, กรดยูโซลิก, กรดวานิลลิก, กรดแคฟเฟอิก, กรดไซรินจิก

Abstract

Ursolic acid, a substance that is useful in prevention and treatment of diabetes. It can reduce blood sugar levels, which would be beneficial for diabetic patients. It could also prevent and treat liver inflammation caused by chemicals. This experiment analyzed ursolic acid contents in dried and jelly products from a grass *Mesona procumbens* Hemsley. which used raw materials from Indonesian and China. It was found that dried grass from Indonesia contained 1,430 mg ursolic acid/kg and the jelly product made from this grass contained 2.28 mg ursolic acid/kg. While the dried grass from China contained 1,291 mg ursolic acid/kg and its grass jelly had 1.99 mg ursolic acid/kg. Beside ursolic acid, the grass also had other beneficial antioxidant compounds, e.g. vanillic acid, caffeic acid and syringic acid which can inhibit cancer reduce inflammatory and increase immunity. From analyses, dried grass from China had vanillic acid, caffeic acid and syringic acid contents of 12.18, 172.59 and 8.00 mg/kg, respectively, while the jelly made from this

Faculty of Science and Technology, Kamphaeng Phet Rajabhat University, Kamphaeng Phet 62000, Thailand

* Corresponding author. Tel./fax: +66 5570 6555 ext.1246 Mobile: +668 1595 2908

E-mail: danchai_fst@hotmail.com, nek_ha@hotmail.com, boykmitl@hotmail.com

grass contained 0.75, less than 0.02 and 0.73 mg/kg, respectively. Dried grass from Indonesian had vanillic acid, caffeic acid and syringic acid contents of 14.39, 453.91 and 7.57 mg/kg, respectively, while the jelly made from this grass contained 0.30, less than 0.02 and 0.55 mg/kg, respectively.

Keywords: *Mesona procumbens* Hemsley, ursolic acid, caffeic acid, vanillic acid, syringic acid

1. บทนำ

เจาก๊วยพร้อมดื่มเป็นเครื่องดื่มที่นิยมดื่มกันมากขึ้นโดยเฉพาะเวลาอากาศร้อน เนื่องจากใช้แก้กระหาย เย็นชุ่มคอ และรสชาติอร่อยในอดีตเจาก๊วยเป็นที่รู้จักเฉพาะในถิ่นคนจีน เช่น เขาวงกต ลำไย ต่อมาได้แพร่หลายมีผู้ทำขายกันอย่างกว้างขวางจนเป็นที่รู้จักของคนไทยทั่วประเทศ โดยการผลิตจะนำน้ำต้มเจาก๊วยมาผสมกับแป้ง เช่น มันสำปะหลัง แป้งท้าวยายม่อม จะเกิดเป็นเจลขึ้น เจาก๊วยที่รับประทานเป็นขนมหวานมี 2 ชนิด คือ ชนิดอ่อนที่มีลักษณะนุ่มเป็นเจล รับประทานโดยดักเป็นแผ่นใส่ถ้วยโรยน้ำตาลทราย นิยมรับประทานกันในหมู่ชาวจีนสูงอายุ และชนิดแข็งซึ่งมีความแข็งและความกรอบมากกว่า เวลารับประทานจะขูดเป็นเส้น หรือหั่นเป็นชิ้น ใส่ในน้ำเชื่อมและน้ำแข็ง นิยมรับประทานกันแพร่หลาย เจาก๊วยมีสรรพคุณทางยาซึ่งรับรองโดยกองวิจัยสมุนไพรแห่งชาติของกรุงปักกิ่งว่าสามารถใช้แก้ร้อนใน กระหายน้ำ ไข้หวัด ความดันโลหิตสูง กล้ามเนื้อข้อพับอักเสบ เบาหวาน และตับอักเสบ เป็นที่ยอมรับในวงการแพทย์จีนทั่วไป (ฤดีวรรณ, 2546) สรรพคุณของเจาก๊วยที่เป็นประโยชน์ในการป้องกันหรือการรักษาโรคเบาหวานมีรายงานการศึกษาพบว่าในต้นเจาก๊วยมี กรดยูโซลิก (ursolic acid) ซึ่งเป็นสารช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดซึ่งจะเป็นผลดีต่อผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Wang et al., 2010)

นอกจากนั้นกรดยูโซลิกยังมีประโยชน์อื่นๆ อีกคือสามารถเพิ่มระดับอินซูลินและลดระดับน้ำตาลในเลือดให้ปกติ (Jang et al., 2009) มีประสิทธิภาพในการป้องกันสารเคมีไม่ให้เกิดการอักเสบหรือทำลายตับในสัตว์ทดลองเป็นสารยับยั้งสารพิษและทำให้เกิดผลดีต่อระบบภูมิคุ้มกัน ลดอาการอักเสบ ด้านการเกิดเนื้องอก และลดระดับไขมันในเลือดได้ (Liu, 1995) มีความสามารถในการป้องกันและรักษาตับอักเสบที่เกิดจากแอลกอฮอล์ (Saravanan et al., 2006) นอกจากกรดยูโซลิกแล้วในเจาก๊วยยังพบกรดวานิลลิก (vanillic acid) กรดคาเฟอิก (caffeic acid) กรดไซรินจิก (syringic acid) ซึ่งเป็นกรดฟีนอลิกที่สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชัน และพบว่ากรดคาเฟอิกเป็นกรดฟีนอลิกที่สำคัญที่สุดในต้นเจาก๊วยเนื่องจากมีความสามารถในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้สูงสุด (Hung and Yen, 2002)

จากสารสำคัญที่มีในเจาก๊วยดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่ช่วยลดปริมาณน้ำตาลในเลือด คือ กรดยูโซลิก และกรดฟีนอลิกที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ กรดวานิลลิก กรดคาเฟอิก กรดไซรินจิก ในเจาก๊วยแห้งที่มีขายในจังหวัดกำแพงเพชร และเจลเจาก๊วยที่ผลิตขึ้นเอง เพื่อตรวจสอบปริมาณสารสำคัญดังกล่าว เพื่อจะได้ใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น และพัฒนาผลิตภัณฑ์เจาก๊วยต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 กลุ่มตัวอย่าง

การวิจัยครั้งนี้ใช้ตัวอย่าง ได้แก่ เจาก๊วยแห้ง 2 ชนิด คือ

1) เจาก๊วยแห้ง มีลักษณะเป็นต้นเจาก๊วยที่ตากแห้งทั้งต้น โดยมีแหล่งที่มาจาก

1.1) ประเทศจีนยี่ห้อไก่ดำ โดยซื้อจากตลาดศูนย์การค้า จังหวัดกำแพงเพชร

1.2) ประเทศอินโดนีเซีย จากโรงงานเจาก๊วยชากังราวจังหวัดกำแพงเพชร

2) เจลเจาก๊วยเตรียมโดยดัดแปลงจากวิธีการของฤติวรรณ (2546) มีวิธีการเตรียมดังนี้

ใช้ต้นเจาก๊วยแห้งทั้ง 2 แหล่ง มาล้างน้ำให้สะอาดเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมอื่นๆออก นำไปต้มในน้ำ โดยมีสัดส่วนเจาก๊วยแห้งต่อน้ำ 1:60 (น้ำซึ่งมีส่วนผสมของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.25) และเมื่อเคี่ยวเสร็จจะมีปริมาณน้ำที่เหลือในน้ำเจาก๊วยก่อนนำไปทำให้เกิดเจลมีประมาณร้อยละ 50 ของน้ำที่ใช้สกัดต้มด้วยไฟปานกลาง (80 องศาเซลเซียส) ใช้เวลาเคี่ยวประมาณ 5 ชั่วโมง หรือจนได้น้ำเจาก๊วยที่มีลักษณะเมือกกลื่น สีดำใสและเข้มข้น นวดต้นเจาก๊วยหลายๆ ครั้ง เพื่อให้เมือกกลื่นๆ หลุดออกจากต้นให้มากที่สุด และคั้นให้น้ำออกมามากที่สุดเพื่อจะได้มีความดำและความเหนียวมากๆ กรองซ้ำด้วยผ้าขาวบาง ตักใส่ภาชนะทิ้งไว้ให้เย็น จะได้น้ำเคี่ยวเจาก๊วยที่เหนียวเต็มเปี่ยมสำหรับแช่หลัง ร้อยละ 5 ของปริมาณน้ำเจาก๊วย ลงไปเมื่อต้มเจาก๊วยเสร็จแล้ว ทำได้โดยนำน้ำเจาก๊วยที่สกัดได้มาต้มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จึงเทแป้งมันที่ละลายน้ำลงไปกวนต่ออีกประมาณ 15 นาที จนขึ้นเงา แบ่งไม่เป็นลูกและไม่ติดพายนำมาเทใส่พิมพ์ทิ้งไว้ให้เย็นและนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดซูซิก

โดยดัดแปลงจากวิธีของ Wang et al. (2008) ดังนี้ซึ่งเจาก๊วยแห้ง 0.5 กรัม และเจลเจาก๊วย 10 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่เติมคลอโรฟอร์ม 30 มิลลิลิตรสกัดโดยใช้เครื่องอัลตราโซนิกที่พลังงาน 600 วัตต์เป็นเวลา 30 นาที นำมากรองด้วยกระดาษกรองเก็บของเหลวส่วนที่เป็นคลอโรฟอร์มไว้ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้คลอโรฟอร์มครั้งละ 10 มิลลิลิตรล้างตะกอนด้วยคลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตรเก็บสารละลายทั้งหมดไว้ในขวดกันกลมระเหยคลอโรฟอร์มออกโดยใช้เครื่องระเหยสูญญากาศเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ 10 มิลลิลิตร และระเหยออกโดยใช้เครื่องระเหยสูญญากาศเติมเมทานอล 5 มิลลิลิตรลงในขวดกันกลมกรองด้วยกระดาษกรองไนลอน (membrane filter; nylon) ขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Series 200 วิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยควบคุมด้วย Perkin Elmer Software Version 6.2.0 ทำการแยกโดย reverse-phase column urasil C18 (4.6mm x 150mm, 5 μ m) ใช้ mobile phase เป็น isocratic เมทานอล-กรดฟอสฟอริก-น้ำ ในสัดส่วน 88.0–0.05–11.95 โดยปริมาตรด้วยอัตรา 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดวานิลลิก กรดแคฟเฟอิก และกรดไซรินจิก

ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดวานิลลิก กรดแคฟเฟอิก และกรดไซรินจิกโดยดัดแปลงจากวิธีของ Lopez et al. (2011) ซึ่งเจกกัวแห้ง 0.1 กรัม เจลเจกกัว 1.0 กรัม ใส่ในหลอดทดลองเติมน้ำที่ปราศจากไอออน (deionize water) 2 มิลลิลิตรทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยเครื่องเขย่า (vortex) เป็นเวลา 1 นาที เขย่าด้วยเครื่องเขย่าในที่มืด และที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที นำตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 2000 g เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนที่ใสมาทำให้แห้งเติมน้ำที่ปราศจากไอออน 0.5 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองไนลอน 0.45 ไมครอนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น series 200 วิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร โดยควบคุมด้วย Perkin Elmer software Version 6.2.0 แยกโดย reverse-phase column urasil C18 (4.6mm x 150 mm, 5 μ m) ที่อุณหภูมิในการวิเคราะห์ 27 องศาเซลเซียส ใช้ mobile phase เป็น gradient เมื่อ Solvent A เป็นร้อยละ 0.1 Formic acid ในน้ำ และ solvent B เป็น methanol โดยใช้โปรแกรม gradient ดัง Table 1

Table 1 The gradient program in HPLC method for vanillic acid, caffeic acid, and syringic acid analysis.

Time(min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0 – 5	80	20
6 – 30	40	60
31 – 35	40	60
36 – 40	80	20

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี 2 sample T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบในเจกกัวที่มาจากแหล่งประเทศจีนและประเทศอินโดนีเซีย

2.4 การหาความจำเพาะในการวิเคราะห์ (Selectivity)

การหาความจำเพาะในการวิเคราะห์ เป็นการเปรียบเทียบ retention time พีคของสารมาตรฐานกับพีคของตัวอย่างว่ามีความตรงกัน โดยการใช้สารมาตรฐานกรดยูโซลิกวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC เพื่อหา retention time ของพีคสารมาตรฐานแล้วใช้สารตัวอย่างวิเคราะห์โดยใช้วิธีเดียวกันเพื่อหาพีคของกรดยูโซลิก ที่ retention time เดียวกันกับสารมาตรฐานโดยไม่มีพีคอื่นมารบกวนหรือรบกวนน้อยที่สุด แสดงความจำเพาะในการวิเคราะห์ ในทำนองเดียวกันกับการหาความจำเพาะของกรดแคฟเฟอิก กรดวานิลลิก และกรดไซรินจิก (ดัดแปลงจาก Lopez et al., 2011)

2.5 การหา Linearity ของการวิเคราะห์

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดยูโซลิก ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5–1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 50, 200, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC สร้างกราฟมาตรฐาน ทำการคัดเลือกช่วงกราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงมากที่สุด โดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) ของกราฟมาตรฐานเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก และค่าที่ใช้คือ correlation coefficient (r) มากที่สุดหรือ ค่า $r > 0.9982$ (ดัดแปลงจาก Lopez et al., 2011)

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแคฟเฟอิก กรดวานิลลิก และกรดไซรินจิก ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5–1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 50, 200, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC สร้างกราฟมาตรฐาน ทำการคัดเลือกช่วงกราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงมากที่สุด โดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) ของกราฟมาตรฐานเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก และค่าที่ใช้คือ correlation coefficient มากที่สุดหรือค่า $r > 0.9982$ (ดัดแปลงจาก Lopez et al., 2011)

2.6 การหาค่า LOD (Limit of Detection) และค่า LOQ (Limit of Quantification)

หาได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟของ signal-to-noise ของการวิเคราะห์ blank ของในช่วงที่เป็น retention time ของกรดยูโซลิก กรดแคฟเฟอิก กรดวานิลลิก และกรดไซรินจิก จำนวน 7 ซ้ำ นำค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานดังกล่าวมาคูณด้วย 3 และ 10 จะได้ค่า LOD (limit of detection) และค่า LOQ (limit of quantification) ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Lopez et al., 2011)

2.7 การหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision)

การหาค่าความถูกต้องทำได้โดยการหำร้อยละของการกลับคืน (%Recovery) ของการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างแล้วหาปริมาณที่พบเทียบเป็นร้อยละ ส่วนการหาค่าความแม่นยำหาได้จาก การวิเคราะห์สารมาตรฐานความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 5 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) (ดัดแปลงจาก Lopez et al., 2011)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การหาค่าความจำเพาะของสารประกอบที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ในเงากวีย

การหากรดยูโซลิก กรดแคฟเฟอิก กรดวานิลลิก และกรดไซรินจิกในเงากวียได้ค่า retention time และช่วงความยาวคลื่นที่วิเคราะห์ ดัง Table 2 การวิเคราะห์กรดทั้ง 4 ชนิดต้องใช้วิธีวิเคราะห์ที่แตกต่างกันเนื่องจากกรดยูโซลิกมีมวลโมเลกุล 456.70 กรัมต่อโมล แต่กรดแคฟเฟอิก กรดวานิลลิก และกรดไซรินจิก มีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 168.16 ถึง 198.17 กรัมต่อโมล ดังนั้นการวิเคราะห์จึงแบ่งเป็น 2 วิธีตามกลุ่มน้ำหนักโมเลกุลของสาร ส่วนความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดยูโซลิกใช้ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และกลุ่มของสารประกอบฟีนอลลิกคือ กรดวานิลลิก กรดแคฟเฟอิก และกรดไซรินจิกใช้

ความยาวคลื่นในการวิเคราะห์ที่ 270 นาโนเมตร โดยการแยกของสารประกอบในเจกัววียโดยใช้เครื่อง HPLC จะแสดงใน Fig. 1-2

Table 2 The chemical composition of Grass jelly separated with retention times and wavelength

Compounds	retention time (min)	Wavelength (nm)
Ursolic acid	15.67	210
Vanillic acid	10.85	270
Caffeic acid	11.61	270
Syringic acid	12.37	270

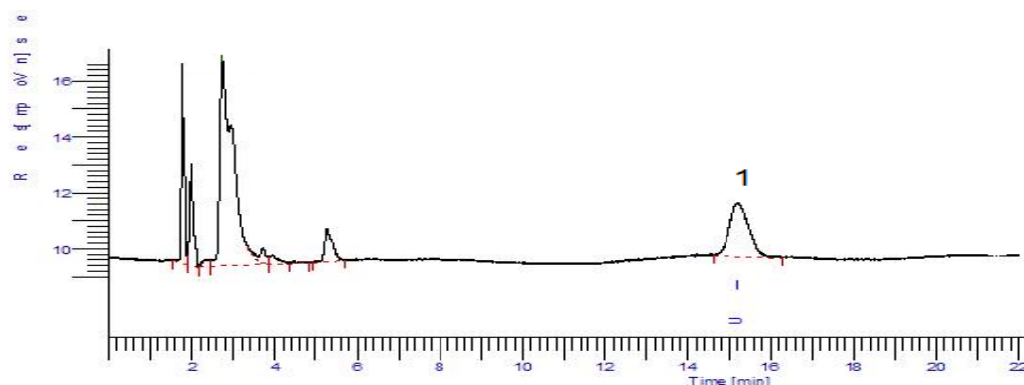


Fig.1 HPLC chromatogram in extracts of *Mesona procumbens* Hemsley.

210 nm: peak1 =ursolic acid

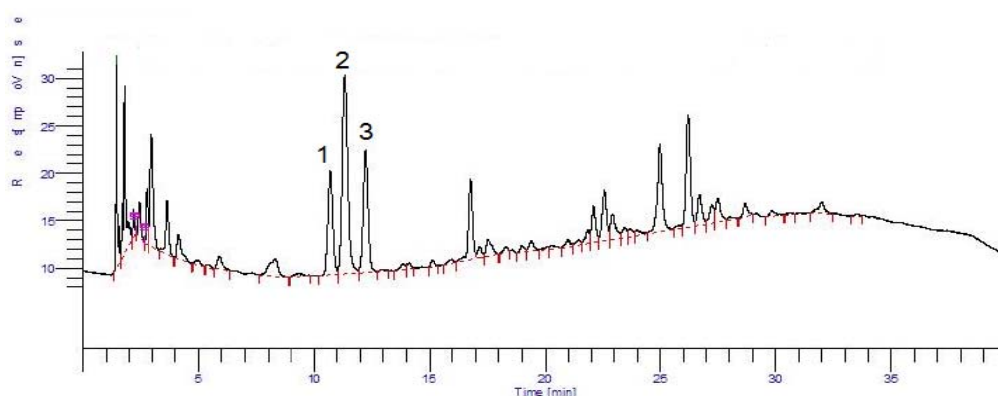


Fig. 2 HPLC chromatogram in extracts of *Mesona procumbens* Hemsley.

270 nm: peak 1 = Vanillic acid, peak 2 = Caffeic acid and peak 3 = Syringic acid

จากรูปที่ 1 ความจำเพาะของวิธีการวิเคราะห์กรดยูโซลิกวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC พบว่าที่ retention time ของพีคสารมาตรฐาน 15.67 นาที และใช้สารตัวอย่างวิเคราะห์โดยใช้วิธีเดียวกันเพื่อหาพีคของกรดยูโซลิก ที่ retention time เดียวกันกับสารมาตรฐานโดยไม่มีพีคอื่น ๆ มารบกวน แสดงความจำเพาะในการวิเคราะห์กรดยูโซลิก ในทำนองเดียวกันในรูปที่ 2 การหาความจำเพาะของกรดแคลเฟอิก กรดวานิลลิก และกรดไซรินจิกพบว่ากรดทั้งสามมี retention time 10.85, 11.61 และ 12.37 นาที ตามลำดับ พีคที่ได้แยกกันชัดเจน และไม่มีพีคอื่น ๆ มารบกวน แสดงความจำเพาะของการวิเคราะห์กรดแคลเฟอิก กรดวานิลลิก และกรดไซรินจิก

3.2 การหาช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity range) ของสารประกอบในเหงือกัว

การหาช่วงของการวิเคราะห์ของสารประกอบทั้ง 5 ชนิด จะหาได้จากค่า correlation coefficient (r) ที่ได้จากการสมการเส้นตรงโดยเลือกช่วงที่ได้ค่า r สูงสุดของความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานจำนวน 7 จุด ได้ผลดัง Table 3

Table 3 Linearity data, Regression equation and correlation coefficient (r) of compounds determination by HPLC

Compounds	Linearity range ($\mu\text{g/ml}$)	Regression equation	Correlation coefficient (r)
Ursolic acid	0.047-200	$y = 4205.8x - 3296.3$	0.9999
Vanillic acid	0.006-500	$y = 28265x + 1307.5$	0.9998
Caffeic acid	0.009-500	$y = 18810x + 15434$	0.9997
Syringic acid	0.006-500	$y = 28914x + 26384$	0.9998

จากตารางที่ 3 ช่วงการวิเคราะห์ สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และค่า correlation coefficient (r) ของกรดยูโซลิก กรดวานิลลิก กรดแคลเฟอิก และกรดไซรินจิก สามารถหาช่วงการวิเคราะห์โดยนำค่า LOQ เป็นค่าที่วิเคราะห์ได้ต่ำสุด ส่วนค่าสูงสุดในการวิเคราะห์หาได้จากการคัดเลือกจากกราฟมาตรฐานในสารประกอบแต่ละชนิด ซึ่งมีความเข้มข้นระหว่าง 5–1000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วใช้ช่วงการวิเคราะห์ที่มีค่า correlation coefficient (r) ของกราฟมาตรฐานเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก และค่าที่ใช้ คือ correlation coefficient มากที่สุดหรือ ค่า $r > 0.9982$ เป็นค่าสูงสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ดี

3.3 การหาค่าความถูกต้อง ค่าความแม่นยำ ค่า LOD (Limit of Detection) และค่า LOQ (Limit of Quantification) ของสารประกอบในเหงือกัว

การหาค่า LOD (limit of detection) และค่า LOQ (limit of quantification) ของการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบในเหงือกัว ได้ผลดังตารางที่ 4 กรดยูโซลิกมีค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) (ใช้วิธีการทดลองที่ดัดแปลงจาก Wang et al., 2008) เท่ากับ 97.70 ส่วนค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 16.37 ส่วนกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ กรดวานิลลิก กรดคาเฟอิก และกรดไฮดรินจิก มีค่าความถูกต้องเท่ากับ 93.55, 85.97 และ 86.99 ตามลำดับ ส่วนค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์กรดวานิลลิก กรดคาเฟอิก และกรดไฮดรินจิก มีค่าความแม่นยำเท่ากับ 9.26, 9.81 และ 16.67 ตามลำดับ ซึ่งจากการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่าการดูดซับโครมาโทกราฟีและกรดไฮดรินจิกมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) สูงกว่าสารประกอบอื่นๆ อาจจะมีสาเหตุจากการไม่เป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างเฉกาทัวกันที่ใช้ตัวอย่างทั้งต้นเฉกาทัว และขั้นตอนการสกัดสารประกอบดังกล่าวค่อนข้างยุ่งยากมากจึงอาจทำให้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์สูง แต่จากค่าที่ได้ก็พอจะเป็นที่ยอมรับได้เนื่องจากรายงานการศึกษาของ Wood (1999) ที่ระบุว่าค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการวิเคราะห์ที่มีความเข้มข้นส่วนในล้านส่วน (ppm) จะต้องไม่เกิน ร้อยละ 16

Table 4 Method validation data for the quantitative determination of compounds in extracts of *Mesona procumbens* Hemsley. by HPLC method

Compounds	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	RSD (%)
Ursolic acid	0.014	0.047	97.70	16.37
Vanillic acid	0.002	0.006	93.55	9.26
Caffeic acid	0.003	0.009	85.97	9.81
Syringic acid	0.002	0.006	86.99	16.67

3.4 ปริมาณสารสำคัญในเฉกาทัวและผลิตภัณฑ์

จากการนำเฉกาทัวแห้ง และเจลเฉกาทัวจากตัวอย่างเฉกาทัวจากประเทศจีนและประเทศอินโดนีเซีย มาวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ ได้ผลดังตารางที่ 5

จากการวิเคราะห์กรดดูดซับโครมาโทกราฟีในเฉกาทัวแห้งจากประเทศอินโดนีเซีย พบว่า มีปริมาณกรดดูดซับโครมาโทกราฟี 1430 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ร้อยละ 0.143 โดยน้ำหนัก) และหลังจากผ่านกระบวนการทำเป็นเจลแล้วจะทำให้กรดดูดซับโครมาโทกราฟีเหลืออยู่ 2.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ร้อยละ 0.0002 โดยน้ำหนัก) แสดงว่าการนำเฉกาทัวมาแปรรูปเป็นเจลเพื่อนำมารับประทานนั้นทำให้กรดดูดซับโครมาโทกราฟีที่มีอยู่ในเฉกาทัวมีปริมาณลดลงมากทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการมีวิธีการสกัดที่มีส่วนผสมของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ซึ่งมีสภาพเป็นด่างจึงสามารถสกัดเอมิเซลลูโลสออกจากต้นเฉกาทัวได้ แต่ไม่สามารถสกัดกรดดูดซับโครมาโทกราฟีซึ่งเป็นสารไม่มีขั้วที่ต้องใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจึงจะสามารถสกัดออกมาได้ ดังนั้นจึงทำให้เหลือปริมาณกรดดูดซับโครมาโทกราฟีน้อย และอาจเนื่องมาจากการเติมส่วนผสมของสารก่อเจล (แป้งมันสำปะหลัง) ทำให้ความเข้มข้นของกรดดูดซับโครมาโทกราฟีลดลงตามสัดส่วนแป้งมันสำปะหลังที่เติมลงไปตามสูตรของการทำเจลเฉกาทัวที่ดี จากการวิเคราะห์เฉกาทัวแห้งจากประเทศจีนมีปริมาณ 1,291 มิลลิกรัม

Table 5 The four main compounds in extracts of *Mesona procumbens* Hemsley.

Sample		Compounds (mg/kg)			
Type of sample	Source	Ursolic acid	Vanillic acid	Caffeic acid	Syringic acid
dry	China	1291±84 ^{ns}	12.18±4.00 ^{ns}	172.59±18.87 ^a	8.00±1.54 ^{ns}
	Indonesia	1430±5.5 ^{ns}	14.39±0.97 ^{ns}	453.91±40.95 ^b	7.57±0.98 ^{ns}
jell	China	1.99±0.03 ^a	0.75±0.15 ^a	< 0.01*	0.73±0.14 ^{ns}
	Indonesia	2.28±0.11 ^b	0.30±0.04 ^b	< 0.01*	0.55±0.02 ^{ns}

หมายเหตุ: - ^{a,b} Means followed by the different letters in each source within the same column are significantly difference ($p \leq 0.05$)

- ^{ns} Means in each treatment within the same column are not significantly difference ($p > 0.05$)

- * LOQ value with caffeic acid is 0.006 mg/L or 0.01 mg/kg Grass jelly

ต่อกลีกรัม (ร้อยละ 0.129 โดยน้ำหนัก) ไม่แตกต่างจากของประเทศอินโดนีเซีย ($p > 0.05$) และเมื่อนำมาทำเป็นเจลพบว่าจะมีปริมาณกรดยูซิลิกเหลืออยู่ 1.99 มิลลิกรัมต่อกลีกรัม (ร้อยละ 0.0002 โดยน้ำหนัก) จากการศึกษาของ Du et al. (2007) ที่วิเคราะห์หาปริมาณยูซิลิกในสมุนไพรชนิด *Fructus chaenomelis* (Mugua) ซึ่งเป็นสมุนไพรจากประเทศจีนที่ทำให้แห้งแล้วจากตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ เช่น Nanjing Bozhou และ Xuanzhou พบว่ามีปริมาณอยู่ในช่วง 5,000-7,000 มิลลิกรัมต่อกลีกรัม (ร้อยละ 0.5-0.7 โดยน้ำหนัก) และจากการศึกษาของ Anandjiwala et al. (2006) ปริมาณกรดยูซิลิกในใบกระเพราขาวมีปริมาณ 3,480-4,780 มิลลิกรัมต่อกลีกรัม (ร้อยละ 0.348-0.478 โดยน้ำหนัก) ปริมาณกรดยูซิลิกในกระเพราดำมีปริมาณ 2,520-2,640 มิลลิกรัมต่อกลีกรัม (ร้อยละ 0.252-0.264 โดยน้ำหนัก) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเจก๊วยแห้งที่ทำการวิเคราะห์ในครั้งนี้นี้นี้พบว่าจะมีปริมาณกรดยูซิลิกน้อยกว่าสมุนไพรชนิด *Fructus chaenomelis* (Mugua) จากประเทศจีนและใบกระเพราทั้งชนิดที่เป็นกระเพราขาวและกระเพราดำในประเทศอินเดียโดยปริมาณกรดยูซิลิกที่มีผลต่อร่างกายในการป้องกันและรักษา คือ ปริมาณกรดยูซิลิก 50 มิลลิกรัมต่อกลีกรัม (ร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก) จะมีผลต่อการรักษาระดับน้ำตาลในเลือด เพิ่มการไวต่อการทำงานของอินซูลินในการลดระดับปริมาณน้ำตาล และเพิ่มความทนทานต่อระดับปริมาณกลูโคสในเลือดที่ทำให้เกิดโรคเบาหวาน (Jang et al., 2009) กรดยูซิลิกที่ปริมาณ 20 มิลลิกรัมต่อกลีกรัม (ร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนัก) มีผลต่อน้ำหนักของผู้ป่วยโรคตับอักเสบที่เกิดจากพิษของแอลกอฮอล์มากขึ้น และทำให้อาการบาดเจ็บของตับของผู้ป่วยโรคตับอักเสบที่เกิดจากพิษของแอลกอฮอล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Saravanan et al., 2006) กรดยูซิลิกที่ปริมาณ 3,650 มิลลิกรัมต่อกลีกรัม (ร้อยละ 0.365 โดยน้ำหนัก: 8 มิลลิโมลต่อลิตร) มีผลต่อการรักษาโรคมะเร็งในตับ ทำให้ช่วยรักษามะเร็งตับได้ผลมากขึ้น (Yan et al., 2010) และพบว่าปริมาณกรดยูซิลิกเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกลีกรัม (ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก) มีผลทำให้ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (Wang et al., 2010)

จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่าความเข้มข้นที่สามารถวิเคราะห์ได้ในเนากัวยแห้งมีปริมาณ 1,290-1,430 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ร้อยละ 0.129-0.143 โดยน้ำหนัก) และเมื่อทำเป็นเจลจะมีปริมาณกรดยูโซลิกเหลืออยู่น้อยมาก 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ร้อยละ 0.0002 โดยน้ำหนัก) จึงอาจจะไม่สามารถเกิดประโยชน์ต่อร่างกายได้เพราะอย่างน้อยที่สุดจะต้องมีปริมาณกรดยูโซลิกมากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนัก) เช่น คนปกติมีน้ำหนัก 60 กิโลกรัมจะต้องกินอย่างน้อย 12 กรัม ถึงจะมีผลผู้ป่วยโรคตับอักเสบที่เกิดจากพิษของแอลกอฮอล์ ดังกล่าวข้างต้น (Saravanan et al., 2006)

การวิเคราะห์กรดวานิลลิกในเนากัวยแห้งจากประเทศจีน และประเทศอินโดนีเซีย พบว่า มีปริมาณกรดวานิลลิกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ที่ 12.18 และ 14.39 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และหลังจากผ่านกระบวนการทำเป็นเจลแล้วจะทำให้กรดวานิลลิก เหลืออยู่อย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$) ที่ 0.75 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ การวิเคราะห์กรดแคลเฟอิกในเนากัวยแห้งจากประเทศจีน และประเทศ อินโดนีเซีย พบว่า มีปริมาณกรดแคลเฟอิกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$) ที่ 172.59 และ 453.91 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และหลังจากผ่านกระบวนการทำเป็นเจลแล้วจะเหลือกรดแคลเฟอิกน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนการวิเคราะห์กรดไซรินจิกในเนากัวยแห้งจากประเทศจีน และประเทศ อินโดนีเซีย พบว่า มีปริมาณกรดไซรินจิกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ทั้งที่เป็นเนากัวยแห้งและเจลเนากัวยโดยเนากัวยแห้งพบปริมาณกรดไซรินจิก 8.00 และ 7.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และหลังจากผ่านกระบวนการทำเป็นเจลแล้วจะทำให้กรดไซรินจิก เหลืออยู่ 0.73 และ 0.55 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

ดังนั้นการนำเนากัวยมาแปรรูปเป็นเจลเพื่อนำมารับประทานนั้นทำให้กรดยูโซลิก กรดวานิลลิก กรดแคลเฟอิก กรดไซรินจิกที่มีอยู่ในเนากัวยมีปริมาณลดลงทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการวิธีการสกัดที่ไม่เหมาะสม เช่น ตัวทำละลาย สภาพความเป็นกรด-ด่าง ระยะเวลา อุณหภูมิ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุทำให้ไม่สามารถสกัดกรดที่มีประโยชน์ดังกล่าวในเนากัวยออกมาได้หมด

4. สรุป

เนากัวยแห้งจากประเทศอินโดนีเซียมีปริมาณกรดยูโซลิก กรดวานิลลิก กรดแคลเฟอิก และกรดไซรินจิก 1,430, 14.39, 453.91 และ 7.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อนำมาทำเป็นเจลเนากัวยมีปริมาณเหลืออยู่ 2.28, 0.30, น้อยกว่า 0.02 และ 0.55 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนเนากัวยแห้งจากประเทศจีนมีปริมาณกรดยูโซลิก กรดวานิลลิก กรดแคลเฟอิก กรดไซรินจิก เท่ากับ 1,291, 12.18, 172.59 และ 8.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับและเมื่อนำมาทำเป็นเจลพบว่าจะมีปริมาณกรดเหลืออยู่ 1.99, 0.75, น้อยกว่า 0.02 และ 0.73 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

ผลของการวิเคราะห์ปริมาณกรดยูโซลิก กรดแคลเฟอิก กรดวานิลลิก กรดไซรินจิก ที่มีในเนากัวยแห้งพบว่าในเนากัวยแห้งมีสารประกอบที่มีประโยชน์ดังกล่าวในปริมาณที่ค่อนข้างสูง แต่เมื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำเจลเนากัวยเพื่อนำมารับประทานในรูปของเนากัวยพร้อมดื่มเจลเนากัวยที่ได้จะมีปริมาณสารประกอบที่มีประโยชน์ดังกล่าวในปริมาณน้อย ซึ่งก็ไม่ได้หมายความว่าเจลเนากัวยนั้นไม่มีประโยชน์ในการบริโภค แต่จะมีประโยชน์อื่นๆ เช่น ให้พลังงาน ให้ความอร่อย ใช้เป็นยาอาหาร เป็น

ต้น แต่หากในอนาคตมีการศึกษาวิจัยที่การทำเจลเจกัวให้มีสารประกอบที่มีประโยชน์เหล่านี้มากขึ้นจนมีปริมาณเพียงพอที่จะทำให้เกิดประโยชน์กับร่างกาย ทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากสารสำคัญเหล่านั้นได้มากขึ้น ซึ่งรูปแบบการนำไปใช้อาจจะเป็นในรูปแบบที่เป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่ต้องระบุให้ชัดเจนกรณีที่ผู้บริโภคจะนำไปบริโภคเพื่อให้เกิดประโยชน์กับร่างกายอย่างจริงจังได้

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่าสารสำคัญที่มีอยู่ในเจกัวจะมีมากในกรณีที่เป็เจกัวแห้งซึ่งเป็นวัตถุดิบแต่เมื่อทำการแปรรูปเป็นเจลเจกัวแล้วจะทำให้สารสำคัญที่มีอยู่ในเจกัวลดลง ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรศึกษากรรมวิธีการแปรรูปเจลเจกัวที่สามารถรักษาปริมาณสารสำคัญต่างๆ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณสารที่เป็นประโยชน์เหลือมากที่สุดอีกทั้งควรเพิ่มชนิดของการวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบสำคัญในพืชที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่น ในกลุ่มของกรดยูโซลิกควรเพิ่มการวิเคราะห์กรดโอลีนโนลิก ส่วนในกลุ่มของฟีนอลิก ควรเพิ่มกรดแกลลิก กรดเอลลาจิก เป็นต้น และศึกษาแนวทางวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์ที่มีสารที่มีประโยชน์เหลือมากที่สุดเพื่อให้สามารถพัฒนาไปสู่อุตสาหกรรมได้ และเพื่อเพิ่มความสมบูรณ์ของการวิจัยให้มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- ฤดีวรรณ ตั้งประดิษฐ์. 2546.การศึกษาสารประกอบหลักในน้ำสกัดจากต้นเจกัวเพื่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Anandjiwala, S., Kalola, J. and Kalola, J. 2006. Quantification of eugenol, luteolin, ursolic acid and oleanolic acid in black and green varieties of *ocimum sanctum* linn, using high-performance thin-layer chromatography. *Journal of AOAC International*. 89: 1467-1474.
- Du, S., Chen, L., Ma, K. and Ji, H. 2006. Qualitative and quantitative analysis of Chinese herb *Fructus chaenomelis*. *Journal of Nanjing Medical University*. 21(1): 51-54.
- Hang C-Y. and Yen G-C. 2002. Antioxidant activity of phenolic compounds isolation from *mesona procumbens* hemsl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 2993-2997.
- Jang, S.M., Yee, S.T., Choi, J., Choi, M.S., Do, G.M., Jeon, S.M., Yeo, J., Kim, M.J., Seo, K.I. and Lee, M.K. 2009. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic beta-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. *International Immunopharmacology*. 9: 113-119.
- Liu, J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. 49: 57-68.
- Lopez, A., Rico, M., Rivero, A. and Tangil, M.S. 2011. The effect of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*. 125: 1104-1109.

- Saravanan, R., Viswanathan, P. and Pugalandi, K.V. 2006. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. *Life Sciences*. 78: 713-718.
- Wang, H., Wang, Z. and Guo, W. 2008. Comparative determination of ursolic acid and oleanolic acid of *Macrocarpium officalis* (Sieb. et Zucc.) Nakai by RP-HPLC. *Industrial Crops and Products*. 28: 328-332.
- Wang, Z., Hsu, C., Huang, C. and Yin, M. 2010. Anti-glycative effects of oleanolic and ursolic acid in kidney of diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*. 628: 255-260.
- Wood, R. 1999. How to validate analytical method. *Trends in Analytical Chemistry*. 18:624-632.
- Yan, S., Huang, C., Wu, S. and Yin, M. 2010. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer lines. *Toxicology in Vitro*. 24(3): 842-848.