

การศึกษาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในส่วนต่างๆ ของถั่วดาวอินคา
Qualitative and Quantitative Analysis and Types of Phenolic Compounds
in Various Parts of *Plukenetia volubilis* Linn.

บุษบาวดี พุทธานู นิรมล ศรีชนะ และสุวัชชัย มิสุนา*

Bussabavadee Puttanu, Niramol Srichana and Suwatchai Misuna*

สาขาวิชาเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย จังหวัดเลย 42000 ประเทศไทย
Chemistry program, Department of Science, Faculty of Science and Technology, Loei Rajabhat University,
Loei, 42000, Thailand

*E-mail: suwatchai.mis@lru.ac.th

Received: 25 Mar 20

Revised: 01 Nov 20

Accepted: 12 Nov 20

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณและชนิดของกรดฟีนอลิกในส่วนของ ใบอ่อน ใบแก่ ใบชาของถั่วดาวอินคา เปลือกหุ้มเมล็ดและเมล็ด โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี ผลการทดลองพบว่า ใบแก่จากถั่วดาวอินคา มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ให้ค่าเท่ากับ 190.25 ± 3.31 mg GAE/100g (น้ำหนักแห้ง) และพบน้อยที่สุดในส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ด ถั่วดาวอินคา เมื่อนำใบแก่จากถั่วดาวอินคามาลดเป็นใบชาพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้น เท่ากับ 296.09 ± 6.64 mg GAE/100g (น้ำหนักแห้ง) การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลิกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดฟีนอลิก 5 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก กรดไซรินจิก กรดเฟอร์รูลิก กรดพาราคูมาริก และกรดวานิลลิก พบว่ามีกรดแกลลิกและกรดวานิลลิกมากที่สุดในใบชาของถั่วดาวอินคา เท่ากับ 127.08 ± 4.96 และ 141.00 ± 2.40 $\mu\text{g}/100$ g (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ กรดไซรินจิกและกรดเฟอร์รูลิกพบมากที่สุดในใบแก่ เท่ากับ 35.14 ± 3.70 และ $1,143.03 \pm 3.17$ $\mu\text{g}/100$ g (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ และกรดพาราคูมาริกพบมากที่สุดในใบอ่อน มีค่าเท่ากับ 213.56 ± 14.30 $\mu\text{g}/100$ g (น้ำหนักแห้ง)

คำสำคัญ : ถั่วดาวอินคา สารประกอบฟีนอลิก กรดฟีนอลิก ชา โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Abstract

This study aimed to determine total phenolic compounds in various parts of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* Linn.) plants such as leaflet, mature leaves, tea from Sacha Inchi leaves, nutshell and seeds by the spectrophotometric method. The results showed that the highest of total phenolic content in mature leaves was 190.25 ± 3.31 mgGAE/100 g of a dry sample. Whereas a nutshell had the lowest total phenolic content. The highest total phenolic content was found in tea from Sacha Inchi leaves (296.09 ± 6.64 mg GAE/100 g of a dry sample). Types and content of phenolic acids were analyzed by High-Performance Liquid Chromatography technique comparing with phenolic acids standards, gallic acid, vanillic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid and ferulic acid. Tea from Sacha Inchi leaves showed the most significant of gallic acid and vanillic acid of 127.08 ± 4.96 and 141.00 ± 2.40 $\mu\text{g}/100$ g of a dry sample, respectively. In comparison, the mature leaves of Sacha Inchi exhibited the most significant syringic acid and ferulic acid of 35.14 ± 3.70 and $1,143.03 \pm 3.17$ $\mu\text{g}/100$ g of a dry sample, respectively. Finally, the highest of *p*-coumaric acid was found in the leaflet of Sacha Inchi (213.56 ± 14.30 $\mu\text{g}/100$ g of a dry sample).

Keywords: *Plukenetia volubilis* Linn., Phenolic compounds, Phenolic acids, Tea, High Performance Liquid Chromatography

1. บทนำ

ถั่วอินคา (*Plukenetia volubilis* Linn.) หรือที่นิยมเรียกกันว่าถั่วดาวอินคาเพราะรูปร่างลักษณะผลมีแฉกคล้ายดาว ถั่วดาวอินคาสามารถปลูกได้ง่ายบนสภาพอากาศแล้ง เหมาะกับสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยและได้ผลผลิตต่อไร่สูง [1] ปัจจุบันมีการนำถั่วดาวอินคามาใช้ประโยชน์หลากหลาย เช่น เมล็ดนำมาสกัดน้ำมันหรือน้ำมันเมล็ดมารับประทานเป็นอาหารคาวเคี้ยว ใบของถั่วดาวอินคาใช้ปรุงอาหารและบริโภคได้ เป็นต้น เมล็ดถั่วดาวอินคาที่มีปริมาณน้ำมันสูงมากกว่า 50% น้ำมันสกัดได้ง่ายโดยไม่ต้องใช้การกลั่น มีกรดไขมันที่จำเป็น (84%) [2] น้ำมันเมล็ดถั่วดาวอินคา มีสารต้านอนุมูลอิสระ มีกรดไขมันโอเมก้า 3, 6 และ 9 เป็นองค์ประกอบ ถั่วดาวอินคาสามารถนำเมล็ดมารับประทานได้คล้ายถั่วชนิดต่าง ๆ และยังมีวิตามินเอ วิตามินอี มีโปรตีนสูง ช่วยลดความเสี่ยงโรคหัวใจ ป้องกันโรคอัลไซเมอร์ ลดอาการซึมเศร้านอนไม่หลับ ไมเกรน ป้องกันและยับยั้งเซลล์มะเร็ง ช่วยลดคอเรสเตอรอลที่ไม่ดี ช่วยลดไตรกลีเซอไรด์ สามารถป้องกันโรคหัวใจและกลุ่มโรคหลอดเลือดตีบตันได้ [2] น้ำมันถั่วดาวอินคาเป็นน้ำมันที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ในปี ค.ศ. 2007 น้ำมันถั่วดาวอินคาได้รับรางวัลเหรียญทองจาก The AVPA Specialty Foods Commodities [3]

มีรายงานการวิจัยที่กล่าวว่าการดื่มชาที่ผลิตจากใบถั่วดาวอินคาทำให้ระบบการไหลเวียนโลหิตทำงานดีขึ้น ช่วยลดปัญหาเบาหวาน ความดัน หัวใจ ลดอาการปวดและช่วยให้ประจำเดือนมาปกติ นอกจากนี้ยังช่วยปรับสมดุลในร่างกายทำให้รู้สึกสดชื่น [4] ใบถั่วดาวอินคายังพบกรดฟีนอลิก (Phenolic acid) เป็นองค์ประกอบ [5] และมีสารอื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง [6] จากรายงานวิจัยของ Chirinos และคณะในปี ค.ศ. 2016 ได้ศึกษาถึงสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วดาวอินคา ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วดาวอินคา มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 74.5 ± 5.1 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยมีแทนนินเป็นองค์ประกอบ 93.1% [7] นอกจากนี้ยังพบกรดฟีนอลิก ชนิดกรดเฟอร์รูลิก กรดพาราคูมาริก กรดโปรโตคาเทอซอิกเป็นส่วนประกอบในปริมาณที่แตกต่างกัน [7]

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ในพืชมีคุณสมบัติที่ดีต่อสุขภาพ มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง ลดระดับของคอเรสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือด กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน [7] สารประกอบฟีนอลิกในพืชเป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในกระบวนการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของพืช จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นในส่วนเมล็ดของถั่วดาวอินคาพบสารในกลุ่มสารประกอบพอลิฟีนอล (Polyphenolic compound) ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) และกรดอะมิโนซิสเตอีน [8]

จากข้อมูลดังกล่าวผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาส่วนต่าง ๆ ของถั่วดาวอินคา โดยวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจากส่วนต่าง ๆ ของถั่วดาวอินคา เพื่อเป็นประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์และเพื่อพัฒนาชุมชนและท้องถิ่น โดยชุมชนสามารถนำมาใช้ประกอบเป็นข้อมูลในการคิดแปรรูปทำผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นที่มีคุณค่าต่อสุขภาพของผู้บริโภคและใช้เป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการวิจัยต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

เก็บตัวอย่างเมล็ดถั่วดาวอินคาพร้อมแยกเปลือกออก ใบอ่อนและใบแก่ของถั่วดาวอินคาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปผึ่งลมให้แห้ง สำหรับใบชาจากถั่วดาวอินคาเตรียมได้โดยเก็บใบแก่ของถั่วดาวอินคาล้างและทำความสะอาด อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และนำไปทำการทดลองในขั้นต่อไป

การเตรียมตัวอย่างส่วนใบอ่อน ใบแก่ ใบชา เปลือกและเมล็ดถั่วดาวอินคาเพื่อการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเตรียมได้ดังนี้ ซึ่งตัวอย่างแห้งของแต่ละส่วนส่วนละ 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ สกัดโดยการเติม 70% เมทานอล จำนวน 300 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง กวนเป็นระยะ ๆ แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางและนำมากรองซ้ำอีกครั้งด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำเอาส่วนที่เป็นกากไปสกัดซ้ำด้วย 70 % เมทานอล 300 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าขาวบางและนำมากรองซ้ำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่สกัดได้ทั้งสองครั้งมารวมกันและระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (Rotary evaporator) แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่อไป

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

เติมสารสกัดหยาบของถั่วดาวอินคาที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร และสารละลาย Folin ciocalteu reagent 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ 7.5 % สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 735 nm (ในกรณีค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไม่อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกให้เปลี่ยนความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ) คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ($r=0.9987$) รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมของตัวอย่างแห้ง (mgGAE/100 g ตัวอย่างแห้ง)

2.3 การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลิก

ซึ่งตัวอย่างส่วนต่าง ๆ ของถั่วดาวอินคา 10 กรัม สกัดด้วย 70 % เมทานอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ จนเหลือปริมาตร 60 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้ไปกำจัดตะกอนโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนของสารละลายใสที่ได้ไปสกัดต่อโดยใช้ไดเอทิลอีเทอร์เป็นตัวทำละลาย ปริมาตร 80 มิลลิลิตร (สกัดสามรอบ) ทั้งส่วนของไดเอทิลอีเทอร์ เก็บสารละลายที่ได้ทั้งสามรอบรวมกัน ปรับค่าพีเอชของสารละลายที่ได้โดยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 โมลาร์ ให้ได้ค่าพีเอชเป็น 1.5 ต่อจากนั้นกรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บส่วนที่กรองได้นำมาสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตรอีกสามรอบ ในการสกัดครั้งนี้จะเก็บส่วนของสารละลายชั้นไดเอทิลอีเทอร์มารวมกันแล้วเติมโซเดียม

ซัลเฟตแอนไฮไดรส์ (Na_2SO_4) ลงไปเล็กน้อยเพื่อกำจัดน้ำ กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บส่วนของสารละลายใสที่ได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 มิลลิลิตร นำไประเหยต่อจนแห้งด้วยอุณหภูมิห้องหรือเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน (N_2) นำสารละลายที่ได้ไปละลายในเมทานอลต่อน้ำ (50:50) กรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Syringe filter) นำสารละลายที่กรองได้ไปหาชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลิก ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

สภาวะของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงคือคอลัมน์ C-18 Reverse phase ขนาด 3.9×250 mm หน้า 5 ไมโครเมตร (LC-10Avp, Shimadzu, Japan) ฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร มีเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นระบบ Gradient phase ที่เกิดจากการผสมระหว่าง 100% อะซิโตรไนไตร์ (เฟส A) และ 10% กรดอะซิติก (เฟส B) Table 1 โดยให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1.25 มิลลิลิตรต่อนาที และมีระบบตรวจจับเป็น Photo Diode Array Detector (PDA) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ระยะเวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์ทั้งสิ้น 35 นาที (Stop time)

Table 1 Gradient phase system

Time (min)	Mobile phase	
	Phase A (%)	Phase B (%)
0	1	99
5	8	92
15	8	92
20	20	80
30	20	80
35	Stop time	

2.4 การแปลผลที่ได้จากการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดฟีนอลิก

การหาชนิดของกรดฟีนอลิกในตัวอย่างของถั่วดาวอินคาทำได้โดยเปรียบเทียบระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (Retention time) ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานกรดฟีนอลิกแต่ละชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก กรดวานิลลิก กรดไซรินจิก กรดพาราคูมาริกและกรดเฟอร์รูลิก ยืนยันชนิดของกรดฟีนอลิกที่พบโดยเติมสารมาตรฐานกรดฟีนอลิกที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลงในตัวอย่างแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้ง (Spiked sample experiment)

ปริมาณของกรดฟีนอลิกแต่ละชนิดในตัวอย่างถั่วดาวอินคาคำนวณได้โดยนำพื้นที่ใต้กราฟของกรดฟีนอลิกที่ได้จากการทดลองมาเทียบกับสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของกรดฟีนอลิกแต่ละชนิด คำนวณและรายงานผลในหน่วย

ไมโครกรัมของกรดฟีนอลิกต่อหนึ่งร้อยกรัมของน้ำหนักแห้ง ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$ น้ำหนักแห้ง)

การหาประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ทำได้โดยเตรียมสารมาตรฐานของกรดฟีนอลิกแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 5–100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทำการทดลองในสภาวะเช่นเดียวกับสารตัวอย่าง ทำการหาค่ามาตรฐานและความเข้มข้น 11 ขั้ว นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานและรายงานประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ในรูปของค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่สามารถวัดได้ (Limit of detection, LOD) และความเข้มข้นที่ใช้เป็นขีดจำกัดต่ำสุดในการหาปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

Table 2 Total phenolic in Sacha Inchi

Part of Sacha Inchi	Total Phenolic Content (mgGAE/100 g)
Seed	23.72±0.81 ^d
Nutshell	6.11±0.32 ^e
Leaflet	145.51±4.66 ^c
Mature leaves	190.25±3.31 ^b
Tea from Sacha Inchi Leaves	296.09±6.64 ^a

Values in the same column followed by a different letter (^{a-e}) are significantly different ($P < 0.05$). Each value in table is represented as mean±SD (n=5).

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (Technical replicates) หาค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ ความแปรปรวน (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16.0 ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากส่วนต่าง ๆ ของถั่วดาวอินคาและผลิตภัณฑ์ใบชาของถั่วดาวอินคา โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารละลายมาตรฐาน รายงานผลในค่ามิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมของตัวอย่างแห้ง (mg GAE/100 g ตัวอย่างแห้ง) พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในส่วนใบของถั่วดาวอินคาพบมากที่สุด โดยเฉพาะในส่วนของใบแก่จากถั่วดาวอินคาและพบน้อยที่สุดในส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ด Table 2 แต่เมื่อนำใบของถั่วดาวอินคาไปผลิตเป็นใบชาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะเพิ่มสูงขึ้น Table 2 นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในชาที่ทำจากใบถั่วดาวอินคา คือ 296.09 ± 6.64 mgGAE/100g น้ำหนักแห้ง Table 2 สูงกว่าชาที่ทำจากชาเขียว (186.83 mgGAE/100 tea) [9]

3.2 ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์

จากการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลิกในตัวอย่างถั่วดาวอินคาและชาถั่วดาวอินคาโดยเทคนิค HPLC พบว่าสารมาตรฐานของกรดฟีนอลิกทั้ง 5 ชนิด มีค่าระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์เป็นไปตาม Table 3 และ Figure 1 กรดฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นโดยพืช สามารถแบ่งกรดฟีนอลิกได้ 2 ชนิด [9] ได้แก่ กรดไฮดรอกซีซินนามิก (Hydroxycinnamic acids) เป็นกรดฟีนอลิกกลุ่มใหญ่ที่สุดและพบทั่วไปในพืช กรดฟีนอลิกที่พบมากในกลุ่มนี้ ได้แก่ กรดพาราควมาริก กรดคาเฟอิก กรดเฟอร์รูลิกและกรดซินนาปิก อีกกลุ่มคือกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (Hydroxybenzoic acids) มีโครงสร้าง

โดยทั่วไปคือ C6-C1 กรดฟีนอลิกกลุ่มนี้เป็นอนุพันธ์ของกรดเบนโซอิก ความแปรผันของโครงสร้างของกรดฟีนอลิกขึ้นอยู่กับการเกิดปฏิกิริยา Hydroxylations และ Methylations ของวงแหวนอะโรมาติก [10] ตัวอย่างของกรดฟีนอลิกในกลุ่มนี้ เช่น กรดวานิลลิกและกรดไซรินจิก ซึ่งในธรรมชาติพบอยู่ในรูปที่จับกับน้ำตาลหรือกรดอินทรีย์ ถูกสะสมอยู่ในบริเวณผนังเซลล์ของพืชในส่วนที่เรียกว่า ลิกนิน (Lignin) [10] ความแตกต่างของโครงสร้างของกรดฟีนอลิกแต่ละชนิดทำให้คุณสมบัติในการละลายของกรดฟีนอลิกแตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้จึงสามารถใช้เทคนิค HPLC แยกกรดฟีนอลิกแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบได้ จากการวิเคราะห์พบว่าลำดับการแยกกรดฟีนอลิกโดยเทคนิค HPLC คือ กรดแกลลิก กรดวานิลลิก กรดไซรินจิก กรดพาราควมาริก และกรดเฟอร์รูลิก ตามลำดับ Figure 1

ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ พบว่ากรดฟีนอลิกแต่ละชนิดมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) คือ กรดแกลลิก 0.9970 กรดวานิลลิก 0.9980 กรดไซรินจิก 0.9965 กรดพาราควมาริก 0.9984 และกรดเฟอร์รูลิก 0.9985 Table 3 และเมื่อคำนวณค่าความเข้มข้นต่ำสุดของกรดฟีนอลิกแต่ละชนิดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) พบว่ากรดแกลลิกมีค่า LOD เท่ากับ 0.0920 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรดวานิลลิกมีค่า LOD เท่ากับ 2.4381 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรดไซรินจิกมีค่า LOD เท่ากับ 2.8011 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรดพาราควมาริกมีค่า LOD เท่ากับ 1.6056 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกรดเฟอร์รูลิกมีค่า LOD เท่ากับ 0.7890 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Table 4 พบว่ากรดฟีนอลิกแต่ละชนิดสามารถตรวจวัดได้ในปริมาณที่ต่างกันได้ โดยกรดแกลลิกแม้จะมีปริมาณน้อยก็สามารถตรวจวัดได้ดีกว่ากรดเฟอร์รูลิก กรดพาราควมาริก กรดวานิลลิกและกรดไซรินจิก ตามลำดับ

3.3 ชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นมา โดยโครงสร้างจะประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซี (OH) เกาะอยู่กับวงแหวนเบนซีน (C_6H_6) ในธรรมชาติพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิด [11] ประโยชน์ของสารประกอบฟีนอลิก เช่น ใช้เป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันในอาหาร [10] กรด

วานิลลิกมีคุณสมบัติในการต้านเซลล์มะเร็งในลำไส้เล็ก [12] กรดแกลลิกมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อรา เชื้อไวรัสและป้องกันไม่ให้เกิดการทำลายของเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน [10] กรดพาราคูมาริกในธรรมชาติพบได้ 3 ไอโซเมอร์ คือ กรดออร์โทคูมาริก (*o*-Coumaric acid) กรดเมตาคูมาริก (*m*-Coumaric acid) และกรดพาราคูมาริก (*p*-Coumaric acid) ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเมอร์แตกต่างกันตรงตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซี

กรดพาราคูมาริกเป็นไอโซเมอร์ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ [10] มีรายงานการวิจัยที่ว่ากรดพาราคูมาริกมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น ด้านการเกิดออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (Low-Density Lipoprotein, LDL) [13] ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร โดยลดการเกิด Carcinogenic Nitrosamines ทำให้มะเร็งในกระเพาะอาหารไม่พัฒนา [14]

Table 3 Retention time and Regression Equation of individual phenolic acid standard

Phenolic acids	Retention time (min)	Regression Equation	Correlation coefficient (<i>r</i>)
Gallic acid	2.465	$Y = 47788X + 398443$	0.9970
Vanillic acid	13.146	$Y = 42837X + 215918$	0.9980
Syringic acid	15.009	$Y = 32767X + 38077$	0.9965
<i>p</i> -Coumaric acid	21.795	$Y = 133489X + 545311$	0.9984
Ferulic acid	25.343	$Y = 45247X + 119383$	0.9985

Table 4 Limit of detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ) of individual phenolic acid standard

Phenolic acids	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Gallic acid	0.0920	0.3060
Vanillic acid	2.4381	8.1270
Syringic acid	2.8011	9.3370
<i>p</i> -Coumaric acid	1.6056	5.3520
Ferulic acid	0.7890	2.6290

กรดฟีนอลิกที่พบในส่วนต่าง ๆ ของถั่วดาวอินคา และในใบชาที่ทำจากใบแก่ของถั่วดาวอินคาแสดงใน Figure 1 และปริมาณของกรดฟีนอลิกที่พบในแต่ละส่วนของถั่วดาวอินคาแสดงใน Table 5 จากการหาชนิดของกรดฟีนอลิกในส่วนต่างๆ ของถั่วดาวอินคาโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดฟีนอลิกพบว่า ใบอ่อนของถั่วดาวอินคาพบกรดฟีนอลิก 3 ชนิด คือกรดแกลลิก กรดพาราคูมาริกและกรดเฟอร์รูลิก Table 5 ใบแก่และใบชาที่ทำจากถั่วดาวอินคาพบชนิดของกรดฟีนอลิกครบทั้ง 5 ชนิด Figure 1 และ Table 5 สำหรับในเมล็ดถั่วดาวอินคาพบชนิดของกรดฟีนอลิกอยู่ 2 ชนิด คือ

กรดวานิลลิกและกรดพาราคูมาริก Table 5 แต่ในส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดของถั่วดาวอินคาตรวจไม่พบกรดฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ Table 5 พบปริมาณกรดแกลลิกและกรดวานิลลิกมากที่สุดในผลิตภัณฑ์ใบชาของถั่วดาวอินคา ให้ค่าเท่ากับ 127.08 ± 4.96 และ $141.00 \pm 2.40 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ น้ำหนักแห้งตามลำดับ ปริมาณกรดไซรินจิกและกรดเฟอร์รูลิก พบมากที่สุดในใบแก่ของถั่วดาวอินคา 35.14 ± 3.70 และ $1,143.03 \pm 35.17 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ น้ำหนักแห้งตามลำดับ และกรดพาราคูมาริกพบมากที่สุดในใบอ่อนของถั่วดาวอินคา $213.56 \pm 1.43 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ น้ำหนักแห้ง Table 5

Table 5 Type of phenolic acids from Sacha Inchi

Part of Sacha Inchi	Phenolic acids ($\mu\text{g}/100\text{g}$ dry sample)				
	Gallic acid	Vanillic acid	Syringic acid	<i>p</i> -Coumaric acid	Ferulic acid
Seed	N.D.	1.38 ± 0.05^a	N.D.	2.40 ± 0.03^a	N.D.
Nutshell	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Leaflet	62.61 ± 9.80^a	N. D.	N.D.	213.56 ± 14.30^d	454.65 ± 21.08^a
Mature leaves	69.09 ± 4.82^a	138.19 ± 8.98^b	35.14 ± 3.70^a	108.98 ± 3.22^c	$1,143.03 \pm 35.17^c$
Tea from Sacha Inchi Leaves	127.08 ± 4.96^b	141.00 ± 2.40^b	31.06 ± 5.68^a	72.06 ± 13.50^b	869.92 ± 163.37^b

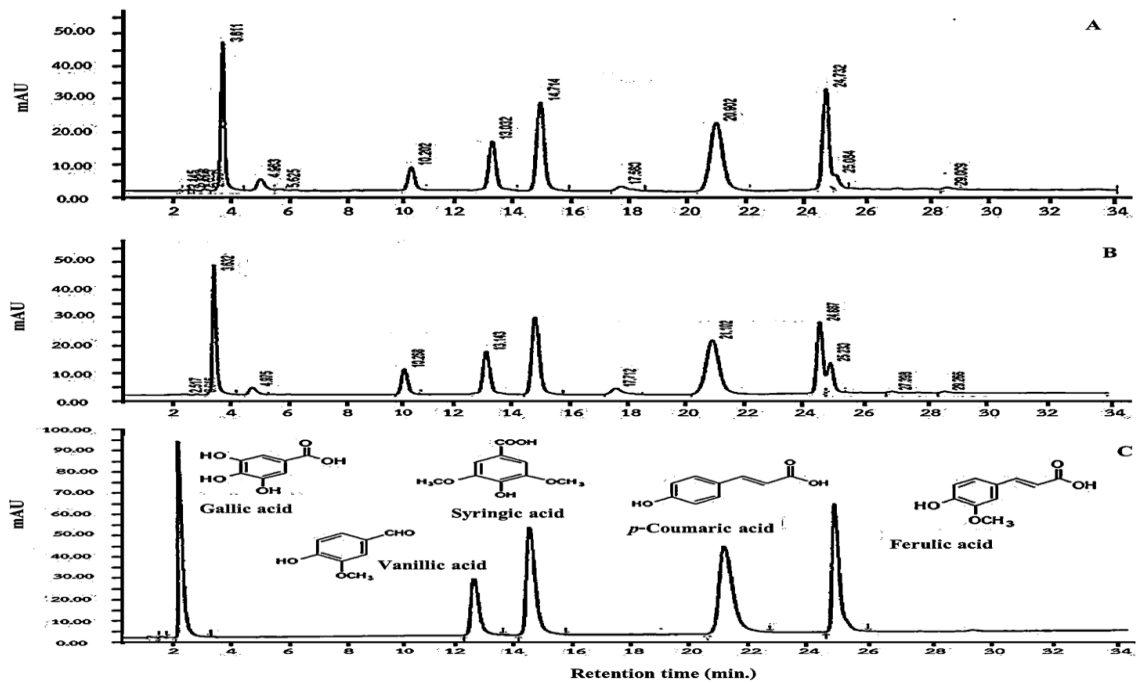


Figure 1 HPLC-UV-VIS chromatograms of (A) phenolic acids in Sacha Inchi. (B) = Chromatograms of phenolic acids in tea from Sacha Inchi leaves. (C) = Chromatograms of phenolic acids standard

กรดแกลลิกและกรดวานิลลิกในผลิตภัณฑ์ชาจากใบของถั่วดาวอินคาที่มีปริมาณที่สูงกว่าในใบอ่อนและใบแก่ Table 5 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของปิยพร สีแสง ในปี พ.ศ. 2562 ที่ได้ศึกษาถึงผลของอุณหภูมิในการอบแห้งต่อสารพฤกษเคมีในหน่อไม้ตังลิ้มแล้ง โดยพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นปริมาณของกรดแกลลิกก็จะเพิ่มขึ้นด้วย [15] นอกจากนี้กรดแกลลิกยังเป็นกรดฟีนอลิกที่มีขั้ว มีหมู่ไฮดรอกซี 3 หมู่อยู่ก่บวงฟีนอล ทำให้กรดแกลลิกมีความสามารถในการละลายได้ดีต่อเฟสเคลื่อนที่ที่มีขั้ว กรดแกลลิกจึงแยกออกจากคอลัมน์ได้เป็นลำดับแรก Figure 1C ขณะที่ในตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ชาพบว่าเวลาในการออกจากคอลัมน์ของกรดแกลลิกคลาดเคลื่อนไปเล็กน้อย Figure 1A และ Figure 1B เนื่องจากในขั้นตอนการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลิกได้ใช้วิธีการสกัดที่จำเพาะทำให้กรดฟีนอลิกในตัวอย่างดาวอินคาออกมา (ทั้งที่อยู่ในรูปกรดฟีนอลิกอิสระและกรดฟีนอลิกที่สร้างพันธะเคมีกับสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ) จึงทำให้ในตัวอย่างของดาวอินคามีชนิดของกรดฟีนอลิกออกมาหลายชนิด

ในทางตรงกันข้ามกรดไซรินจิก กรดพาราควมาริก และกรดเฟอร์รูลิกมีปริมาณลดลงเมื่ออยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ชา Table 5 ทั้งนี้เนื่องมาจากความร้อนที่เกิดจากกระบวนการผลิตชามีส่วนสำคัญต่อการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าอุณหภูมิที่มากกว่า 70 องศาเซลเซียส มีผลต่อการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกอย่างมีนัยสำคัญ [16]

4. สรุปผลการวิจัย

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในส่วนต่าง ๆ ของถั่วดาวอินคา พบว่าใบแก่จากถั่วดาวอินคามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด พบน้อยที่สุดในส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วดาวอินคา เมื่อนำใบแก่จากถั่วดาวอินคา มาผลิตเป็นใบชาจะทำให้มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น ซึ่งใบถั่วดาวอินคาแต่ละส่วนให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแตกต่างกัน

ส่วนการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลิกในส่วนต่างๆ ของถั่วดาวอินคา พบชนิดของกรดฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบในแต่ละส่วนแตกต่างกัน โดยกรดแกลลิกและกรดวานิลลิกพบมากที่สุด ใบชาที่ทำจากถั่วดาวอินคา กรดไซรินจิกและกรดเฟอร์รูลิกพบมากที่สุดในใบแก่ของถั่วดาวอินคา กรดพาราควมาริกพบมากที่สุดในใบอ่อนของถั่วดาวอินคา เมื่อดูในภาพรวมจะพบว่าในส่วนของใบถั่วดาวอินคาจะมีชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลิกมากที่สุด โดยเฉพาะในใบแก่และเมื่อนำใบแก่มาผลิตเป็นชาจะมีผลทำให้ปริมาณของกรดฟีนอลิกบางชนิดเพิ่มสูงขึ้น

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนบุคลากรมหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ประจำปี พ.ศ. 2559 ภายใต้สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย

6. Reference

- [1] Montri, S. 2015. **Sacha Inchi**. Bangkok. Panyachon Distributor. (in Thai)
- [2] Kwanrudee, T. and Pinit, J. 2015. **Sacha Inchi: Rich of Omega**. Bangkok. Panyachon Distributor. (in Thai)
- [3] Udomwit, V., Kanyarat, J. and Thaluangsak, V. 2016. **Sacha Inchi and Benefit**. Department of Agriculture. Maejo University. (in Thai)
- [4] Chirnos, R. and et al. 2013. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. **Food Chemistry**. 141: 1732-1739.
- [5] Souza, A. H. P. and et al. 2013. Sacha inchi as potential source of essential fatty acids and tocopherols: multivariate study of nut and shell. **Acta Scientiarum**. 35: 757-763.
- [6] Hanssen, H. P. and Hubsch, M. S. 2011. Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) nut oil and its therapeutic and nutritional uses. Nuts and Seeds in health and disease prevention. **Academic Press**. 991-994.
- [7] Chirinos, R., Necochea, O., Pedreschi, R. and Campos, D. 2016. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) shell: an alternative source of phenolic compounds and antioxidants. **International Journal of Food Science and Technology**. 51(4): 986-993.
- [8] Fanali, C. and et al. 2011. Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 59: 13043-13049.
- [9] Nadiyah, N. I. and Uthumporn, U. 2015. Determination of phenolic and antioxidant properties in tea and spent tea under various extraction method and determination of catechins, caffeine and gallic acid by HPLC. **International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology**. 5(3): 158-164.
- [10] Luchai, B. 2012. Phenolic compounds and biological activity. **Journal of Science and Technology Mahasarakham University**. 4(31): 443-455.
- [11] Rice-Evans, C. A. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**. 22(4): 3785-3793.
- [12] Xu, Y. M. and et al. 2003. DNA damaging activity of ellagic acid derivatives. **Bioorganic and Medical Chemistry**. 11: 1593-96.
- [13] Lun-Yi, Z. and et al. 2000. Effect of antioxidant protection by *p*-Coumaric acid on low density lipoprotein cholesterol oxidation. **Journal of Cellular Physiology**. 279: 954-60.
- [14] Ferguson, L. R, Shuo-tun, Z. and Harris P. J. 2005. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. **Molecular Nutrition and Food Research**. 49(6): 585-93.
- [15] Seewaeng, P. and Siriamornpun, S. 2019. Effect of drying temperature on phytochemicals and antioxidant activities of *Bambusa beecheyana*. **Khon Kaen Agriculture Journal**. 47(Suppl. 1): 1385-1392. (in Thai)
- [16] Katsubea, T. and et al. 2009. Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. **Food Chemistry**. 113(4): 964-969.