วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.1) January – April 2021 บทความวิจัย

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโครสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดใบรางแดง (*Ventilago denticulata* Willd.)

Development and Validation of the Folin-Ciocalteu Semi-Micro Method for Total Phenolic Compounds Determination in Rangdaeng (*Ventilago denticulata* Willd.) Extract

รวินิภา ศรีมูล* และ ศิริกมล นิยมวรรณ์

Rawinipa Srimoon* and Sirikamol Niyomwan

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์และเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออกวิทยาเขตจันทบุรี

Department of Applied Science and Biotechnology, Faculty of Agro-Industrial Technology,
Rajamangala University of Technology Tawan-OK, Chanthaburi Campus

Received : 18 May 2020
Revised : 11 July 2020
Accepted : 23 July 2020

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโครและทดสอบความใช้ได้ของวิธีการสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดใบรางแดง (*Ventilago denticulata* Willd.) ผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมของวิธี คือ ใช้สารตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร สารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร 250 ไมโครลิตร สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 3.75 โดยมวลต่อปริมาตร 100 ไมโครลิตร เวลาเข้าสู่สมดุล 40 นาที และใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ไม่แตกต่างจากวิธี Folin-Ciocalteu แบบมีโซซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ปริมาณสารมากกว่าวิธีนี้ 20 เท่า (P>0.05) การทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่ามีความเป็นเส้นตรง (R^2>0.999) และมีความจำเพาะ (กราฟมาตรฐานและกราฟแสดงความจำเพาะขนานกันมีความชันแตกต่างกันร้อยละ 0-5.91) ขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 3.70 และ 11.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ความแม่นและความเที่ยงอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ มีร้อยละของการกลับคืน เท่ากับ 82.11-105.31 และ %RSD=4.77-6.42 ความเที่ยงของการทวนซ้ำในวันเดียวกัน, การทำซ้ำต่างวันกัน และ intermediate-precision method มีค่า %RSD=0.77-2.42, 2.41-3.63 และ 1.39-3.26 ตามลำดับ มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 20-50 องศาเซลเซียส (%RSD=0.21-6.03) เมื่อนำวิธีที่พัฒนาได้ไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดใบรางแดงเทียบกับวิธี Folin-Ciocalteu แบบมีโซ พบว่า มีค่า 73.87±0.75 และ 74.61±0.82 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) สรุปได้ว่า วิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโครที่พัฒนาได้ในการศึกษานี้สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในตัวอย่างที่ต้องวิเคราะห์เป็นประจำได้ดีเนื่องจากใช้เวลาทำปฏิกิริยาและใช้สารละลายน้อยลง ลดการใช้สารเคมี เกิดของเสียน้อยลง จึงปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้น

คำสำคัญ : การทดสอบความใช้ได้ของวิธี ; วิธี Folin-Ciocalteu ; สารประกอบฟีนอลิก ; รางแดง

Abstract

The purposes of this research were to develop and validate the Folin-Ciocalteu semi-micro method for total phenolic compounds determination in Rangdaeng (*Ventilago denticulata* Willd.) extract. The results showed that the optimum condition was as follows: 100 μL of sample, 250 μL of 20%v/v Folin-Ciocalteu phenol reagent, 100 μL of 3.75%w/v Na_2CO_3 and 40 minutes of the equilibrium time using gallic acid as the standard. The absorbance at 765 nm was no significant difference (P>0.05) compared with the conventional Folin-Ciocalteu meso-method (20 folds in volume of the sample and reagents). Method validation revealed good linearity (R^2>0.999) and specificity (calibration curve and specificity curve were paralleled with 0-5.91% of slope difference). LOD and LOQ was 3.70 and 11.22 μg/mL, respectively. Accuracy and precision of the method were acceptable. Percentage of recovery and %RSD were in the range of 82.11-105.31 and 4.77-6.42, respectively. Repeatability (intra-day), reproducibility (inter-day) and intermediate-precision method as %RSD were 0.77-2.42, 2.41-3.63 and 1.39-3.26, respectively. Method also showed the robustness under temperature in the range of 20-50 ^{o}C (%RSD=0.21-6.03). The developed Folin-Ciocalteu semi-micro method was applied to the determination of total phenolic compounds (TPC) in Rangdaeng (*V. denticulata*) extract, compared with the Folin-Ciocalteu meso-method. The results showed that the TPC were 73.87±0.75 and 74.61±0.82 mg GAE/g dw, respectively, which were not different significantly (P>0.05). In conclusion, the Folin-Ciocalteu semi-micro method is appropriated to the routine assay. Due to the decreasing in the reaction time, it is faster. This method reduces solution volume, chemical usage and wasted discharge so it is more environmental-friendly and safer.

Keywords : method validation ; Folin-Ciocalteu method ; phenolic compounds ; *Ventilago denticulata* Willd

***Corresponding author. E-mail** : rawinipa_sr@rmutto.ac.th

บทนำ

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้น ลักษณะสำคัญ คือ มีวงแหวนแอโรแมติกอย่างน้อย 1 วง ในโมเลกุลซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่แทนที่ ประกอบด้วยสารหลายกลุ่ม เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก แทนนิน และลิกนิน เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกมีสมบัติเป็นตัวต้านออกซิเดชัน (antioxidants) ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์และป้องกันการเกิดโรคหลายชนิด เช่น มะเร็ง เบาหวาน (Martinez, 2005; Hu, 2011) ลดอัตราการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด เสริมความแข็งแรงของปอด (Keaney & Frei, 1994; Bland, 1995) ควบคุมระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด (Shori, 2015; Srimoon, Anartgnam, & Tilarux, 2020) ลดริ้วรอยและช่วยชะลอวัย (Leu *et al*., 2006) เป็นต้น

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมนิยมใช้วิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งใช้หลักการถ่ายโอนอิเล็กตรอนระหว่างสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent กับสารประกอบฟีนอลิกในสภาวะด่าง สารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ประกอบด้วยโซเดียมทังสเตต (Na_2WO_4) โซเดียมโมลิบเดต (Na_2MoO_4) กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) และโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) โมลิบดินัมและทังสเตนในสารละลายอยู่ในรูป Mo^{6+} และ W^{6+} ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อรับอิเล็กตรอนจากสารประกอบฟีนอลิกแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป Mo^{5+} และ W^{5+} ซึ่งมีสีน้ำเงินโมลิบดินัมบลู (molybdenum blue) และทังสเตนบลู (tungsten blue) ตามลำดับ โดยเกิดเป็นสารเชิงซ้อนฟอสโฟโมลิบเดต/ฟอสโฟทังสเตต ($[phe\text{-}MoW_{11}O_{40}]^{4-}$) ดังสมการ (1) ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

$$\underset{\text{สีเหลือง}}{Na_2WO_4/Na_2MoO_4} \longrightarrow \underset{\text{สีน้ำเงิน}}{[phe\text{-}MoW_{11}O_{40}]^{4-}} \qquad (1)$$

วิธี Folin-Ciocalteu นิยมใช้ในการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างพืช ผลิตภัณฑ์จากพืช และผลิตภัณฑ์อาหารทั่วไป มีข้อดีคือ ทำได้ง่าย เครื่องมือไม่ซับซ้อน ได้ผลรวดเร็ว รีเอเจนท์มีความเสถียรแม้จะเจือจางลงมาก มีความไวและความเที่ยงสูง แต่ข้อเสียคือ เป็นวิธีที่ไม่จำเพาะเจาะจง เนื่องจากเป็นการวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนหรือสมบัติรีดิวซ์ (reducing power) ของสาร ดังนั้น สารอื่นในตัวอย่างที่มีสมบัติรีดิวซ์ เช่น น้ำตาลรีดิวซ์ กรดแอสคอร์บิก เฟอรัสไอออน (Fe^{2+}) และซัลไฟต์ อาจรบกวนการวิเคราะห์ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำตาลสูงหรือเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมสารกันเสีย (Medina, 2011) มีการพัฒนาวิธี Folin-Ciocalteu ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น เพิ่มความแม่นโดยกำจัดสิ่งรบกวนออกจากตัวอย่าง การตกตะกอนโปรตีนก่อนการวิเคราะห์ (Clcco *et al*., 2009) ใช้คอลัมน์ดูดซับแบบของแข็ง (solid-phase extraction, SPE) และใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) กำจัดสารรบกวนที่มีสมบัติรีดิวซ์ (Sánchez-Rangel *et al*., 2013)

สำหรับพืชที่ใช้ในการทดสอบวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาได้ในครั้งนี้ คือ รางแดง (*Ventilago denticulata* Willd.) ซึ่งเป็นพืชที่ผู้วิจัยได้ศึกษาก่อนหน้าและพบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูง โดยเฉพาะกรดโปรโตคาเทชูอิก กรดวานิลลิก กรดไซแนปิก กรดเฟอรูลิก กรดแกลลิก เควอร์ซีทิน รูทิน และคาเทชิน มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส อะไมเลส และไลเปส (Srimoon, Anartgnam, & Tilarux, 2020) มีรายงานวิจัยพบว่า สารสกัดจากลำต้น

และเถาของรางแดงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ช่วยรักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง และภาวะความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง (Temkitthawon *et al.*, 2008) ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโคร ซึ่งใช้สารตัวอย่างปริมาตรน้อย (100 ไมโครลิตร) เพื่อลดปริมาณสารตัวอย่างและสารเคมีที่ใช้ให้น้อยที่สุด ลดเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ (น้อยกว่า 1 ชั่วโมง) โดยศึกษาขนาดของสารตัวอย่างและปริมาตรรีเอเจนท์ที่เหมาะสม ความเข้มข้นของรีเอเจนท์ คือ สารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent และ Na_2CO_3 เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา และสารมาตรฐานที่ใช้เทียบปริมาณ จากนั้น นำวิธีที่พัฒนาได้ไปทดสอบความใช้ได้ของวิธีการ (method validation) ตามมาตรฐานของ ICH หรือ The international conference on the harmonization of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use (ICH Guideline, 2017) และใช้วิธีการที่ได้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในใบรางแดง ซึ่งผลที่ได้จะเป็นแนวทางในการนำวิธีที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในตัวอย่างพืชชนิดอื่นต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

สารเคมีที่ใช้ทั้งหมดเป็นเกรดวิเคราะห์ (analytical reagent grade): Folin-Ciocalteu phenol reagent กรดแกลลิก (gallic acid) กรดโปรโตคาเทชูอิก (protocatechuic acid) และกรดเฟอรูลิก (ferulic acid) ของ Sigma-Aldrich (USA) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ของ Univar Ajax Finechem (New Zealand) กรดวานิลลิก (vanillic acid) ของ Alfa-Aesar (UK) เอทานอล (ethanol) ของ Merck (Germany) เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (rotary evaporator) Labora 4003 ของ Heidolph เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ Lambda 365 ของ Perkin Elmer และ Libra S22 ของ Biochrom

2. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดใบรางแดง

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างใบรางแดงได้มาจากวิสาหกิจชุมชนใน ต. เกาะเกร็ด จ. นนทบุรี เก็บเฉพาะใบอ่อนที่ยอด นำไปล้างด้วยน้ำให้สะอาด อบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน แล้วเก็บในถุงพลาสติกซิปล็อค ในที่แห้งและอุณหภูมิห้องก่อนนำไปวิเคราะห์ ตัวอย่างใบรางแดงได้รับการระบุชนิดพันธุ์ที่แน่นอนด้วยผู้เชี่ยวชาญด้านพืชและพรรณไม้ และเก็บรักษาตัวอย่างแห้งไว้ที่สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชและภูมิทัศน์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี โดยมีรหัสพรรณไม้ (voucher specimen) R. Srimoon 1

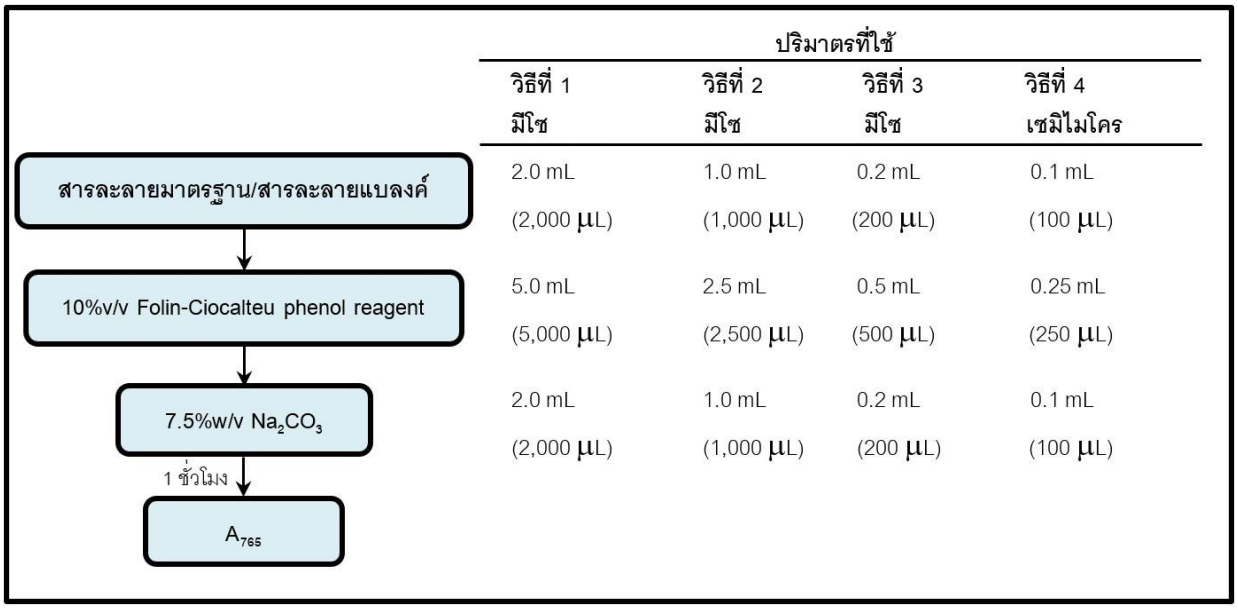
2.2 การเตรียมสารสกัดหยาบเข้มข้น

ตัวอย่างใบรางแดงแห้งนำไปสกัดด้วยวิธีสกัดแบบหมัก (maceration) โดยใช้สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร ในอัตราส่วน ตัวอย่าง:ตัวทำละลาย=1:5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ใช้ตัวอย่างใบรางแดงแห้ง 252.3628 กรัม ตัวทำละลาย 1,520 มิลลิลิตร) แช่ไว้ 1 คืน สกัดซ้ำอีกครั้ง นำสารที่สกัดได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดันที่อุณภูมิ 70 องศาเซลเซียส เมื่อระเหยตัวทำละลายออกไปหมดแล้ว จะได้สารสกัดหยาบเข้มข้น (crude extract)

3. การพัฒนาวิธี Folin-Ciocalteu method แบบเซมิไมโคร

3.1 การทดสอบขนาดสารตัวอย่าง (sample size) และปริมาตรรีเอเจนท์ที่เหมาะสม

เตรียมสต็อคของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเป็น 25, 50 และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล และใช้สารละลายเอทานอลร้อยละ 70 โดยปริมาตร เป็นแบลงค์ ทดสอบปริมาตรสารตัวอย่างและรีเอเจนท์ตามภาพที่ 1 เกณฑ์ขนาดสารตัวอย่างอ้างอิงจาก Christian (1994) ได้แก่ วิธีที่ 1: มีโซ (ปริมาตรปกติ) ตามวิธีการของ Srimoon, Anartgnam, & Tilarux (2020), วิธีที่ 2: มีโซ (ปริมาตรลดลง 2 เท่า), วิธีที่ 3: มีโซ (ปริมาตรลดลง 10 เท่า) และวิธีที่ 4: เซมิไมโคร (ปริมาตรลดลง 20 เท่า) แต่ละการทดลองวิเคราะห์ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (A_{765}) ของแต่ละวิธี จากนั้นนำวิธีที่ได้ไปวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดใบรางแดงเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายแบลงค์ แล้วสแกนสเปกตรัมช่วงความยาวคลื่น 400-850 นาโนเมตร เพื่อดูความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุดของวิธีที่พัฒนาขึ้น



	ปริมาตรที่ใช้			
	วิธีที่ 1 มีโซ	วิธีที่ 2 มีโซ	วิธีที่ 3 มีโซ	วิธีที่ 4 เซมิไมโคร
สารละลายมาตรฐาน/สารละลายแบลงค์	2.0 mL (2,000 µL)	1.0 mL (1,000 µL)	0.2 mL (200 µL)	0.1 mL (100 µL)
10%v/v Folin-Ciocalteu phenol reagent	5.0 mL (5,000 µL)	2.5 mL (2,500 µL)	0.5 mL (500 µL)	0.25 mL (250 µL)
7.5%w/v Na_2CO_3	2.0 mL (2,000 µL)	1.0 mL (1,000 µL)	0.2 mL (200 µL)	0.1 mL (100 µL)

ภาพที่ 1 แผนภาพการทดสอบขนาดสารตัวอย่างและปริมาตรรีเอเจนท์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

3.2 การทดสอบความเข้มข้นของรีเอเจนท์ที่เหมาะสม

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล ใช้วิธีวิเคราะห์วิธีที่ 4 (เซมิไมโคร) แต่ทดสอบความเข้มข้นของรีเอเจนท์ที่ใช้เป็นเพิ่มขึ้น 2 เท่า, 1 เท่า และลดลง 2 เท่า ได้แก่ สารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เข้มข้นร้อยละ 20, 10 และ 5 โดยปริมาตร และสารละลาย Na_2CO_3 เข้มข้นร้อยละ 15, 7.5 และ 3.75 โดยมวลต่อปริมาตร แต่ละการทดลองวิเคราะห์ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

3.3 เวลาที่ใช้เข้าสู่สมดุล (equilibrium time)

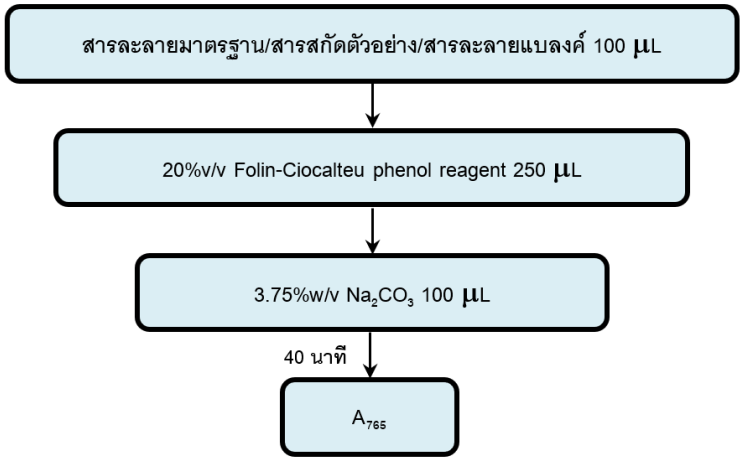
เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล ใช้วิธีวิเคราะห์วิธีที่ 4 (เซมิไมโคร) แต่ใช้ความเข้มข้นของสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ร้อยละ 20 โดยปริมาตร และ Na_2CO_3 ร้อยละ 3.75 โดยมวลต่อปริมาตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทุก ๆ 5 นาที จนครบ 60 นาที วิเคราะห์ 3 ซ้ำ เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา เพื่อหาเวลาเข้าสู่สมดุลของปฏิกิริยา

3.4 การทดสอบสารมาตรฐานที่เหมาะสม

ศึกษาสารมาตรฐานที่เหมาะสมเพื่อใช้เทียบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก กรดโปรโตคาเทชูอิก และกรดเฟอรูลิก ชนิดละ 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล นำไปวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ 4 (เซมิไมโคร) ความเข้มข้นของสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ร้อยละ 20 โดยปริมาตร และ Na_2CO_3 ร้อยละ 3.75 โดยมวลต่อปริมาตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ที่เวลา 40 นาที แต่ละการทดลองวิเคราะห์ 3 ซ้ำ เขียนกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด หาสมการถดถอยเชิงเส้น เปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) และความชันของกราฟมาตรฐานเพื่อหาสารมาตรฐานที่เหมาะสมเพื่อใช้เทียบปริมาณฟีนอลิกรวม

4. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการ (method validation) ที่พัฒนาได้ ดังภาพที่ 2 ตามมาตรฐานของ ICH (ICH Guideline, 2017) ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 2 แผนภาพการทดลองวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโครที่พัฒนาได้

4.1 ความเป็นเส้นตรง (linearity)

ความเป็นเส้นตรง คือ ความสามารถของวิธีที่จะให้ผลเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด ทดสอบด้วยวิธี The least-square โดยเตรียมสต็อคของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางเป็น 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล และเตรียมสต็อคของสารสกัดใบรางแดงเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางเป็น 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 100, 200, 300, 500, 700, 900 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีการที่พัฒนาได้ แต่ละการทดลองวิเคราะห์ 3 ซ้ำ เขียนกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกและกราฟมาตรฐานของสารสกัดใบรางแดง หาสมการถดถอยเชิงเส้น และค่า R^2 เพื่อหาความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ

4.2 ความจำเพาะ (specificity)

ความจำเพาะ คือ ความสามารถของวิธีที่จะวิเคราะห์เฉพาะสารที่ต้องการได้โดยไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ในตัวอย่าง การทดสอบความจำเพาะใช้วิธีการที่อ้างอิงจาก Blainski, Lopes, & De Mello (2013) โดยเปรียบเทียบความชันของกราฟมาตรฐานกับกราฟแสดงความจำเพาะ (specificity curve) ที่สร้างจากสารมาตรฐานหรือสารสกัดที่เติมสารมาตรฐานภายใน (internal standard) อีกชนิดหนึ่งที่ทราบความเข้มข้นและปริมาณที่แน่นอนลงไปในที่นี้ใช้กรดวานิลลิก เนื่องจากเป็นกรดฟีนอลิกที่พบในปริมาณสูงในตัวอย่างสารสกัดใบรางแดง (357.42 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เป็นสารในกลุ่มอนุพันธ์ของกรดเบนโซอิกเช่นเดียวกับกรดแกลลิก และมีตำแหน่งพีกในโครมาโทแกรมใกล้กับกรดแกลลิกเมื่อแยกด้วยวิธี HPLC (Srimoon, Anartgnam, & Tilarux, 2020) โดยเตรียมสต็อคของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางเป็น 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล และเตรียมสต็อคของสารสกัดใบรางแดงเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางเป็น 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 100, 200, 300, 500, 700, 900 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล จากนั้นเติมสารละลายกรดวานิลลิก เข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปในสารแต่ละความเข้มข้น แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาได้ แต่ละการทดลองวิเคราะห์ 3 ซ้ำ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความจำเพาะ หาสมการถดถอยเชิงเส้นและค่า R^2 เทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความจำเพาะของวิธีการ

4.3 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (limit of quantification, LOQ)

ค่า LOD เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถวิเคราะห์ได้ ส่วนค่า LOQ เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถวัดปริมาณได้อย่างแม่นยำและมีความเที่ยงที่ยอมรับได้ ทดสอบโดยเตรียมสารละลายแบลงค์โดยใช้เอทานอลร้อยละ 70 โดยปริมาตร นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาได้ ทั้งหมด 10 ซ้ำ คำนวณค่า LOD และ LOQ จากสมการที่ (2) และ (3) ตามลำดับ

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S} \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (3)$$

เมื่อ σ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลายแบลงค์ ที่วัด 10 ซ้ำ และ S คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน

4.4 ความแม่น (accuracy)

ความแม่น คือ ความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ ทดสอบโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก 3 ระดับความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นต่ำ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้นใกล้กับค่า LOQ ที่ได้จากการทดลอง 4.3 คือ 11.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ความเข้มข้นกลาง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นสูง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดใบรางแดงเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายเอทานอลร้อยละ 70 โดยปริมาตรเป็นแบลงค์ สารสกัดใบรางแดงเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เติมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายแบลงค์ที่เติมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละชุดการทดลองนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาได้ 3 ซ้ำ คำนวณร้อยละของการกลับคืน (% recovery) จากสมการที่ (4)

$$\text{ร้อยละของการกลับคืน} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐานและตัวอย่าง - ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง}}{\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป}} \times 100 \quad (4)$$

4.5 ความเที่ยง (precision)

ความเที่ยง คือ การตรวจสอบว่าวิธีการที่ใช้ให้ผลใกล้เคียงกันมากน้อยเพียงใดเมื่อทำซ้ำภายใต้สภาวะเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน ทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 20, 50 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบความเที่ยง 3 กรณี ได้แก่ ความสามารถในการทวนซ้ำในวันเดียวกัน (repeatability หรือ intra-day precision) วิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ในวันเดียวกัน, ความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility หรือ inter-day precision) วิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ติดต่อกัน 3 วัน และ intermediate-precision method วิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ในวันเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ใช้เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ 2 เครื่อง คำนวณค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ดังสมการที่ (5) เพื่อหาความเที่ยงของวิธีการ

$$\%\ RSD = \frac{\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ย}} \times 100 \quad (5)$$

4.6 ความคงทน (robustness)

ความคงทนของวิธีการ คือ วิธีวิเคราะห์ให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกันหรือคลาดเคลื่อนเพียงเล็กน้อยที่ไม่มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อการวิเคราะห์ ทำโดยดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ให้ต่างไปเล็กน้อย ในการศึกษานี้ จะทดสอบความคงทนของวิธีที่พัฒนาได้ต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ค่า คือ 20, อุณหภูมิห้อง (32±2) และ 50 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีการที่พัฒนาได้ แต่ละอุณหภูมิวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณค่า %RSD เพื่อหาความคงทนของวิธีการ

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดใบรางแดง

5.1 การวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโคร (semi-micro method) ที่พัฒนาได้

ปิเปตสารสกัดหรือสารละลายแบลงค์ 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Na_2CO_3 เข้มข้นร้อยละ 3.75 โดยมวลต่อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 40 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเทียบกับกรดแกลลิก (mg GAE/g dw)

5.2 การวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu แบบมีโซ (meso method)

วิธี Folin-Ciocalteu แบบมีโซใช้วิธีของ Srimoon, Anartgnam, & Tilarux (2020) ปิเปตสารสกัดหรือสารละลายแบลงค์ 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เติมสารละลาย Na_2CO_3 เข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเทียบกับกรดแกลลิก (mg GAE/g dw)

6. การทดสอบทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD.) หรือร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของการทดลอง 3, 7 หรือ 10 ซ้ำขึ้นกับการทดสอบวิเคราะห์ความแปรปรวน analysis of variance, ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test และ t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัย

ตัวอย่างใบรางแดงแห้ง 252.3628 กรัม ได้สารสกัดหยาบหนัก 107.4518 กรัม คิดเป็นร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้เท่ากับ 42.58 ผลการศึกษาการพัฒนาวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโคร เป็นดังต่อไปนี้

1. การพัฒนาวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโคร

1.1 ผลการทดสอบขนาดสารตัวอย่างและปริมาตรรีเอเจนท์ที่เหมาะสม

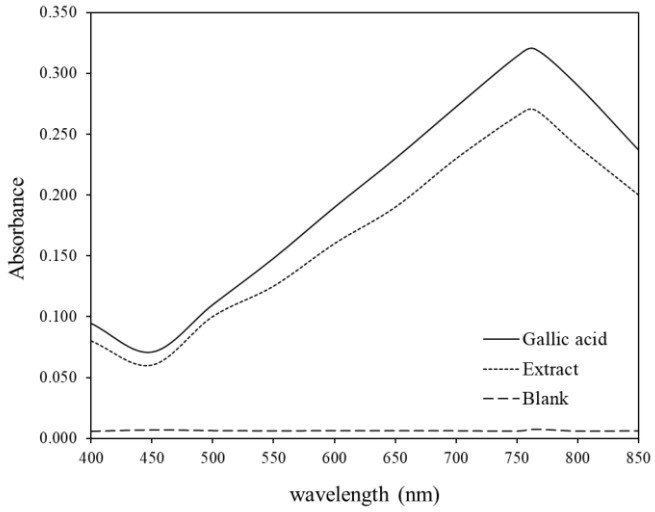
ผลทดสอบขนาดสารตัวอย่างและปริมาตรรีเอเจนท์ที่เหมาะสม เป็นดังตารางที่ 1 พบว่า แต่ละวิธีให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ไม่แตกต่างกัน (P>0.05) แสดงว่า การใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อย (100 ไมโครลิตร) และใช้รีเอเจนท์ปริมาตรน้อยลง ให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนท์ปริมาณมาก

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบขนาดสารตัวอย่างและปริมาตรรีเอเจนท์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ (n=3)

ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (μg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (A_{765})*			
	วิธีที่ 1 (มีโซ)	วิธีที่ 2 (มีโซ)	วิธีที่ 3 (มีโซ)	วิธีที่ 4 (เซมิไมโคร)
	2,000 mL (200 μL)	1,000 mL (100 μL)	200 mL (0.2 μL)	100 mL (0.1 μL)
25	0.157±0.004	0.161±0.009	0.152±0.006	0.153±0.002
50	0.321±0.005	0.327±0.008	0.316±0.007	0.319±0.002
75	0.459±0.008	0.453±0.010	0.444±0.001	0.450±0.001

หมายเหตุ * A_{765}ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

จากนั้นนำวิธีที่ได้ไปวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดใบรางแดงเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายแบลงค์ แล้วสแกนสเปกตรัมช่วงความยาวคลื่น 400-850 นาโนเมตร เพื่อดูความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุดของวิธีที่พัฒนาขึ้น ผลเป็นดังภาพที่ 2 พบว่า ทั้งสารมาตรฐาน และสารสกัดใบรางแดงให้รูปแบบสเปกตรัมที่เหมือนกัน และสามารถอ่านค่าความยาวคลื่นสูงสุดได้ที่ 765 นาโนเมตร



ภาพที่ 3 สเปกตรัมช่วงความยาวคลื่น 400-850 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดใบรางแดงเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายแบลงค์เอทานอลร้อยละ 70 โดยปริมาตร

1.2 ผลการทดสอบความเข้มข้นของรีเอเจนท์ที่เหมาะสม

ผลการทดสอบความเข้มข้นของรีเอเจนท์ที่ใช้ ได้แก่ Folin-Ciocalteu phenol reagent และ Na_2CO_3 ผลเป็นดังตารางที่ 2 สารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตรสูงสุด อย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05) ค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol

reagent ลดลง ในขณะที่สารละลาย Na_2CO_3 แต่ละความเข้มข้นให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกัน (P>0.05) แสดงว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Na_2CO_3 ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ ดังนั้น จึงเลือกใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร และสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 3.75 โดยมวลต่อปริมาตร สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

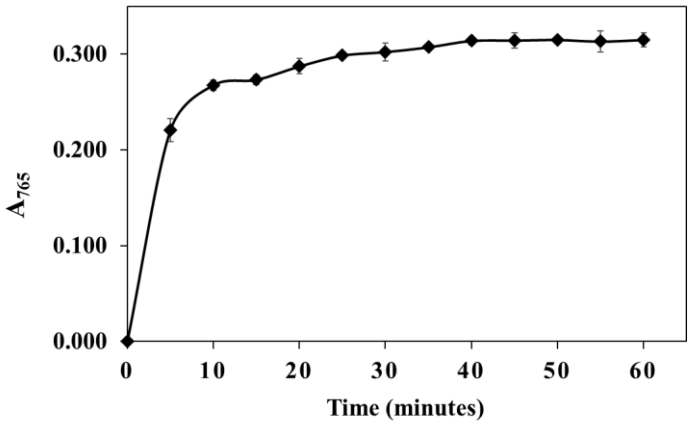
ตารางที่ 2 การทดสอบความเข้มข้นของรีเอเจนท์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ (n=3)

ความเข้มข้นสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent (%v/v)	ค่าการดูดกลืนแสง (A_{765}) ความเข้มข้น Na_2CO_3 (%w/v)		
	15	7.5	3.75
20	0.361±0.006[a]	0.359±0.003[a]	0.360±0.002[a]
10	0.322±0.002[b]	0.317±0.001[b]	0.320±0.002[b]
5	0.282±0.003[c]	0.292±0.008[c]	0.295±0.002[c]

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษ ([a, b, c]) ที่แตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05)

1.3 ผลการทดลองเวลาที่ใช้เข้าสู่สมดุล

เวลาที่ใช้เข้าสู่สมดุลของปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนสีน้ำเงินโมลิบดินัมบลูและทังสเตนบลู เป็นดังภาพที่ 4 และจากตารางที่ 3 ซึ่งแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ที่วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเวลาต่าง ๆ ทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test จะเห็นว่า ที่เวลาตั้งแต่ 30 นาที เป็นต้นไปค่าการดูดกลืนแสงจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) แต่เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นในช่วง 30-40 นาที มีค่ามากกว่าร้อยละ 1 แต่หลังเวลา 40 นาทีไปแล้ว ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นน้อยกว่าร้อยละ 1 แสดงว่า ปฏิกิริยาเข้าสู่สมดุลที่เวลา 40 นาที



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา

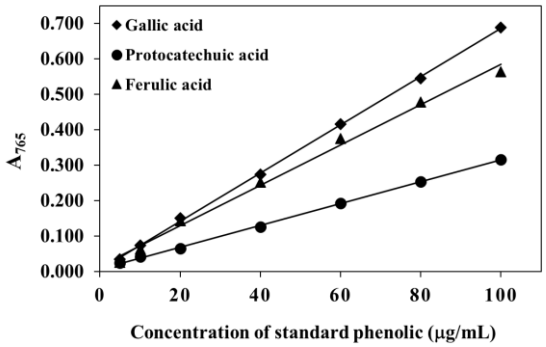
ตารางที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงกับเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาด้วยวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโครที่ทดสอบข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test (n=3)

เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสง (A_{765})*				%A ที่เพิ่มขึ้น
5	0.221±0.012				-
10		0.268±0.006			21.299
15		0.273±0.005			2.117
20			0.287±0.008		5.122
25			0.299±0.002	0.299±0.002	3.944
30				0.302±0.009	0.302±0.009	1.228
35				0.307±0.001	0.307±0.001	1.654
40					0.314±0.004	2.169
45					0.314±0.008	0.106
50					0.315±0.003	0.212
55					0.313±0.011	-0.529
60					0.3150.008	0.532

หมายเหตุ * A_{765} ที่อยู่ต่างคอลัมน์แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

1.4 ผลการทดสอบสารมาตรฐานที่เหมาะสม

การเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก กรดโปรโตคาเทชูอิก และกรดเฟอรูลิก ผลเป็นดังภาพที่ 5 และตารางที่ 4 ซึ่งกรดฟีนอลิกทั้ง 3 ชนิด พบมากในสารสกัดใบรางแดงที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัย (Srimoon, Anartgnam, & Tilarux, 2020) จากผลการทดลองพบว่า กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกและกรดโปรโตคาเทชูอิก มีค่า R^2>0.999 และ %RSD<5 และสูงกว่ากราฟมาตรฐานของกรดเฟอรูลิกอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) แสดงว่า กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกและกราฟมาตรฐานกรดโปรโตคาเทชูอิก มีความเป็นเส้นตรงสูง ความชันของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกมีค่าสูงกว่าความชันของกราฟมาตรฐานของกรดเฟอรูลิกและกราฟมาตรฐานกรดโปรโตคาเทชูอิก ตามลำดับ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากค่า R^2 และความชันของกราฟมาตรฐานแล้ว พบว่า กรดแกลลิก มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานในการเทียบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมต่อไป



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก กรดโปรโตคาเทชูอิก และกรดเฟอรูลิก

ตารางที่ 4 สมการถดถอยเชิงเส้นและค่า R^2 ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก กรดโปรโตคาเทชูอิก และกรดเฟอรูลิก (n=3)

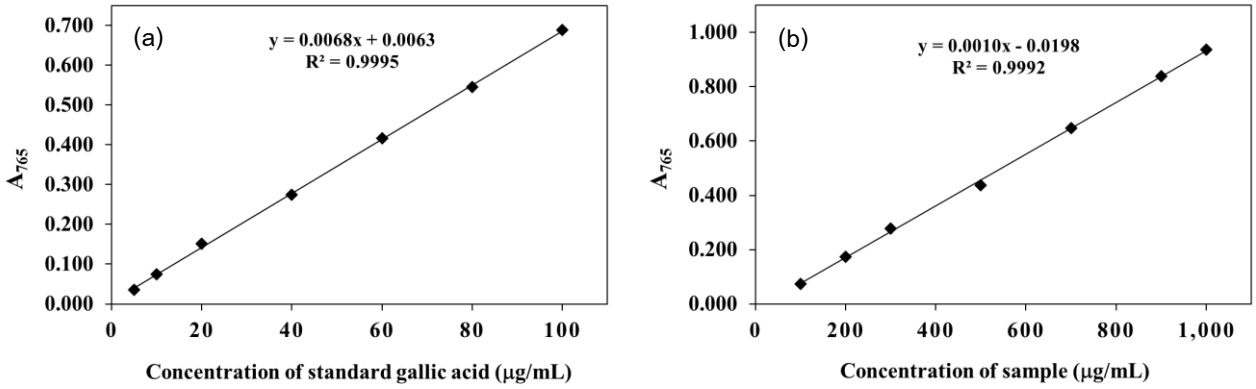
สารมาตรฐาน	สมการถดถอยเชิงเส้น	R^2
กรดแกลลิก	$y = 0.0068^{a} x + 0.0063$	0.9995^{a}
กรดโปรโตคาเทชูอิก	$y = 0.0031^{b} x + 0.0076$	0.9993^{a}
กรดเฟอรูลิก	$y = 0.0057^{c} x + 0.0162$	0.9943^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษ ($^{a, b, c}$) ที่แตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

2. ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการ

2.1 ความเป็นเส้นตรง

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโครที่พัฒนาได้ เป็นดังภาพที่ 6 และพารามิเตอร์ต่างๆ ในสมการถดถอยเชิงเส้นแสดงในตารางที่ 5 พบว่า วิธีการมีความเป็นเส้นตรงสูงพิจารณาจากค่า R^2>0.999 ทั้งกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกในช่วงความเข้มข้น 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกราฟมาตรฐานสารสกัดใบรางแดง ในช่วงความเข้มข้น 100-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของ (a) กรดแกลลิก และ (b) สารสกัดใบรางแดง

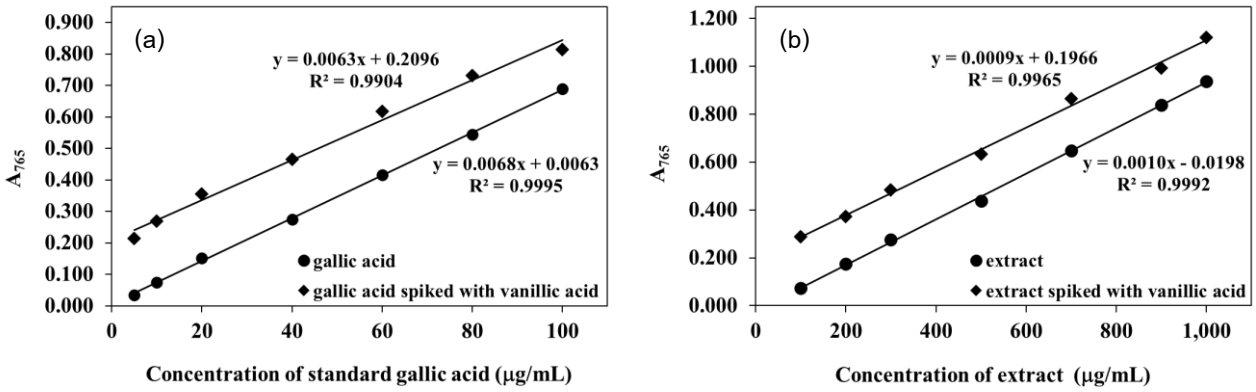
ตารางที่ 5 พารามิเตอร์ในสมการถดถอยเชิงเส้นและค่า R^2 ของสารมาตรฐานกรดแกลลิกและสารสกัดใบรางแดง (n=3)

พารามิเตอร์	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก	กราฟมาตรฐานสารสกัดตัวอย่างใบรางแดง
ความชัน	0.0068±0.0001	0.001±0.0001
จุดตัดแกน	0.0063±0.0017	-0.0198±0.0057
R^2	0.9995±0.0003	0.9992±0.0005

2.2 ความจำเพาะ

ความจำเพาะของวิธีการได้จากการเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกหรือสารสกัดใบรางแดงกับกราฟแสดงความจำเพาะที่ได้จากการเติมสารมาตรฐานภายในกรดวานิลลิกเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า กราฟมาตรฐานและกราฟแสดงความจำเพาะขนานกัน ดังภาพที่ 7 ความชันของกราฟมาตรฐานและกราฟแสดงความจำเพาะ

แตกต่างกันร้อยละ 0-5.91 ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ถือว่าวิธีการมีความจำเพาะโดยไม่มีผลรบกวนการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากสารอื่นในตัวอย่างใบรางแดง



ภาพที่ 7 กราฟมาตรฐานและกราฟแสดงความจำเพาะ (specificity curve) ของ (a) กรดแกลลิก และ (b) สารสกัดใบรางแดง

2.3 ขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (LOQ)

ผลการทดสอบค่า LOD และ LOQ ของวิธีที่พัฒนาได้ มีค่า 3.70 และ 11.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ %RSD ของความเข้มข้นแบลงค์ เท่ากับ 0.799 ซึ่งน้อยกว่าร้อยละ 5 ถือว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้นี้มี LOD และ LOQ ต่ำ ทำให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกปริมาณน้อย ๆ ได้ดี

2.4 ความแม่น

ความแม่นของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้แบบเซมิไมโคร มีร้อยละของการกลับคืน เป็นดังตารางที่ 5 พบว่า ความแม่นที่ความเข้มข้นกรดแกลลิก 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละของการกลับคืน และ %RSD อยู่นอกช่วงที่ยอมรับได้เล็กน้อย และพบว่า ความแม่นมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์เพิ่มขึ้น ถ้าความแม่นมีค่าร้อยละของการกลับคืนอยู่ในช่วง 90-110 และ %RSD<5 จะถือว่าวิธีการมีความแม่นยำสูง (ICH Guideline, 2017)

ตารางที่ 6 ความแม่นของวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโครที่พัฒนาได้ (n=3)

ความเข้มข้นกรดแกลลิกที่เติมลงใน	ร้อยละของการกลับคืน		
ตัวอย่าง (µg/mL)	ช่วง	เฉลี่ย	%RSD
10	82.11-93.07	86.97±5.58	6.42
50	94.69-104.37	99.21±4.87	4.91
100	96.74-105.31	99.83±4.76	4.77

2.5 ความเที่ยง

ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ เป็นดังตารางที่ 7 พบว่า ความเที่ยงของการทวนซ้ำในวันเดียวกัน (repeatability) มี %RSD ต่ำกว่าความเที่ยงของการทำซ้ำต่างวันกัน (reproducibility) และวิธี intermediate-precision method ตามลำดับ ($P \leq 0.05$) ปริมาณฟีนอลิกรวมที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกันไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่ค่าที่ได้จะแตกต่างกันหากมีการวิเคราะห์ต่างวันหรือใช้ผู้วิเคราะห์คนละคนและเครื่องมือคนละเครื่อง ($P \leq 0.05$) อย่างไรก็ตาม %RSD ของการทวนซ้ำในวันเดียวกันและการทำซ้ำต่างวันกันมีค่าน้อยกว่าร้อยละ 5 ถือว่าวิธีที่ใช้มีความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ส่วน %RSD ของ intermediate-precision method ตามมาตรฐานของ ICH ต้องไม่เกินร้อยละ 2 แต่จากผลการทดลองพบว่ามี %RSD >2 เมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ %RSD จะต่ำกว่า 2 เมื่อวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่า %RSD จะลดลงถ้าวิเคราะห์สารที่ความเข้มข้นสูงขึ้น

ตารางที่ 7 ความเที่ยงของวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโครที่พัฒนาได้

ความเข้มข้นกรดแกลลิก (μg/mL)	%RSD ของความเข้มข้นกรดแกลลิกที่วิเคราะห์ได้		
	repeatability (intra-day) (n=7)	reproducibility (inter-day) (n=3)	intermediate-precision method (n=7)
20	2.42[a]	3.63[b]	3.26[c]
40	2.03[a]	2.97[b]	2.07[a]
80	0.77[a]	2.41[b]	1.39[c]

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษ ([a, b, c]) ที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

2.6 ความคงทน

ความคงทนของวิธีวิเคราะห์ต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ในช่วง 20-50 องศาเซลเซียส ผลเป็นดังตารางที่ 8 พบว่า วิธีที่การมีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงที่ศึกษา %RSD อยู่ในช่วง 0.21-6.03 ความเข้มข้นกรดแกลลิกที่วิเคราะห์ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิไม่มีผลต่อวิธีการวิเคราะห์

ตารางที่ 8 ความคงทนของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้ต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน (n=3)

ความเข้มข้นกรดแกลลิก (μg/mL)	ความเข้มข้นที่กรดแกลลิกที่วิเคราะห์ได้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ* (μg/mL)					
	20 °C		อุณหภูมิห้อง (32±2) °C		50 °C	
	ค่าเฉลี่ย	%RSD	ค่าเฉลี่ย	%RSD	ค่าเฉลี่ย	%RSD
20	20.15±0.37	1.84	20.20±0.22	1.11	21.13±1.27	6.03
40	40.79±0.45	1.10	39.96±0.74	1.84	40.99±0.53	1.29
80	79.71±0.17	0.21	80.89±1.77	2.19	81.87±2.68	3.27

หมายเหตุ * ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)

สรุปผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโครที่พัฒนาได้ แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สรุปการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการ Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโคร

พารามิเตอร์ที่ทดสอบ		ผลการทดสอบ
ความเป็นเส้นตรง	สารมาตรฐานกรดแกลลิก ช่วงความเข้มข้น 5-100 μg/mL	$y = 0.0068x + 0.0063$ $R^2 = 0.9995$
	สารสกัดใบรางแดง ช่วงความเข้มข้น 100-1,000 μg/mL	$y = 0.0010x – 0.0198$ $R^2 = 0.9992$
ความจำเพาะ	สารมาตรฐานกรดแกลลิกที่เติมกรดวานิลลิก	$y = 0.0063x + 0.2096$ $R^2 = 0.9904$
	สารสกัดใบรางแดงที่เติมกรดวานิลลิก	$y = 0.0009x + 0.1966$ $R^2 = 0.9965$
LOD (μg/mL)		3.70
LOQ (μg/mL)		11.22
ความแม่น	%recovery	94.69-104.37
	%RSD	4.91
ความเที่ยง (%RSD)	repeatability (intra-day)	0.77-2.42
	reproducibility (inter-day)	2.41-3.63
	intermediate-precision	1.39-3.26
ความคงทน (ต่ออุณหภูมิ) (%RSD)		0.21-6.03

3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดใบรางแดง

เมื่อนำวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโครที่พัฒนาได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดใบรางแดงเทียบกับวิธีแบบมีโซ (meso method) ซึ่งใช้ปริมาตรมากกว่า 20 เท่า ผลเป็นดังตารางที่ 10 พบว่า ปริมาณฟีนอลิกรวมที่วิเคราะห์ได้มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ค่า %RSD=1.09 และมีร้อยละความคลาดเคลื่อน (%error)=1.00

ตารางที่ 10 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโครเทียบกับวิธีแบบมีโซ (n=3)

วิธีวิเคราะห์	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม* (mg GAE/g dw)
วิธีเซมิไมโคร (semi-micro method)	73.87±0.75
วิธีแบบมีโซ (meso method)	74.61±0.82

หมายเหตุ * ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

วิจารณ์ผลการวิจัย

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโคร ซึ่งใช้ปริมาณสารตัวอย่างและรีเอเจนท์ลดลงกว่าวิธีปกติ 20 เท่า พบว่า ขนาดสารตัวอย่างและปริมาตรรีเอเจนท์ที่เหมาะสม คือ สารตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร สารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent 250 ไมโครลิตร และ Na_2CO_3 100 ไมโครลิตร ให้ค่าการดูดกลืน

แสงไม่แตกต่างกับวิธีวิเคราะห์ที่ใช้สารปริมาตรมากกว่า (P>0.05) สเปกตรัมของสารมาตรฐานกรดแกลลิกและสารสกัดใบรางแดงมีลักษณะเหมือนกันและความยาวคลื่นสูงสุดมีค่า 765 นาโนเมตร เมื่อทดสอบความเข้มข้นของรีเอเจนท์ที่ใช้ พบว่า สารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 5 ตามลำดับ (P≤0.05) ในขณะที่สารละลาย Na_2CO_3 เข้มข้นร้อยละ 3.75 โดยมวลต่อปริมาตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างจากความเข้มข้นร้อยละ 7.5 และ 15 (P>0.05) แสดงว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Na_2CO_3 ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pereira, Arruda, & Pastore (2018) ที่ใช้สารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ Na_2CO_3 เข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร 800 ไมโครลิตร วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมในผักและผลไม้หลายชนิด ได้ค่าไม่แตกต่างจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu แบบดั้งเดิม และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย Na_2CO_3 มีผลต่อความแม่นและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์น้อยกว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent

จากการทดลองเวลาที่ใช้เข้าสู่สมดุลของปฏิกิริยาในช่วง 0-60 นาที พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเริ่มคงที่ที่เวลา 40 นาที ในการทดลองจึงทิ้งสารละลายไว้ 40 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เวลาที่ได้นี้ต่ำกว่าเวลาที่ใช้ในวิธี Folin-Ciocalteu ทั่วไปที่ใช้สารละลายปริมาตรมากกว่า ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เวลาเกิดปฏิกิริยา 60 นาที (Wong, Leong, & Koh, 2006; Srimoon, Anartgnam, & Tilarux, 2020) และ 120 นาที (Ainsworth & Gillespie, 2007) สำหรับการเปรียบเทียบความเหมาะสมของสารมาตรฐานในการเทียบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยพิจารณาจากค่า R^2 และความชันของกราฟมาตรฐาน พบว่า กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก มีค่า R^2 มากกว่า 0.999 ให้ความเป็นเส้นตรงสูง และมีความชันมากกว่ากราฟมาตรฐานกรดโปรโตคาเทชูอิกและกรดเฟอรูลิก แสดงว่าการใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานจะให้ความไว (sensitivity) ของการวิเคราะห์สูงกว่าสารมาตรฐานอีก 2 ชนิด ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของสาร 2 ความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกันได้ดี (Matić, Sabljić, & Jakobek, 2017) อย่างไรก็ตาม การเลือกสารมาตรฐานสำหรับเทียบหาปริมาณต้องพิจารณาว่าในตัวอย่างที่วิเคราะห์มีสารประกอบฟีนอลิกใดเป็นกลุ่มเด่น ก็ควรเลือกสารนั้นเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัยพบว่า ในตัวอย่างใบรางแดงพบกรดโปรโตคาเทชูอิก กรดเฟอรูลิก และกรดแกลลิก เป็นกลุ่มเด่น ดังนั้น การเลือกใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน จึงมีความเหมาะสม

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์แล้ว ก่อนนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างจริง ต้องทดสอบความใช้ได้ของวิธีการเพื่อยืนยันว่าวิธีที่พัฒนาได้มีความน่าเชื่อถือยอมรับได้ ซึ่งผลการทดสอบ พบว่า วิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโครมีความเป็นเส้นตรงสูง โดยพิจารณาจากค่า R^2 มากกว่า 0.999 ทั้งกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกในช่วงความเข้มข้น 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกราฟมาตรฐานของสารสกัดใบรางแดง ในช่วงความเข้มข้น 100-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงถือว่าวิธีการที่ใช้มีความเป็นเส้นตรงเป็นไปตามกฎของเบียร์และแลมเบิร์ตในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ ส่วนการทดสอบความจำเพาะของวิธีโดยการเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกหรือสารสกัดใบรางแดงกับกราฟแสดงความจำเพาะที่ได้จากการเติมสารมาตรฐานภายในกรดวานิลลิกลงไป พบว่า กราฟมาตรฐานและกราฟแสดงความจำเพาะมีลักษณะขนานกัน ความชันของกราฟทั้งสองไม่แตกต่างกัน (P>0.05) จึงถือว่าวิธีการมีความจำเพาะ อย่างไรก็ตามความจำเพาะที่ได้นี้แสดงถึง

เมทริกซ์ (matrix) ของสารในตัวอย่างสารสกัดใบรางแดงไม่มีผลรบกวนการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธีที่พัฒนาได้ แต่ไม่แสดงถึงความจำเพาะต่อชนิดหรือสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มย่อยแต่อย่างใด

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (LOQ) มีค่า 3.70 และ 11.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าที่ได้ใกล้เคียงกับ LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu แบบไมโครของ Matić, Sabljić, & Jakobek (2017) ซึ่งใช้ตัวอย่างปริมาตรเพียง 20 ไมโครลิตร LOD และ LOQ อยู่ในช่วง 0.47-2.14 และ 1.41-6.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ถือว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้ในครั้งนี้มีขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการวัดปริมาณที่ต่ำ ทำให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกปริมาณน้อย ๆ ได้ดี

การทดสอบความแม่นของวิธีการ พบว่า ความแม่นที่ความเข้มข้นกรดแกลลิก 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับค่า LOQ มีค่าร้อยละของการกลับคืน และ %RSD อยู่นอกช่วงที่ยอมรับได้เล็กน้อย แต่ความแม่นของการวิเคราะห์จะเพิ่มขึ้นเมื่อวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ถ้าความแม่นมีค่าร้อยละของการกลับคืนอยู่ในช่วง 90-110 และ %RSD<5 จะถือว่าวิธีการมีความแม่นยำสูง (ICH Guideline, 2017) ดังนั้น จากผลการทดลองจึงถือว่าวิธีการที่ใช้มีความแม่นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และมีความแม่นใกล้เคียงกับวิธี Folin-Ciocalteu แบบมีโซของ Blainski, Lopes, & De Mello (2013) ซึ่งมีค่า ร้อยละของการกลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 89.9-101.6 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ในรูปของความสามารถในการทวนซ้ำในวันเดียวกัน (repeatability) ความสามารถในการทำซ้ำต่างวันกัน (reproducibility) และ intermediate-precision method ของผู้ทดลองคนละคนและเครื่องมือวิเคราะห์คนละเครื่อง พบว่า ความเที่ยงของการทวนซ้ำในวันเดียวกันมีค่า %RSD ต่ำกว่าความเที่ยงของการทำซ้ำต่างวันกัน และ intermediate-precision method ตามลำดับ ($P \leq 0.05$) นอกจากนี้ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกันไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่ค่าที่ได้จะแตกต่างกันมากขึ้นหากมีการวิเคราะห์คนละวันกันหรือใช้ผู้วิเคราะห์คนละคน ($P \leq 0.05$) แสดงให้เห็นว่า มีความแปรผันในการวิเคราะห์ต่างวันกันและระหว่างผู้วิเคราะห์มากกว่า ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกด้วยวิธี differential pulse voltammetric (DPV) ของ Magarelli *et al.* (2013) ที่พบว่า ความเที่ยงของการทำซ้ำต่างวันมีค่าสูงกว่าความเที่ยงของการทวนซ้ำในวันเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ความเที่ยงทั้ง 2 กรณี มี %RSD<5 ยังถือว่าวิธีที่ใช้มีความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ในขณะที่ %RSD ที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ของ ICH ของ intermediate-precision method ต้องไม่เกินร้อยละ 2 แต่จากผลการทดลองพบว่ามี %RSD>2 ที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ %RSD<2 ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาแนวโน้มของ %RSD พบว่า %RSD จะลดลงถ้าวิเคราะห์สารที่ความเข้มข้นสูงขึ้น สอดคล้องกับผลการทดลองความแม่นข้างต้น แสดงว่า ความแม่นและความเที่ยงของการวิเคราะห์จะสูงขึ้นถ้าสารที่ต้องการวิเคราะห์มีปริมาณมากพอควร

การทดสอบความคงทนของวิธีที่ใช้ต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 20-50 องศาเซลเซียส พบว่า วิธีการมีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงที่ศึกษา โดย %RSD อยู่ในช่วง 0.21-6.03 แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโครที่พัฒนาได้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Pereira, Arruda, & Pastore (2018) ที่พบว่า การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อความแม่นและความเที่ยงของการทดลอง ดังนั้น การวิเคราะห์จึงสามารถทำได้ในอุณหภูมิห้องปกติ

เมื่อนำวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโครที่พัฒนาได้นี้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดใบรางแดงเทียบกับวิธี Folin-Ciocalteu แบบมีโซ ซึ่งใช้สารปริมาณมากกว่า พบว่า ปริมาณฟีนอลิกรวมที่วิเคราะห์ได้มีค่าไม่แตกต่างกัน (P>0.05) ค่า %RSD เท่ากับ 1.09 และมี %error เท่ากับ 1.00 แสดงว่า วิธีการที่พัฒนาได้แบบเซมิไมโคร ซึ่งใช้สารละลายตัวอย่างปริมาตรน้อย เพียง 100 ไมโครลิตร และใช้รีเอเจนท์ปริมาณน้อย สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในใบรางแดงได้โดยให้ผลไม่แตกต่างกับวิธี Folin-Ciocalteu ที่ใช้โดยทั่วไป ทำให้สามารถลดการใช้สารเคมีและลดเวลาการวิเคราะห์ลงได้

สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาวิธี Folin-Ciocalteu แบบเซมิไมโคร (semi-micro method) โดยใช้สารตัวอย่างและรีเอเจนท์ปริมาณน้อย มีความแม่น ความเที่ยง และความคงทนสูง สามารถวิเคราะห์ได้โดยมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ มีความจำเพาะโดยเมทริกซ์หรือสิ่งรบกวนในตัวอย่างไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตาม วิธี Folin-Ciocalteu ไม่จำเพาะต่อชนิดของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละกลุ่ม เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์ปริมาณรวมเท่านั้น นอกจากนี้ LOD และ LOQ มีค่าต่ำแสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจวัดสารที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้ดี เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดตัวอย่างใบรางแดง พบว่า ได้ผลไม่แตกต่างกับวิธี Folin-Ciocalteu ที่ใช้ทั่วไป โดยวิธีเซมิไมโครที่พัฒนาได้ในครั้งนี้มีข้อดี คือ ใช้สารตัวอย่างปริมาตรน้อยเหมาะแก่การวิเคราะห์ที่มีสารตัวอย่างอยู่จำกัด ใช้รีเอเจนท์ในการทำปฏิกิริยาน้อยลงจึงมีของเสียเกิดขึ้นจากการทดลองน้อย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้น มีความปลอดภัย และลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ ยังสามารถลดเวลาในการทำปฏิกิริยาลงเหลือเพียง 40 นาที ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็วขึ้น จึงเหมาะแก่การนำไปใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในตัวอย่างสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไปได้เป็นอย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทางสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์และเทคโนโลยีชีวภาพในการเอื้อเฟื้อสถานที่ทำการวิจัย และวิสาหกิจชุมชนในตำบลเกาะเกร็ด จังหวัดนนทบุรี สำหรับการอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

Ainsworth, E.A., & Gillespie, K.M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, *2*(4), 875-877.

Blainski, A., Lopes, G.C., & De Mello, J.C.P. (2013). Application and analysis of the Folin-Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, *18*, 6852-6865.

Bland, J.S. (1995). Oxidants and antioxidants in clinical medicine: past, present, and future potential. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine*, *5*, 255-280.

Christian, G.D. (1994). *Analytical Chemistry*. 5th edition. New Jersey: John Wiley & Sons.

Clcco, N., Lanorte, M.T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V.A. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal, 91*(1), 107-110.

Hu, M.L. (2011). Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung Medical Journal*, *34*, 449-459.

ICH Guidelines. (2017). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1).* Retrieved May 5, 2020, from http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf

Keaney, J.F., & Frei, B. (1994). Chapter 11: Antioxidant protection of low density lipoprotein and its role in the prevention of atherosclerotic vascular disease. In: Frei, B. (Ed.), *Natural Antioxidants in Human Health and Disease.* (pp 303-351). San Diego: Academic Press.

Leu, S.J., Lin, Y.P., Lin, R.D., Wen, C.L., Cheng, K.T., Hsu, F.L., & Lee, M.H. (2006). Phenolic constituents of *Malus doumeri* var. formosana in the field of skin care. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *29*, 740-745.

Magarelli, G., Da Silva, J.G., De Sousa-Filho, I.A., Lopes, I.S.D., De Souza, J.R., Hoffmann, L.V., & De Castro, C.S.P. (2013). Development and validation of a voltammetric method for determination of total phenolic acids in cotton cultivars. *Microchemical Journal*, *109*, 23-28.

Matić, P., Sabljić, M., & Jakobek, L. (2017). Validation of spectrophotometric methods for the determination of total polyphenol and potal flavonoid content. *Journal of AOAC International*, *100*(6), 1795-1803.

Martinez, M.E. (2005). Primary prevention of colorectal cancer: lifestyle, nutrition, exercise. *Recent Results in Cancer Research*, *166*, 177-211.

Medina, M.B. (2011). Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59*, 1565-1571.

Pereira, G.A., Arruda, H.S., & Pastore, G.M. (2018). Modification and validation of Folin-Ciocalteu assay for faster and safer analysis of total phenolic content in food samples. *Brazilian Journal of Food Research, 9*(1), 125-140.

Sánchez-Rangel, J.C., Benavides, J., Heredia, J.B., Cisneros-Zevallosc, L., & Jacobo-Velázquez, D.A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods, 5*, 5990-5999.

Shori, A.B. (2015). Screening of antidiabetic and antioxidant activities of medicinal plants. *Journal of Integrative Medicine, 13*(5), 297-305.

Srimoon, R., Anartgnam, P., & Tilarux, P. (2020). *In vitro* inhibitory efficiency of *Ventilago denticulata* Willd. dried leaves extract on alpha-glucosidase, alpha-amylase and lipase and antioxidant activities. *Science & Technology Asia, 25*(4), *in press*.

Temkitthawon, P., Viyoch, J., Limpeanchob, N., Pongamornkul, W., Sirikul, C., Kumpila, A., Suwanborirux, K., & Ingkaninan, K. (2008). Screening for phosphodiesterase inhibitory activity of Thai medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology, 119*, 214-217.

Wong, S.P., Leong, L.P., & Koh, J.H.W. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry, 99*, 775-783.