

ที่ อว ๐๖๕๖.๑๒/๑๔๐๗



คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ
เลขที่ ๖๐ หมู่ ๓ ถนนสายเอเชีย
ตำบลหันตรา อำเภอพระนครศรีอยุธยา
จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ๑๓๐๐๐

๒๘ ธันวาคม ๒๕๖๓

เรื่อง ตอบรับบทความ

เรียน คุณปริยาพร อุ่มชะอุ่ม และคณะ อ.สุรางค์รัตน์ พันแสง

ตามที่ท่านได้ส่งบทความมายัง “การประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ ๕ (The 5th National Conference on Science and Technology)” โดยมีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ เป็นเจ้าภาพจัดการประชุมวิชาการ ซึ่งกำหนดจัดระหว่างวันที่ ๑๕ – ๑๖ มกราคม ๒๕๖๔ ในรูปแบบออนไลน์ ผ่าน Google Meet รายละเอียดดังนี้

เลขรหัสบทความ: NCOST5-S040

ชื่อบทความ: การศึกษาวิธีการสกัดและองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของ *Hiptage candicans* Hook.f.

คณะกรรมการจัดการประชุมวิชาการขอแจ้งว่า บทความของท่านได้รับการตอบรับให้นำเสนอในภาคบรรยาย (Oral Presentation) และได้รับการตีพิมพ์บทความฉบับเต็ม (Full Paper) ในรายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการ (Proceedings) โดยขอให้ท่านดำเนินการ ดังนี้

๑. ส่งบทความฉบับสมบูรณ์ที่ปรับแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ประเมินบทความ (ในกรณีที่ต้องปรับแก้) มายัง Email: ncost@rmutsb.ac.th ภายในวันที่ ๖ มกราคม ๒๕๖๔ โดยใช้แบบฟอร์มจากเว็บไซต์ http://sci.rmutsb.ac.th/ncost/?page_id=113

๒. ชำระเงินค่าลงทะเบียน พร้อมทั้งส่งสำเนาหลักฐานการชำระเงิน มายัง Email: ncost@rmutsb.ac.th โดยสามารถเริ่มชำระเงินได้ตั้งแต่วันที่ ๑ ธันวาคม ๒๕๖๓ – ๘ มกราคม ๒๕๖๔

สำหรับข้อมูลเพิ่มเติมสามารถเข้าดูได้ที่ <http://sci.rmutsb.ac.th/ncost/>

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

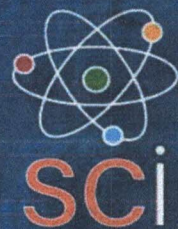
เบญจพร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เบญจพร สว่างศรี)

เลขานุการการประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ ๕
The 5th National Conference on Science and Technology



V COST 2021

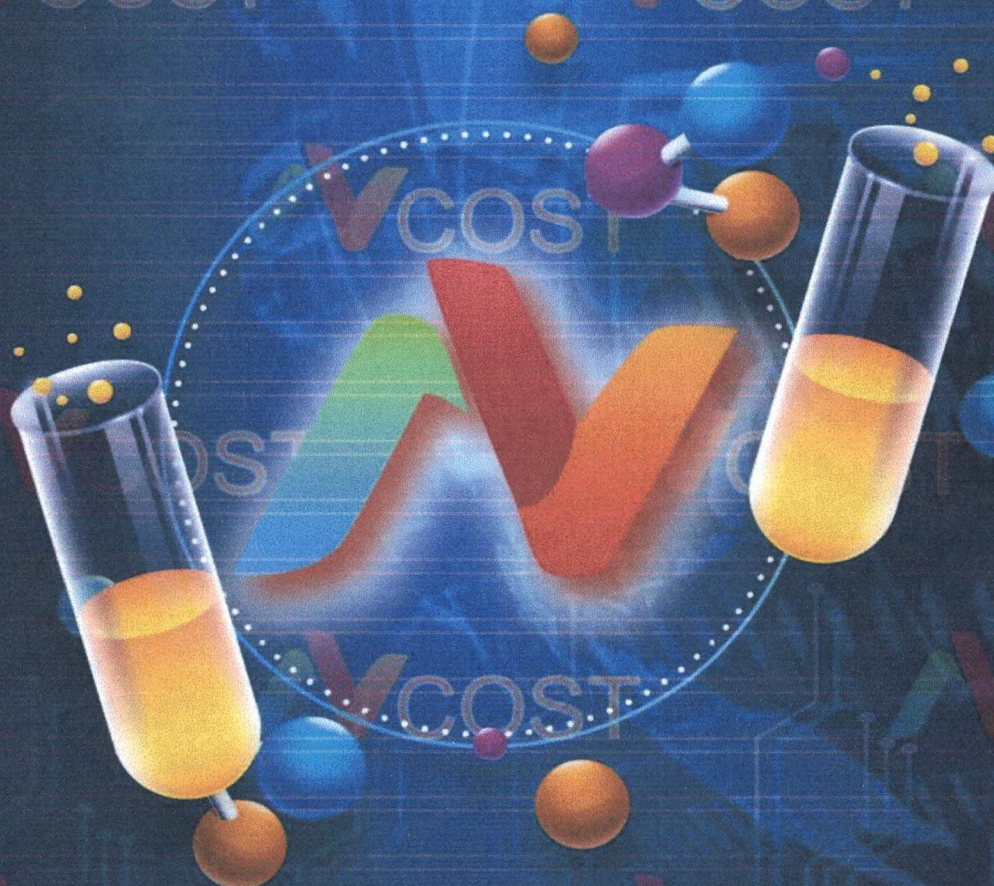


เอกสารประกอบการประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 5

Proceedings of the 5th National Conference on Science and Technology

วันที่ 15-16 มกราคม พ.ศ. 2564

ISBN (e-Book) : 978-974-625-920-0



V COST จัดทำโดย V COST
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

การศึกษาวิธีการสกัด สารฟลักซ์เคมีเบื้องต้น และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ของกำลังช้างเผือก (*Hiptage candicans* Hook.f.)

Extraction, Phytochemical Screening and Antioxidant Activity
of *Hiptage candicans* Hook.f.

ปริยาพร อุ่มชะอุม¹ กิตติยากร ชาวสวน¹ พวงผกา แก้วกรม² และสุรางค์รัตน์ พันแสง^{2*}

Preeyaporn Aumchaaum¹ Kittiyakorn Chawsoun¹ Puangpaka Kaewkrom² and Surangrat Punsang^{2*}

¹ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

^{2*} สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

* Surangrat_aejung@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฟลักซ์เคมีเบื้องต้น ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากส่วนใบของกำลังช้างเผือก (*Hiptage candicans* Hook.f.) ด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี วิธีที่หนึ่ง คือ สกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลอย่างเดียว (L) วิธีที่สองสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (UL) และวิธีที่สามสกัดแบบซอกเลต (SL) ผลการทดลองพบว่า การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลร่วมกับเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง ให้ผลเป็นร้อยละได้ดีที่สุดประมาณร้อยละ 90.67 เนื่องจากคลื่นเสียงความถี่สูงทำให้ตัวทำละลายมีการสั่นสะเทือน ช่วยให้โมเลกุลของตัวทำละลายเคลื่อนตัวได้เร็วขึ้นและแทรกซึมได้ลึกมากขึ้น การทดสอบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้น พบแทนนิน ฟลาโวนอยด์ แอลคาลอยด์ คูมารินส์ และฟีนอล สารสกัดจากใบมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด L = 250.77±0.05, UL = 280.80±0.02 และ SL = 669.13±0.21 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging โดยมีค่า IC₅₀ L = 161.56±5.17, UL = 147.63±1.63 และ SL = 139.18±0.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ: ควายเก่าแม่ เอทานอล คลื่นความถี่สูง ซอกเลต

ABSTRACT

The aim of this present study is to screen the phytochemical content, total phenolic content and antioxidant activity from leaves of *Hiptage candicans* Hook.f. were studied by using three methods. In the first method, only ethanol was used as the solvent (L). In the second method, ethanol along with ultrasonication was attempted (UL). In the third method, Soxhlet extraction with ethanol as the solvent was conducted (SL). The results showed that the percentage yield was highest at around 90.67% when *Hiptage candicans* Hook.f. was extracted with ethanol along with ultrasonication. The high yield was attributed to the enhancement of high frequency movement of the solvent by ultrasonication, so that the molecules of solvent can move faster and diffuse more deeply into the matrix of *Hiptage candicans* Hook.f.. The preliminary phytochemical group

test revealed that the presence of tannins, flavonoids, alkaloids, cumarins and phenol. The extracts from leaves showed the highest total phenolic L= 250.77 ± 0.05 , UL= 280.80 ± 0.02 and SL = 669.13 ± 0.21 mg GAE/g extract. The antioxidant activity using DPPH radical scavenging method extracts from leaves of *Hiptage candicans* Hook.f. showed the highest antioxidant activity with IC₅₀ values of L= 161.56 ± 5.17 , UL = 147.63 ± 1.63 and SL = 139.18 ± 0.09 µg/mL.

Keywords: *Hiptage candicans* Hook.f., Ethanol, Ultrasonic, Soxhlet

1. บทนำ

ในปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระ มีจำเป็นอย่างมากต่อร่างกาย เนื่องจากอนุมูลอิสระสร้างความเสียหายให้กับร่างกาย เซลล์ต่างๆเสียหาย ทำให้ร่างกายเกิดการเจ็บป่วยและโรคภัยที่ตามมา พืชและพืชสมุนไพรเป็นแหล่งสารพฤกษเคมีที่สำคัญ ซึ่งมนุษย์ได้นำมาใช้ประโยชน์ทางด้านยารักษาโรค โดยสารพฤกษเคมี มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ[1]ที่จะทำการรักษา ได้แก่ แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (anthraquinone glycoside) สารประกอบฟีนอลิก (phenolic) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน [2] และเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมารักษาและป้องกันการเกิดโรค [3] ควายแก้วแม่เป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญ ที่พบได้ทั้งในอินเดีย ออสเตรเลีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ใบเป็นใบเดี่ยว แทงออกมาจากลำต้นใต้ดิน แผ่นใบเป็นรูปหัวใจหรือรูปสามเหลี่ยมคล้ายหัวลูกศร ปลายใบแหลม โคนใบมนเว้า ดอก ออกเป็นช่อแบบช่อกระจุก มีแผ่นใบประดับสีเขียวรองรับดอกย่อย 15-16 ดอก กลีบดอกเป็นสีน้ำเงินปนม่วง สีฟ้าปนม่วงหรือมีสีขาว ออกดอกในช่วงประมาณเดือนพฤษภาคมถึงเดือนพฤศจิกายน ผลเป็นแบบแคปซูล ลักษณะเป็นรูปรี หั้วและแตกได้สรรพคุณ ใบใช้สำหรับพอกฝีหลังจากฝีแตกแล้ว น้ำคั้นจากรากใช้แก้ปวดท้อง ท้องบิด และปวดฟัน [4]

การสกัดสารจากวัสดุธรรมชาติ มีหลายกระบวนการ โดยทั่วไปใช้สารละลายอินทรีย์เอทานอลร่วมกับวิธีการต่าง ๆ เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของสาร เช่น การให้ความร้อน การกวน การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง [5] ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยจึงมุ่งเน้นศึกษาวิธีการสกัด สารพฤกษเคมี ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของก้างช้างเผือก โดยใช้วิธีการสกัด 3 วิธี วิธีที่หนึ่ง คือ สกัดโดยตัวทำละลายเอทานอลอย่างเดียว วิธีที่สองสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง และวิธีที่สามสกัดแบบซอกเลต เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาสารสกัดก้างช้างเผือกให้เกิดประโยชน์สูงสุด

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ก้างช้างเผือก หรือควายแก้วแม่ (*Hiptage candicans* Hook.f.) เป็นไม้พุ่มหรือไม้เถาขนาดใหญ่สามารถเลื้อยไปได้ไกลและรวดเร็ว เถาเป็นสีเขียว ลักษณะกลมเกลี้ยง เนื้อไม้แข็ง ลำต้นแตกกิ่งก้านเล็กและห้อยลงทรงต้นมีรูปร่างไม่แน่นอน ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ดและวิธีการตอนกิ่ง สามารถพบได้ตั้งแต่ประเทศอินเดีย จีน มาเลเซีย รวมถึงประเทศไทย ซึ่งในประเทศไทยจะพบได้ทุกภาค โดยจะขึ้นตามป่าผลัดใบ ป่าดิบเขา และป่าชายหาด ตั้งแต่ระดับใกล้น้ำทะเลไปจนถึง 2,000 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยวออกเรียงตรงข้ามกัน ลักษณะของใบเป็นรูปรีแกมขอบขนาน ปลายใบแหลม โคนใบสอบ ส่วนขอบใบเรียบ ใบมีขนาดกว้างประมาณ 4-6 เซนติเมตรและยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร แผ่นใบด้านบนเกลี้ยง ส่วนท้องใบมีขน มีต่อมเล็ก ๆ อยู่ใกล้ฐานใบ ดอกเป็นช่อตาม

ชอกใบและปลายกิ่ง ช่อดอกยาวประมาณ 9-22 เซนติเมตร ดอกเป็นสีขาวหรือสีชมพูอ่อน กลางดอกเป็นสีเหลือง มีกลิ่นหอมแบบอ่อน ๆ คล้ายกลิ่นดอกส้มโอ มีกลีบดอก 5 กลีบขนาดไม่เท่ากัน กลีบข้างจะพับลง ปลายกลีบจักเป็นฝอย กลีบดอกมักอยู่เดี่ยว ดอกมีเกสรเพศผู้จำนวน 10 ก้าน และมี 1 ก้าน ที่ยาวเป็นพิเศษ ส่วนกลีบเลี้ยงหรือกลีบรองดอกมี 5 กลีบโคนเชื่อมติดกัน มีกลีบหนึ่งมีต่อมนูน ดอกจะบานอยู่ได้ประมาณ 3-4 วันแล้วก็ร่วง และจะมีดอกใหม่ทยอยบานอยู่เรื่อย ๆ โดยจะออกดอกในช่วงช่วงฤดูหนาวคือช่วงเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ แต่บางทีก็จะออกดอกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน ผลเป็นผลแห้งไม่แตก เป็นสีแดง ลักษณะของผลเป็นรูปกระสวย ปลายแหลม มีปีก 3 ปีก ปีกกลางมีขนาดใหญ่

การทดสอบการต้านออกซิเดชันมีด้วยกันหลายวิธี ซึ่งหนึ่งวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ วิธี DPPH free radical scavenging assay โดยใช้ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นได้ โดยสารละลาย DPPH ซึ่งมีสีม่วง ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ในระยะเวลาที่กำหนด พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสารละลายจากสีม่วงเป็นสีเหลือง เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร พบว่าความสามารถในการดูดกลืนแสงลดลง บ่งบอกถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) เป็นกลุ่มสารที่พบมากในพืชมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ ป้องกันความเสียหายที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเลต และป้องกันการสร้างสารก่อมะเร็ง สารกลุ่มนี้ถูกจำแนกตามโครงสร้างทางเคมีออกเป็นกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม ซึ่งสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นหนึ่งในกลุ่มย่อยเหล่านี้ที่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นอาหาร ยา และเครื่องสำอางอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

3. วิธีการวิจัย

1. วัตถุประสงค์

กำลังช้างเผือกหรือควายแก้วแม่ (*Hiptage candicans* Hook.f.) ไม้พุ่มหรือไม้ต้นขนาดเล็กในอาณาจักรพืช (Plantae) วงศ์ MALPIGHIACEAE โดยใช้ส่วนของใบ (L) เก็บตัวอย่างจากสำนักสงฆ์ดอยนางแล ตำบลลงขวาง อำเภอลำสัก จังหวัดเพชรบูรณ์



ภาพที่ 1 ลักษณะของ *Hiptage candicans* Hook.f.

2. การเตรียมตัวอย่างก่อนสกัด

นำตัวอย่าง *Hiptage candicans* Hook.f. นำส่วนของใบ อบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส บดตัวอย่างให้ได้ตามขนาดที่ต้องการ 425 ไมโครเมตร

3. วิธีการสกัด

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ ผสมกับเอทานอลความเข้มข้น 30% โดยปริมาตร [6] ที่อัตราส่วนมวลสารตัวอย่างต่อเอทานอล 0.5 กรัม : 50 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยวิธีการสกัด 3 แบบ

วิธีที่ 1 สกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลอย่างเดียว ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

วิธีที่ 2 สกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลร่วมกับเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูงที่ความถี่ 44-48 KHz เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 3 สกัดแบบ Soxhlet เป็นเวลา 2 ชั่วโมง อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

สารที่สกัดได้นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman filter paper No.1 นำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบด้วยเอทานอล (ethanolic crude extract) นำสารสกัดที่ได้มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คำนวณหาปริมาณสารสกัด (% Yield Crude Extract) จากสมการ

$$\text{Percent yield} = a/b \times 100$$

a = น้ำหนักที่สกัดได้ (กรัม)

b = ปริมาณที่ใช้ในการสกัด (กรัม)

4. การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ มาตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น ได้แก่ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ แอลคาลอยด์ ซาโปนิน คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ คูมารินส์ และฟีนอล ใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน [7,8] ดังนี้

4.1 การตรวจสอบแทนนิน ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ กรอง หยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_3) 2-3 หยด ลงไปในของเหลว หากปรากฏสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำ แสดงว่า พบแทนนิน

4.2 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายสารสกัดด้วยสารละลายเอทานอล 50% 3 มิลลิลิตร ใส่หลอดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 2-3 ชิ้น นำไปต้ม และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) ให้สารละลายสีเหลือง ส้ม หรือแดง แสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

4.3 การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์ ใช้การทดสอบซาลโควสกี (Salkowski test) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ครั้งละ 3-5 มิลลิลิตร 2-3 ครั้ง เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เขย่า ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริก (conc. H_2SO_4) หากเกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลาย แสดงว่าพบเทอร์ปีนอยด์

4.4 การตรวจสอบสเตียรอยด์ ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรองเติมกรดแกลเชียลแอซิดิก เขย่า แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น หากปรากฏเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียว แสดงว่าพบสเตียรอยด์

4.5 การตรวจสอบแอลคาลอยด์ ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยกรดซัลฟิวริก 15 มิลลิลิตร (2% H_2SO_4) นำไปอุ่น 2-3 นาที กรอง นำของเหลวไปหยดน้ำยาตราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) ปรากฏตะกอนสีส้มแดง แสดงว่าพบแอลคาลอยด์

4.6 การตรวจสอบซาโปนิน ใช้การทดสอบฟอง โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด กรอง นำของเหลวมาเติมน้ำกลั่น 2-3 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง หากมีฟองเกิดขึ้น แสดงว่าพบซาโปนิน

4.7 การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ส่วน ส่วนตามโครงสร้างพื้นฐานของคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ คือ ส่วนสเตียรอยด์ ส่วนวงแหวนแอลกอฮอล์ไม่อิ่มตัวและส่วนน้ำตาลที่ออกซิการทดสอบทำได้ดังนี้ ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม สกัดสีออกด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 2-3 ครั้ง ละลายสารสกัดด้วยเอทานอล 80% ทดสอบส่วนสเตียรอยด์ด้วยการทดสอบลิเบอร์แมน (Liebermann test) โดยการเติมกรดกลacialแอซิดิก (glacial acetic acid) 3 หยด ถ้าปรากฏสีน้ำเงินหรือสีเงินเขียว แสดงว่าพบสเตียรอยด์ ทดสอบส่วนวงแหวนแอลกอฮอล์ไม่อิ่มตัวด้วยน้ำยาเคดเด (Kedde reagent) จะให้สีม่วง และทดสอบส่วนน้ำตาลที่ออกซิด้วยการทดสอบเคลเลอร์ คิลยานี (Keller Kiliani test) ซึ่งประกอบด้วยกรดกลacialแอซิดิก สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ กรดซัลฟิวริกเข้มข้น จะปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก

4.8 การตรวจสอบคูมารินส์ ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมนิโคติคไฮดรอกไซด์ 10% หากปรากฏสารละลายสีเหลือง แสดงว่าพบคูมารินส์

4.9 การตรวจสอบฟีนอล ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น หยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 10% หากปรากฏสารละลายสีฟ้าหรือเขียว แสดงว่าพบฟีนอล

5. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และการทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี

DPPH assay

5.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolics compound) ตามวิธีการของ Re et.al., (1999) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในตัวอย่าง ด้วย Folin-Ciocalteu's reagent โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 100 μ l (ละลายตัวอย่างด้วย 0.1% HCl ใน 80% methanol) ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu's reagent 500 μ l แล้วเติม sodium carbonate (75 g/l) 400 μ l ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm แล้วปิเปตเอาสารละลายข้างบนมา 200 μ l แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเทียบจากกราฟมาตรฐานของ gallic acid (gallic acid equivalent, GAE)

5.2 การทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay ดัดแปลงจากวิธีการของ Farrukh et.al., (2006) เตรียมสารละลายสารสกัดตัวอย่าง (stock) โดยละลายในเอทานอล (sonicate 10 นาที) แล้วกรองผ่าน filter ขนาด 0.45 ไมครอน เจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ 5-6 ความเข้มข้น (100-10,000 μ g/ml) การทดสอบให้ปิเปตสารตัวอย่างละลายแต่ละความเข้มข้น 100 μ l ใส่ใน 96 well plate เติมน้ำ DPPH (2.4 mg/100 ml ในเอทานอล) ต้องเติมแต่ละ well ในเวลาใกล้เคียงกัน โดยใช้ multichannel จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที นำไปวัดค่า absorbance ที่ 520 nm โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT (Butylated hydroxytoluene) ความเข้มข้น 12.5-100 μ g/ml

คำนวณหาค่า % inhibition = $(1 - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}) / 100$

แล้วนำมาคำนวณหาค่า IC₅₀ (The 50% inhibitory of the concentration)

4. ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 การเตรียมสารสกัดจาก *Hiptage candicans* Hook.f.

สารสกัดจากส่วนของใบ *Hiptage candicans* Hook.f. โดยวิธีการสกัด 3 แบบ พบว่า การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลร่วมกับเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูงให้ผลเป็นร้อยละได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นการสกัดแบบชอกเล็ด และสกัดแบบเอทานอล ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 น้ำหนักสารสกัดและผลได้เป็นร้อยละ (percentage yield)

วิธีการสกัด สารสกัด	เอทานอลอย่างเดี่ยว (L)	เอทานอลร่วมกับ เครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง (UL)	สกัดแบบ Soxhlet (SL)
น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	3.92	5.44	5.38
ผลได้เป็นร้อยละ	65.34	90.67	89.67

ตอนที่ 2 การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบสารพฤษเคมีจาก *Hiptage candicans* Hook.f. โดยวิธีการสกัด 3 แบบ (ตารางที่ 2) พบว่ามีแทนนิน ฟลาโวนอยด์ คูมารินส์ และฟีนอล

ตารางที่ 2 การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น

สารพฤษเคมี	สารสกัดหยาบจากส่วนของใบ		
	เอทานอลอย่างเดี่ยว (L)	เอทานอลร่วมกับ เครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง (UL)	สกัดแบบ Soxhlet (SL)
แทนนิน	+++	+++	+++
ฟลาโวนอยด์	++	++	+
เทอร์ปีนอยด์	-	+	-
สเตียรอยด์	-	-	+
แอลคาลอยด์	+	-	+
ซาโปนิน	+++	-	-
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	-	+	-
คูมารินส์	++	+++	+
ฟีนอล	+++	+++	+++

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบ
+ หมายถึง น้อย
++ หมายถึง ปานกลาง
+++ หมายถึง มาก

ตอนที่ 3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม ของสารสกัดหยาบ *Hiptage candicans* Hook.f. พบว่า สารสกัดในส่วนของใบ (L) โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลอย่างเดียวนั้นมีปริมาณฟีนอลิกรวม สูงที่สุดเท่ากับ 64.57 ± 5.44 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด (ตารางที่ 3)

การตรวจสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ DPPH การสกัดแบบ Soxhlet (SL) ให้ฤทธิ์ในการต้าน ออกซิเดชันดีที่สุด (IC_{50}) เท่ากับ 139.18 ± 0.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการสกัด	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (mg GAE/g)	DPPH IC_{50} (μ g/ml)
เอทานอลอย่างเดียวน (L)	64.57 ± 5.44	161.56 ± 5.17
เอทานอลร่วมกับเครื่องคลื่นเสียง ความถี่สูง (UL)	46.10 ± 1.90	147.63 ± 1.63
สกัดแบบ Soxhlet (SL)	52.12 ± 5.15	139.18 ± 0.09
BHT	-	16.00 ± 1.83

5. อภิปรายผลและข้อเสนอแนะการวิจัย

สารสกัดจาก *Hiptage candicans* Hook.f. โดยวิธีการสกัดทั้ง 3 แบบ พบว่า การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลร่วมกับเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูงให้ผลเป็นร้อยละได้ดีที่สุด เนื่องจากคลื่นเสียงความถี่สูงส่งผลให้เกิดฟองขนาดเล็กในสารสกัด ฟองขนาดเล็กดูดซับพลังงานจากคลื่นเสียง ความดัน อุณหภูมิสูง ฟองจะแตกและปลดปล่อยพลังงานสู่ตัวทำละลาย เรียกว่า acoustic cavitation [9] ประกอบไปด้วย การเกิด (creation) การเติบโต (growth) และการแตกของฟองก๊าซ (collapse of bubbles) ในช่วงนี้ ช่วยให้ตัวทำละลายเคลื่อนตัวได้เร็วขึ้นและแทรกซึมได้ดีขึ้น [10] ส่วนการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลอย่างเดียวหรือการหมัก วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก และการสกัดแบบ Soxhlet วิธีนี้ใช้ความร้อน จึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัวไป

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบสารพฤกษเคมีจาก *Hiptage candicans* Hook.f. โดยวิธีการสกัด 3 แบบ พบว่า มีแทนนิน ฟลาโวนอยด์ คูมารินส์ และฟีนอล แต่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลร่วมกับเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง พบเทอร์ฟีนอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์เพิ่มมา และพบว่าสารสกัดจาก *Hiptage benghalensis* (L.) Kurz ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีในกลุ่มแอลคาลอยด์ แทนนิน และน้ำตาลรีดิวซ์ [11] นอกจากนี้มีรายงานว่าเอทานอลสามารถละลายสารพฤกษเคมีในกลุ่มสเตียรอยด์ เทอร์ฟีนอยด์ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ และแทนนินได้ดี [12]

สารสกัดจากชิ้นส่วนราก ของ *Hiptage candicans* Hook.f. มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 20.0 ± 0.848 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 มิลลิกรัมสารสกัด และมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC_{50}) เท่ากับ 0.1427 ± 0.0015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อให้สารสกัดดังกล่าวแก่หนู BALB/CAJcl ทุกวันเป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ไม่ก่อให้เกิดพิษที่เป็นอันตรายต่อสัตว์ทดลอง [13]

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ *Hiptage candicans* Hook.f. พบว่า มีความสอดคล้องกับรายงานของ [14] รายงานไว้ว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณที่สูงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงด้วย

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย งบประมาณผ่านกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกว.) ภายใต้แผนงานยุทธศาสตร์การวิจัยและนวัตกรรม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2563 สัญญาเลขที่ PCRU_2563_TSTR008 งานศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ได้ให้ความสนับสนุนในด้านปฏิบัติการวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Hassanpour, S., Maheri-Sis, N., Eshratkhan, B. and Banghbani, F. "Plants and secondary metabolites (Tannins): A review," IJFSE. 2011; 1(1): 47-53.
- [2] Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J. and Shahabimajd, N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. Afr. J. Biotechnol. 2006; 5(11): 1142-1145.
- [3] Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E. and Rahmat, A. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Molecules. 2010; 15: 4324-4333.
- [4] Akter, R., Khairul, Md.I., Islam, R., Alam, I., Wahab, Md. A. and Rahman, Md. H. Evaluation of phytochemical screening and cytotoxic activity of different extracts of *Monochoria hastata* leaves. WJPPS. 2018; 7(7): 71-82.
- [5] Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L. and Mason, T.J. Investigation of the Effects of Ultrasound on Vegetal Tissues during Solvent Extraction. Ultrason Sonochem. 2001; 8: 137-142.
- [6] ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ และคณะ. การศึกษาวิธีการสกัดและปริมาณของสารสำคัญในสมุนไพรหญ้าเขาแพะ. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 2560; 40(4): 533-541.
- [7] Harborne, J.B. Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 3rd ed. London: Chapman & Hall. 1998: 182-190.
- [8] Trease, G.E. and Evans, W.C. Pharmacognosy. 15th ed. Edinburgh: W.B. Saunders. 2002: 221-224, 303-306.
- [9] Hemwimol, S., Pavasan, P. and Shotipruk, A., Ultrasound-assisted Extraction of *Morinda Citrifolia*. Ultrasonics Sonochemistry. 2006; 13: 543-548.
- [10] Zhang, H.F., Yang, X.H., Zhao, L.D. and Wang, Y. Ultrasound-assisted Extraction of Epomedin C from Fresh Leaves of *Epimedium* and Extraction Mechanism. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2009; 10: 54-60

- [11] Lalnundanga, Ngente, L. and Lalrinkima, R. Phytochemical analysis of the methanol extract of root bark of *Hiptage benghalensis* (L.) Kurz. Sci. Vis. 2012; 12(1): 8-10.
- [12] Mendonca-Filho, R.R. Bioactive Phytocompounds: New Approaches in the Phytosciences, Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs, Ahman, I., Aqil, F. and Owais, M. (Ed), 2012.
- [13] สุรางค์รัตน์ พันแสง และพวงผกา แก้วกรม. ฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกในส่วนต่างๆของต้นกำลังช้างเผือกและผลต่อลิพิดและโมโนไซต์ในหนู. วารสารนเรศวรพะเยา. 2561; 12(1); 10-12.
- [14] Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., and Shahabimajd, N. Antioxidant activity, phenol and Flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 2006; 5(11): 1142-1145.