

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาใบขลุ่ยและผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อ
ความสามารถในการออกฤทธิ์

Determination of pharmaceuticals property of Indian Marsh Fleabane
leaf and effect of storage time on bioactive potential

ผู้วิจัย

ผศ.ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์
ดร.สมจิตต์ ปาละภาค

สนับสนุนโดย งบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๕๖-๒๕๕๗ จากมหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

ในการตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและของสารสกัดจากใบขลุ่ย 3 ชนิด คือ สารสกัดจากใบขลุ่ยสด สารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้ง และสารสกัดจากใบขลุ่ยอบ พบว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยอบที่สกัดด้วยเอทานอล ร้อยละ 70 ปริมาตรเป็น 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงสุดเท่ากับ 66.07 ± 2.53 มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอคซ์ต่อกรัมตัวอย่าง มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุดเท่ากับ 48.53 ± 2.54 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด ให้ค่าเท่ากับ 59.34 ± 2.03 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง และ 36.76 ± 0.98 มิลลิกรัมสมมูลของคาทีชินต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ ส่วนการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส พบว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยทั้ง 3 วิธี ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase)

ส่วนการตรวจสอบสารสกัดใบขลุ่ยด้วยน้ำร้อน และตรวจสอบ ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากใบขลุ่ย ที่สกัดด้วยน้ำร้อนโดยวิธีการสกัดที่แตกต่างกันคือการแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกันการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน และการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยดพบว่า การสกัดด้วยการแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดจากการทดสอบด้วยวิธี DPPH ระยะเวลาสกัด 3-10 นาทีให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ระยะเวลาสกัด 5 นาทีให้ผลการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS สูงสุดคือ 104.93 ± 0.63 มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอบิกต่อกรัมตัวอย่างเช่นเดียวกับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยมีค่าเท่ากับ 58.83 ± 0.32 มิลลิกรัมสมมูลคาทีชินต่อกรัมตัวอย่างสำหรับการสกัดระยะเวลา 10 นาทีให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยการทดสอบด้วยวิธี FRAPและมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 180.97 ± 7.17 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมตัวอย่างและ 66.92 ± 2.21 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างตามลำดับ แต่การสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสระยะเวลา 3 นาทีให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บีสูงที่สุดคือ 50.62 ± 0.96 และ 147.29 ± 1.90 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ในขณะที่สารสกัดจากขลุ่ยไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) โดยเมื่อเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อเก็บรักษาสภาพใบขลุ่ยอบแห้งระยะเวลา 3 เดือนพบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดคงที่ โดยที่ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบีลดลง ในส่วนของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPHและ ABTS ให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระคงที่ แต่การทดสอบด้วยวิธี FRAP ให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติเป็นอย่างสูง ที่เป็นผู้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัยเรื่อง การตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาใบขลุ่ยและผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อความสามารถในการออกฤทธิ์ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์ในระยะเวลาในการทำงานวิจัย ๒ ปี ขอขอบคุณในความอนุเคราะห์ของห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ทำให้การดำเนินการวิจัยร่วมกันดำเนินด้วยดีตลอด

ผศ.ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์

หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

| | หน้า |
|--------------------------------|------|
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| บทที่ 2 เอกสารประกอบการวิจัย | 3 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย | 16 |
| บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย | 30 |
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย | 74 |
| บรรณานุกรม | 78 |
| ภาคผนวก | 81 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 1 | โครงสร้างของ Acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) ที่ใช้ในทางคลินิก | 7 |
| 2 | กระบวนการสังเคราะห์ Eu-Melanin และ Pheo-Melanin | 9 |
| 3 | โครงสร้างของเอนไซม์ไทโรซิเนส | 10 |
| 4 | โครงสร้างกรดโคจิก | 11 |
| 5 | โครงสร้างกรดอะเซลลาอิก 1 | 1 |
| 6 | โครงสร้างกรดแอลฟาไฮดรอกซี 11 | |
| 7 | โครงสร้างไฮโดรควิโนน 1 | 2 |
| 8 | โครงสร้างอาร์บูติน 12 | |
| 9 | โครงสร้างของ DPPH [•] | 13 |
| 10 | โครงสร้างของ ABTS | 14 |
| 11 | กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารเชิงซ้อนเหล็กเฟอร์รัส | 14 |
| 12 | กลไกปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารโดปาโครมโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส | 15 |
| 13 | การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบขลุ่ย 3 | 1 |
| 14 | การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากใบขลุ่ย | 32 |
| 15 | การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอของสารสกัดจากใบขลุ่ย | 33 |
| 16 | การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์บีของสารสกัดจากใบขลุ่ย | 34 |
| 17 | การเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากใบขลุ่ย | 35 |
| 18 | การเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดจากใบขลุ่ย | 36 |
| 19 | คุณสมบัติการดูดกลืนแสงของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในสภาวะต่าง ๆ | 37 |
| 20 | คุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 | 38 |
| 21 | คุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 | 39 |
| 22 | ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดใบขลุ่ยที่เริ่มการทดลอง | 45 |
| 23 | ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดใบขลุ่ยหลังเก็บรักษาภาพที่ 3 เดือน | 45 |
| 24 | ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของสารสกัดใบขลุ่ยที่เริ่มการทดลอง | 47 |
| 25 | ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของสารสกัดใบขลุ่ยหลังเก็บรักษาภาพที่ 3 เดือน | 48 |
| 26 | ปริมาณคลอโรฟิลล์บีของสารสกัดใบขลุ่ยที่เริ่มการทดลอง 5 | 0 |
| 27 | ปริมาณคลอโรฟิลล์บีของสารสกัดใบขลุ่ยหลังเก็บรักษาภาพที่ 3 เดือน 5 | 0 |
| 28 | ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดใบขลุ่ยที่เริ่มการทดลอง | 53 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 29 | ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดใบขลู่หลังเก็บรักษาสภาพที่ 3 เดือน | 53 |
| 30 | ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดใบขลู่ที่เริ่มการทดลอง | 56 |
| 31 | การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดใบขลู่หลังเก็บรักษาที่ 3 เดือน | 56 |
| 32 | ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดใบขลู่ที่เริ่มการทดลอง | 59 |
| 33 | ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดใบขลู่หลังเก็บรักษา 3 เดือน | 59 |
| 34 | ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดใบขลู่ที่เริ่มการทดลอง | 62 |
| 35 | ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดใบขลู่หลังเก็บรักษา 3 เดือน 6 | 2 |
| 36 | รูปแบบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารยับยั้งมาตรฐาน kojic acid 6 | 3 |
| 37 | รูปแบบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากใบขลู่ที่สกัดด้วยน้ำร้อน 6 | 4 |
| 38 | ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบขลู่อบและผงใบขลู่อบด้วยน้ำร้อน | 66 |
| 39 | ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดใบขลู่อบและผงใบขลู่อบด้วยน้ำร้อน | 67 |
| 40 | ปริมาณสารประกอบแทนนินของสารสกัดใบขลู่อบและผงใบขลู่อบด้วยน้ำร้อน | 69 |
| 41 | ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดใบขลู่อบที่ผ่านการเก็บรักษา | 70 |
| 42 | ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดใบขลู่ที่เก็บรักษา | 72 |
| 43 | ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดใบขลู่ที่เก็บรักษา | 73 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|--|------|
| 1 | การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ | 18 |
| 2 | การเตรียมสารละลายมาตรฐานคาทีชินที่ความเข้มข้นต่างๆ | 20 |
| 3 | การเตรียมสารละลายมาตรฐานโพลีฟีนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ 2 | 1 |
| 4 | การเตรียมสารละลายมาตรฐานแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ | 23 |
| 5 | การเตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสไอออนที่ความเข้มข้นต่างๆ | 25 |
| 6 | การเตรียมสารละลายมาตรฐานแทนนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ | 26 |
| 7 | การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากใบชาที่ความเข้มข้นต่างๆ | 28 |
| 8 | การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกที่ความเข้มข้นต่างๆ | 28 |
| 9 | สมบัติการต้านอนุมูลอิสระหลังจากการเก็บรักษาสารสกัดจากใบชาสด | 40 |
| 10 | สมบัติการต้านอนุมูลอิสระหลังจากการเก็บรักษาสารสกัดจากใบชาแห้ง | 41 |
| 11 | สมบัติการต้านอนุมูลอิสระหลังจากการเก็บรักษาสารสกัดจากใบชาอ่อน | 42 |
| 12 | ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบชาด้วยความร้อน | 44 |
| 13 | ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของสารสกัดใบชาด้วยความร้อน | 46 |
| 14 | ปริมาณคลอโรฟิลล์บีของสารสกัดใบชาด้วยความร้อน | 49 |
| 15 | ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดใบชาด้วยความร้อน 5 | 2 |
| 16 | ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดใบชาด้วยความร้อน | 55 |
| 17 | ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดใบชาด้วยความร้อน | 58 |
| 18 | ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดใบชาด้วยความร้อน | 61 |
| 19 | ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบชาอ่อนและผงใบชาอ่อนด้วยน้ำร้อน | 65 |
| 20 | ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดใบชาอ่อนและผงใบชาอ่อนด้วยน้ำร้อน | 67 |
| 21 | ปริมาณสารประกอบแทนนินของสารสกัดใบชาอ่อนและผงใบชาที่เก็บรักษา | 68 |
| 22 | ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดใบชาที่เก็บรักษา 7 | 0 |
| 23 | ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดใบชาที่เก็บรักษา | 71 |
| 24 | ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดใบชาที่เก็บรักษา | 73 |
| 25 | สรุปสถานะการสกัดใบชาด้วยน้ำร้อนที่ให้ปริมาณสารสำคัญและการออกฤทธิ์ที่ดีที่สุด | 76 |

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำงานวิจัย

ในปัจจุบันประชากรโลกได้หันมาสนใจการดูแลสุขภาพกันมากขึ้น โดยเฉพาะการเลือกบริโภคอาหารที่มีผลดีต่อสุขภาพ เช่น อาหารที่มีคุณสมบัติเป็นยา ที่เรียกว่า Functional food หรือ Nutraceutical ซึ่งหมายถึงอาหารที่มีคุณสมบัติในทางยาในการช่วยส่งเสริมสุขภาพให้ดีขึ้นหรือมีคุณสมบัติช่วยป้องกันการเกิดโรคต่างๆ เช่น การบริโภคผักสดและผลไม้ในปริมาณสูงสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งและโรคหัวใจ (Franceschi และคณะ, 1998) เนื่องจากผักสดและผลไม้เป็นแหล่งอาหารสำคัญที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นผลผลิตเมทาโบไลต์ทุติยภูมิที่พบได้ในพืชทั่วไป จัดเป็นสารประกอบที่มีศักยภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชันและมีความสามารถในการจับและทำลายฤทธิ์ของอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี นับเป็นกลุ่มของสารประกอบที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางสรีรวิทยาที่มีผลต่อสุขภาพของมนุษย์หลายประการ เช่น การป้องกันความเสียหายจากการออกซิเดชันของไขมันและไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (Morton และคณะ, 2000) การยับยั้งการแยกตัวของเกล็ดเลือด (Daniel และคณะ, 1999) รวมทั้งมีความสามารถในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ตลอดจนความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง (Newmark, 1996) นอกจากผักและผลไม้แล้วธัญพืชเป็นอาหารอีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถเพิ่มปริมาณการได้รับสารประกอบฟีนอลิก (Scalbert & Williamson, 2000) เพราะเมล็ดธัญพืชเป็นแหล่งรวมของสารประกอบฟีนอลิกและกลูโคไซด์ทั้งที่อยู่ในรูปสารละลายและสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำที่อยู่ร่วมกับโพลีแซคคาไรด์ในผนังเซลล์ของพืช (Miller และคณะ, 2000) สารประกอบฟีนอลิกพบทั่วไปในอาหารทั้งในผัก ผลไม้ ตลอดจนในพืชสมุนไพรต่างๆ เป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญ ช่วยลดอาการที่เกิดขึ้นในระบบประสาททำให้เกิดความวิตกกังวล มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารต้านการออกซิเดชัน ลดความเสียหายในระดับเซลล์ และลดอาการความจำเสื่อม ดังนั้นถ้ารับประทานอาหารประเภทผัก ใบบางชนิด ผลไม้และสมุนไพรเป็นประจำทำให้ร่างกายสามารถป้องกันโรคที่มีสาเหตุจากการทำลายของอนุมูลอิสระเช่น โรคไขมันในเลือดสูง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ เบาหวาน โรคมะเร็ง โรคไต รวมทั้งความแก่ชราได้ (Commenges *et al.*, 2000; Bastianetto and Quirion, 2002; Mata *et al.*, 2007; Orhan *et al.*, 2007)

สำหรับประเทศไทยมีพืชพรรณจำนวนมากที่เป็นพืชพื้นเมืองซึ่งได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารและยา ทั้งเพื่อการใช้ประโยชน์ภายในท้องถิ่น การผลิตเป็นสินค้าภายในประเทศ รวมทั้งที่พัฒนาเป็นสินค้าออกที่สามารถนำเงินตราเข้าสู่ประเทศเป็นจำนวนมาก สำหรับในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะมีพืชพื้นเมืองที่ขึ้นตามแหล่งที่น้ำเค็มท่วมหรือบริเวณป่าชายเลน พบว่ามีพืชหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้าน เช่น เหงือกปลาหมอ ขลุ้ กะพริ้ว แสมดำ แสมขาว และปรังทะเล เป็นต้น ส่วนการบริหารจัดการทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3, 2551) สำหรับขลุ้ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้กันทั้งในท้องถิ่นทั้งส่วนของราก ใบ ลำต้น ดอกและผล มีสรรพคุณคือ ลดอาการปวดเมื่อย แผลอักเสบ รักษาอาการบิด ช่วยขับเหงื่อ และบรรเทาโรคที่เกี่ยวข้องกับทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น นอกจากนี้ได้นำเอาใบมาใช้แทนใบชาเพื่อช่วยลดน้ำหนัก (ส่วนการบริหารจัดการทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3, 2551) จากสรรพคุณดังกล่าวเห็นได้ว่าใบขลุ้มี

ความน่าสนใจในการนำมาประยุกต์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ ดังนั้นจึงควรเริ่มต้นจากการรู้จักองค์ประกอบทางพฤกษเคมีจากกลุ่มในท้องถิ่นที่จะนำมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากสภาพแวดล้อมธรรมชาติในแต่ละท้องถิ่นมีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์แตกต่างกัน ตามแนวทางของแผนงานวิจัยเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไบโพลีเป็นส่วนประกอบที่มีเป้าหมายในการสร้างผลิตภัณฑ์อาหารที่มีคุณภาพสูงเพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพและมีคุณค่าทางโภชนาการ จึงมีความจำเป็น ต้องดำเนินการศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี การออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ปริมาณสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านออกซิเดชัน คุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลิเนสเตอเรส คุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสตลอดจนทำการตรวจสอบความคงตัวของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของไบโพลีที่ผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยวิธีการต่างๆ เมื่อนำมาเก็บรักษาเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ เพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้มาใช้ในการปรับปรุงกระบวนการผลิตและการปรับปรุงรูปแบบการใช้ประโยชน์ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อประเมินความคงตัวของปริมาณและคุณภาพของสมบัติการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา คือ ปริมาณสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านออกซิเดชัน คุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลิเนสเตอเรส และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ของไบโพลีสดและไบโพลีแห้ง รวมทั้งความคงตัวของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เพื่อนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ สำหรับการผลิตอาหารในเชิงยาหรือ functional food ขึ้น โดยมีสมมติฐานที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเชิงคุณภาพและปริมาณของสารประกอบ ดังนี้

- 1) วิธีการทำแห้งของไบโพลีที่แตกต่างกันมีผลทำให้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน
- 2) การเก็บรักษาของไบโพลีแห้งมีผลต่อระดับคุณภาพของและความคงตัวของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

เป้าหมายหลักของการดำเนินโครงการวิจัยนี้ คือ การตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของไบโพลีสดและไบโพลีแห้งที่ได้จากการวิจัยในโครงการวิจัยที่ 2 รวมทั้งความคงตัวของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการเก็บรักษาไบโพลีแห้ง โดยสามารถประมวลภาพรวมของขอบเขตการศึกษาได้ดังนี้

- 1) การตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา คือ ปริมาณสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านออกซิเดชัน คุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลิเนสเตอเรส และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ของไบโพลีสดและไบโพลีแห้งซึ่งผ่านการทำแห้งด้วยวิธีการต่าง ๆ กัน จำนวน 3 วิธีคือ การอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน และการอบแห้งด้วยใช้แสงอาทิตย์ในธรรมชาติ
- 2) การตรวจสอบความคงตัวของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของไบโพลีแห้งที่มีระยะเวลาในการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 ปี

บทที่ 2

เอกสารประกอบการทำวิจัย

1. ขลุ่

พืชพรรณบริเวณที่มีพื้นที่ดินเค็มหรือบริเวณป่าชายเลน พบได้ทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงใต้ เป็นแหล่งของสมุนไพรที่น่าสนใจหลายชนิด เช่น โกงกาง แสมดำ แสมขาว จิก จาก ข้าเลือด และขลุ่ เป็นต้น พืชสมุนไพรได้ถูกนำมาใช้ในท้องถิ่นในการประกอบอาหาร และเป็นสมุนไพรเพื่อบำบัดอาการต่าง ๆ สำหรับขลุ่ เป็นสมุนไพรที่น่าสนใจในท้องถิ่นทั้งส่วนของรากใบ ลำต้น ดอกและผล มีสรรพคุณคือ ลดอาการปวดเมื่อย แผลอักเสบ รักษาอาการบิด ช่วยขับเห็้อ และบรรเทาโรคที่เกี่ยวข้องกับทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้นำเอาใบมาใช้แทนใบชาเพื่อช่วยลดน้ำหนัก (ส่วนบริหารการจัดการทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3, 2551) จากสรรพคุณดังกล่าวจะเห็นว่าใบขลุ่มีความน่าสนใจในการนำมาประยุกต์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ

ขลุ่เป็นพืชที่พบทั่วไปในเขตร้อน เช่น ประเทศอินเดีย จีน ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย ไทย เป็นต้น มีชื่อสามัญว่า Indian Fleabane และมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Pluchea indica* Less. จัดอยู่ในวงศ์ COMPOSITAE จัดเป็นไม้พุ่ม มีความสูงประมาณ 0.5 - 2 เมตร ลักษณะยอดและใบอ่อนมีขนอ่อนปกคลุมอยู่ทั่วไป ใบมีกลิ่นเล็กน้อย ลักษณะใบรูปไข่หัวกลับ ขอบใบหยัก มีขนาดกว้างประมาณ 1 - 5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2 - 9 เซนติเมตร ลักษณะดอกเป็นช่อที่ประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมาก มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย สีขาวอมม่วงขนาดเล็ก ขลุ่เป็นพืชที่ชอบขึ้นตามธารน้ำโดยเฉพาะบริเวณที่มีน้ำเค็มขึ้นถึงและบริเวณป่าชายเลน สำหรับการเรียกชื่อพื้นเมืองอื่นๆ ในประเทศไทย เช่น คลู ขลุ่ (ภาคใต้) ขี้ป่าน (แม่ฮ่องสอน) หนวดงั่ว หนวดจั่ว หนวดวัว หนวดจั่ว (อุดรธานี) (อุดมการ อินทสุใส และปารีชาติ ทะนานแก้ว, 2549)

1.1 สรรพคุณและการนำไปใช้ประโยชน์

ต้นขลุ่มีสรรพคุณช่วยรักษาอาการขัดเบา ปัสสาวะพิการ ขับปัสสาวะ รักษาโรคเบาหวาน ริดสีดวงทวาร ริดสีดวงจมูก รักษาวัณโรคที่ต่อมน้ำเหลือง ใบมีสรรพคุณช่วยลดน้ำหนัก แก้ปวดเมื่อย บำรุงประสาท เป็นยาขับมดลูก รักษาโรคบิด รักษาโรคบิด รักษาริดสีดวงทวาร ระงับกลิ่นปาก กลิ่นตัว รากและใบเป็นยาฝาดสมาน รักษาไข้ ขับเห็้อ แก้แผลอักเสบ ใบและต้นอ่อนรักษาประดงเกี่ยวกับเลือดลม ใช้รักษาอาการปวดในโรคไขข้ออักเสบ บรรเทาอาการปวดแหว รักษาโรคผิวหนังจำพวกหิด กลากเกลื้อน ขี้เรื้อน (สุภกักริรมย์, 2551) ตามภูมิปัญญาท้องถิ่นได้มีขลุ่ทั้ง 5 ส่วน คือ ใบ ราก ลำต้น ดอก และผลมาใช้เป็นสมุนไพร มีสรรพคุณทางยาในการขับปัสสาวะ แก้ปัสสาวะพิการ และลดอาการบวม (ส่วนบริหารการจัดการทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3, 2551; Sharma & Goyal, 2011) นอกจากนี้ได้มีการนำใบขลุ่ใช้ต้มน้ำดื่มแทนชาเพื่อลดน้ำหนักตัวอีกด้วย

ในการใช้ประโยชน์จากต้นขลุ่ เพื่อเป็นพืชสมุนไพรมีกันแพร่หลายในประเทศแถบเอเชีย เช่น อินเดีย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย เป็นต้น โดยการรับประทานหน่อขลุ่อ่อนดิบ รับประทานเป็นผักสลัด การรับประทานใบขลุ่เพื่อลดไข้ ลดอาการท้องร่วง ใช้ใบขลุ่บดมาบดเป็นยาพอก เพื่อบรรเทาอาการปวดของ

ผลพวง ลดอาการอักเสบ (Wiert, 2006, Mohd Nazri et.al., 2011, Sharma & Goyal, 2011) จากการศึกษาสารพฤกษเคมีที่พบในต้นขลุ่ พบว่า เป็นสารประกอบกลุ่ม terpene และ lignin glycosides เช่น citrucin C, hedyotisol A, hedyotisol B, plucheoside C, plucheoside E, plucheosides D1, D2, D3, plucheol A, plucheol B (Uchiyama et al., 1989 ; Uchiyama et al., 1991) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Mukhapadhyay et al. (1983) ศึกษาสารประกอบที่มีฤทธิ์ในทางสมุนไพรมะของขลุ่ พบว่าเป็นสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล และ 3-(2',3'-diacetoxy-2'-methyl butyryl)-cuauhtemone ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ eudesmane ส่วน Anchalee Traithip (2005) ได้ศึกษา พบว่า สารสกัดของใบขลุ่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดี โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 6.92 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดมาแยกสารสำคัญและพิสูจน์โครงสร้างด้วยวิธีสเปคโตรสโคปี พบว่ามีโมเลกุลของ quercetin (5,7,3',4' tetrahydroxy - flavonol) ซึ่งสามารถวัดค่า EC_{50} เท่ากับ 1.69 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Andarwulan และคณะ (2010) ได้ตรวจสอบปริมาณฟลาโวนอยด์จากผักในประเทศอินโดนีเซียพบว่า ใบขลุ่ซึ่งถูกใช้ในมีการลดไข้ ลดการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ลดอาการปวดท้อง มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์คิดเป็น 6.39 มิลลิกรัมต่อ100 กรัม โดยเป็นสาร quercetin ประมาณ 81 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเป็นสาร myricetin และ kaempferol

ในการศึกษาฤทธิ์ขับปัสสาวะของขลุ่ในหนูและในคนปกติพบว่า สารสกัดจากต้นขลุ่ 5 เปอร์เซ็นต์เตรียมในรูปของเหลวให้ดื่มในคนปกติและฉีดในสัตว์ทดลองพบว่า มีฤทธิ์ขับปัสสาวะสูงกว่ายาขับปัสสาวะ hydrochlorothiazide ขนาด 50 มิลลิกรัม ประมาณ 1.9 เท่า และมีการสูญเสียเกลือแร่ร้อยละ (น้ำหนักพรนิลพิเศษ และคณะ, 2532) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของรัชชัย รอดสม (2536) พบว่าฤทธิ์ขับปัสสาวะของยาที่เตรียมจากขลุ่ในรูปยาขงและแคปซูลจากใบและกิ่งของต้นขลุ่ตากแห้งทดลองในอาสาสมัครและผู้ป่วย พบว่า ไม่มีฤทธิ์ขับปัสสาวะที่ชัดเจนเมื่อเทียบกับยาขับปัสสาวะ furosemide 40 มิลลิกรัม ในการศึกษาที่มีทั้งกลุ่มที่ได้ผลและไม่ได้อาจเนื่องมาจากขนาดยาที่ได้รับวัตถุดิบต้นขลุ่ที่นำมาศึกษา และอายุการเก็บสมุนไพรมะ ในการศึกษาศักยภาพของสมุนไพรมะในการรักษาและป้องกันโรคนี้ว่าขลุ่เป็นพืชสมุนไพรมะที่ให้ผลทำให้ปริมาณผลึกแคลเซียมออกซาเลตในปัสสาวะลดลง ซึ่งได้จากการทำการทดสอบกับอาสาสมัครเพศชายอายุระหว่าง 20-50 ปี จำนวน 10 คน (พจน์ ศรีบุญถือ และคณะ, 2542) จากการศึกษาฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของสารสกัดรากขลุ่ในหนูขาวปกติและหนูขาวที่เหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวานด้วยสาร streptozotocin พบว่า สารสกัดเมทานอลจากรากขลุ่ขนาด 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสามารถลดระดับน้ำตาลในพลาสมาได้ภายในเวลา 90 และ 120 นาที หลังการป้อนน้ำตาลในหนูปกติและหนูที่เป็นเบาหวาน ตามลำดับ ดังนั้นอาจจัดว่าขลุ่มีฤทธิ์อย่างอ่อนในการลดน้ำตาล (เพ็ญโฉม พิงวิชา และคณะ, 2542)

ในการวิจัยสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของต้นขลุ่ของ Sen และคณะ (1991) เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ของสารสกัดจากรากขลุ่ พบว่า สารสกัดจากรากขลุ่ สามารถต้านการอักเสบได้ โดยการยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่เกิดจากการฉีด carragenin histamine serotonin hyaluronidase และ sodium urate โดยสารสกัดจะยับยั้งกระบวนการที่โปรตีนหลุดออกจากหลอดเลือด (exudation) และการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณอักเสบ (leucocyte migration) ส่วนในปี 1993 Sen และคณะ ศึกษาฤทธิ์การปกป้องตับของสารสกัดจากขลุ่ในหนูที่ตับบาดเจ็บเฉียบพลัน (acute liver damage) จากการเหนี่ยวนำของสารคาร์บอนเตตระคลอไรด์ พบว่า สามารถลดระดับเอนไซม์ aspartate amino transferase (AST), serum alkaline phosphatase (ALP), alanine amino

transferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH) และ bilirubin ได้ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า สารสกัดจากขลุ่ยยังสามารถลดระยะเวลาการนอนหลับของหนูจากการที่ได้รับ pentobarbitone ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารคาร์บอนเตตระคลอไรด์ นอกจากนี้ได้ทำการ ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรากขลุ่ยในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง โดยใช้คาร์บอนเตตระคลอไรด์เหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการสลายไขมันและเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid) จากเอนไซม์ไลพอกซีจีเนส (lipoxygenase) ซึ่งสองกระบวนการนี้ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดจากรากขลุ่ยสามารถลดการอักเสบและการสลายตัวของเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ สารสกัดจากรากขลุ่ยยังสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้มากกว่า B755c และ phenidone ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Sen et. al., 2002) ส่วนรายงานของ Thongpraditchote และคณะ (1996) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากรากขลุ่ยต่อระบบประสาทในหนู พบว่า หนูที่ได้รับสารสกัดจากรากขลุ่ยขนาด 50 – 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้โดยการกิน มีการทำงานของระบบประสาทที่ควบคุมการเคลื่อนไหวที่เพิ่มขึ้น และลดระยะเวลาการนอนหลับของหนูที่ได้รับ pentobarbital ให้สั้นลง ซึ่งขึ้นกับขนาดที่ได้รับ นอกจากนี้พบว่า ฤทธิ์ของสารสกัดจากรากขลุ่ยที่ให้ในหนูที่ได้รับ pentobarbital จะลดลงเมื่อได้รับ flumazenil (1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ให้ทางหลอดเลือดดำ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า สารสกัดจากรากขลุ่ย (50 - 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และ diazepam (0.5 - 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สามารถลดพฤติกรรมก้าวร้าวได้ตามขนาดที่ได้รับ โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากรากขลุ่ยเกี่ยวข้องกับระบบ GABA system ในสมอง แต่สารสกัดจากรากขลุ่ยไม่มีฤทธิ์ระงับการชักที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของ pentyleneterazole

วาริชัย พิมพ์บุตร และคณะ (2011) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งได้แก่ คลอโรฟิลล์เอและบี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด สารประกอบแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และสารประกอบฟีนอลในใบอ่อนของต้นขลุ่ย โดยทำการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่าใบอ่อนของต้นขลุ่ยมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอและบี คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 132.41, 125.21, 257.62 และ 95.00 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ นอกจากนี้ใบอ่อนของต้นขลุ่ย ยังมีปริมาณสารประกอบฟีนอล 296.15 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง 28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 65 พบว่าเก็บได้นาน 3 วัน โดยปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์ทั้งหมด และสารประกอบฟีนอลลดลงตามอายุการเก็บรักษา ขณะที่ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดค่อนข้างคงที่ โดยใบอ่อนของต้นขลุ่ยสามารถรักษาปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด แคโรทีนอยด์ทั้งหมด และสารประกอบฟีนอลคือ 245.62, 94.02 และ 262.26 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ

Andarwulan และคณะ (2010) รายงาน ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในผักที่นิยมบริโภคในประเทศอินโดนีเซีย พบว่า ตัวอย่างสารสกัดจากใบขลุ่ยให้ฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงสุดเมื่อเทียบกับผักตัวอย่างและให้ผลของปริมาณสารฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 0.831 ± 0.129 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระโดย ตรวจสอบวิธี DPPH มีค่าเท่ากับ 96.4 ± 15.2 ไมโครโมลโทรลออกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง

ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระโดย การตรวจสอบด้วย วิธี ABTS มีค่าเท่ากับ 3.75 ± 0.16 ไมโครโมลโทรลออกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง และฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing มีค่าเท่ากับ 81.1 ± 0.6 ไมโครโมลโทรลออกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง

Srisook และคณะ (2012) ได้ศึกษาผลของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบของสารสกัดด้วยน้ำร้อนจากใบขลุ่ย พบว่า สารสกัดใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนให้ผลที่ดีด้านคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ ต้านการชักนำ สารกระตุ้นการอักเสบได้แก่ lipopolysaccharide-induced nitric oxide (NO) และ prostaglandin E₂ (PGE₂) production ในแมคโครฟาจ RAW 264.7 macrophages ซึ่งแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของสารสกัดใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนสามารถนำไปใช้ในการรับประทานเพื่อสุขภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีและยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

Pramanik และคณะ (2006) ศึกษาความสามารถในการลดระดับน้ำตาลของสารสกัดขลุ่ย โดยทำการสกัดผงขลุ่ยด้วยเมทานอลจากนั้นระเหยน้ำออก ทดลองให้หนูปกติและหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานกินสารสกัดขลุ่ยที่ความเข้มข้นต่างๆ และวัดระดับน้ำตาลในเลือดที่ 1, 4, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง หลังจากได้รับสารสกัด พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติ ลดลงร้อยละ 35.12 และ 36.01 เมื่อได้รับสารสกัดขลุ่ย 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมตามลำดับ ส่วนหนูที่เป็นเบาหวานมีระดับน้ำตาลในเลือด ลดลงร้อยละ 36.10 และ 41.87 เมื่อได้รับสารสกัดขลุ่ย 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ

Cho และคณะ (2012) ทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบขลุ่ย โดยสกัดใบและรากขลุ่ยด้วยการนำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 70 - 80 องศาเซลเซียส แล้วทำให้ส่วนสกัดน้ำแห้งด้วยวิธีระเหิดเป็นไอ (freeze dry) นำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งสมอง (GBM8401 cells) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela cells) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อผ่านไประยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดหยาบจากใบและรากขลุ่ยสามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์และการกระจายตัวของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดได้ร้อยละ 75 และร้อยละ 70 ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบของรากขลุ่ยที่ระดับความเข้มข้น 10 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ เซลล์มะเร็งสมอง และที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ มีผลให้จำนวนเซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่า phosphorylated-p53 และ p21 ถูกเหนี่ยวนำขึ้นในเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด

1.2. สารสำคัญที่พบในขลุ่ย แบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ

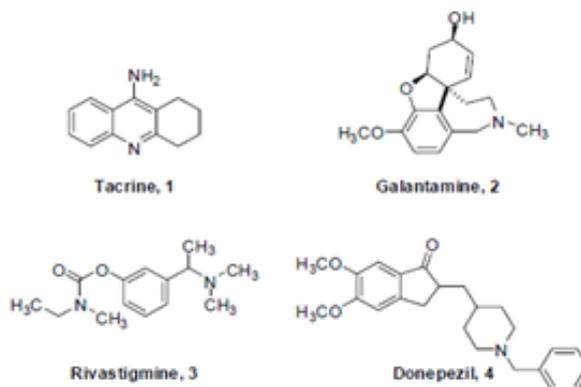
1) ต้นขลุ่ย สารที่พบในต้นขลุ่ยเป็นสารประกอบประเภทเทอร์ปีน (terpene) และ ลิกแนนไกลโคไซด์ (lignin glycosides) เช่น citrucin C, hedyotisol A, hedyotisol B, plucheoside C, plucheoside E, plucheosides D1, D2, D3, plucheol A, plucheol B (Uchiyama และคณะ, 1991; Uchiyama และคณะ, 1989) สารประกอบกลุ่ม polyphenol และ 3-(2',3'-diacetoxy-2'-methylbutyryl)-cuauhtemone ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ eudesmane (Mukhapadhyay และคณะ, 1983)

2) ใบขลุ่ย สารที่พบในใบขลุ่ยประกอบด้วยสารประเภทเกลือแร่ เช่น โซเดียมคลอไรด์ สารโพแทสเซียม และมีสารกลัยโคไซด์อัลคาลอยด์ (มาโนซ วามานนท์ และเพ็ญญา ทรัพย์เจริญ, 2540)

2. เอนไซม์ Acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) (ลือลักษณะ ล้อมลิม และอีร์ภัทร นวลน้อย, 2554)

Acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) เป็นกลุ่มยาหลักที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบัน การพัฒนา AChEI โดยแนวทางที่สำคัญ ได้แก่ การออกแบบและสังเคราะห์ dual binding site inhibitors และการพัฒนาสารให้อยู่ในรูป multi-target-directed ligands (MTDLs) แนวทางทางการออกแบบ dual binding site inhibitor ได้แก่ การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ donepezil และการทำ homo- หรือ heterodimer ของ CAS ligand เป็นต้น ส่วน MTDLs เป็น AChEI ที่มีฤทธิ์ต่อเป้าหมายอื่นที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุการเกิดโรคหรืออาการอื่นๆ ที่มักพบในผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ แนวทางการออกแบบ MTDL ได้แก่ การเชื่อมต่อโมเลกุลของ AChEI กับ pharmacophore ของสารที่มีฤทธิ์อื่นที่ต้องการ หรือการทำอนุพันธ์ผสม (hybrid molecule) แนวทางทั้งหมดนี้นำไปสู่การพัฒนา AChEI ใหม่ ๆ ซึ่งมีความแรงในการออกฤทธิ์ที่สูงขึ้น และมีประสิทธิภาพทั้งในการรักษาอาการ ตลอดจนมีผลชะลอการดำเนินไปของโรคอีกด้วย โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) เป็นโรคที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มโรคสมองเสื่อม (neurodegenerative disease) ซึ่งเป็นหนึ่งในเจ็ดอันดับแรกของโรคที่พบบ่อยในผู้สูงอายุในประเทศไทย โดยพบมากขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งยังพบอีกว่าผู้สูงอายุหญิงมีสัดส่วนการเป็นโรคมมากกว่าชายเล็กน้อย

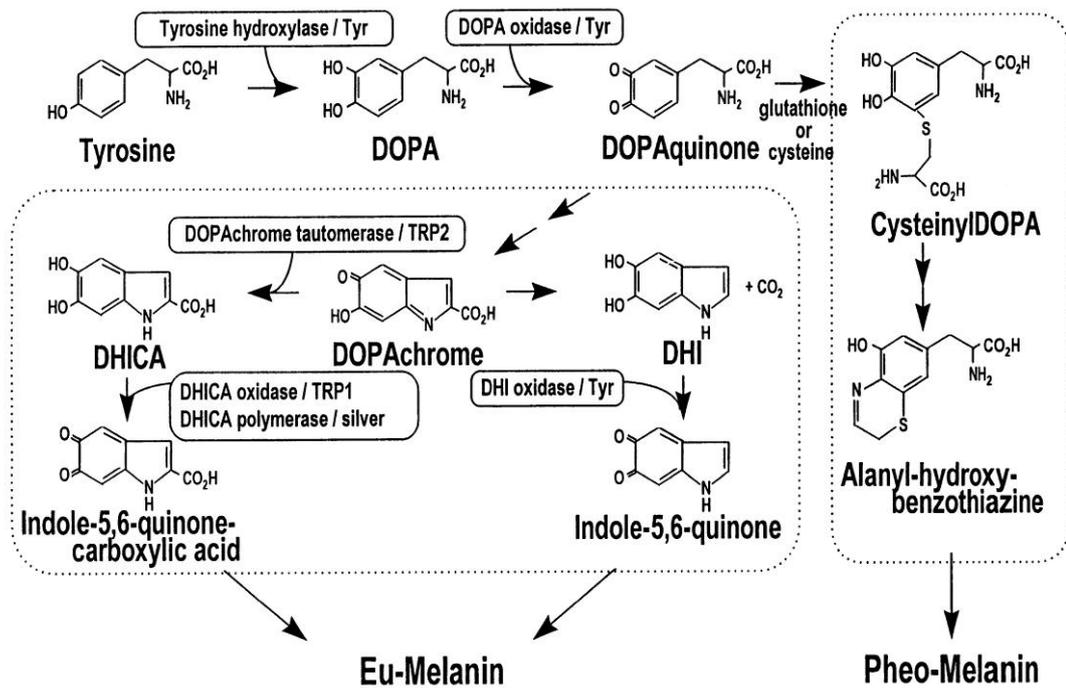
จากการศึกษาทางพยาธิวิทยาของเนื้อสมองของผู้ป่วยอัลไซเมอร์ พบการเกิด senile plaque ที่เกิดจากการสะสมของ A β protein ที่มีการ folding อย่างผิดปกติ และยังมีเกิดการเกิด neurofibril tangle (NFT) ซึ่งเกิดจาก hyperphosphorylation เมื่อโรครมีการดำเนินต่อไปจะพบการตายของเซลล์ประสาท โดยเฉพาะอย่างยิ่ง cholinergic neuron และ synapse ในบริเวณสมองส่วนหน้าจะถูกทำลายอย่างมาก จึงเป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยเกิดการสูญเสียความจำในที่สุด สมมติฐานเกี่ยวกับการสูญเสียความทรงจำ เนื่องจากการทำลายของ cholinergic neuron เรียกว่า “cholinergic hypothesis” ซึ่งนำไปสู่แนวทางการรักษาโดยใช้ยาที่มีผลทำให้เพิ่มปริมาณสารสื่อประสาท Acetylcholine (ACh) ในสมองของผู้ป่วยโดย acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) ปัจจุบัน AChEI ที่ได้รับการรับรองให้ใช้สำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์มี 4 ชนิด ได้แก่ (1) tacrine (2) galanthamine (3) rivastigmine (4) donepezil (ภาพที่ 1) ซึ่งเป็น AChEI ที่ใช้ในทางคลินิกสำหรับการรักษาอัลไซเมอร์ การยับยั้ง AChE จะทำให้สารสื่อประสาท ACh ในบริเวณ synapse มีระดับสูงขึ้น AChEI ที่มีประโยชน์ในการรักษาโรค ได้แก่ สารที่ยับยั้ง AChE แบบผันกลับได้ (reversible inhibitor)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ Acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) ที่ใช้ในทางคลินิก
ที่มา : ลือลักษณะ ล้อมลิม และอีร์ภัทร นวลน้อย (2554)

3. การเกิดสีผิวตามธรรมชาติในร่างกาย (พิมพ์ร สีลาพรพิสิฐ, 2551)

ผิวหนังโดยทั่วไปทำหน้าที่ปกคลุมและปกป้องร่างกาย โดยมีกระบวนการสร้างเม็ดสีผิวหรือ เมลานิน (melanin pigments) เพื่อทำหน้าที่ป้องกันผิวหนังจากสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากแสงแดด มิให้เกิดการเผาไหม้หรือบวมแดง (sunburn) โดยเมลานินหรือเม็ดสีผิวเหล่านี้ จะดูดซับรังสีอุลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet) ในแสงแดดเอาไว้ กระบวนการสร้างเมลานินเกิดขึ้นของหนังกำพร้าชั้นล่างสุด (stratum basale) มีกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่าเซลล์สร้างสีผิว (melanocytes) ทำหน้าที่สร้างและหลั่ง เมลาโนโซม (melanosomes) ซึ่งเป็นเม็ดสีน้ำตาล (brown organelles) ที่ภายในประกอบด้วย copper containing enzyme เรียกว่าไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไทโรซีน (Tyrosine) ที่เป็นอะมีน (amine) ที่มีอยู่ในผิวหนังเปลี่ยนเป็น indole 5,6 quinone และ สารตัวกลาง (intermediates) อื่นๆอีกหลายชนิดจะทำให้เกิดปฏิกิริยา polymerization ไปเป็น highly insoluble substance โดยสามารถรวมตัวเข้ากับโปรตีนในลักษณะเมลานोโปรตีน (melanoprotein) อย่างหนาแน่น ด้วยพันธะซัลไฟด์ (sulfhydryl linkage) เกิดเป็นเมลานิน (epidermal melanin unit) ปรากฏเป็นสีผิว เกิดขึ้น ดังนั้นเมลานินจึงเป็นควินอยด์โพลีเมอร์ (quinoid polymers) สามารถแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆคือ ฟิโอมเมลานิน (Pheomelanins) ซึ่งมีสีแดงหรือสีเหลือง และ ยูเมลานิน (Eumelanins) ที่ประกอบด้วย indole-5,6-quinone และ intermediates ทำให้เกิดสารสีดำหรือน้ำตาล โดยคนต่างเชื้อชาติกันจะมี รายละเอียดส่วนประกอบของเมลานินเหล่านี้ต่างกัน ทำให้เกิดสีผิวต่างๆกันได้หลายระดับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกรรมพันธุ์ และฮอร์โมน MSH (melanocyte stimulating hormone) และการสัมผัสกับแสงอุลตราไวโอเล็ต ซึ่งกลไกการสังเคราะห์เมลานินแสดงในภาพที่ 2 ดังนั้นเมื่อผิวหนัง ยิ่งถูกกระตุ้นจากภายนอกโดยเฉพาะแสงแดด กระบวนการสร้างเม็ดสีผิวเหล่านี้จะเกิดมากขึ้น ทำให้ปรากฏผิวสีเข้มขึ้นกว่าปกติ โดยจะเห็นได้จากนักกีฬาากลางแจ้ง ชาวประมง และชาวนา เป็นต้น ซึ่งบุคคลเหล่านี้ จะมีผิวสีคล้ำกว่าคนปกติเพราะระบบการสร้างเมลานินถูกกระตุ้นบ่อยๆ นอกจากนี้ในบางสภาวะเช่นในหญิงตั้งครรภ์ อาจมีการหลั่งฮอร์โมน MSH มากกว่าปกติหรือฮอร์โมนเพศที่เกิดจากการกินยาคุมกำเนิด อาจมี ผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเมลานินมากขึ้น อีกด้วย ทำให้ปรากฏเป็นฝ้าเกิดขึ้นได้ เมลาโนโซมนอกจากจะป้องกันรังสี อุลตราไวโอเล็ตแล้ว ยังช่วยป้องกันการทำลาย ของเซลล์โดย phototoxic substance จึงเป็นการลดอัตราการเกิดมะเร็งของผิวหนังได้ด้วย จึงจัดว่าเป็นสิ่งที่มีประโยชน์ต่อผิวหนัง สำหรับคนที่ขาวผิดปกติ (คนผิวเผือก) เกิดจากกลไกการสร้างสีผิวบกพร่องทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์เม็ดสีได้

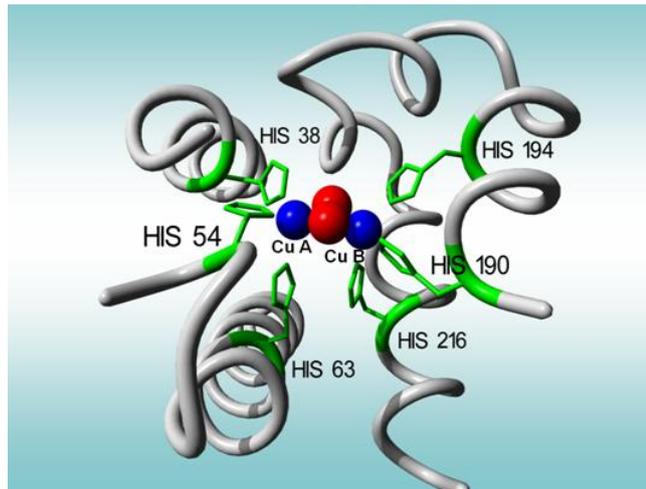


ภาพที่ 2 กระบวนการสังเคราะห์ Eu-Melanin และ Pheo-Melanin
ที่มา: <http://www.freepatentsonline.com/6579848.html>

3.1 เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase)

เอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นเอนไซม์ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ โดยโครงสร้างแสดงในภาพที่ 3 เอนไซม์ไทโรซิเนสสามารถพบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก พืช และสัตว์ ซึ่งมีบทบาทแตกต่างกันไป ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ของสารประกอบไทโรซีนไปเป็น o-diphenols และปฏิกิริยาออกซิเดชัน oxidation ของ o-diphenols ไปเป็น o-quinones ซึ่งเป็นขบวนการปกติในการสังเคราะห์สารประกอบเมลานิน (melanin) ที่เป็นรงควัตถุในรูปสีน้ำตาลหรือสีดำในสิ่งมีชีวิต

สำหรับในมนุษย์เอนไซม์ไทโรซิเนสจะทำหน้าที่ในการสร้างเมลานินพบมากที่บริเวณผิวหนัง เพื่อทำหน้าที่ในการป้องกันร่างกายจากสิ่งแวดล้อม การมีเมลานินมาสะสมที่ผิวหนัง ปริมาณมากจะทำให้ผิวหนังส่วนนั้นมีสีคล้ำเรียกว่า hyperpigmentation ในกึ่ง ฟู และแมลงต่างๆ เอนไซม์นี้จะทำหน้าที่ในกระบวนการสร้างเปลือกแข็งหลังมีการลอกคราบทำให้กระดองของสัตว์เหล่านี้มีสีคล้ำ ส่วนในผักและผลไม้หลายชนิดเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวการที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลทำให้อายุการเก็บของผลิตภัณฑ์และผลไม้ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปสั้นลง (พัชรี ชุนพลัด และคณะ, 2551)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ที่มา: <http://www.ac.uni-kiel.de/tuczek/research-new/oxygen-activation>

3.2 กลไกการขจัดสีผิว (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2551)

สีผิวที่ปรากฏให้เห็นเป็นองค์ประกอบรวมของ ฮีโมโกลบิน (haemo-globin), แคโรทีน (carotene) และเมลานิน (melanin) โดยส่วนใหญ่เกิดจากสีของเมลานินหรือเม็ดสี ดังนั้น ในการขจัด สีผิว (depigmentation) จึงมุ่งเน้นที่กระบวนการสร้างเมลานินซึ่งสามารถทำได้หลายขั้นตอนคือ

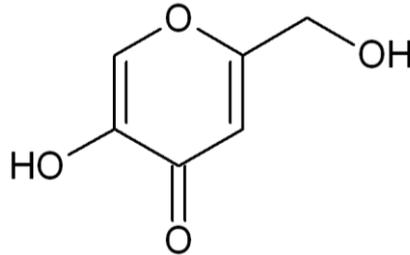
- 1) การทำลายเซลล์สร้างเม็ดสีผิว (melanocytes)
- 2) การรบกวนชีวสังเคราะห์ของเมลานินและสารเริ่มต้นของกระบวนการสังเคราะห์
- 3) การยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส
- 4) การรบกวนกระบวนการในการส่งผ่าน melanosome ไปยัง malpighian cell โดยระงับ phagocytosis ของ melanocytic dendrite หรือโดยทำให้เกิด intercellular edema
- 5) การเปลี่ยนแปลงเมลานินที่สร้างแล้วใน melanosome จาก oxidized form (สีเข้ม) ไปเป็น reduced form (สีจาง)

ในปัจจุบันพบว่ามีการสังเคราะห์เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์ขจัดสีผิวสามารถแบ่งออกเป็น 4 ประเภทใหญ่ๆ คือ

- 1) สารเคลือบคลุม (opacifying or covering agent) ทำหน้าที่เคลือบคลุม กลบเกลื่อนสีผิวเดิมเอาไว้ สารเหล่านี้มักมีสีขาวซึ่งเคลือบติดผิวได้ เป็นการทำให้ผิวขาวทึบอ้อม
- 2) สารต่อต้านกลไกการสร้างสีผิว (depigmentating agent) ได้แก่ สารที่รบกวนเอนไซม์ไทโรซิเนส มิให้ทำหน้าที่ได้
- 3) สารป้องกันแสงแดด (sunscreen agent) ได้แก่ สาร ที่ทำหน้าที่ในการ ดูดซับหรือเปลี่ยนแปลงรังสี อัลตราไวโอเล็ต ให้กลายเป็นรังสีที่มีช่วงคลื่นยาวกว่า ซึ่งไม่ทำอันตรายต่อผิวหนัง และไม่ส่งผลต่อการกระตุ้นการสร้างเมลานิน
- 4) สารออกซิไดเซอร์ (oxidizing agent) ทำหน้าที่ฟอกสีผิวโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน

3.3 สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้มีการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์จัดฝ้าและทำให้ผิวขาวได้แก่ (พิมพ์ร ลีลาพรพิสิฐ, 2547)

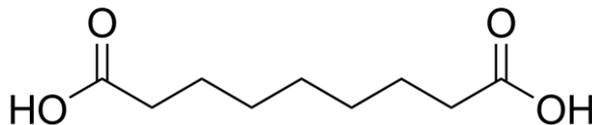
3.3.1 กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อรา *Aspergillus sp.* , *Penicillium sp.* และแบคทีเรียที่เรียกว่า *Acetobacter sp.* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยจับกับ คอปเปอร์ (copper) ทำให้ลดการสร้างเม็ดสี ยูเมลานิน (eumelanin) นอกจากนี้ยังสามารถดูดซับรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ด้วย โดยโครงสร้างกรดโคจิกแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 โครงสร้างกรดโคจิก

ที่มา: <http://cornellbiochem.wikispaces.com/Kojic+Acid>

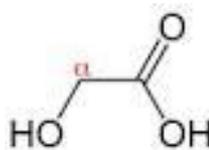
3.3.2 กรดอะเซลลาอิก (Azelaic acid) เป็นสารที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นสายโซ่ของกรดคาร์บอกซิลิกที่อิ่มตัว (saturated straight-chain dicarboxylic acid) โดยสามารถพบได้ตามธรรมชาติในเมล็ดข้าวสาลี ข้าวไรน์ และข้าวบาร์เลย์ สามารถยับยั้งการทำงานของเซลล์ที่ควบคุมกระบวนการสร้างเม็ดสีได้ ซึ่งโครงสร้างกรดอะเซลลาอิกแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 โครงสร้างกรดอะเซลลาอิก

ที่มา: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Azelaic_acid.png

3.3.3 กรดแอลฟาไฮดรอกซี (alpha hydroxyl acids) สามารถทำให้เซลล์ผิวหนึ่งตายแล้ว (Corneocyte) หลวมตัวและหลุดจากกัน ทำให้เกิดการผลัดเปลี่ยนเซลล์ผิว ส่งผลทำให้ผิวขาวขึ้น ซึ่งโครงสร้างกรดแอลฟาไฮดรอกซีแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 โครงสร้างกรดแอลฟาไฮดรอกซี

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Alpha_hydroxy_acid

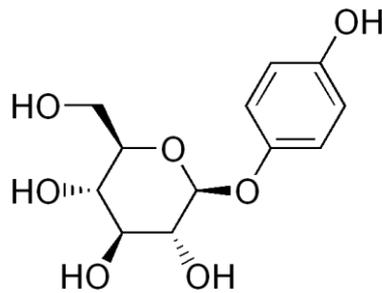
3.3.4 ไฮโดรควิโนน (Hydroquinone) เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีแต่ปัจจุบันเลิกใช้เพราะมีผลข้างเคียง ต่อผิวหนังโดยเฉพาะอย่างยิ่งทำให้เกิดสีผิวถาวรเพราะถูกออกซิไดส์และไม่คงสภาพ ซึ่งโครงสร้างไฮโดรควิโนนแสดงในภาพที่ 2-24



ภาพที่ 7 โครงสร้างไฮโดรควิโนน

ที่มา: <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures-H/Hydroquinone.htm>

3.3.5 อาร์บูติน (Arbutin) เป็น hydroquinone glycoside สกัดได้จากพืช ที่มีชื่อว่า bearberry plant หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Uva-Ursi สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี กว่า kojic acid และ ascorbic acid โดยใช้ในความเข้มข้น ร้อยละ 3-7 มีสมบัติละลายน้ำ ซึ่งโครงสร้าง อาร์บูตินแสดงในภาพที่ 8



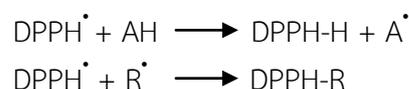
ภาพที่ 8 โครงสร้างอาร์บูติน

ที่มา: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Arbutin_structure.png

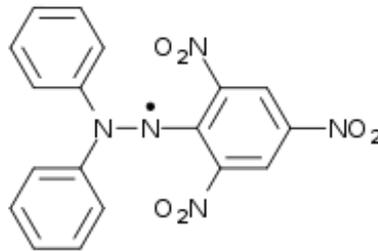
4. รายละเอียดเกี่ยวกับเทคนิคในการศึกษา

4.1 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2549)

DPPH หรือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl คือ อนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนเพิ่มได้อีก สามารถเปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่เป็นอนุมูลอิสระ เมื่อได้รับอะตอมของไฮโดรเจนของโมเลกุลอื่นที่ทำให้สารดังกล่าวเกิดเป็นอนุมูลอิสระ การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นวิธีการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งได้รับ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl สาร DPPH จัดเป็น stable radical ในตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งสารละลายมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยอนุมูล DPPH[•] (ภาพที่ 9) จะเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (AH) หรือกับชนิดของสารอนุมูลอิสระ (R[•]) ดังแสดงในสมการ



ในการนำตัวอย่างมาทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มข้นของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ข้อดีของวิธี DPPH คือ สะดวก รวดเร็ว และง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้องและมีความเที่ยงตรงสูง เนื่องจาก ปฏิกิริยาของแอลกอฮอล์จะมีผลทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอน ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จะนิยมใช้โทรลอคซ์ (Trolox : 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) เป็นสารมาตรฐาน เนื่องจากโทรลอคซ์เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสายอัลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก ทำให้สามารถละลายน้ำได้ดี เมื่อมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี จึงทำให้สามารถออกฤทธิ์ได้เร็วกว่าวิตามินอี โดยจะออกฤทธิ์ทันทีเมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินอีจะต้องใช้เวลาเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน จึงนิยมใช้โทรลอคซ์เป็นสารมาตรฐานสำหรับงานวิจัยในปัจจุบัน



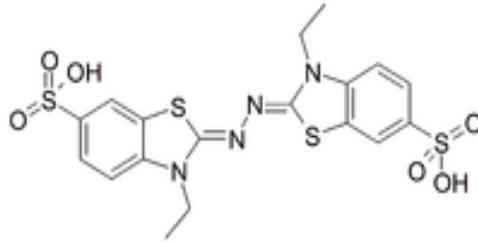
ภาพที่ 9 โครงสร้างของ DPPH

ที่มา : <http://en.wikipedia.org/wiki/DPPH>

4.2 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2549)

วิธี ABTS หรือ TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) เป็นการวัดความสามารถในการขจัดอนุมูล ABTS ที่มีความคงตัว โดย ABTS (ภาพที่ 10) จะถูกออกซิเดชันโดยอนุมูลเปอร์ออกไซด์ แล้วเกิดเป็นอนุมูลที่มีประจุบวก ($ABTS^{+•}$) และมีสีเกิดขึ้น ดังนั้นเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป ทำให้มีสีจางลง โดยค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 415 และ 734 นาโนเมตร เป็นค่าความยาวคลื่นที่นิยมใช้ในการวัดการดูดกลืนแสงของอนุมูล ABTS

โดยในการวิเคราะห์จะวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูล ABTS ที่ลดลงจากค่าควบคุมที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ โดยเติมสารทดสอบและสารอื่นๆ รวมกันก่อนแล้วทำให้เกิดอนุมูลโดยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นขั้นสุดท้าย ซึ่งทำให้ได้ค่าสูงกว่าความเป็นจริง หลังจากนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีโดยเปลี่ยนลำดับการเติมสารทดสอบ โดยผสมสารที่ต้องการวิเคราะห์ท้ายสุดหลังจากที่ทำให้เกิดอนุมูล ABTS และการพัฒนาวิธีต่อมาทำโดยใช้สารอื่นในการทำให้เกิดอนุมูล ABTS อันได้แก่ แมงกานีสไดออกไซด์ หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ข้อดีของวิธี ABTS คือ ทำได้ง่าย อนุมูล ABTS จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ทำได้ในช่วงความเป็นกรด - ด่างที่กว้าง อนุมูล ABTS ละลายได้ทั้งในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์จึงนำมาใช้วิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารต่างๆ ทั้งที่เป็นสารที่ละลายน้ำหรือสารที่ละลายในลิปิด แต่ข้อเสีย คือ ABTS ไม่เป็นสารธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลในเซลล์หรือร่างกาย

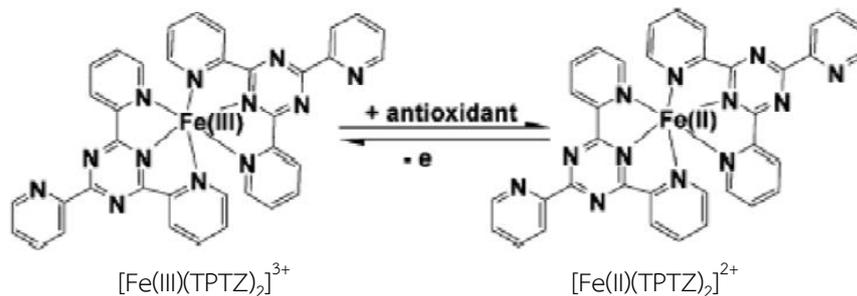


ภาพที่ 10 โครงสร้างของ ABTS

ที่มา : <http://th.wikipedia.org/wiki/ABTS>

4.3 การทดสอบด้วยวิธี FRAP (ferric reducing antioxidant power) (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2549)

การทดสอบด้วยวิธี FRAP เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ ดังแสดงในภาพที่ 11 โดย $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ มีสีน้ำเงินมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตรโดยค่าที่ได้สามารถประมาณฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4)

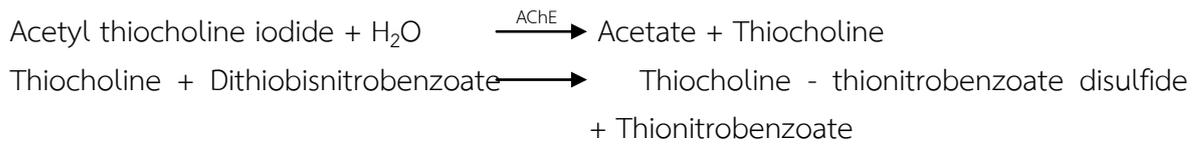


ภาพที่ 11 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารเชิงซ้อนเหล็กเฟอร์รัส

ที่มา: โอภา วัชระคุปต์ และคณะ (2549)

4.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (พิมลวรรณ ทัพยาพิจารณ์ และคณะ, 2555)

วิธีการทดสอบตามหลักการของ Ellman และคณะ (2505) หลักการโดยย่อ คือ สาร Acetylthiocholine iodide เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำ โดยมีเอนไซม์ Acetylcholinesterase จะได้เป็นสาร Thiocholine สารนี้ทำปฏิกิริยาสีกับ Dithiobisnitrobenzoate ได้สารสีเหลืองซึ่งตรวจวัดได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ความเข้มของสีจะแปรผกผันกับปริมาณสารต้านเอนไซม์ในสารสกัดจากพืช



4.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Chiari และคณะ, 2010)

สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสส่วนใหญ่เป็น สารในกลุ่มของสารประเภทฟีนอลิกซึ่งมีความสามารถเป็น chelating agent โดยเข้าจับกับทองแดงซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ในโมเลกุลของเอนไซม์ไทโรซิเนส มีผลทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ตามปกติ ในการทดสอบมีการใช้ L-dopa เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์เป็นสารประกอบโดปาควิโนน (Dopaquinone) และถูกเปลี่ยนเป็นโดปาโครม (Dopachrome) ซึ่งมีสีส้มแดงดังแสดงในภาพที่ 12 สามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร เมื่อระบบในการทดสอบมีสารในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไทโรซิเนสจะส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์สารโดปาโครมในปริมาณน้อย แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารที่ใช้ในการทดสอบ



ภาพที่ 12 กลไกปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารโดปาโครมโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส

ที่มา: http://www.vernier.com/experiments/bioi/8/analysis_of_enzymes_using_tyrosinase/

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

1. วัตถุดิบ

ใบขลู่จากจังหวัดจันทบุรี เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำมาทำการทดลอง

2. อุปกรณ์

- 2.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Hewlett[®] Packard รุ่น G1103A
- 2.2 คิวเวตควอทซ์ Hellma
- 2.3 เครื่องเขย่า n-Biotek รุ่น NB101M
- 2.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง HERMLE รุ่น 2323
- 2.5 เครื่องดูดสารปริมาณน้อย (Auto Pipette) DRAGON MED
- 2.6 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) CERTOMAT[®] MV
- 2.7 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) SHEL LAB รุ่น 1375FX
- 2.8 เครื่องบดละเอียด XING SHENG[®] รุ่น XS-10
- 2.9 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง METTLER TOLEDO รุ่น DELTA 320
- 2.10 เครื่องชั่งตวงน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง METTLER รุ่น AE200
- 2.11 เครื่องชั่งตวงน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง OHAUS รุ่น ARC120
- 2.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) SHEL LAB รุ่น 1265

3. สารเคมี

- 3.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- 3.2 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)
- 3.3 Absolute ethanol
- 3.4 Gallic acid ($C_7H_6O_5$)
- 3.5 Folin-ciocalteu reagent
- 3.6 Sodium carbonate (Na_2CO_3)
- 3.7 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium salt (ABTS)
- 3.8 Ascorbic acid
- 3.9 Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$)
- 3.10 Catechin
- 3.11 Sodium hydroxide (NaOH)
- 3.12 Sodium nitrite ($NaNO_2$)
- 3.13 Aluminium chloride ($AlCl_3$)
- 3.14 Tris-HCl buffer (pH 7.4)
- 3.15 Acetylcholinesterase (AChE)

- 3.16 Acetylthiocholine iodide (AChI)
- 3.17 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)
- 3.18 Galanthamine
- 3.19 Hydrochloric acid (HCl)

4. การดำเนินการวิจัย

4.1 การเตรียมสารสกัดจากใบขลุ่ยสด

นำใบขลุ่ยสด 10 กรัม ที่ผ่านการล้างและผึ่งให้แห้งแล้วมาหั่นฝอยขนาดประมาณ 0.1 เซนติเมตร แช่ลงในตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 โดยใช้ปริมาตร 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำส่วนของสารสกัดทั้งหมดที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

4.2 การเตรียมสารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้ง

นำใบขลุ่ยสด 10 กรัม ที่ผ่านการล้างแล้วมาตากแดดให้แห้งจนกว่าน้ำหนักใบขลุ่ยคงที่ จากนั้นนำไปบดให้เป็นผง แช่ลงในตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 โดยใช้ปริมาตร 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเก็บส่วนของสารสกัดทั้งหมดที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงเก็บ สารสกัดที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

4.3 การเตรียมสารสกัดจากใบขลุ่ยอบด้วยเอทานอล

นำใบขลุ่ยสด 10 กรัม ที่ผ่านการล้างแล้วมาอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 - 45 องศาเซลเซียส จนกว่าน้ำหนักใบขลุ่ยคงที่ (ประมาณ 10 ชั่วโมง) จากนั้นนำไปบดให้เป็นผง แช่ลงใน ตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 โดยใช้ปริมาตร 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเก็บส่วนของสารสกัดทั้งหมดที่ได้มา ปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

4.4 การเตรียมสารสกัดจากใบขลุ่ยอบด้วยน้ำร้อน

นำผงใบขลุ่ย 5 กรัม แช่ลงในน้ำร้อนปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3, 5, 8 และ 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 4 เก็บส่วนของเหลวที่กรองได้ นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

1) การสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยด

นำผงใบขลุ่ย 5 กรัม เติมนลงในถุงกรองกาแฟ สกัดด้วยน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตรเก็บสารสกัดที่ได้ นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2) การสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน

นำผงใบชา 5 กรัม ใส่ลงหัวชงกาแฟ ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสโดยเก็บตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่ระยะเวลา 40, 80, 120, 160 วินาทีและนำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดมาปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

4.5 การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Marina และคณะ, 2009)

1) การเตรียมสารละลายโฟลีนซิโอแคลตุ (folin-ciocalteu reagent)

เตรียมโดยนำสารละลาย โฟลีนซิโอแคล ตูมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1:1 และนำไปทดสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตรให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.9 – 1.0

2) การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนตมา 7.5 กรัมละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออนและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3) การเตรียมสารสกัดจากใบชา

เจือจางตัวอย่างสารสกัดจากใบชาให้เป็น 10 เท่าจากตัวอย่างเข้มข้น โดยปิเปตน้ำกลั่นปราศจากไอออน 900 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) และเติมสารสกัดจากใบชา 100 ไมโครลิตรจากนั้นผสมให้เข้ากัน

4) การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก โดยการชั่งกรดแกลลิก 0.0100 กรัม ทำการละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตร (stock 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นทำการเจือจางสารละลายกรดแกลลิกให้มีความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ปริมาตรกรดแกลลิกจาก Stock (ไมโครลิตร) | ปริมาตรน้ำกลั่นปราศจากไอออน (ไมโครลิตร) |
|-------------------------------------|---------------------------------------|---|
| 0 | 0 | 1,000 |
| 200 | 200 | 800 |
| 400 | 400 | 600 |
| 600 | 600 | 400 |
| 800 | 800 | 200 |
| 1,000 | 1,000 | 0 |

5) การทำกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิก

นำสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 790 ไมโครลิตร และสารละลายโฟลีนซิโอแคลตุปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไป

เก็บไว้ในที่มีดเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 150 ไมโครลิตรตามลำดับ ทำการผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเก็บไว้ในที่มีดเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาพลอตกราฟกับค่าความเข้มข้นต่างๆของสารละลายกรด แกลลิกเพื่อหาสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

6) การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

นำสารสกัดจากใบขลุ่ย ที่ทำการเจือจางแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตรเติมด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 790 ไมโครลิตร และสารละลายโพลินซีโอแคลตุปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ในที่มีดเป็นเวลา 5 นาทีแล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 150 ไมโครลิตรตามลำดับ ทำการผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเก็บไว้ในที่มีดเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดดังสมการ

$$\text{สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร)} \\ = [(A_{725} - B) / M] \times D$$

โดยที่ : A_{725} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร

B คือ จุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

M คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

D คือ ค่าการเจือจางของตัวอย่าง

โดยผลจะแสดงในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งในแต่ละการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคิดเป็นค่าเฉลี่ย (\pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

4.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบี (ดัดแปลงจาก Lichtenthaler & Wellburn, 1983)

นำสารสกัดจากใบขลุ่ยทั้ง 3 ชนิด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบี คำนวณตามสมการดังนี้

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (มิลลิกรัมต่อลิตรตัวอย่าง)} = 13.95A_{663} - 6.88A_{645}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (มิลลิกรัมต่อลิตรตัวอย่าง)} = 24.96A_{645} - 7.32A_{663}$$

4.7 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Marinova และคณะ, 2005)

1) การเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2)

เตรียมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยชั่งโซเดียมไนไตรท์ 0.7500 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนและปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร

2) การเตรียมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3)

เตรียมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยชั่งอะลูมิเนียมคลอไรด์ 2.5000 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนและปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร

3) การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร

4) การเตรียมสารสกัดจากใบขลุ่ย

เจือจางตัวอย่างสารสกัดจากใบขลุ่ยให้เป็น 50 เท่าจากตัวอย่างเข้มข้น โดยปิเปตน้ำกลั่นปราศจากไอออน 980 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวก์และเติมสารสกัดจากใบขลุ่ย 20 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน

5) การเตรียมสารละลายมาตรฐานคาทีซิน (Catechin)

เตรียมสารละลายมาตรฐานคาทีซิน โดยการชั่งคาทีซิน 0.0010 กรัม ทำการละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตร (stock 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นทำการเจือจางสารละลายคาทีซินให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานคาทีซินที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ปริมาตรคาทีซินจาก Stock (ไมโครลิตร) | ปริมาตรน้ำกลั่นปราศจากไอออน (ไมโครลิตร) |
|-------------------------------------|-------------------------------------|---|
| 0 | 0 | 1,000 |
| 20 | 20 | 980 |
| 40 | 40 | 960 |
| 60 | 60 | 940 |
| 80 | 80 | 920 |
| 100 | 100 | 900 |

6) การทำกราฟมาตรฐานสารละลายคาทีซิน

นำสารละลายคาทีซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 400 ไมโครลิตร และสารละลายโซเดียมไนไตรด์ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ 5 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ 6 นาที และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาพลอตกราฟกับค่าความเข้มข้นต่างๆของสารละลายคาทีซินเพื่อหาสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในคำนวณปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

7) การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

นำ สารสกัดจากใบขลุ่ย ที่ทำการเจือจางแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 400 ไมโครลิตร และสารละลายโซเดียมไนไตรด์ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ 5 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ 6 นาที และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนทำการผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดดังสมการ

สารประกอบฟลาโวนอยทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลของคาทีชินต่อมิลลิลิตร)

$$= [(A_{510} - B) / M] \times D$$

โดยที่ : A_{510} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

B คือ จุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐานคาทีชิน

M คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานคาทีชิน

D คือ ค่าการเจือจางของตัวอย่าง

โดยผลจะแสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ คาทีชินต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งในแต่ละการทดลอง จะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคิดเป็นค่าเฉลี่ย (\pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

4.8 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

4.8.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ดัดแปลงจาก Kapila และคณะ, 2009)

1) การเตรียมสารละลาย DPPH reagent

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 0.0390 กรัม ละลายด้วยเอทานอลร้อยละ 99.9 ปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร และก่อนใช้ในการทดสอบให้เจือจางด้วยเอทานอลร้อยละ 99.9 และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.9 – 1.0

2) การเตรียมสารสกัดจากใบขลุ่ย

เจือจางตัวอย่างสารสกัดจากใบขลุ่ยให้เป็น 20 เท่าจากตัวอย่างเข้มข้น โดยปิเปตน้ำกลั่นปราศจากไอออน 950 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวก์และเติมสารสกัดจากใบขลุ่ย 50 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน

3) การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox)

เตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ โดยการชั่งโทรลอกซ์ 0.0250 กรัม ทำการละลายด้วยเอทานอลร้อยละ 99.9 ปริมาตร 40 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน (stock 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นทำการเจือจางสารละลาย โทรลอกซ์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ปริมาตรโทรลอกซ์จาก Stock (ไมโครลิตร) | ปริมาตรน้ำกลั่นปราศจากไอออน (ไมโครลิตร) |
|--|---|--|
| 0 | 0 | 1,000 |
| 50 | 100 | 900 |
| 100 | 200 | 800 |
| 150 | 300 | 700 |
| 200 | 400 | 600 |
| 250 | 500 | 500 |

4) การทำกราฟมาตรฐานสารละลายโทรลอกซ์

ปิเปต สารละลาย DPPH ปริมาตร 950 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซน ตรีฟิวก์ เติมสารละลายโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการยับยั้ง และนำมาพลอตกราฟกับค่าความเข้มข้นต่างๆของสารละลายโทรลอกซ์เพื่อหาสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

5) การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากตัวอย่างสารสกัดใบขลู่

ปิเปต สารละลาย DPPH ปริมาตร 950 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซน ตรีฟิวก์ เติมสารสกัดจากใบขลู่ที่ทำการเจือจางแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการยับยั้ง และคำนวณฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดังสมการ

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = [(A_{[0]} - A_{[t]}) / A_{[0]}] \times 100$$

โดยที่ : $A_{[0]}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 0 มิลลิโมลต่อลิตร สารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์

$A_{[t]}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ไมโครกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตร)

$$= [(A_{517} - B) / M] \times 100$$

โดยที่ : A_{517} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

B คือ จุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์

M คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์

D คือ ค่าการเจือจางของตัวอย่าง

โดยผลจะแสดงในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งในแต่ละการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคิดเป็นค่าเฉลี่ย (\pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

4.8.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (ดัดแปลงจาก Re และคณะ, 1999)

1) การเตรียมสารละลาย ABTS reagent

A. เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลต่อลิตร โดยชั่ง 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) Diammonium salt 0.0384 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนและปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร

B. เตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลต่อลิตร โดยชั่งโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 0.0166 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนและปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร

นำสารละลาย A ปริมาตร 8 มิลลิลิตรกับสารละลาย B ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกันเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 729 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.9 – 1.0

2) การเตรียมสารสกัดจากใบขลุ่ย

เจือจางตัวอย่างสารสกัดจากใบขลุ่ยให้เป็น 50 เท่าจากตัวอย่างเข้มข้น โดยปิเปตน้ำกลั่นปราศจากไอออน 980 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวก์และเติมสารสกัดจากใบขลุ่ย 20 ไมโครลิตรจากนั้นผสมให้เข้ากัน

3) การเตรียมสารละลายมาตรฐานแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)

เตรียมสารละลายมาตรฐานแอสคอร์บิกโดยการชั่งแอสคอร์บิก 0.001 กรัม ทำการละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตร (stock 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นทำการเจือจางสารละลายแอสคอร์บิกให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ปริมาตรแอสคอร์บิกจาก Stock (ไมโครลิตร) | ปริมาตรน้ำกลั่นปราศจากไอออน (ไมโครลิตร) |
|--|---|--|
| 0 | 0 | 1,000 |
| 20 | 20 | 980 |
| 40 | 40 | 960 |
| 60 | 60 | 940 |
| 80 | 80 | 920 |
| 100 | 100 | 900 |

4) การทำกราฟมาตรฐานสารละลายแอสคอร์บิก

ปิเปต สารละลาย ABTS ปริมาตร 950 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวก์เติมสารละลายแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 729 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการยับยั้ง และนำมาพลอตกราฟกับค่าความเข้มข้นต่างๆของสารละลายแอสคอร์บิกเพื่อหาสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

5) การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากตัวอย่างสารสกัดใบขลุ่ย

ปิเปต สารละลาย ABTS ปริมาตร 950 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวก์ เติมสารสกัดจากใบขลุ่ยที่ทำการเจือจางแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 729 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการยับยั้ง และคำนวณฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดังสมการ

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = [(A_{[0]} - A_{[t]}) / A_{[0]}] \times 100$$

โดยที่ : $A_{[0]}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 0 มิลลิโมลต่อลิตรของ

สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

$A_{[t]}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ไมโครกรัมสมมูลของกรดแอสคอบิกต่อมิลลิลิตร)

$$= [(A_{729} - B) / M] \times 100$$

โดยที่ : A_{729} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 729 นาโนเมตร

B คือ จุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิก

M คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกรดแอสคอบิก

D คือ ค่าการเจือจางของตัวอย่าง

โดยผลจะแสดงในหน่วยมิลลิกรัม สมมูลของกรดแอสคอบิกต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งใน แต่ละ การทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคิดเป็นค่าเฉลี่ย (\pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

4.8.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (ดัดแปลงจาก Benzie และคณะ, 1996)

1) การเตรียมสารละลาย FRAP reagent

A. เตรียมกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) 40 มิลลิโมล โดยปิเปตจากกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc.) 34 ไมโครลิตร ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้เป็น 10 มิลลิลิตร

B. เตรียม TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine) [MW= 314.34 กรัมต่อโมล] ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล โดยชั่ง TPTZ 0.0039 กรัม ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิโมลปริมาตร 10 มิลลิลิตร

C. เตรียมเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) [MW=270.26 กรัมต่อโมล] ความเข้มข้น 20 มิลลิโมล โดยชั่งเฟอร์ริกคลอไรด์ 0.0540 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร

D. เตรียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดต่าง 3.6 โดยชั่งโซเดียมอะซิเตท ($C_2H_3NaO_2$) 1.55 กรัม จากนั้นเติมกรดอะซิติก (Glacial Acetic Acid) 8 มิลลิลิตร คนให้ละลายจนหมดแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย B+C+D ผสมเข้าด้วยกันจะได้ FRAP reagent

2) การเตรียมสารสกัดจากใบขลุ่ย

เจือจางตัวอย่างสารสกัดจากใบขลุ่ยให้เป็น 50 เท่าจากตัวอย่างเข้มข้น โดยปิเปตน้ำกลั่นปราศจากไอออน 980 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์และเติมสารสกัดจากใบขลุ่ย 20 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน

3) การเตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสไอออน

เตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสไอออน โดยการชั่งเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.0280 กรัม ทำการละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร (stock 1,000 ไมโครโมลต่อลิตร) จากนั้นทำการเจือจางสารละลายเฟอร์รัสไอออนให้มีความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครโมลต่อลิตรดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสไอออนที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้น (ไมโครโมลต่อลิตร) | ปริมาตรเฟอร์รัสไอออนจาก Stock (ไมโครลิตร) | ปริมาตรน้ำกลั่นปราศจากไอออน (ไมโครลิตร) |
|----------------------------------|--|--|
| 0 | 0 | 1,000 |
| 200 | 200 | 800 |
| 400 | 400 | 600 |
| 600 | 600 | 400 |
| 800 | 800 | 200 |
| 1,000 | 1,000 | 0 |

4) การทำกราฟมาตรฐานสารละลายเฟอร์รัสไอออน

ปิเปต สารละลาย FRAP ปริมาตร 950 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวก์ เติมสารละลายเฟอร์รัสไอออนที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 มาพลอตกราฟกับค่าความเข้มข้นต่างๆของสารละลายเฟอร์รัสไอออนเพื่อหาสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในคำนวณฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

5) การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากตัวอย่างสารสกัดใบขลุ่

ปิเปต สารละลาย FRAP ปริมาตร 950 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวก์ เติมสารสกัดจากใบขลุ่ ที่ทำการเจือจางแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ค่าคำนวณฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดังสมการ

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ไมโครโมลสมมูลของเฟอร์รัสไอออนต่อลิตร)

$$= [(A_{595} - B) / M] \times 100$$

โดยที่ : A_{595} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

B คือ จุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสไอออน

M คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสไอออน

D คือ ค่าการเจือจางของตัวอย่าง

โดยผลจะแสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมตัวอย่างซึ่งในแต่ละการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคิดเป็นค่าเฉลี่ย (\pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

4.9 การวิเคราะห์หาปริมาณแทนนินทั้งหมดเทียบกับกรดแทนนิก (ดัดแปลงจาก Hoe และคณะ, 2003 อ้างถึงใน จันทิมา นามโชติ และคณะ, 2555)

1) การเตรียมสารละลายโฟลีนซิโอแคลตุ (folin-ciocalteu reagent) เตรียมโดยนำสารละลายโฟลีนซิโอแคลตุมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1: 1 จากนั้นผสมให้เข้ากัน และนำไปทดสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.9 – 1.0 เก็บที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งต่อไป

2) การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยทำการชั่งโซเดียมคาร์บอเนตมา 7 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในครั้งต่อไป

3) การเตรียมสารสกัดจากใบขลุ่ย เจือจางตัวอย่างสารสกัดจากใบขลุ่ยให้เป็น 10 เท่าจากตัวอย่างเข้มข้น โดยปิเปตน้ำกลั่นปราศจากไอออน 900 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโคร เซ็นตริฟิวก์ และเติมสารสกัดจากใบขลุ่ย 100 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน

4) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน กรดแทนนิก เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก โดยการชั่งกรดแทนนิก 0.025 กรัม ละลายในเอทานอล บริสุทธิ์และปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจาง 10 เท่า ให้ได้สารมาตรฐาน กรดแทนนิกเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยการปิเปตมา 2.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยเอทานอลให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐาน กรดแทนนิกมาเจือจางด้วยเอทานอลให้ความเข้มข้นเป็น 0 , 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแทนนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ปริมาตรแทนนิกจาก Stock (ไมโครลิตร) | ปริมาตรน้ำกลั่นปราศจากไอออน (ไมโครลิตร) |
|--|---------------------------------------|--|
| 0 | 0 | 1,000 |
| 20 | 20 | 980 |
| 40 | 40 | 960 |
| 60 | 60 | 940 |
| 80 | 80 | 920 |
| 100 | 100 | 900 |

5) การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแทนนิก นำสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน 520 ไมโครลิตร และเติมสารละลายเฟอร์ริโนซิโอแคลตุปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติมโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมกันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ในที่มีด 90 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาพลอต กราฟกับค่าความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายกรดแทนนิก เพื่อหาสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานสำหรับการใช้ในการคำนวณปริมาณสารประกอบแทนนิน

6) การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบแทนนิน นำสารสกัดจากใบขลุ่ยที่ทำการเจือจางแล้ว ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารละลายเฟอร์ริโนซิโอแคลตุปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 400 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปเก็บไว้ในที่มีดเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณแทนนิน ดังสมการ

สารประกอบแทนนิน (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแทนนิกต่อกรัมตัวอย่าง)

$$= [(A_{760} - B) / M] \times D$$

โดยที่ : A_{760} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร
B คือ จุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐานกรดแทนนิก
M คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกรดแทนนิก
D คือ ค่าการเจือจางของตัวอย่าง

โดยผลจะแสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแทนนิกต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งในแต่ละการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคิดเป็นค่าเฉลี่ย (\pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

4.9 การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (ดัดแปลงจาก Albona และคณะ, 2012)

เตรียมสกัดจากใบขลุ่ยปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติม Tris-HCl buffer (ค่าความเป็นกรดต่าง 7.4) 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 415 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) 0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมสารตั้งต้นอะซิติลไทโอโคลีนไอโอไดด์ (Acetylthiocholine iodide) ที่มีความเข้มข้น 18.3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเติม 5,5'-dithiobis [2-nitrobenzoic acid] (DTNB) ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 475 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย กาแลนทาไมน์ (Galanthamine) เป็นสารมาตรฐาน คำนวณหาร้อยละการยับยั้งตามสมการดังนี้

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

โดยที่ : A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกาแลนทาไมน์ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร
 A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

4.10 การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (ดัดแปลงจาก Caixeiro และคณะ, 2012)

1) การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลต่อลิตรค่าความเป็นกรดต่าง 6.8

A. เตรียมโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ความเข้มข้น 0.02 โมลต่อลิตร โดยชั่งโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2839 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

B. เตรียมโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.02 โมลต่อลิตร โดยชั่งโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3120 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

นำสารละลาย A ปริมาตร 100 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย B ปริมาตร 70 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรดต่าง 6.8

2) การเตรียมสารละลาย L-dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)

เตรียมสารละลาย L-dopa ความเข้มข้น 3.2 มิลลิโมลต่อลิตร โดยชั่ง L-dopa 0.0158 กรัมละลายด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3) การเตรียมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase from mushroom, บริษัท Fluka ; 3,610 unit/mg)

เตรียมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 350 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งเอนไซม์ ไทโรซิเนส 0.0030 กรัมละลายด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 1.083 มิลลิลิตร (stock 10,000 หน่วยต่อมิลลิลิตร) จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 350 หน่วยต่อมิลลิลิตรโดยปิเปตโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 965 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์และเติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสจาก stock ปริมาตร 35 ไมโครลิตรจากนั้นผสมให้เข้ากัน

4) การเตรียมสารสกัดจากใบขลุ่ย

เจือจางตัวอย่างสารสกัดจากใบขลุ่ยให้เป็น 10 , 100 และ 1,000 เท่าจากตัวอย่างเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากใบขลุ่ยที่ความเข้มข้นต่างๆ

| อัตราการเจือจาง (เท่า) | ปริมาตรสารสกัดจากใบขลุ่ย (ไมโครลิตร) | ปริมาตรน้ำกลั่นปราศจากไอออน (ไมโครลิตร) |
|------------------------|--------------------------------------|---|
| 10 | 100 | 900 |
| 100 | 10 | 990 |
| 1,000 | 1 | 999 |

5) การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกโดยการชั่งกรดโคจิก 0.01 กรัม ทำการละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตร (stock 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นทำการเจือจางสารละลายกรดโคจิกให้มีความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

| ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | ปริมาตรกรดโคจิกจาก Stock (ไมโครลิตร) | ปริมาตรน้ำกลั่นปราศจากไอออน (ไมโครลิตร) |
|-------------------------------------|--------------------------------------|---|
| 0 | 0 | 500 |
| 0.2 | 10 | 490 |
| 0.4 | 20 | 480 |
| 0.6 | 30 | 470 |
| 0.8 | 40 | 460 |
| 1.0 | 50 | 450 |

6) การทำกราฟมาตรฐานสารละลายกรดโคจิก

เติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 560 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดโคจิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที และเติมสารละลาย L-DOPA ปริมาตร 320 ไมโครลิตร นำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการยับยั้ง และนำมาพลอตกราฟกับค่าความเข้มข้นต่างๆของสารละลายกรดโคจิกเพื่อหาสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในการยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนส

7) การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 560 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารสกัดจากใบขลุ่ยที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA ปริมาตร 320 ไมโครลิตร นำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการยับยั้ง และคำนวณฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดังสมการ

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = [(A_{[0]} - A_{[t]}) / A_{[0]}] \times 100$$

โดยที่ : $A_{[0]}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 0 มิลลิโมลาร์ของสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก

$A_{[t]}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง

ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (ไมโครกรัมสมมูลของกรดโคจิกต่อมิลลิลิตร)

$$= [(A_{492} - B) / M] \times 100$$

โดยที่ : A_{492} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

B คือ จุดตัดแกน Y ของกราฟมาตรฐานกรดโคจิก

M คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกรดโคจิก

D คือ ค่าการเจือจางของตัวอย่าง

โดยผลจะแสดงในหน่วยมิลลิกรัม สมมูลของ กรดโคจิก ต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งในแต่ละการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคิดเป็นค่าเฉลี่ย (\pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

5. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) โดยนำผลที่ได้จากการหาปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบี ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด คุณสมบัติ ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' Multiple Range test ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 4

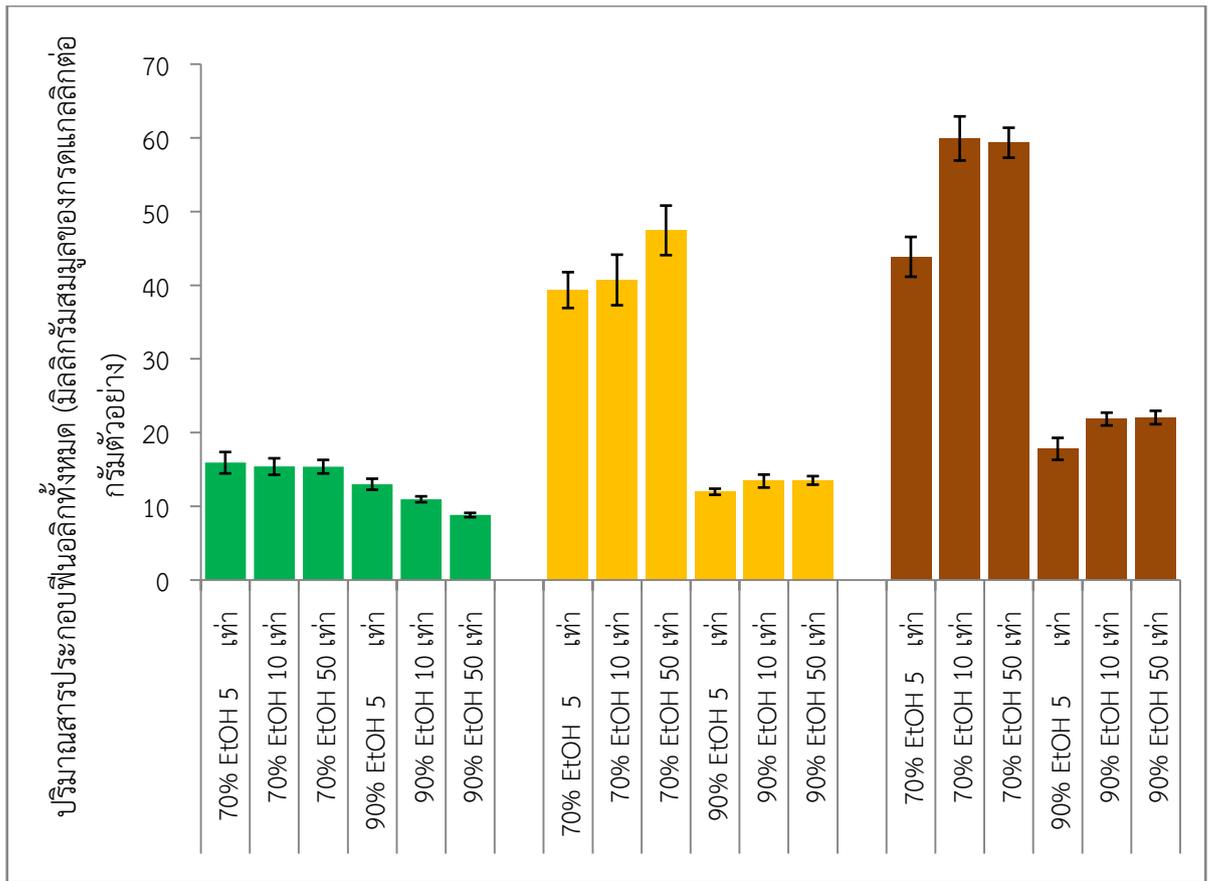
ผลและอภิปรายผลการทดลอง

ปีที่ 1 การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างของใบขลุ่ย และวิธีการสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของสารชีวภาพจากสารสกัดจากใบขลุ่ยที่วิธีการเก็บรักษาที่แตกต่างกัน การเตรียมตัวอย่างเพื่อสกัดสารจากใบขลุ่ยสด ใบขลุ่ยตากแห้ง และใบขลุ่ยอบ ที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 ปริมาตร 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) ซึ่งใบขลุ่ยสดมีความชื้นคิดเป็นร้อยละ 80 และเก็บสารสกัดจากใบขลุ่ยไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบี ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase) ซึ่งผลการทดลองมีดังต่อไปนี้

1. การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่เตรียมตัวอย่างและความเข้มข้นของเอทานอลแตกต่างกัน

ในการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบขลุ่ยทั้ง 3 ชนิด คือ สารสกัดจากใบขลุ่ยสด สารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้ง และสารสกัดจากใบขลุ่ยอบ โดยค่าที่ได้คิดเทียบเป็นสมมูลมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic Acid Equivalent : GAE) (ภาพที่ 13) พบว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยอบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 59.92 ± 2.99 และ 59.34 ± 2.03 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากใบขลุ่ยสดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 ปริมาตร 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่ำ เช่นเดียวกับสารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้งที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 ทุกปริมาตรการสกัด ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกัน จากวิธีการที่ได้ศึกษาข้างต้น พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สูงกว่า รายงานของ Noridayu และคณะ (2011) พบว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยเอทานอลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 573.52 ± 6.20 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมตัวอย่าง และสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยเฮกเซน ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด มีค่าเท่ากับ 75.26 ± 0.94 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมตัวอย่าง

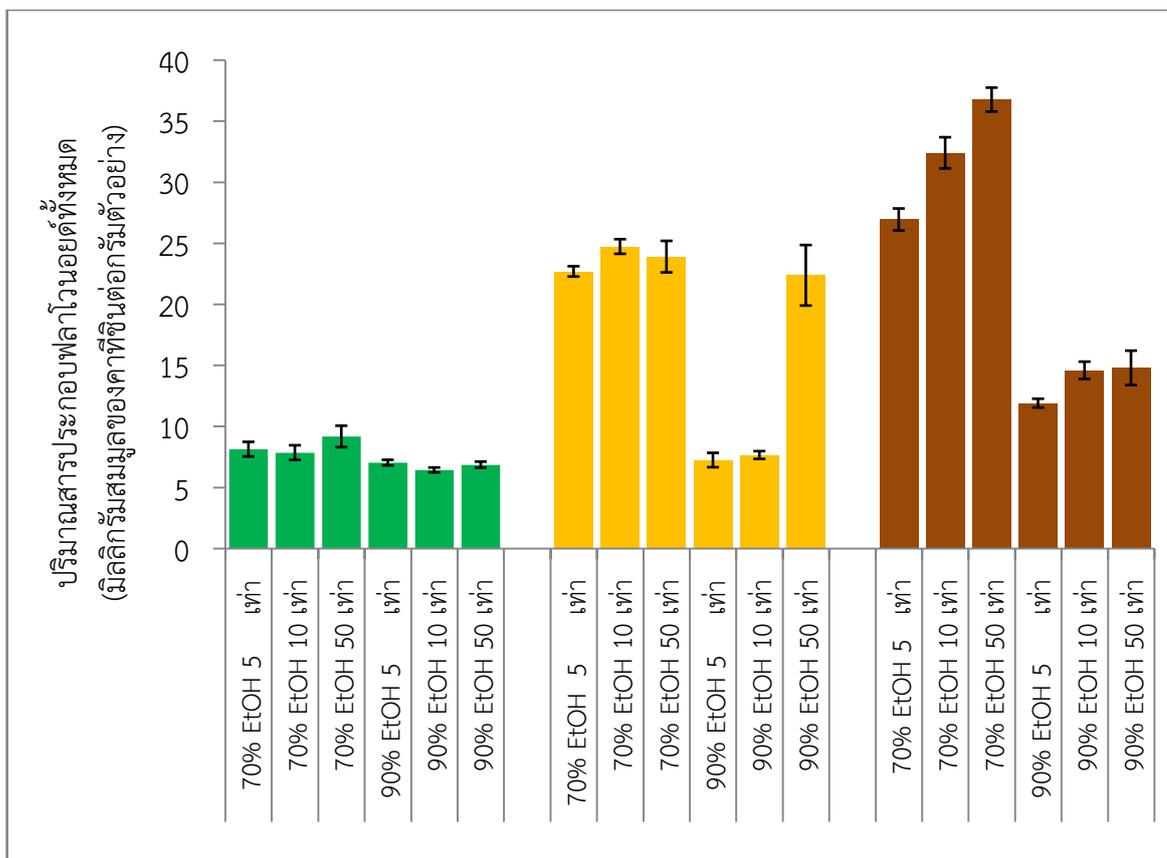


ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบขลุ่ย

2. การตรวจสอบคุณสมบัติทางพิษเคมี โดยตรวจสอบสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และ สารประกอบคลอโรฟิลล์ของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่เตรียมตัวอย่างและความเข้มข้นของเอทานอลแตกต่างกัน

2.1 สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

จากการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ของสารสกัดจากใบขลุ่ยทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากใบขลุ่ยสด สารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้ง และสารสกัดจากใบขลุ่ยอบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 ปริมาตรการสกัด 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) พบว่า สารสกัดที่ให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด คือ สารสกัดจากใบขลุ่ยอบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตรการสกัด 5 และ 10 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) มีค่าเท่ากับ 36.76 ± 0.98 และ 32.40 ± 1.28 มิลลิกรัมสมมูลของคาทีชินต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ ส่วนในกรณีของสารสกัดจากใบขลุ่ยสดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 ในทุกปริมาตรการสกัด มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดต่ำ และมีค่าไม่แตกต่างกัน จากภาพที่ 14 จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้งและสารสกัดจากใบขลุ่ยอบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 ในทุกปริมาตรการสกัด



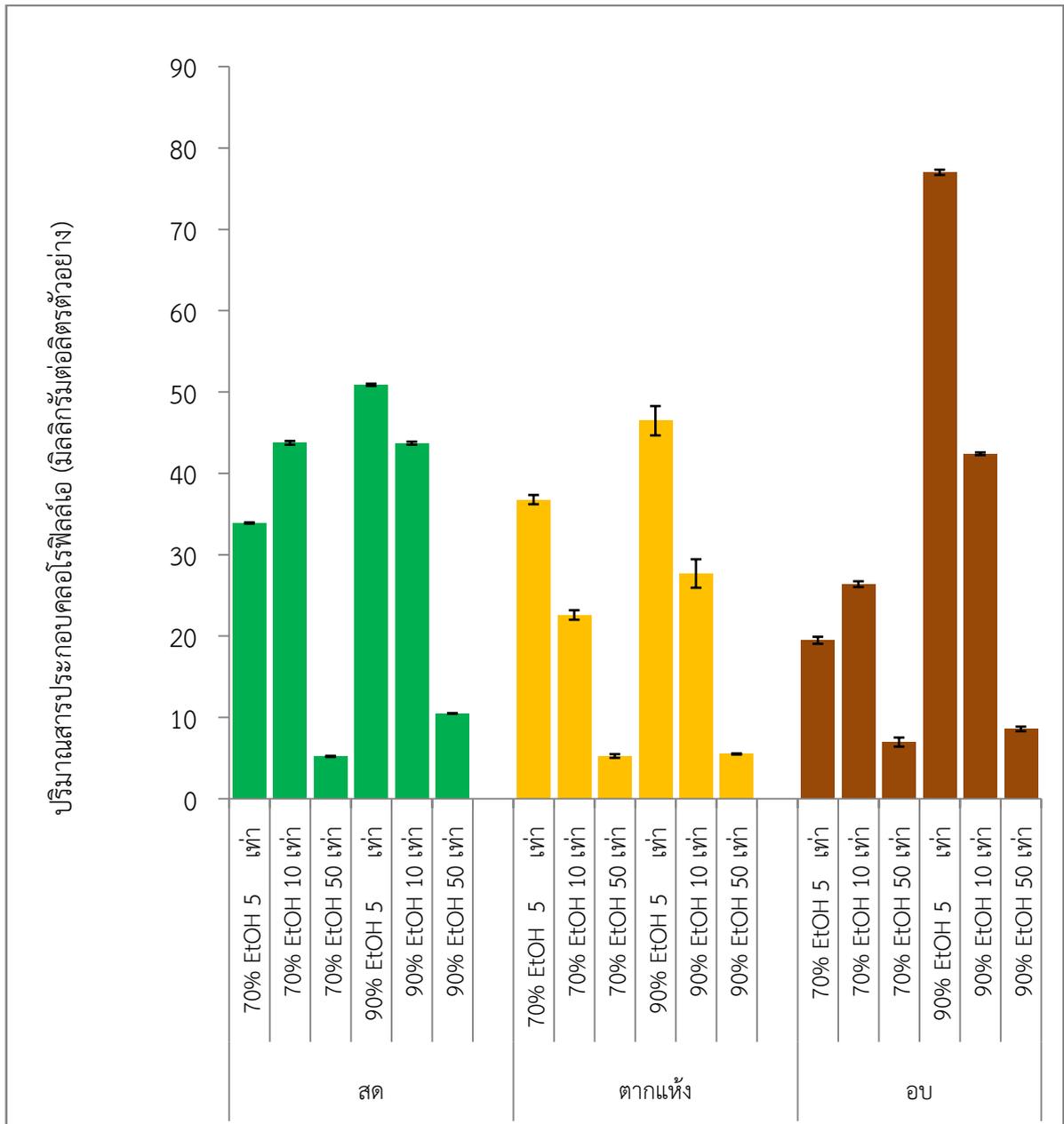
ภาพที่ 14 การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากใบขลุ่ย

2.2 ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์ของสารสกัดจากใบขลุ่ย

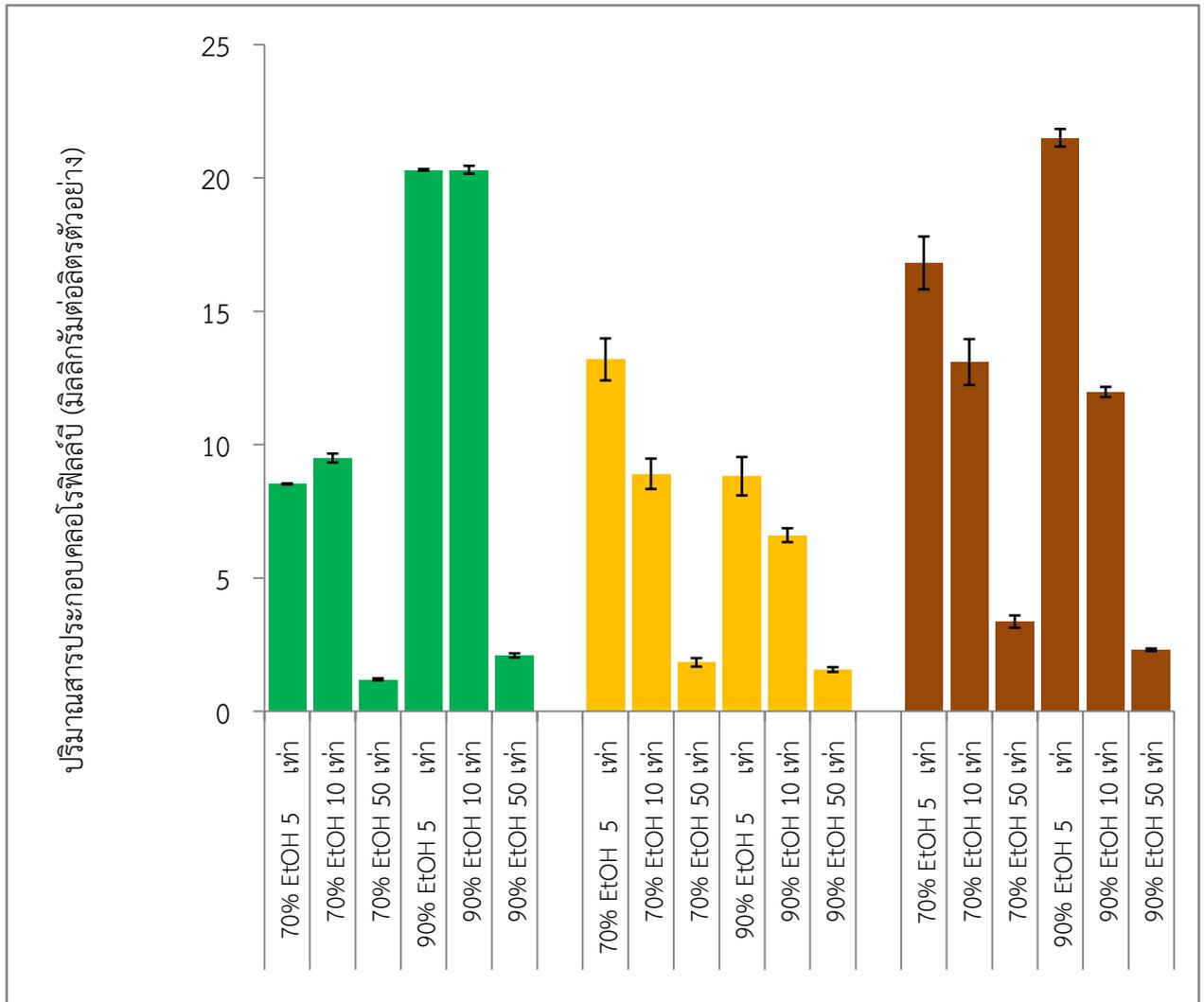
จากการตรวจสอบปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอในสารสกัดจากใบขลุ่ยทั้ง 3 ชนิด พบว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยอบ สารสกัดจากใบขลุ่ยสด และสารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้ง ที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอล ร้อยละ 90 ปริมาตร 5 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) ให้ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอสูงสุดคือ 76.99 ± 0.32 , 50.87 ± 0.14 และ 46.46 ± 1.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากภาพที่ 15 แสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 ให้ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอมากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล ร้อยละ 70 ทุกเท่าของการสกัด

จากการตรวจสอบสารสกัดจากใบขลุ่ย 3 ชนิด คือ สารสกัดจากใบขลุ่ยสด สารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้ง และสารสกัดจากใบขลุ่ยอบที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 ปริมาตร 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) พบว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยอบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 ปริมาตร 5 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) มีปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอสูงสุดเท่ากับ 21.50 ± 0.33 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่แตกต่างกันกับสารสกัดจากใบขลุ่ยสดที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 ปริมาตร 5 และ 10 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) เท่ากับ 20.30 ± 0.03 และ 20.30 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้งไม่สามารถเก็บรักษาสารประกอบคลอโรฟิลล์เอไว้ได้ จึงทำให้ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอมีน้อย เมื่อเทียบกับสารสกัดจากใบขลุ่ยอบ และสารสกัดจากใบขลุ่ยสด (ภาพที่ 16) จะเห็นได้ว่าการสกัดด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ เอทานอล ร้อยละ 70 และ 90 ให้ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบีต่างกัน ซึ่งการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 จะให้ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบีออกมาได้มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 นอกจากนี้ยังพบว่า

ปริมาณเอทานอลที่แตกต่างกันคือ 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) ให้ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบีที่แตกต่างกันด้วย โดยวิธีการสกัดที่มีปริมาตรน้อยสามารถสกัดสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบีออกมาได้มากกว่าการสกัดที่ใช้เอทานอลปริมาณมาก



ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอของสารสกัดจากใบขลุ่ย

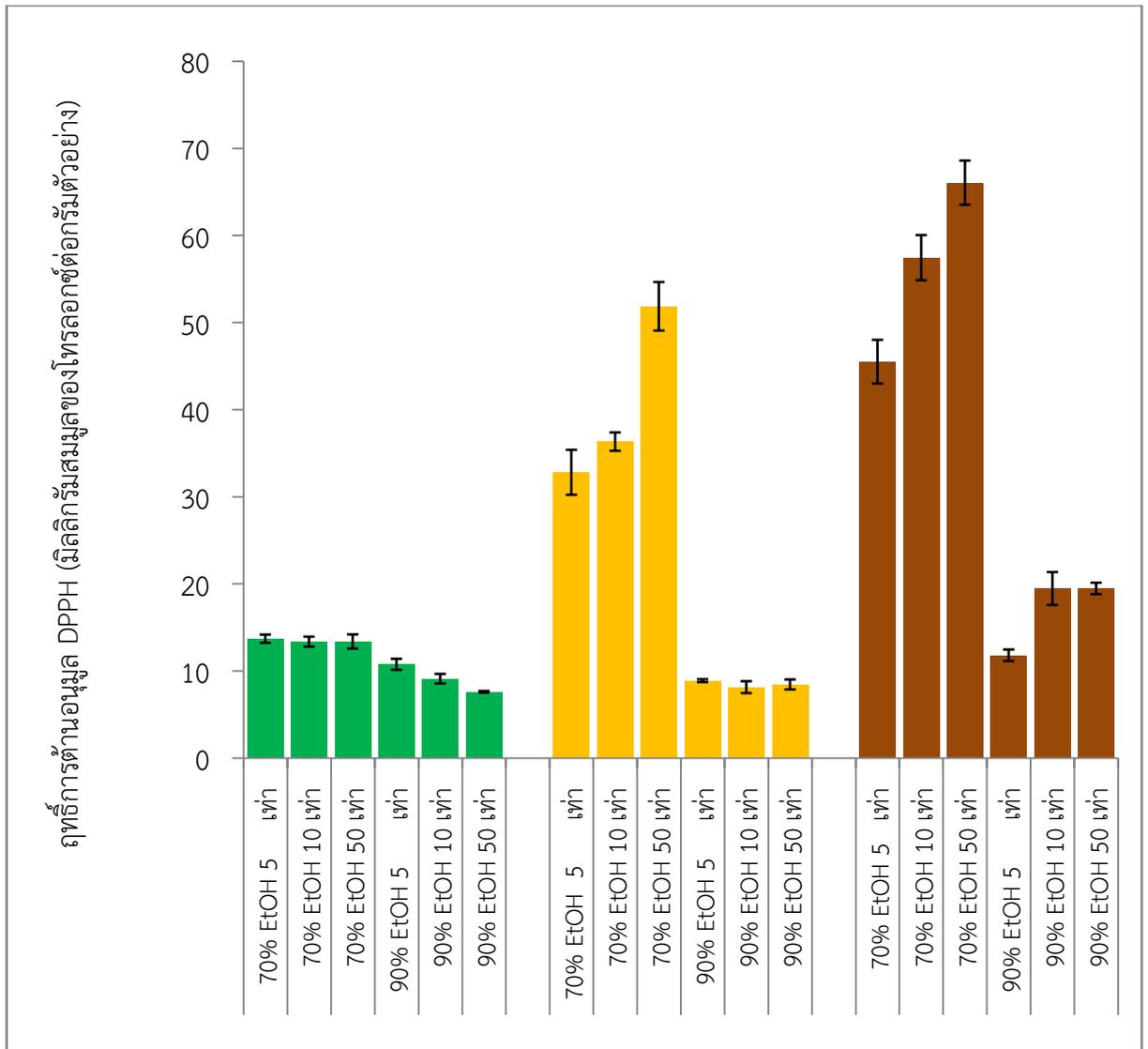


ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์ปีของสารสกัดจากใบขลุ่ย

3. คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่เตรียมตัวอย่างและความเข้มข้นของเอทานอลแตกต่างกัน

3 .1 ความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

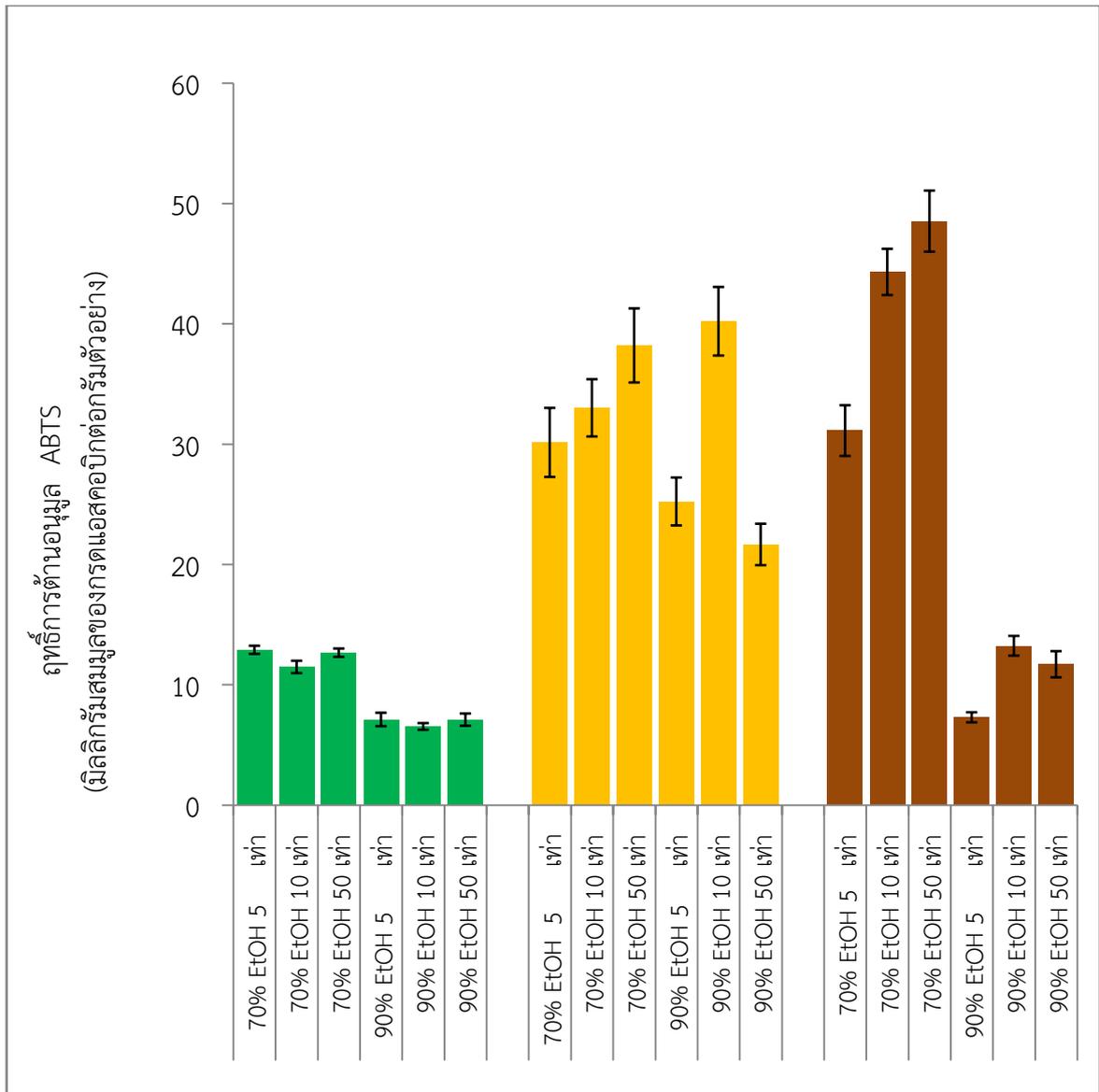
การทดสอบกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ได้แก่ สารสกัดจากใบขลุ่ยสด สารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้ง และสารสกัดจากใบขลุ่ยอบที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 ปริมาตร 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) พบว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยสดในทุกการสกัด มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกัน ส่วนสารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้งที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ดีกว่าที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 ของทุกปริมาตรการสกัด และสำหรับสารสกัดจากใบขลุ่ยอบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 50 และ 10 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ดีที่สุด ให้ค่าเท่ากับ 66.07 ± 2.53 และ 57.46 ± 2.59 มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 การเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากใบขลุ่ย

3.2 ความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

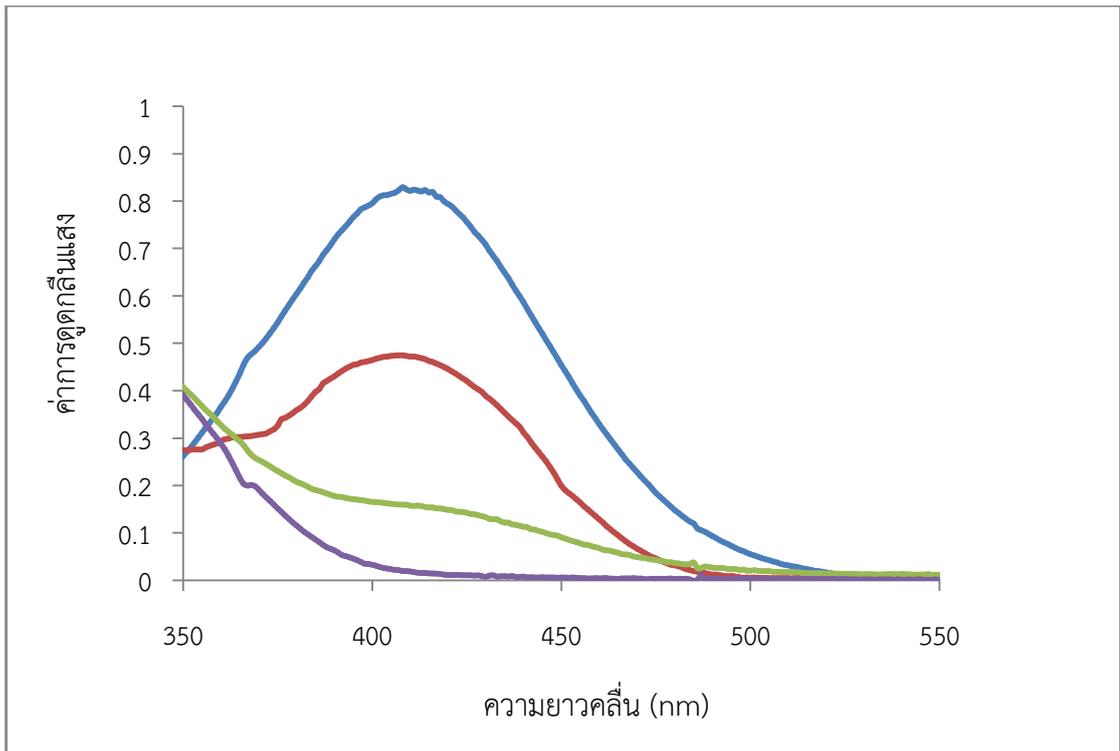
ในการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดจากใบขลุ่ยสด สารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้ง และสารสกัดจากใบขลุ่ยอบที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 ปริมาตร 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) จากผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยอบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 50 และ 10 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล ABTS ได้สูงสุด ให้ค่าเท่ากับ 48.53 ± 2.54 และ 44.31 ± 1.92 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอบิกต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ สารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้งที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตรการสกัด 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) ส่วนในกรณีของสารสกัดจากใบขลุ่ยสดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 ในทุกปริมาตรการสกัด มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล ABTS ต่ำ และมีค่าไม่ต่างกัน แสดงให้เห็นว่า การถนอมใบขลุ่ยด้วยการอบและตากแห้งมีฤทธิ์การต้านอนุมูล ABTS คงที่และดีกว่าใบขลุ่ยสด (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 การเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดจากใบขลุ่ย

4. ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) ของสารสกัดจากใบขลุ่ย

จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดจากใบขลุ่ยทั้ง 3 ชนิด คือ สารสกัดจากใบขลุ่ยสด สารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้ง และสารสกัดจากใบขลุ่ยอบ โดยค่าที่คิดเทียบกับสารมาตรฐานกาแลนทาไมน์ (Galanthamine) แสดงดังภาพที่ 19 พบว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) (ภาพที่ 20 และภาพที่ 21)



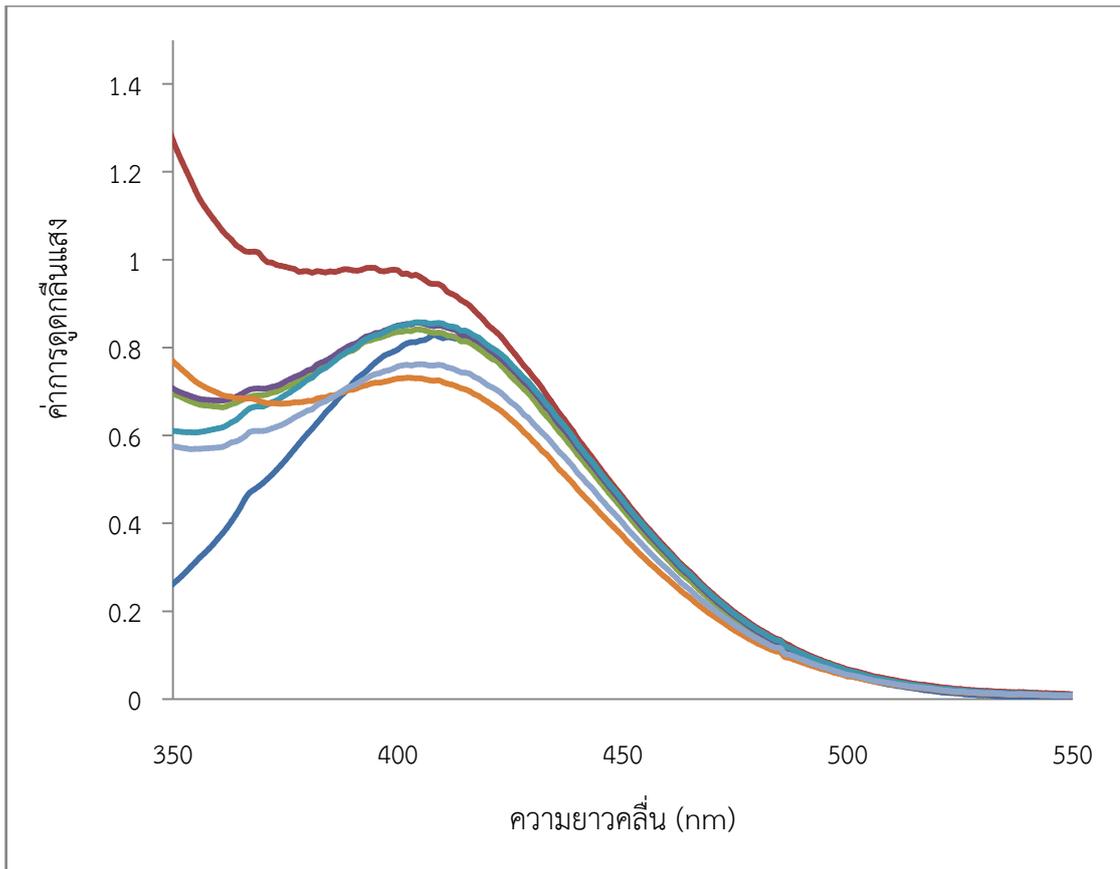
ภาพที่ 19 คุณสมบัติการดูดกลืนแสงของเอนไซม์อะซิทีลโคลีนเอสเทอเรสในสภาวะต่าง ๆ

Ao คือ เอนไซม์ + สารตั้งต้น (—)

A20 คือเอนไซม์ + สารตั้งต้น + สารยับยั้งเอนไซม์มาตรฐานความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (—)

A40 คือเอนไซม์ + สารตั้งต้น + สารยับยั้งเอนไซม์มาตรฐานความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (—)

A60 คือเอนไซม์ + สารตั้งต้น + สารยับยั้งเอนไซม์มาตรฐานความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (—)



ภาพที่ 20 คุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์อะซิทีลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด)

Ao คือ เอนไซม์ + สารตั้งต้น (—)

สารสกัดจากใบสด 5 เท่า คือ ใบขลุ่ยสดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 5 เท่า (—)

สารสกัดจากใบอบ 10 เท่า คือ ใบขลุ่ยอบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 10 เท่า (—)

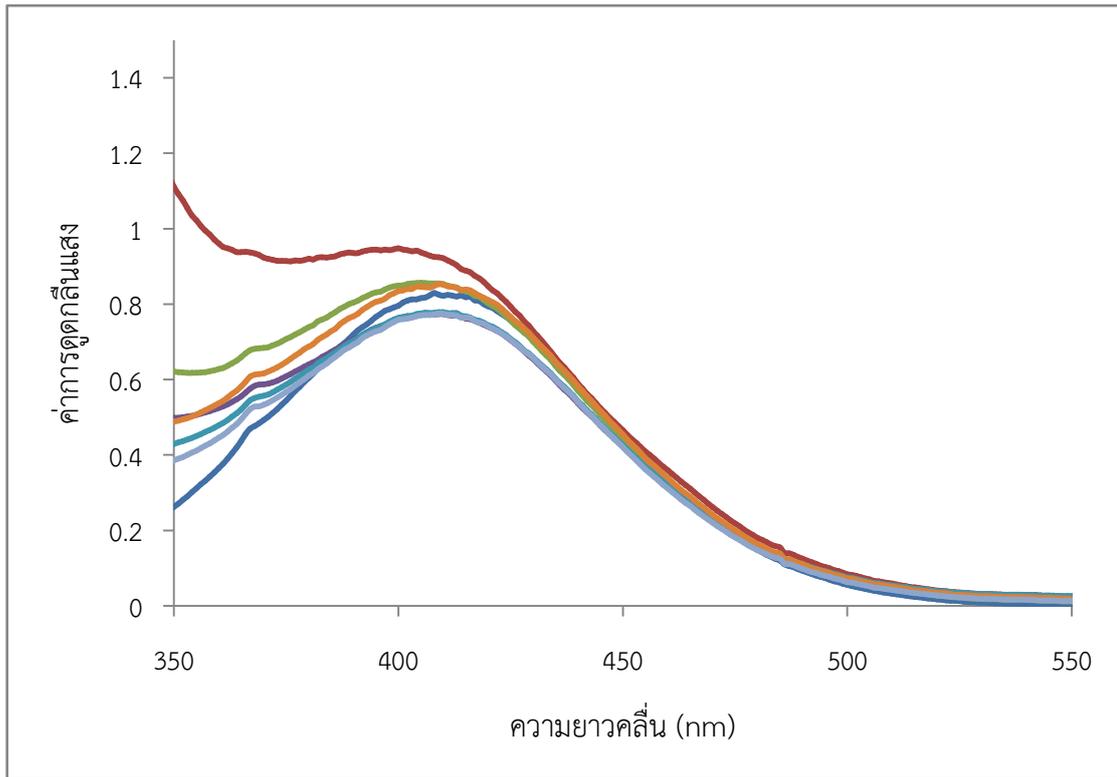
สารสกัดจากใบสด 10 เท่า คือ ใบขลุ่ยสดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 10 เท่า (—)

สารสกัดจากใบตากแดด 5 เท่า คือ ใบขลุ่ยตากแดดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 5 เท่า (—)

สารสกัดจากใบอบ 5 เท่า คือ ใบขลุ่ยอบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 5 เท่า (—)

สารสกัดจากใบตากแดด 10 เท่า คือ ใบขลุ่ยตากแดดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 10 เท่า (—)

หมายเหตุ : ปริมาตร 5 และ 10 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด)



ภาพที่ 21 คุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์อะซิทีลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 ปริมาตร 5, 10 และ 50 เท่า (น้ำหนักใบขลุ่ยสดต่อปริมาตร)

Ao คือ เอนไซม์ + สารตั้งต้น (—)

สารสกัดจากใบสด 5 เท่า คือ ใบขลุ่ยสดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 5 เท่า (—)

สารสกัดจากใบอบ 10 เท่า คือ ใบขลุ่ยอบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 10 เท่า (—)

สารสกัดจากใบสด 10 เท่า คือ ใบขลุ่ยสดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 10 เท่า (—)

สารสกัดจากใบตากแดด 5 เท่า คือ ใบขลุ่ยตากแดดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 5 เท่า (—)

สารสกัดจากใบอบ 5 เท่า คือ ใบขลุ่ยอบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 5 เท่า (—)

สารสกัดจากใบตากแดด 10 เท่า คือ ใบขลุ่ยตากแดดที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 10 เท่า (—)

หมายเหตุ : ปริมาตร 5 และ 10 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด)

4. การเก็บรักษาสารสกัดจากใบขลุ่ย 3 ชนิด คือ สารสกัดจากใบขลุ่ยสด สารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้ง และสารสกัดจากใบขลุ่ยอบ

4.1 การเก็บรักษาสารสกัดจากใบขลุ่ยสด

ในการเก็บรักษาใบขลุ่ยสดเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าสารสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 มีค่าไม่แตกต่างจากการสกัดเริ่มต้น (0 เดือน) ทั้งที่ปริมาตร 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) ส่วนฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH และ ABTS มีค่าสูงขึ้นในทุกปริมาณการสกัด โดยฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH มีค่าสูงสุดหลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือน ที่ปริมาตร 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) มีค่าเท่ากับ 20.17 ± 1.64 มิลลิกรัมสมมูลของโพลีฟีนอลต่อกรัมตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบว่า การสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ทั้งหมดและค่าการต้านอนุมูล DPPH และ ABTS สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 ทั้งที่การสกัดเริ่มต้นและที่เก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือน (ตารางที่ 9) ดังนั้น สารสกัดจากใบขลุ่ยสดมีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษา เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 9 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระหลังจากการเก็บรักษาสารสกัดจากใบขลุ่ยสด

| สารสกัดจากใบขลุ่ย | | Total phenolic | DPPH | ABTS | |
|-------------------|----------|----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 เดือน | 70% EtOH | 5 เท่า | 15.93 ^a ± 1.45 | 13.72 ^c ± 0.47 | 12.90 ^c ± 0.34 |
| | | 10 เท่า | 15.41 ^a ± 1.12 | 13.38 ^{cd} ± 0.57 | 11.48 ^d ± 0.51 |
| | | 50 เท่า | 15.39 ^a ± 0.92 | 13.40 ^{cd} ± 0.82 | 12.66 ^c ± 0.35 |
| | 90% EtOH | 5 เท่า | 13.01 ^{bc} ± .75 | 10.97 ^d ± .40 | 8.83 ^{ef} ± 0.29 |
| | | 10 เท่า | 10.78 ^e ± 0.63 | 9.13 ^f ± 0.55 | 7.62 ^g ± 0.10 |
| | | 50 เท่า | 7.11 ^f ± 0.56 | 6.53 ^f ± 0.28 | 7.10 ^f ± 0.51 |
| 1 เดือน | 70% EtOH | 5 เท่า | 15.50 ^a ± 1.36 | 17.09 ^b ± 0.54 | 13.50 ^{bc} ± 0.28 |
| | | 10 เท่า | 14.52 ^{ab} ± 1.05 | 16.67 ^b ± 0.27 | 63.18 ^a ± 1.73 |
| | | 50 เท่า | 15.84 ^a ± 1.22 | 20.17 ^a ± 1.64 | 14.14 ^b ± 0.49 |
| | 90% EtOH | 5 เท่า | 11.48 ^{cd} ± 0.88 | 10.32 ^{de} ± 0.75 | 8.54 ^f ± 0.76 |
| | | 10 เท่า | 13.60 ^c ± 0.36 | 12.30 ^d ± 0.49 | 9.79 ^{ef} ± 0.17 |
| | | 50 เท่า | 8.52 ^e ± 0.36 | 7.28 ^f ± 0.36 | 6.24 ^f ± 0.37 |

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

4.2 การเก็บรักษาสารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้ง

ในการเก็บรักษาใบขลุ่ยตากแห้ง เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้งที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 ในทุกปริมาณของการสกัด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลง และมีค่าการต้านอนุมูล DPPH เปลี่ยนแปลงไปจากค่าเริ่มต้นเล็กน้อย (ตารางที่ 10) ส่วนในกรณีของฤทธิ์การต้านอนุมูล ABTS การสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ของสารสกัดเริ่มต้น มีค่าการต้านอนุมูล ABTS ใกล้เคียงกันกับสารสกัดที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือน แต่ในกรณีของการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 มีค่าการต้านอนุมูล ABTS ลดลงในทุกเท่าของการสกัด

ตารางที่ 10 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระหลังจากการเก็บรักษาสารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้ง

| สารสกัดจากใบขลุ่ย | | | Total phenolic | DPPH | ABTS |
|-------------------|----------|---------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 0 เดือน | 70% EtOH | 5 เท่า | 39.35 ^{bc} ± 2.43 | 32.82 ^b ± 2.58 | 30.14 ^{bcd} ± 2.87 |
| | | 10 เท่า | 40.72 ^b ± 3.43 | 36.34 ^b ± 1.05 | 33.01 ^{abc} ± 2.38 |
| | | 50 เท่า | 47.45 ^a ± 3.36 | 51.87 ^a ± 2.79 | 38.20 ^{ab} ± 3.08 |
| | 90% EtOH | 5 เท่า | 11.99 ^e ± 0.41 | 8.91 ^c ± 0.71 | 25.23 ^{cd} ± 1.99 |
| | | 10 เท่า | 13.44 ^e ± 0.88 | 8.16 ^c ± 0.68 | 40.21 ^a ± 2.85 |
| | | 50 เท่า | 13.53 ^e ± 0.58 | 8.47 ^c ± 0.57 | 21.66 ^d ± 1.72 |
| 1 เดือน | 70% EtOH | 5 เท่า | 15.97 ^e ± 1.38 | 39.79 ^b ± 1.77 | 28.14 ^{cd} ± 2.45 |
| | | 10 เท่า | 23.00 ^d ± 2.28 | 47.22 ^a ± 2.66 | 33.04 ^{abc} ± 1.81 |
| | | 50 เท่า | 34.57 ^c ± 2.7 | 49.77 ^a ± 3.67 | 39.43 ^{ab} ± 2.16 |
| | 90% EtOH | 5 เท่า | 0.40 ^f ± 0.03 | 2.23 ^c ± 0.24 | 6.49 ^e ± 0.16 |
| | | 10 เท่า | 2.84 ^f ± 0.10 | 4.67 ^c ± 0.22 | 7.18 ^e ± 0.33 |
| | | 50 เท่า | 3.12 ^f ± 0.22 | 5.02 ^c ± 0.43 | 8.30 ^e ± 0.35 |

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

4.3 การเก็บรักษาสารสกัดจากใบขลุ่ยอบ

จากการเก็บรักษาใบขลุ่ยอบ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า การสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงมีฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH เพิ่มขึ้น โดยมีค่าสูงสุดที่ ปริมาตร 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) เท่ากับ 76.20 ± 3.16 มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัม ตัวอย่าง และมีฤทธิ์การต้านอนุมูล ABTS คงที่ ทั้งปริมาตร 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) โดยที่การสกัดด้วยเอทานอล ร้อยละ 70 ให้ค่าที่สูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 (ตารางที่ 11) จากผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การถนอมใบขลุ่ยโดยวิธีการอบ ไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา เนื่องจาก ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลง

ตารางที่ 11 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระหลังจากการเก็บรักษาสารสกัดจากใบขลุ่ย

| สารสกัดจากใบขลุ่ย | | | Total phenolic | DPPH | ABTS |
|-------------------|----------|---------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 เดือน | 70% EtOH | 5 เท่า | 43.86 ^b ± 2.70 | 45.52 ^d ± 2.50 | 31.12 ^c ± 2.11 |
| | | 10 เท่า | 59.92 ^a ± 2.99 | 57.46 ^c ± 2.59 | 44.31 ^{ab} ± 1.92 |
| | | 50 เท่า | 59.34 ^a ± 2.03 | 66.07 ^b ± 2.53 | 48.53 ^a ± 2.54 |
| | 90% EtOH | 5 เท่า | 17.81 ^d ± 1.49 | 11.82 ^g ± 0.66 | 7.29 ^f ± 0.42 |
| | | 10 เท่า | 21.85 ^d ± 0.87 | 19.48 ^f ± 1.89 | 13.24 ^d ± 0.82 |
| | | 50 เท่า | 22.06 ^d ± 0.91 | 19.49 ^f ± 0.66 | 11.70 ^{de} ± 1.09 |
| 1 เดือน | 70% EtOH | 5 เท่า | 20.34 ^d ± 0.13 | 52.25 ^c ± 2.09 | 32.65 ^c ± 3.15 |
| | | 10 เท่า | 28.39 ^c ± 2.74 | 64.77 ^b ± 3.53 | 42.19 ^b ± 3.00 |
| | | 50 เท่า | 45.02 ^b ± 1.67 | 76.20 ^a ± 3.16 | 47.15 ^a ± 2.10 |
| | 90% EtOH | 5 เท่า | 7.39 ^e ± 0.58 | 22.34 ^{ef} ± 1.66 | 7.61 ^{ef} ± 0.68 |
| | | 10 เท่า | 11.61 ^e ± 1.02 | 28.17 ^e ± 2.81 | 12.98 ^d ± 0.73 |
| | | 50 เท่า | 10.73 ^e ± 0.49 | 24.98 ^{ef} ± 1.35 | 12.81 ^d ± 1.24 |

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

ปีที่ 2 การศึกษาปริมาณสารสกัดจากใบขลุ่ยด้วยความร้อน

ตอนที่ 1 การศึกษาปริมาณสารสกัดจากใบขลุ่ยด้วยความร้อน โดยใช้อุณหภูมิและอุปกรณ์ที่แตกต่างกัน

จากการนำสารสกัดใบขลุ่ยซึ่งสกัดด้วยความร้อนในสภาวะต่างกันโดยนำมาทดสอบคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระและทำการเปรียบเทียบกับสารสกัดใบขลุ่ยที่ผ่านการเก็บรักษาสภาพ ใบขลุ่ยอบแห้งระยะเวลา 3 เดือนโดยทดสอบถึงปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบีทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS, FRAP และความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) โดยมีผลการทดลองดังต่อไปนี้

1. การตรวจสอบสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบขลุ่ยด้วยความร้อน โดยใช้อุณหภูมิและอุปกรณ์ที่แตกต่างกัน

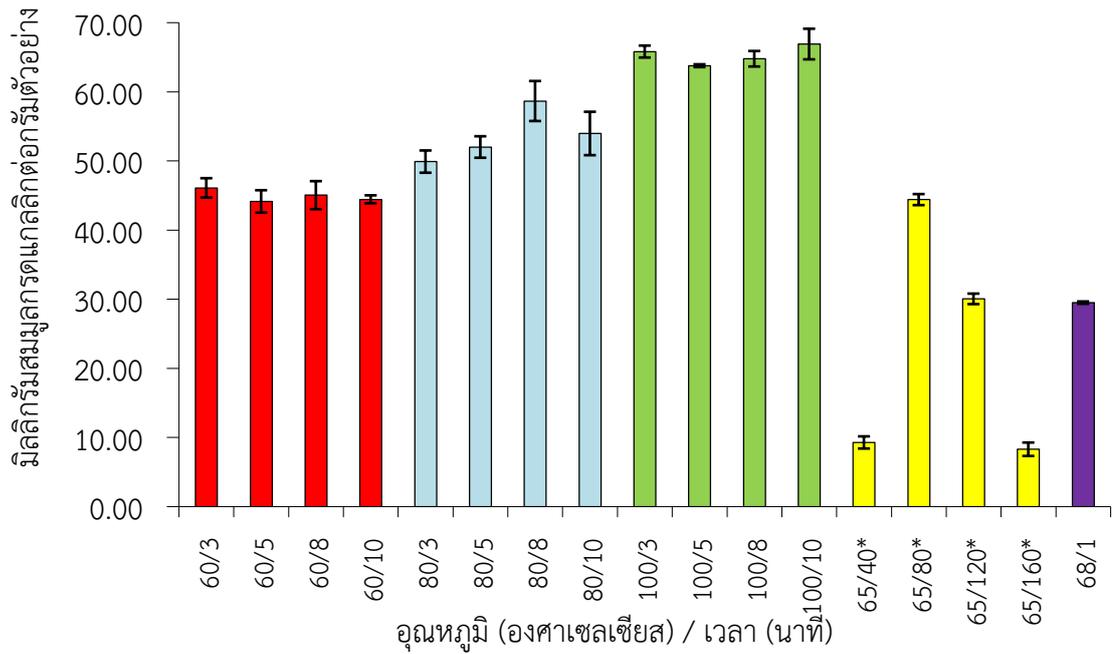
ในการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยคำนวณเทียบเท่าเป็นน้ำหนักสมมูลของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic Acid Equivalent : GAE) จากกราฟมาตรฐานความเข้มข้นระหว่าง 0-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการสกัดใบขลุ่ยด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10

นาที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดคือ 66.92 ± 2.21 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง โดยการสกัดใบช่อดำด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันที่สกัดผ่านหัวชงเป็นเวลา 40 วินาทีที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่ำที่สุดคือ 9.29 ± 0.88 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง และสารสกัดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยดมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 29.51 ± 0.17 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 12 และภาพที่ 22 ซึ่งปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดจากสภาวะต่างๆมีค่ามากกว่ารายงานการศึกษาของ MohdNazri และคณะ (2011) ในการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบช่อดำโดยใช้ตัวทำละลายคือ เอทานอลในการสกัดพบว่า ค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 56.287 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตัวอย่าง และผลการศึกษาของ Andarwulan และคณะ(2010) ได้ศึกษาถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในผักที่นิยมบริโภคในประเทศอินโดนีเซียพบว่าสารสกัดจากใบช่อดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.831 ± 0.129 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างและเมื่อทำการเปรียบเทียบกับสารสกัดใบช่อดำที่ผ่านการเก็บรักษาสภาพใบช่อดำแห้งเป็นระยะเวลา 3 เดือนพบว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาสกัด 10 นาทีที่มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดคือ 62.08 ± 1.31 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างโดยสารสกัด ใบช่อดำที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันที่สกัดผ่านหัวชง ระยะเวลา 160 วินาที มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่ำที่สุดคือ 5.17 ± 1.31 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างและสารสกัดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดคือ 28.90 ± 0.37 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง ดังแสดงภาพที่ 23 จากการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยน้ำร้อน พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดใบช่อดำมีผลทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น จากการทดสอบเปรียบเทียบสารสกัดจากใบช่อดำที่ผ่านการเก็บรักษาสภาพเป็นเวลา 3 เดือนพบว่า มีค่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 12 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบขลุ่ยด้วยความร้อน และหลังจากเก็บรักษา ใบขลุ่ยอบแห้งระยะเวลา 3 เดือน

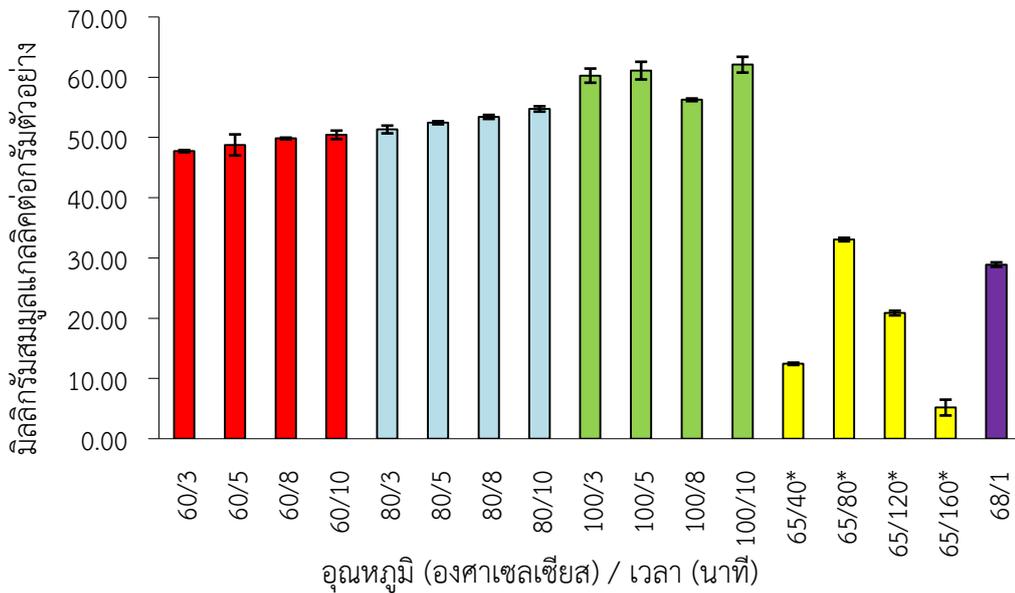
| เครื่องมือสกัด | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) | มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง | |
|--------------------------------------|----------------------------|----------------|--|----------------------------|
| | | | เริ่มทดลอง | เก็บรักษา 3 เดือน |
| กาต้มน้ำไฟฟ้า | 60 | 3.00 | 46.11 ^c ± 1.40 | 47.74 ^f ± 0.18 |
| | | 5.00 | 44.16 ^c ± 1.62 | 48.76 ^{fg} ± 1.75 |
| | | 8.00 | 45.06 ^c ± 2.03 | 49.84 ^{gh} ± 0.41 |
| | | 10.00 | 44.45 ^c ± 0.58 | 50.44 ^{hi} ± 0.71 |
| | 80 | 3.00 | 49.91 ^d ± 1.16 | 51.33 ^{ij} ± 0.65 |
| | | 5.00 | 52.02 ^{de} ± 1.55 | 52.44 ^{jk} ± 0.26 |
| | | 8.00 | 58.67 ^f ± 2.89 | 53.41 ^{kl} ± 0.33 |
| | | 10.00 | 53.98 ^e ± 3.14 | 54.74 ^l ± 0.45 |
| | 100 | 3.00 | 65.83 ^{gh} ± 0.87 | 60.27 ⁿ ± 1.18 |
| | | 5.00 | 63.79 ^g ± 0.20 | 61.10 ^{no} ± 1.47 |
| | | 8.00 | 64.79 ^{gh} ± 1.12 | 56.26 ^m ± 0.22 |
| | | 10.00 | 66.92 ^h ± 2.21 | 62.08 ^o ± 1.31 |
| เครื่องชงกาแฟ อัตโนมัติด้วยแรงดัน | 65 | 40* | 9.29 ^a ± 0.88 | 12.43 ^b ± 0.19 |
| | | 80* | 44.42 ^c ± 0.80 | 33.07 ^e ± 0.30 |
| | | 120* | 30.06 ^b ± 0.76 | 20.86 ^c ± 0.38 |
| | | 160* | 8.30 ^a ± 0.96 | 5.17 ^a ± 1.31 |
| เครื่องชงกาแฟแบบหยด | 68 | 1.00 | 29.51 ^b ± 0.17 | 28.90 ^d ± 0.37 |

หมายเหตุ * หน่วยเป็นวินาที



ภาพที่ 22 ปริมาณสารประกอบพีนอลิกของสารสกัดใบขลู่ที่เริ่มการทดลอง

■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 60°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 80°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 100°C)
 ■ (เครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน) ■ (เครื่องชงกาแฟแบบหยด)* หน่วยเป็นวินาที



ภาพที่ 23 ปริมาณสารประกอบพีนอลิกของสารสกัดใบขลู่หลังเก็บรักษาภาพที่ 3 เดือน

■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 60°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 80°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 100°C)
 ■ (เครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน) ■ (เครื่องชงกาแฟแบบหยด)* หน่วยเป็นวินาที

2. การตรวจสอบคุณสมบัติทางพิษเคมี โดยตรวจสอบสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และ สารประกอบคลอโรฟิลล์ของสารสกัดจากใบช่อบแห้งด้วยความร้อน

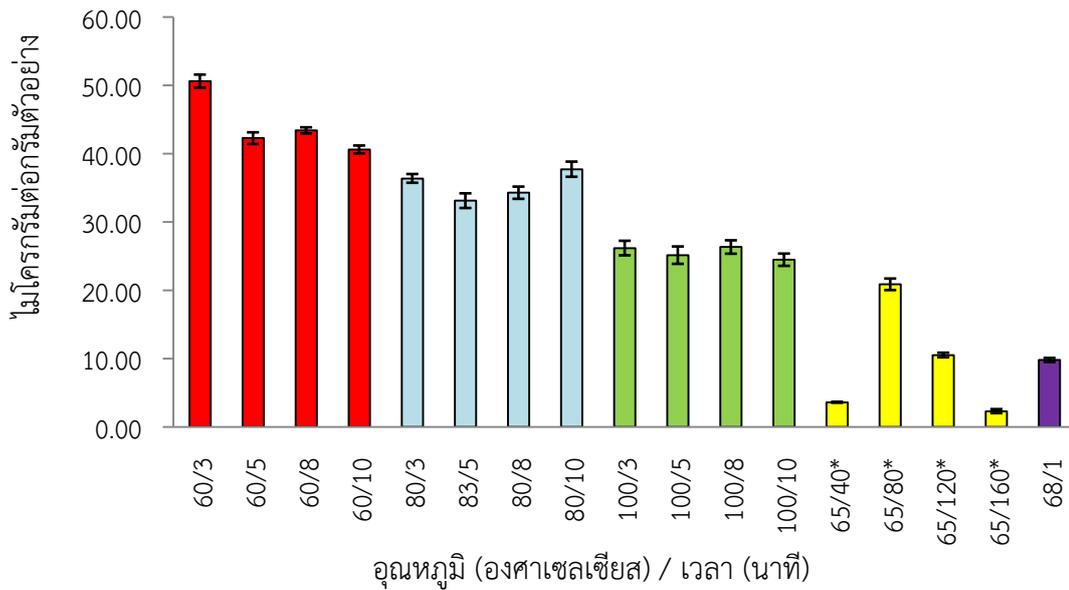
2.1 ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอทั้งหมดของสารสกัดจากใบช่อบแห้ง

ในการตรวจสอบปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอของสารสกัดจากใบช่อบแห้งที่สกัดด้วยน้ำร้อนที่ อุณหภูมิและระยะเวลาที่ แตกต่างกันโดยพบว่าการสกัด ใบช่อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 นาที มีปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอมากที่สุดคือ 50.62 ± 0.96 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง โดยปริมาณ คลอโรฟิลล์เอมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัด (ตารางที่ 13) จะเห็นได้จากผลของ การสกัดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอน้อยที่สุดคือ 24.47 ± 0.90 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ในส่วนของการ สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน พบว่า สารที่สกัดผ่านหัวชงในระยะเวลาต่างๆให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 24)

ตารางที่ 13 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของสารสกัดใบช่อบแห้งด้วยความร้อน และหลังจากเก็บรักษาใบช่อบแห้ง ระยะเวลา 3 เดือน

| เครื่องมือสกัด | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) | ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง | |
|----------------------------------|-------------------------|-------------|--------------------------|-----------------------|
| | | | เริ่มทดลอง | เก็บรักษา 3 เดือน |
| กาดม้ไฟฟ้า | 60 | 3.00 | $50.62^j \pm 0.96$ | $28.92^k \pm 0.56$ |
| | | 5.00 | $42.27^i \pm 0.86$ | $28.64^k \pm 0.05$ |
| | | 8.00 | $43.41^i \pm 0.45$ | $27.94^j \pm 0.75$ |
| | | 10.00 | $40.16^h \pm 0.58$ | $28.29^{jk} \pm 0.22$ |
| | 80 | 3.00 | $36.38^s \pm 0.64$ | $26.58^i \pm 0.24$ |
| | | 5.00 | $33.12^f \pm 1.08$ | $25.89^h \pm 0.35$ |
| | | 8.00 | $34.28^f \pm 0.90$ | $26.70^i \pm 0.04$ |
| | | 10.00 | $37.73^s \pm 1.11$ | $26.13^{hi} \pm 0.72$ |
| | 100 | 3.00 | $26.18^e \pm 1.06$ | $20.77^s \pm 0.08$ |
| | | 5.00 | $25.14^{de} \pm 1.27$ | $20.76^s \pm 0.32$ |
| | | 8.00 | $26.34^e \pm 0.98$ | $20.48^s \pm 0.57$ |
| | | 10.00 | $24.47^d \pm 0.90$ | $19.18^f \pm 0.27$ |
| เครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน | 65 | 40* | $3.60^a \pm 0.07$ | $0.31^a \pm 0.14$ |
| | | 80* | $20.87^c \pm 0.84$ | $9.56^e \pm 0.27$ |
| | | 120* | $10.52^b \pm 0.34$ | $3.47^c \pm 0.13$ |
| | | 160* | $2.30^a \pm 0.29$ | $1.27^b \pm 0.13$ |
| เครื่องชงกาแฟแบบหยด | 68 | 1.00 | $9.79^b \pm 0.30$ | $6.48^d \pm 0.11$ |

หมายเหตุ * หน่วยเป็นวินาที



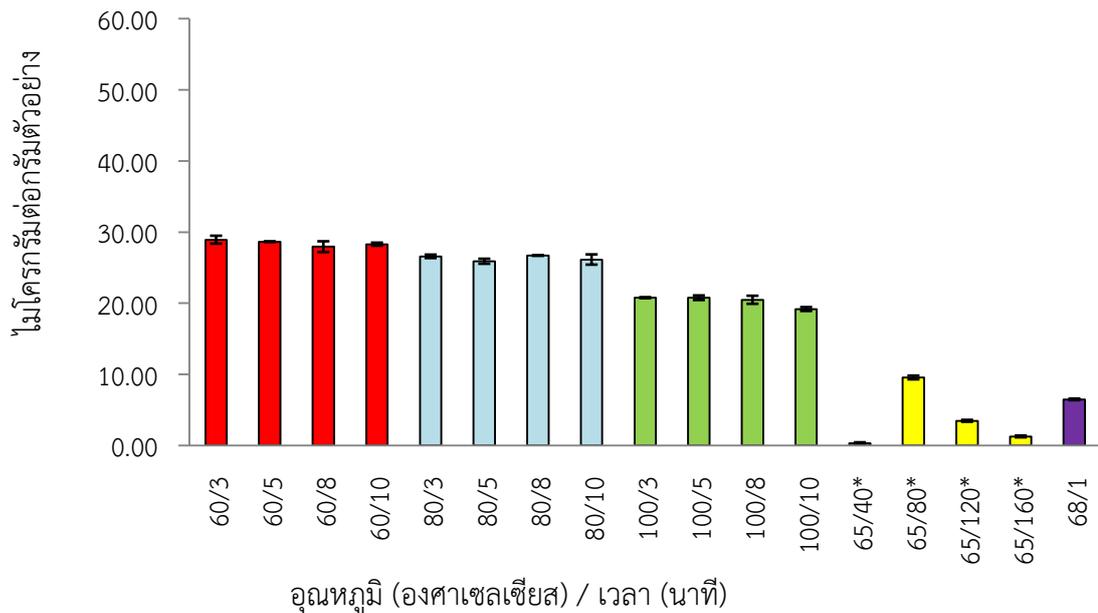
ภาพที่ 24 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของสารสกัดใบขลุ่ยที่เริ่มการทดลอง

■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 60°C) □ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 80°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 100°C)
 ■ (เครื่องชงกาแพ้อัดโนม้ติด้วยแรงดัน) ■ (เครื่องชงกาแพแบบหยด) (*หน่วยเป็นวินาที)

โดยสารสกัดที่สกัดผ่านหัวชงระยะเวลา 40 วินาทีที่มีปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอทั้งหมด 3.60 ± 0.07 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง สำหรับสารสกัดที่ผ่านหัวชงระยะเวลา 80วินาทีให้ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอมากที่สุดคือ 20.87 ± 0.84 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง และเมื่อสกัดต่อไปเรื่อยๆพบว่าปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอมีแนวโน้มลดลงโดยสารสกัดที่สกัดผ่านหัวชงระยะเวลา 160 วินาที มีปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอน้อยที่สุดคือ 2.30 ± 0.29 ไมโครกรัมต่อกรัม สำหรับสารสกัดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแพแบบหยดมีปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์ เอเท่ากับ 9.79 ± 0.30 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดใบขลุ่ยที่ผ่านการเก็บรักษาสภาพใบขลุ่ยอบแห้งเป็นระยะเวลา 3 เดือนดังแสดงในภาพที่ 25 พบว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาทีที่มีปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอสูงที่สุด คือ 28.92 ± 0.56 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง โดยสารสกัดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแพอัดโนม้ติด้วยแรงดันที่สกัดผ่านหัวชงเป็นเวลา 40 วินาที มีปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอต่ำที่สุดคือ 0.31 ± 0.14 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง และสารสกัดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแพแบบหยดมีปริมาณของสารประกอบคลอโรฟิลล์เอเท่ากับ 6.48 ± 0.11 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง

2.2 ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์บีทั้งหมดของสารสกัดจากใบขลุ่ย

ในการตรวจสอบปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์บีของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่ แตกต่างกันโดยพบว่า มีแนวโน้มเช่นเดียวกับปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอ โดยการสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 นาทีที่มีปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์ บีทั้งหมดมากที่สุดคือ 147.29 ± 1.90 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง โดยปริมาณคลอโรฟิลล์บีมีปริมาณลดลงเมื่อเพิ่ม



ภาพที่ 25 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของสารสกัดใบขลุ่ยหลังเก็บรักษาสภาพที่ 3 เดือน

■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 60°C) □ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 80°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 100°C)

■ (เครื่องชงกาแพ้อัตโนมัตด้วยแรงดัน) ■ (เครื่องชงกาแพแบบหยด)* หน่วยเป็นวินาที

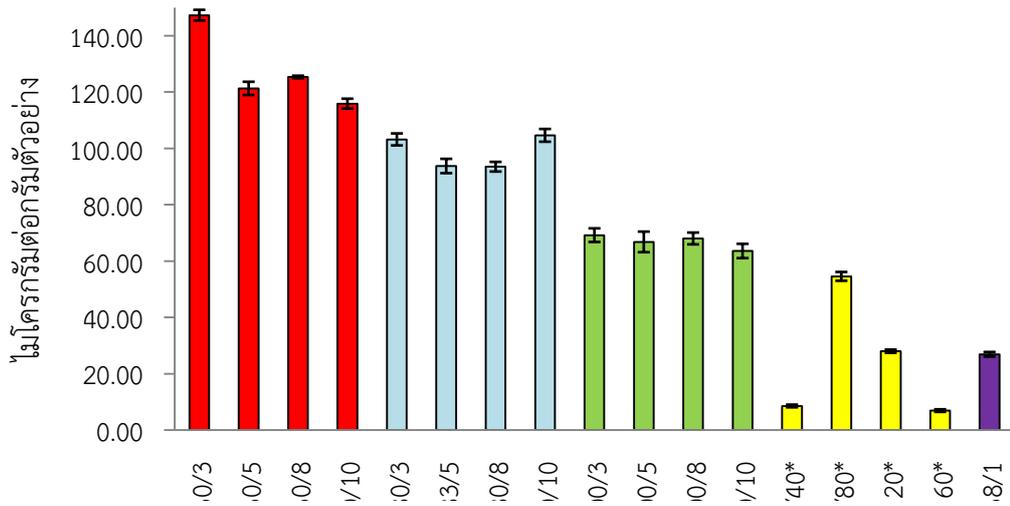
อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัดตั้งแสดงในตารางที่ 14 จะเห็นได้จากผลของการสกัดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ส่งผลให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์บีน้อยที่สุดคือ 63.54 ± 2.55 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ในส่วนของการสกัดด้วยเครื่องชงกาแพ้อัตโนมัตด้วยแรงดันพบว่าสารที่สกัดผ่านหัวขงในระยะเวลาดังกล่าวให้ปริมาณคลอโรฟิลล์บีน้อยที่สุดต่างกันดังแสดงในภาพที่ 26 โดยสารสกัดที่สกัดผ่านหัวขงระยะเวลา 40 วินาที มีปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์บีน้อยที่สุดคือ 8.50 ± 0.48 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง สำหรับสารสกัดที่ผ่านหัวขงระยะเวลา 80 วินาที ให้ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์บีน้อยที่สุดคือ 54.52 ± 1.57 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง และเมื่อสกัดต่อไปเรื่อยๆพบว่าปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์บีน้อยลงโดยสารสกัดที่สกัดผ่านหัวขงระยะเวลา 160 วินาที มีปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์บีน้อยที่สุดคือ 6.86 ± 0.46 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง สำหรับสารสกัดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแพแบบหยดมีปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์บีน้อยที่สุดคือ 26.85 ± 0.83 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดใบขลุ่ยที่ผ่านการเก็บรักษาสภาพใบขลุ่ยแห้งเป็นระยะเวลา 3 เดือน ดังแสดงในภาพที่ 27 พบว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที มีปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์บีน้อยที่สุดคือ 84.18 ± 0.38 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง โดยสารสกัดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแพ้อัตโนมัตด้วยแรงดันที่สกัดผ่านหัวขงเป็นเวลา 40วินาที มีปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์บีน้อยที่สุดคือ 3.07 ± 0.30 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง และสารสกัดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแพแบบหยดมีปริมาณของสารประกอบคลอโรฟิลล์บีน้อยที่สุดคือ 20.02 ± 0.43 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าการเก็บรักษาสภาพ ใบขลุ่ยแห้งเป็น

ระยะเวลา 3 เดือนส่งผลต่อปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบี มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งสอดคล้องกับรายงานของวาริชัย พิมพ์บุตร และคณะ (2011) ได้ศึกษาถึงผลของการเก็บรักษาสภาพใบขลู่ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 65 เป็นระยะเวลา 7 วัน นำการตรวจสอบถึงปริมาณคลอโรฟิลล์ทุกๆ 3 วัน โดยสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเริ่มต้นมีค่า 257.62 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งและเมื่อผ่านการเก็บรักษาสภาพที่ 3 วันพบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด 245.62 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แสดงให้เห็นว่าปริมาณของสารประกอบคลอโรฟิลล์ทั้งหมดมีค่าลดลงเมื่อเวลาผ่านไปเนื่องจากการเสื่อมสภาพตามระยะเวลาของการเก็บรักษา

ตารางที่ 14 ปริมาณคลอโรฟิลล์บีของสารสกัดใบขลู่ด้วยความร้อน และหลังจากเก็บรักษาใบขลู่อบแห้ง ระยะเวลา 3 เดือน

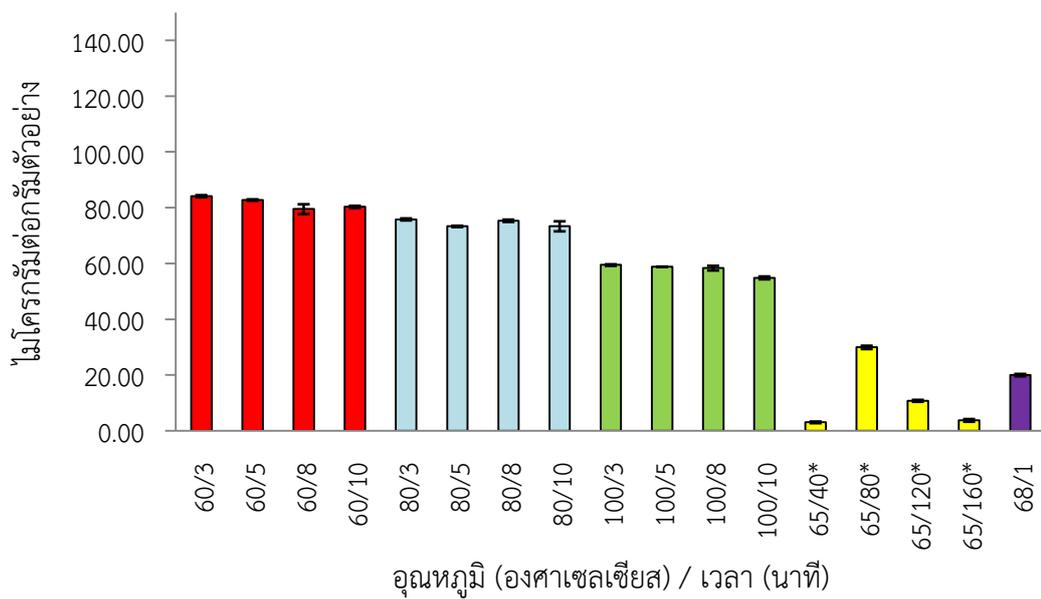
| เครื่องมือสกัด | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) | ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง | |
|--------------------------------------|----------------------------|----------------|----------------------------|---------------------------|
| | | | เริ่มทดลอง | เก็บรักษา 3 เดือน |
| กาดัมน้ำไฟฟ้า | 60 | 3.00 | 147.29 ^k ± 1.90 | 84.18 ^k ± 0.38 |
| | | 5.00 | 121.29 ⁱ ± 2.35 | 82.80 ^j ± 0.26 |
| | | 8.00 | 125.34 ^j ± 0.45 | 79.54 ⁱ ± 1.75 |
| | | 10.00 | 115.87 ^h ± 1.75 | 80.36 ⁱ ± 0.39 |
| | 80 | 3.00 | 103.16 ^g ± 2.13 | 75.85 ^g ± 0.37 |
| | | 5.00 | 93.72 ^f ± 2.54 | 73.34 ^g ± 0.24 |
| | | 8.00 | 93.47 ^f ± 1.72 | 75.38 ^h ± 0.42 |
| | | 10.00 | 104.61 ^g ± 2.27 | 73.37 ^g ± 1.80 |
| | 100 | 3.00 | 69.16 ^e ± 2.42 | 59.49 ^f ± 0.29 |
| | | 5.00 | 66.77 ^{de} ± 3.66 | 58.88 ^f ± 0.06 |
| | | 8.00 | 67.99 ^e ± 2.10 | 58.38 ^f ± 0.84 |
| | | 10.00 | 63.54 ^d ± 2.55 | 54.89 ^e ± 0.52 |
| เครื่องชงกาแฟ อัตโนมัติด้วยแรงดัน | 65 | 40* | 8.50 ^a ± 0.48 | 3.07 ^a ± 0.30 |
| | | 80* | 54.52 ^c ± 1.57 | 29.95 ^d ± 0.60 |
| | | 120* | 27.95 ^b ± 0.58 | 10.79 ^b ± 0.35 |
| | | 160* | 6.86 ^a ± 0.46 | 3.78 ^a ± 0.48 |
| เครื่องชงกาแฟแบบหยด | 68 | 1.00 | 26.85 ^b ± 0.83 | 20.02 ^c ± 0.43 |

หมายเหตุ * หน่วยเป็นวินาที



ภาพที่ 26 ปริมาณคลอรีนที่เหลือของสารสกัดใบชู่ที่เริ่มการทดลอง

■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 60°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 80°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 100°C)
 ■ (เครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน) ■ (เครื่องชงกาแฟแบบหยด)(* หน่วยเป็นวินาที)



ภาพที่ 27 ปริมาณคลอรีนที่เหลือของสารสกัดใบชู่หลังเก็บรักษาภาพที่ 3 เดือน

■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 60°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 80°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 100°C)
 ■ (เครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน) ■ (เครื่องชงกาแฟแบบหยด)(* หน่วยเป็นวินาที)

2.3 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากใบขลุ่ย

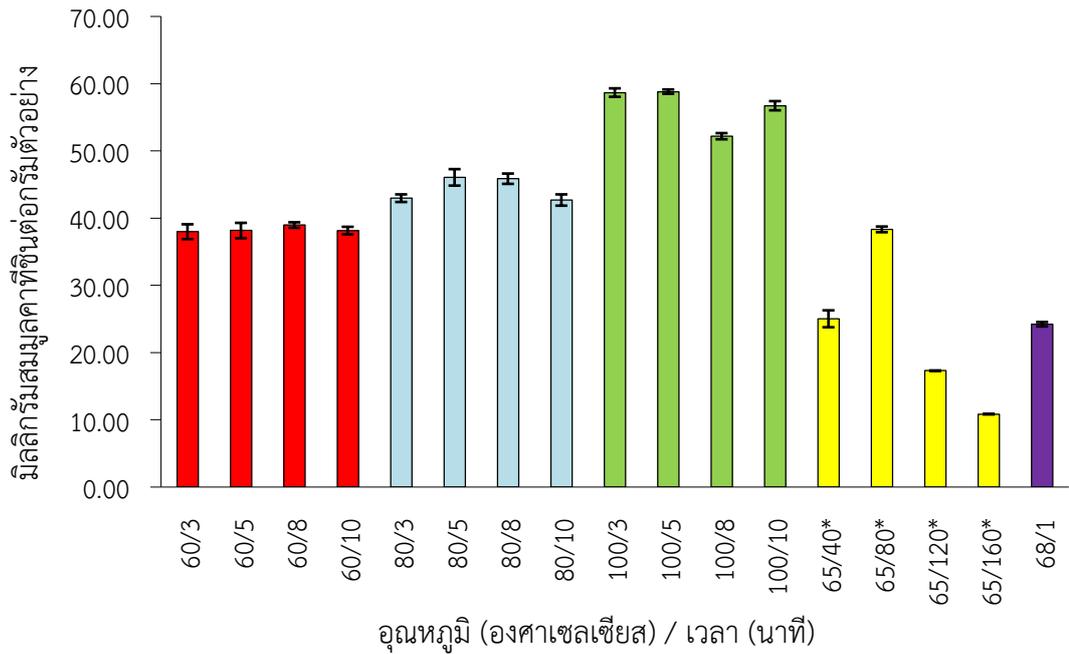
จากการทดสอบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดในสภาวะต่างกันโดยปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดคำนวณเทียบเท่าเป็นน้ำหนักสมมุติ สารมาตรฐานคาทีชินจากกราฟมาตรฐานความเข้มข้นระหว่าง 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีที่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดคือ 58.83 ± 0.32 มิลลิกรัมสมมูลคาทีชินต่อกรัมตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 15 สำหรับการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันพบว่าสารสกัดที่ผ่านหัวขงระยะแรกใช้เวลา 80 วินาที ให้ปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดคือ 38.33 ± 0.42 มิลลิกรัมสมมูลคาทีชินต่อกรัมตัวอย่าง ส่วนสารสกัดที่ผ่านหัวขงระยะเวลา 120 และ 160 วินาที มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ลดลงอย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 28 และสารสกัดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยดมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดคือ 24.22 ± 0.33 มิลลิกรัมสมมูลคาทีชินต่อกรัมตัวอย่าง และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบขลุ่ยที่ผ่านการเก็บรักษาสภาพใบขลุ่ยอบแห้งเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดคือ 55.71 ± 1.85 มิลลิกรัมสมมูลคาทีชินต่อกรัมตัวอย่าง โดยสารสกัดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันที่สกัดผ่านหัวขงเป็นเวลา 80 วินาที มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด สูงที่สุดเท่ากับ 23.45 ± 0.71 มิลลิกรัมสมมูลคาทีชินต่อกรัมตัวอย่าง แต่สารสกัดที่ผ่านหัวขงระยะเวลา 40 วินาที ให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบค่าเริ่มต้นและหลังจากการเก็บรักษาสภาพใบขลุ่ยอบแห้งระยะเวลา 3 เดือน ส่วน สารสกัดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยดมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดคือ 24.47 ± 0.03 มิลลิกรัมสมมูลคาทีชินต่อกรัมตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 29 จะเห็นได้ว่าการเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดใบขลุ่ยมีผลทำให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น และการทดสอบเปรียบเทียบสารสกัดจากใบขลุ่ยที่ผ่านการเก็บรักษาสภาพเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าค่าปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันจากการศึกษาถึงการสกัดด้วยน้ำร้อนในสภาวะต่างๆ ข้างต้นถึงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดซึ่งค่าที่ได้มีความสอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยของ Jonathan และคณะ (2012) ในการศึกษาถึงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากใบขลุ่ยและรากขลุ่ย เพื่อนำสารสกัดหยาบไปศึกษาถึงฤทธิ์ในการต้านการอักเสบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนย้ายของเซลล์มะเร็ง และทดสอบถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 78-80 องศาเซลเซียสให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 40.4 ± 0.3 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง โดยที่ในรากขลุ่ยไม่พบสารประกอบฟลาโวนอยด์

ตารางที่ 15 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดใบชู่ด้วยความร้อน และหลังจากเก็บรักษาใบชู่อบแห้งระยะเวลา 3 เดือน

| เครื่องมือสกัด | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาทีก) | มิลลิกรัมสมมูลคาที่ซินต่อกรัมตัวอย่าง | |
|--------------------------------------|----------------------------|-----------------|---------------------------------------|---------------------------|
| | | | เริ่มทดลอง | เก็บรักษา 3 เดือน |
| กาต้มน้ำไฟฟ้า | 60 | 3.00 | 42.02 ^f ± 0.22 | 37.98 ^e ± 1.10 |
| | | 5.00 | 41.00 ^e ± 0.15 | 38.16 ^e ± 1.14 |
| | | 8.00 | 41.03 ^e ± 0.36 | 38.98 ^e ± 0.41 |
| | | 10.00 | 38.79 ^d ± 0.17 | 38.16 ^e ± 0.55 |
| | 80 | 3.00 | 49.93 ^s ± 0.31 | 42.97 ^f ± 0.57 |
| | | 5.00 | 52.34 ^h ± 0.41 | 46.07 ^s ± 1.23 |
| | | 8.00 | 51.92 ^h ± 1.38 | 45.87 ^s ± 0.77 |
| | | 10.00 | 52.74 ^h ± 0.44 | 42.70 ^f ± 0.84 |
| | 100 | 3.00 | 58.68 ^j ± 0.63 | 55.71 ^j ± 1.85 |
| | | 5.00 | 58.83 ^j ± 0.32 | 52.56 ⁱ ± 0.26 |
| | | 8.00 | 52.19 ^h ± 0.46 | 54.68 ^j ± 0.66 |
| | | 10.00 | 56.72 ⁱ ± 0.68 | 50.39 ^h ± 0.22 |
| เครื่องชงกาแฟ อัตโนมัติด้วยแรงดัน | 65 | 40* | 25.03 ^c ± 1.26 | 7.16 ^b ± 1.03 |
| | | 80* | 38.33 ^d ± 0.42 | 23.45 ^d ± 0.71 |
| | | 120* | 17.32 ^b ± 0.02 | 11.81 ^c ± 0.61 |
| | | 160* | 10.84 ^a ± 0.02 | 3.38 ^a ± 0.38 |
| เครื่องชงกาแฟแบบหยด | 68 | 1.00 | 24.22 ^c ± 0.33 | 24.47 ^d ± 0.03 |

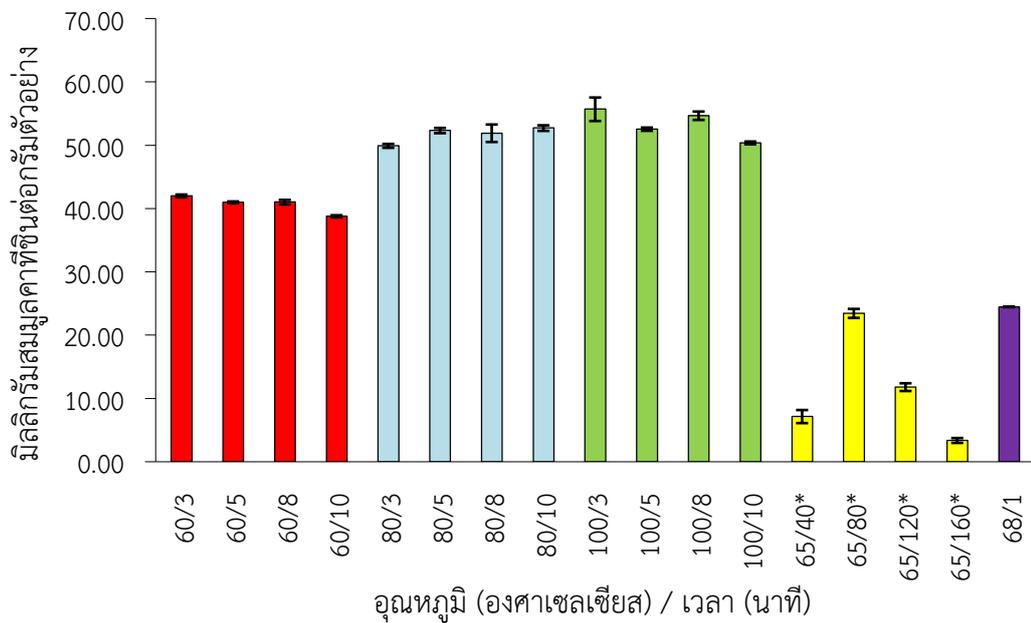
หมายเหตุ * หน่วยเป็นวินาที

-ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ



ภาพที่ 28 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดใบขลุ่ยที่เริ่มการทดลอง

- (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 60°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 80°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 100°C)
- (เครื่องซงกาแพ้อัดโนม้ตด้ว้แรงดัน) ■ (เครื่องซงกาแพ้แบบหยด)(* หน่วยเป็นวินาที)



ภาพที่ 29 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดใบขลุ่ยหลังเก็บรักษาภาพที่ 3 เดือน

- (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 60°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 80°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 100°C)
- (เครื่องซงกาแพ้อัดโนม้ตด้ว้แรงดัน) ■ (เครื่องซงกาแพ้แบบหยด)(* หน่วยเป็นวินาที)

3. การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบขลุ่ยโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิและอุปกรณ์ที่แตกต่างกัน

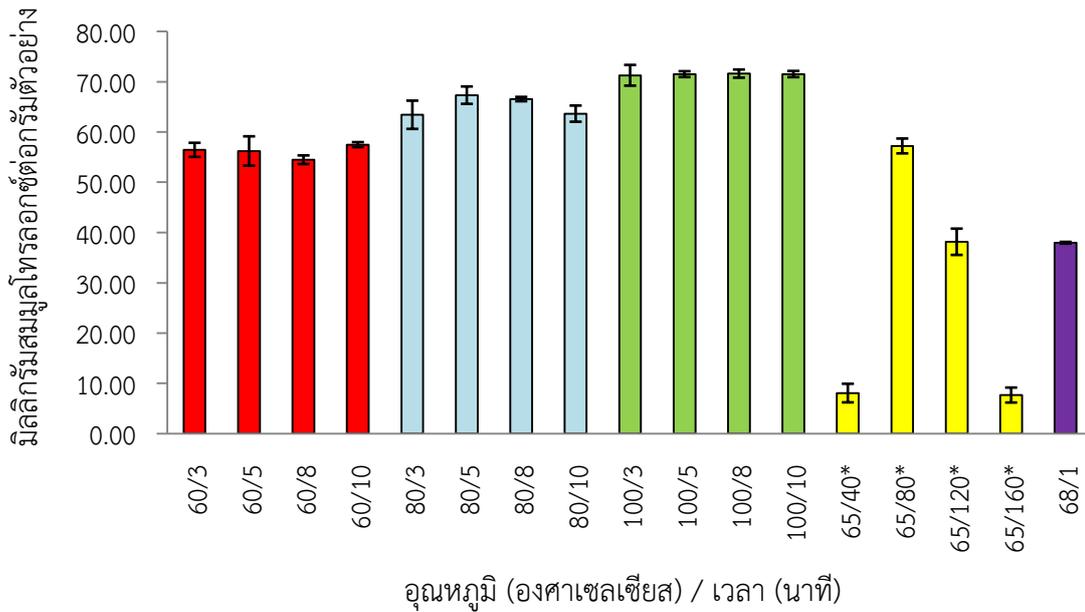
3.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

จากการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดในสภาวะต่างกัน คือ การสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน การสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน และการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยด ซึ่งค่าที่ได้คิดเทียบเป็นสมมูลของสารละลาย Trolox จากกราฟมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสระยะเวลา 3 ถึง 10 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยให้ค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 ถึง 10 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด โดยค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและ ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดดังแสดงในตารางที่ 16 ในการสกัดสารจากใบขลุ่ย ด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลา สกัด 80 วินาที ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดคือ 57.19 ± 1.47 มิลลิกรัมสมมูล Trolox ต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งมีค่าสูงกว่าการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลา อื่นๆสำหรับเครื่องชงกาแฟแบบหยดให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลา สกัด 80 วินาทีโดยมีค่าเท่ากับ 37.95 ± 0.17 มิลลิกรัมสมมูล Trolox ต่อกรัมตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 30 เช่นเดียวกับค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบขลุ่ยเมื่อผ่านการเก็บรักษาสภาพใบขลุ่ยอบแห้งระยะเวลา 3 เดือน พบว่าตัวอย่างสารสกัดใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสระยะเวลา 3 ถึง 10 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยให้ค่าไม่แตกต่างกันโดยสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 ถึง 10 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดสำหรับสารสกัดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลา 80 วินาที และเครื่องชงกาแฟแบบหยดให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 56.11 ± 0.19 และ 33.51 ± 0.43 มิลลิกรัมสมมูล Trolox ต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 31 ซึ่ง เมื่อนำเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบขลุ่ย เริ่มต้นและที่ผ่านการเก็บรักษาสภาพใบขลุ่ยอบแห้งระยะเวลา 3 เดือน พบว่าให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันจากการศึกษาข้างต้นทำให้ทราบว่าใบขลุ่ยมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Andarwulan และคณะ (2010) โดยการสกัดใบขลุ่ยด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 พบว่าให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 96.4 ± 15.2 ไมโครโมล Trolox ต่อกรัมตัวอย่าง และผลการศึกษาของ Srisook และคณะ (2012) ในศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการอักเสบของสารสกัดใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนพบว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 23.8 ± 1.0 ไมโครโมล Trolox ต่อกรัมตัวอย่าง

ตารางที่ 16 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดใบขลุ่ยด้วยความร้อน และหลังจากเก็บรักษาใบขลุ่ยอบแห้งระยะเวลา 3 เดือน

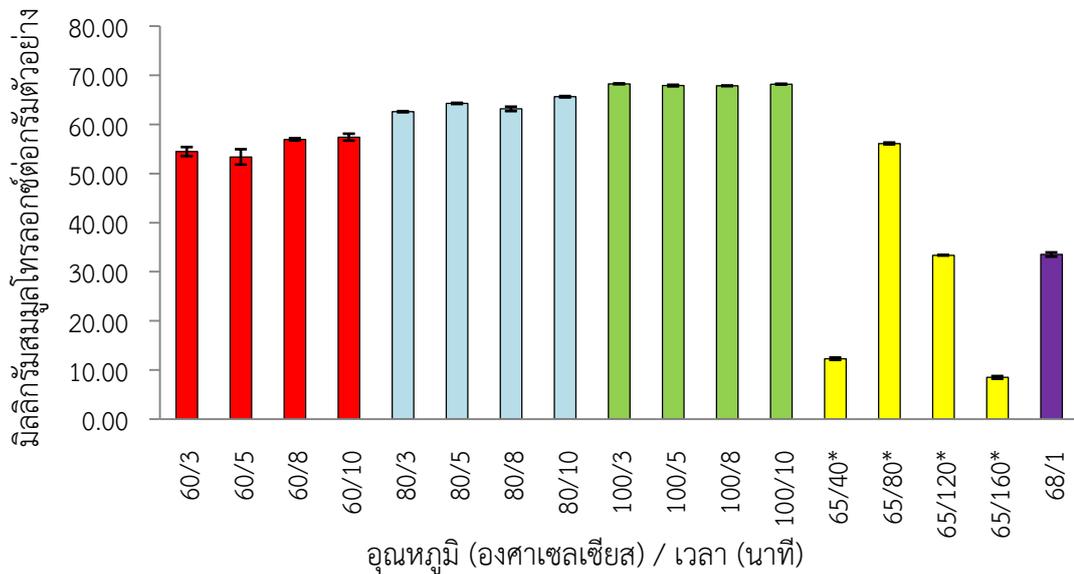
| เครื่องมือสกัด | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) | มิลลิกรัมสมมูลโพลifenอลต่อกรัมตัวอย่าง | |
|--------------------------------------|----------------------------|----------------|--|----------------------------|
| | | | เริ่มทดลอง | เก็บสภาพ 3 เดือน |
| กัต้มน้ำไฟฟ้า | 60 | 3.00 | 56.42 ^c ± 1.40 | 54.46 ^e ± 0.92 |
| | | 5.00 | 56.18 ^c ± 2.92 | 53.37 ^d ± 1.56 |
| | | 8.00 | 54.45 ^c ± 0.86 | 56.95 ^{fg} ± 0.24 |
| | | 10.00 | 57.45 ^c ± 0.50 | 57.39 ^g ± 0.70 |
| | 80 | 3.00 | 63.39 ^d ± 2.81 | 62.57 ^h ± 0.11 |
| | | 5.00 | 67.28 ^e ± 1.73 | 64.26 ⁱ ± 0.11 |
| | | 8.00 | 66.50 ^e ± 0.43 | 63.15 ^h ± 0.45 |
| | | 10.00 | 63.61 ^d ± 1.61 | 65.62 ^j ± 0.14 |
| | 100 | 3.00 | 71.23 ^f ± 2.06 | 68.25 ^k ± 0.09 |
| | | 5.00 | 71.47 ^f ± 0.58 | 67.90 ^k ± 0.15 |
| | | 8.00 | 71.57 ^f ± 0.81 | 67.83 ^k ± 0.01 |
| | | 10.00 | 71.48 ^f ± 0.61 | 68.19 ^k ± 0.07 |
| เครื่องชงกาแฟ อัตโนมัติด้วยแรงดัน | 65 | 40* | 8.07 ^a ± 1.85 | 12.30 ^b ± 0.24 |
| | | 80* | 57.19 ^c ± 1.47 | 56.11 ^f ± 0.19 |
| | | 120* | 38.14 ^b ± 2.61 | 33.34 ^c ± 0.05 |
| | | 160* | 7.67 ^a ± 1.49 | 8.49 ^a ± 0.28 |
| เครื่องชงกาแฟแบบหยด | 68 | 1.00 | 37.95 ^b ± 0.17 | 33.51 ^c ± 0.43 |

หมายเหตุ* หน่วยเป็นวินาที



ภาพที่ 30 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดใบขลุ่ยที่เริ่มการทดลอง

■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 60°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 80°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 100°C)
 ■ (เครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน) ■ (เครื่องชงกาแฟแบบหยด)* หน่วยเป็นวินาที



ภาพที่ 31 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดใบขลุ่ยหลังเก็บรักษาภาพที่ 3 เดือน

■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 60°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 80°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 100°C)
 ■ (เครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน) ■ (เครื่องชงกาแฟแบบหยด)* หน่วยเป็นวินาที

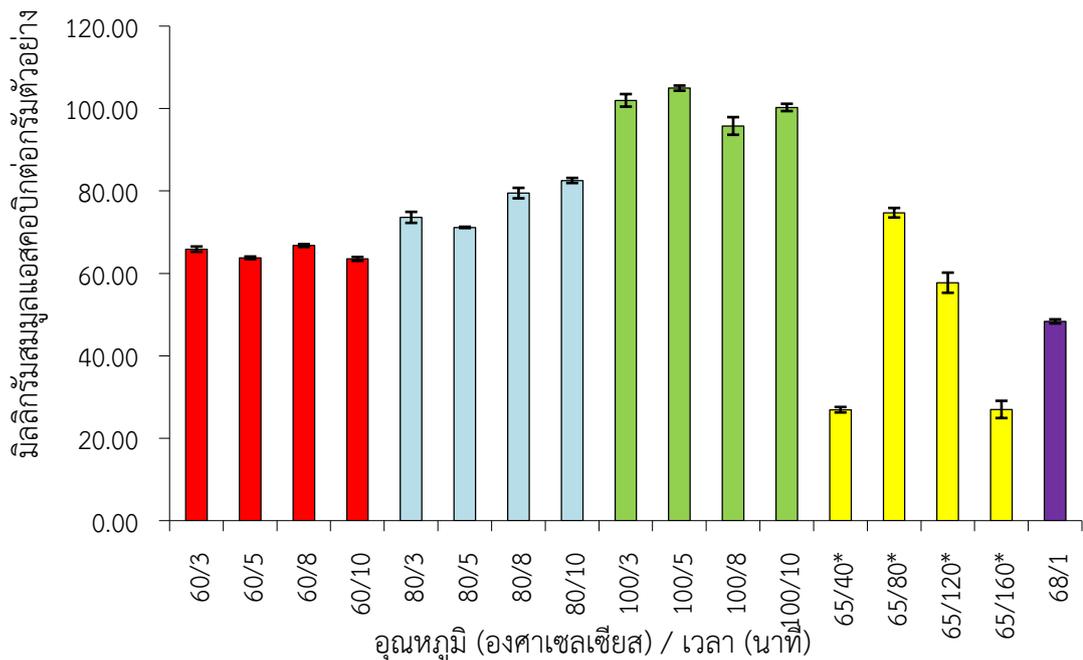
3.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

จากการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดในสภาวะต่างกัน คือ การสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน การสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน และการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยด ซึ่งค่าที่ได้คิดเทียบเป็นสมมูลของสารละลายแอสคอบิก จากกราฟมาตรฐาน แอสคอบิก ที่ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าตัวอย่างสารสกัดใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลาสกัด 3 ถึง 10 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยให้ค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสระยะเวลา 3 ถึง 10 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ซึ่งค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัด ดังแสดงในตารางที่ 17 ในการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลา ในการสกัด 80 วินาที ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดคือ 74.70 ± 1.16 มิลลิกรัมสมมูลแอสคอบิกต่อกรัมตัวอย่าง เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลาต่าง ๆ ส่วนฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยดมีค่าเท่ากับ 48.34 ± 0.50 มิลลิกรัมสมมูลแอสคอบิกต่อกรัมตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 32 เช่นเดียวกับค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบขลุ่ยเมื่อผ่านการรักษาสภาพใบขลุ่ยอบแห้งระยะเวลา 3 เดือน พบว่า ตัวอย่างสารสกัดใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสระยะเวลา 3 ถึง 10 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยให้ค่าไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 ถึง 10 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด สำหรับสารสกัดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลา 80 วินาที ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด มีค่าเท่ากับ 49.71 ± 0.45 มิลลิกรัมสมมูลแอสคอบิกต่อกรัมตัวอย่าง เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลาต่างๆ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดที่สกัดด้วย เครื่องชงกาแฟแบบหยด มีค่า 41.10 ± 0.41 มิลลิกรัมสมมูลแอสคอบิกต่อกรัมตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 33 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ผ่านการเก็บรักษาสภาพใบขลุ่ยอบแห้งระยะเวลา 3 เดือนเมื่อกับค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบขลุ่ยเริ่มต้นพบว่าให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดสอบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบขลุ่ยมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS โดยสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Andarwulan และคณะ (2010) ได้ทำการสกัดใบขลุ่ยโดยใช้เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย พบว่าให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS มีค่าเท่ากับ 3.75 ± 0.16 ไมโครโมลโทรลออกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง

ตารางที่ 17 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดใบขลุ่ยด้วยความร้อน และหลังจากเก็บรักษาใบขลุ่ยอบแห้งระยะเวลา 3 เดือน

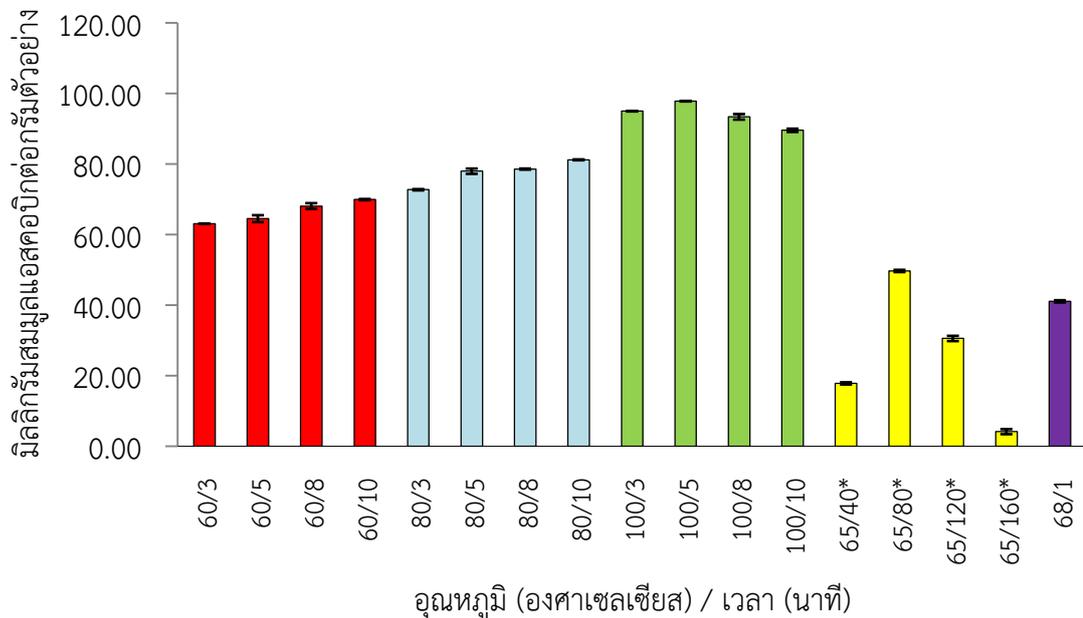
| เครื่องมือสกัด | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) | มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมตัวอย่าง | |
|--------------------------------------|----------------------------|----------------|--|---------------------------|
| | | | เริ่มทดลอง | เก็บรักษา 3 เดือน |
| กาดัมน้ำไฟฟ้า | 60 | 3.00 | 65.86 ^{de} ±0.64 | 63.11 ^f ± 0.09 |
| | | 5.00 | 63.76 ^d ±0.31 | 64.54 ^g ± 1.26 |
| | | 8.00 | 66.74 ^e ±0.34 | 68.11 ^h ± 1.06 |
| | | 10.00 | 63.50 ^d ±0.47 | 69.93 ⁱ ± 0.22 |
| | 80 | 3.00 | 73.57 ^{fg} ±1.34 | 72.73 ^j ± 0.24 |
| | | 5.00 | 71.14 ^f ±0.15 | 77.98 ^k ± 0.98 |
| | | 8.00 | 79.47 ^h ±1.27 | 78.58 ^k ± 0.20 |
| | | 10.00 | 82.53 ⁱ ±0.62 | 81.20 ^l ± 0.16 |
| | 100 | 3.00 | 101.96 ^k ±1.52 | 94.99 ^o ± 0.09 |
| | | 5.00 | 104.93 ^l ±0.63 | 97.82 ^p ± 0.10 |
| | | 8.00 | 95.76 ^j ±2.14 | 93.38 ⁿ ± 1.02 |
| | | 10.00 | 100.25 ^k ±0.88 | 89.57 ^m ± 0.60 |
| เครื่องชงกาแฟ อัตโนมัติด้วยแรงดัน | 65 | 40* | 26.90 ^a ±0.66 | 17.86 ^b ± 0.40 |
| | | 80* | 74.70 ^g ±1.16 | 49.71 ^e ± 0.45 |
| | | 120* | 55.54 ^c ± 2.44 | 30.59 ^c ± 1.09 |
| | | 160* | 26.97 ^a ±2.09 | 4.19 ^a ± 0.93 |
| เครื่องชงกาแฟแบบหยด | 68 | 1.00 | 48.34 ^b ±0.50 | 41.10 ^d ± 0.41 |

หมายเหตุ * หน่วยเป็นวินาที



ภาพที่ 32 ภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดใบขลุ่ยที่เริ่มการทดลอง

- (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 60°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 80°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 100°C)
- (เครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน) ■ (เครื่องชงกาแฟแบบหยด)(* หน่วยเป็นวินาที)



ภาพที่ 33 ภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดใบขลุ่ยหลังเก็บรักษาภาพที่ 3 เดือน

- (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 60°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 80°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 100°C)
- (เครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน) ■ (เครื่องชงกาแฟแบบหยด)(* หน่วยเป็นวินาที)

3.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

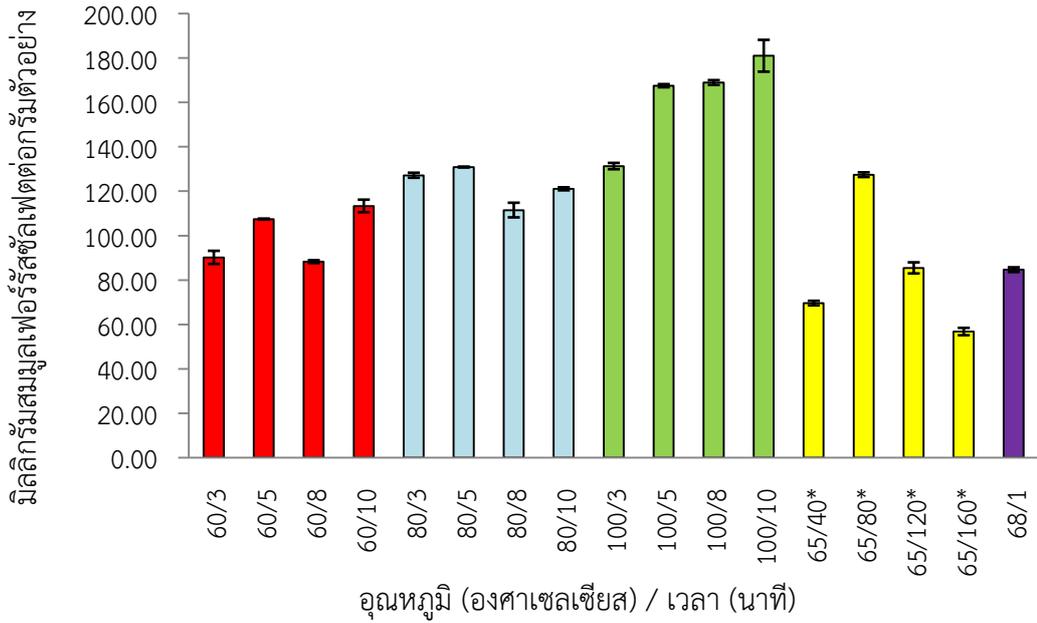
จากการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP โดยค่าที่ได้คิดเทียบเป็น มิลลิกรัมสมมูลเฟอรรัสซัลเฟต ต่อกรัมตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน เฟอรรัสซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0 – 800 ไมโครโมลต่อลิตร พบว่าตัวอย่างสารสกัดใบขลู่ที่สกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสระยะเวลา สกัด 10 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ 180.97 ± 7.17 มิลลิกรัมสมมูลเฟอรรัสซัลเฟตต่อกรัมตัวอย่าง โดยสารสกัดจากใบขลู่ที่สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา สกัด 8 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดคือ 88.25 ± 0.64 มิลลิกรัมสมมูลเฟอรรัสซัลเฟต ต่อกรัม ตัวอย่าง โดยค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ มีแนวโน้ม เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและ ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ดังแสดงในตารางที่ 18 สำหรับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัดใบขลู่ที่สกัด ด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลา 80 วินาที ให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุดมีค่าเท่ากับ 127.40 ± 1.06 มิลลิกรัมสมมูลเฟอรรัสซัลเฟต ต่อกรัมตัวอย่าง เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟ อัตโนมัติด้วยแรงดันที่ระยะเวลาต่างๆ สำหรับการสกัดใบขลู่ด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยดให้ฤทธิ์ในการต้าน อนุมูลอิสระเท่ากับ 84.61 ± 1.06 มิลลิกรัมสมมูลเฟอรรัสซัลเฟตต่อกรัมตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 34 และ เมื่อทดสอบค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบขลู่เมื่อผ่านการรักษาสภาพใบขลู่ อบแห้งระยะเวลา 3 เดือน พบว่ามีค่าการต้านอนุมูลอิสระลดลง โดย ตัวอย่างสารสกัดใบขลู่ที่สกัดด้วยน้ำ ร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ 128.60 ± 3.08 มิลลิกรัมสมมูลเฟอรรัสซัลเฟต ต่อกรัมตัวอย่าง ส่วนสารสกัดจากใบขลู่ที่สกัดด้วยน้ำร้อน อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสระยะเวลา 3 นาทีมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด มีค่าเท่ากับ 78.09 ± 1.94 มิลลิกรัมสมมูลเฟอรรัสซัลเฟต ต่อกรัมตัวอย่าง สำหรับสารสกัดที่สกัดด้วยเครื่อง ชงกาแฟ อัตโนมัติด้วยแรงดันให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ที่ระยะเวลา 80 วินาที โดยมีค่าเท่ากับ 73.09 ± 4.81 มิลลิกรัมสมมูลเฟอรรัสซัลเฟตต่อกรัมตัวอย่าง โดยมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นส่วนการ สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยดให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 57.28 ± 1.08 มิลลิกรัมสมมูลเฟอรรัสซัลเฟตต่อกรัมตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 35 ซึ่ง เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดจากใบขลู่ที่เริ่มต้นและที่ผ่านการเก็บรักษาสภาพใบขลู่อบแห้งระยะเวลา 3 เดือนพบว่าให้ฤทธิ์ ในการต้านอนุมูลอิสระ ลดลงจากผลการทดลองทำให้ทราบว่าสารสกัดจากใบขลู่ที่สกัดด้วยมีความสามารถ ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Andarwulan และคณะ (2010) ได้ ทำการสกัดใบขลู่โดยการสกัดด้วย เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 พบว่า มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เทียบเท่ากับโทรลอกซ์ 81.1 ± 0.6 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง

ตารางที่ 18 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดใบขลุ่ยด้วยความร้อนและหลังจากเก็บรักษาใบขลุ่ยอบแห้งระยะเวลา 3 เดือน

| เครื่องมือสกัด | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) | มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟต ต่อกรัมตัวอย่าง | |
|--------------------------------------|----------------------------|----------------|---|----------------------------|
| | | | เริ่มทดลอง | เก็บรักษา 3 เดือน |
| กาดม้มน้ำไฟฟ้า | 60 | 3.00 | 90.16 ^d ± 2.95 | 78.09 ^e ± 1.94 |
| | | 5.00 | 107.39 ^e ± 0.24 | 92.31 ^s ± 2.14 |
| | | 8.00 | 88.25 ^{cd} ± 0.64 | 88.30 ^f ± 0.33 |
| | | 10.00 | 113.34 ^f ± 2.82 | 98.02 ^h ± 1.05 |
| | 80 | 3.00 | 127.16 ^h ± 1.13 | 124.61 ^j ± 1.43 |
| | | 5.00 | 130.85 ^h ± 0.21 | 110.78 ⁱ ± 1.53 |
| | | 8.00 | 111.47 ^f ± 3.30 | 124.31 ^j ± 0.45 |
| | | 10.00 | 121.04 ^g ± 0.68 | 128.86 ^k ± 0.36 |
| | 100 | 3.00 | 131.29 ^h ± 1.42 | 130.07 ^k ± 0.48 |
| | | 5.00 | 167.49 ⁱ ± 0.71 | 129.75 ^k ± 1.91 |
| | | 8.00 | 168.92 ⁱ ± 1.09 | 143.81 ^l ± 2.23 |
| | | 10.00 | 180.97 ^j ± 7.17 | 128.60 ^k ± 3.08 |
| เครื่องชงกาแฟ อัตโนมัติด้วยแรงดัน | 65 | 40* | 69.57 ^b ± 1.03 | 5.47 ^a ± 0.74 |
| | | 80* | 127.40 ^h ± 1.06 | 73.09 ^d ± 4.81 |
| | | 120* | 85.42 ^c ± 2.50 | 55.03 ^c ± 1.18 |
| | | 160* | 56.74 ^a ± 1.66 | 24.70 ^b ± 1.54 |
| เครื่องชงกาแฟแบบหยด | 68 | 1.00 | 84.61 ^c ± 1.06 | 57.28 ^c ± 1.08 |

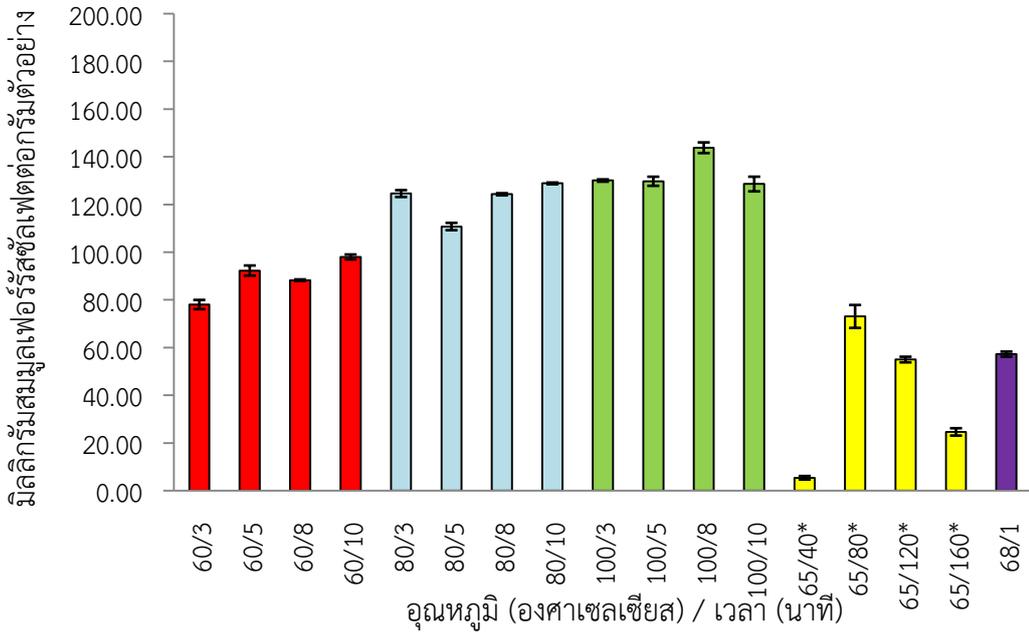
หมายเหตุ * หน่วยเป็นวินาที

-ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ



ภาพที่ 34 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดใบขลู่ที่เริ่มการทดลอง

■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 60°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 80°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 100°C)
 ■ (เครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน) ■ (เครื่องชงกาแฟแบบหยด)(* หน่วยเป็นวินาที)

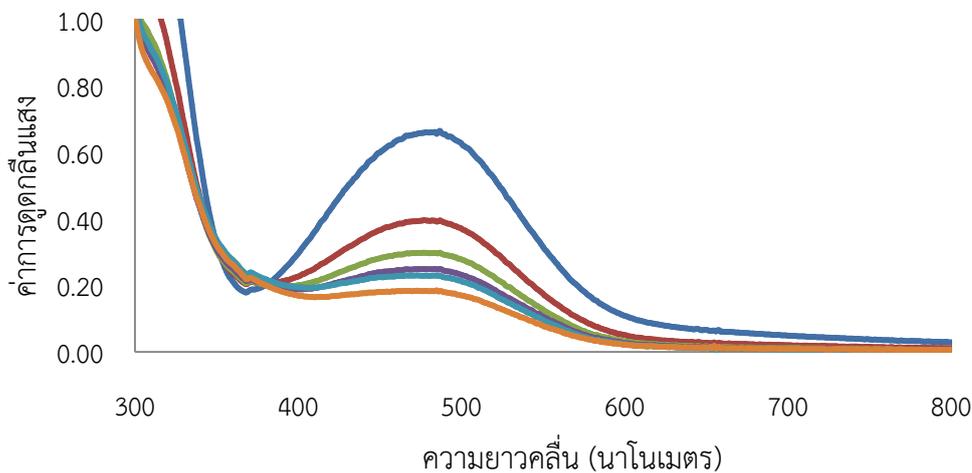


ภาพที่ 35 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดใบขลู่หลังเก็บรักษาภาพที่ 3 เดือน

■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 60°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 80°C) ■ (กาดม้มน้ำไฟฟ้าที่ 100°C)
 ■ (เครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน) ■ (เครื่องชงกาแฟแบบหยด)(* หน่วยเป็นวินาที)

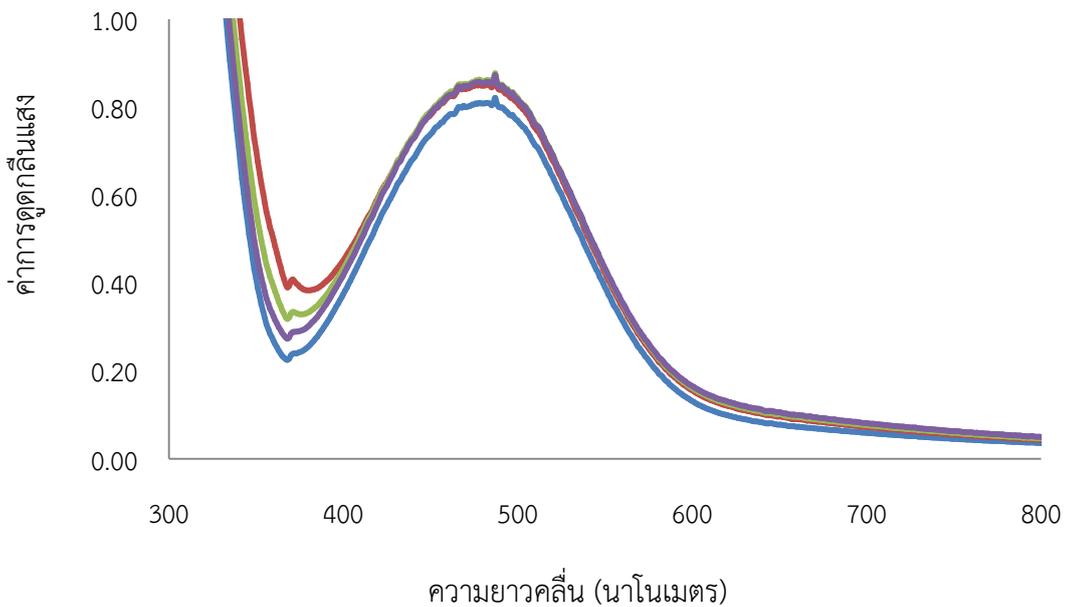
4. ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinases) ของสารสกัดจากใบขลุ่ย

ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมี L-dopa เป็นสารตั้งต้นและเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาในการสังเคราะห์เป็นสารโดปาคิวโนนและเปลี่ยนเป็นโดปาคิวโรนที่มีสีส้มแดง โดยใช้ สารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด 10 นาที ซึ่งเป็นตัวแทนของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดจากการทดสอบด้วยวิธีต่างๆข้างต้น นำมาเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยค่าที่ได้คิดเทียบกับสมมูลสารมาตรฐานกรดโคจิก (kojic acid) ซึ่งเป็นชุดควบคุมเชิงบวกที่ระดับความเข้มข้น 0.1 – 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีลักษณะของค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของกรดโคจิกซึ่ง แสดงในภาพที่ 36 โดยการทดสอบพบว่าสารสกัดจากใบขลุ่ยที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีความสามารถในการยับยั้ง การทำงานของ เอนไซม์ไทโรซิเนส เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากใบขลุ่ยดังแสดงในภาพที่ 37



ภาพที่ 36 รูปแบบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารยับยั้งมาตรฐาน kojic acid ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

- คือ เอนไซม์ + สารตั้งต้น
- คือ เอนไซม์ + สารตั้งต้น + กรดโคจิกที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- คือ เอนไซม์ + สารตั้งต้น + กรดโคจิกที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- คือ เอนไซม์ + สารตั้งต้น + กรดโคจิกที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- คือ เอนไซม์ + สารตั้งต้น + กรดโคจิกที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- คือ เอนไซม์ + สารตั้งต้น + กรดโคจิกที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 37 รูปแบบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสระยะเวลา 10 นาทีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

- คือ เอนไซม์ + สารตั้งต้น (ชุดควบคุม)
- คือ เอนไซม์ + สารตั้งต้น + สารสกัดจากใบขลุ่ยที่เจือจาง 10 เท่า
- คือ เอนไซม์ + สารตั้งต้น + สารสกัดจากใบขลุ่ยที่เจือจาง 100 เท่า
- คือ เอนไซม์ + สารตั้งต้น + สารสกัดจากใบขลุ่ยที่เจือจาง 1,000 เท่า

ตอนที่ 2 การตรวจสอบสารสกัดของใบขลุ่ยอบแห้งและผงใบขลุ่ยอบแห้งที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยน้ำร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

จากการศึกษาการสกัดด้วยน้ำร้อน ในตอนที่ 1 พบว่า การสกัดโดยใช้กาท้มน้ำให้มีอุณหภูมิของน้ำร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 10 นาที ให้ค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงไม่แตกต่างกัน และมีค่าสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ และการสกัดด้วยการใช้เครื่องมือสกัดกาแฟด้วยไออัด และเครื่องต้มน้ำแบบหยด ดังนั้นในตอนที่ 2 จึงเลือกเฉพาะการสกัดด้วยน้ำเดือดที่ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มาทำการทดลองในการสกัดสารจากใบขลุ่ยที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 9 เดือน และ 12 เดือน มาเปรียบเทียบระหว่างใบขลุ่ยอบและผงใบขลุ่ยอบ โดยมีผลการศึกษา ดังนี้

1. การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่ผ่านการเก็บรักษาในรูปแบบแตกต่างกัน

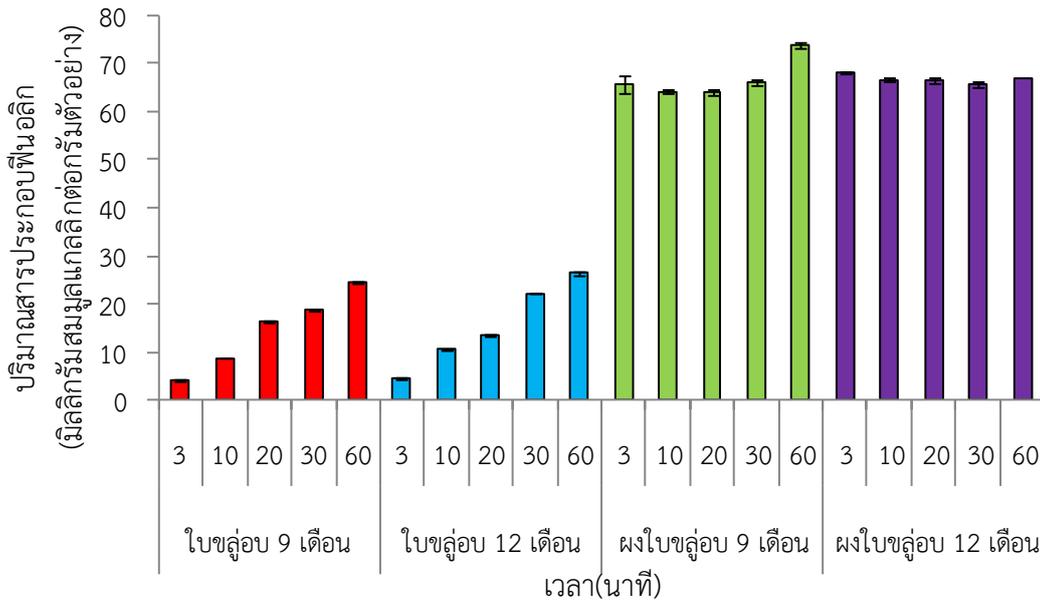
จากการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบขลุ่ยอบและผงใบขลุ่ยอบที่สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ 3, 10, 20, 30 และ 60

นาที โ ดยคำนวณเทียบเท่าเป็นน้ำหนักสมมูลของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic Acid Equivalent: GAE) จากกราฟมาตรฐานความเข้มข้นระหว่าง 0-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากใบช่อบที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 9 เดือน โดยสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 24.25 ± 0.17 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำร้อนของใบช่อบที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 12 เดือน ที่ระยะเวลาในการสกัดเท่ากับ 26.27 ± 0.00 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 19 สำหรับสารสกัดจากผงบใบช่อบที่ผ่านการเก็บรักษาใบช่อบระยะเวลา 9 เดือนที่สกัดด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 60 นาทีที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดคือ 73.95 ± 0.46 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง และมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำร้อนของใบช่อบที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 12 เดือน ที่ระยะเวลาในการสกัดเท่ากับ 67.18 ± 0.61 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 38 ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดจากใบช่อบและผงบใบช่อบมีค่ามากกว่ารายงานการศึกษาของ Andarwulan และคณะ (2010) ได้ศึกษาถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในผักที่นิยมบริโภคในประเทศอินโดนีเซีย พบว่าสารสกัดจากใบช่อบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.831 ± 0.129 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง จากการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยน้ำร้อนพบว่า การเพิ่มระยะเวลาในการสกัดการอบใบช่อบให้ละเอียดมีผลทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น และการทดสอบเปรียบเทียบสารสกัดจากใบช่อบที่ผ่านการเก็บรักษาสภาพเป็นเวลา 12 เดือน พบว่ามีค่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 19 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบช่อบและผงบใบช่อบด้วยน้ำร้อน หลังจากการเก็บรักษาใบช่อบแห้งระยะเวลา 9 เดือน และ 12 เดือน

| สารสกัดใบช่อบ | เวลา (นาที) | ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง) | |
|---------------|-------------|---|-----------------------|
| | | เก็บรักษา 9 เดือน | เก็บรักษา 12 เดือน |
| ใบช่อบ | 3 | $3.85^a \pm 0.00$ | $4.25^a \pm 0.17$ |
| | 10 | $8.60^b \pm 0.17$ | $10.31^c \pm 0.17$ |
| | 20 | $16.27^e \pm 0.00$ | $13.34^d \pm 0.17$ |
| | 30 | $18.50^f \pm 0.17$ | $22.13^s \pm 0.17$ |
| | 60 | $24.25^h \pm 0.17$ | $26.27^i \pm 0.00$ |
| ผงบใบช่อบ | 3 | $65.87^k \pm 0.35$ | $68.19^m \pm 0.46$ |
| | 10 | $64.25^j \pm 1.83$ | $66.68^{kl} \pm 0.17$ |
| | 20 | $64.15^j \pm 0.30$ | $66.48^{kl} \pm 0.46$ |
| | 30 | $66.17^k \pm 0.76$ | $65.77^k \pm 0.63$ |
| | 60 | $73.95^n \pm 0.46$ | $67.18^l \pm 0.61$ |

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (\pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ



ภาพที่ 38 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบชูลูบและผงใบชูลูบด้วยน้ำร้อน หลังจากการเก็บรักษาใบชูลูบแห่งระยะเวลา 9 เดือน และ 12 เดือน

2. การตรวจสอบปริมาณสารพิษเคมีของของสารสกัดจากใบชูลูบที่ผ่านการเก็บรักษาในรูปแบบแตกต่างกัน

2.1 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

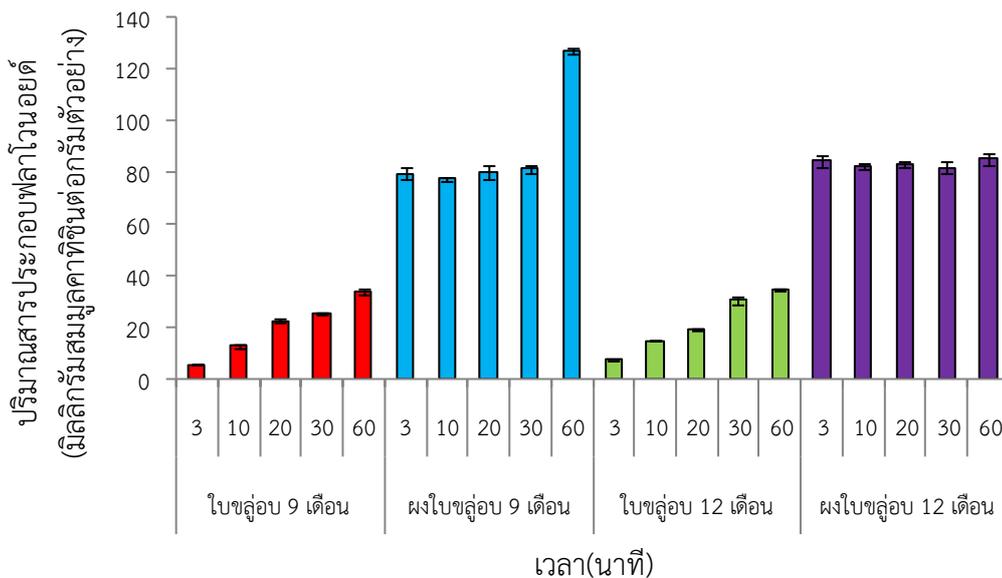
จากการทดสอบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากใบชูลูบและผงใบชูลูบที่สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ 3, 10, 20, 30 และ 60 นาที โดยปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดคำนวณเทียบเท่าเป็นน้ำหนักสมมูลสารมาตรฐานคาที่ซินจากกราฟมาตรฐานความเข้มข้นระหว่าง 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากใบชูลูบที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 9 เดือนโดยสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาทีที่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 33.52 ± 0.99 มิลลิกรัมสมมูลคาที่ซินต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำร้อนของใบชูลูบที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลาเวลา 12 เดือนที่ระยะเวลาในการสกัดเท่ากันคือ 34.04 ± 0.39 มิลลิกรัมสมมูลคาที่ซินต่อกรัมตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 20 ส่วนสารสกัดจากผงใบชูลูบที่ผ่านการเก็บรักษาใบชูลูบระยะเวลา 9 เดือนที่สกัดด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 60 นาทีที่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดคือ 126.98 ± 1.11 มิลลิกรัมสมมูลคาที่ซินต่อกรัมตัวอย่าง มีค่ามากกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำร้อนของใบชูลูบที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลาเวลา 12 เดือนที่ระยะเวลาในการสกัดเท่ากันคือ 85.02 ± 2.39 มิลลิกรัมสมมูลคาที่ซินต่อกรัมตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าการเพิ่มของระยะเวลาในการสกัดการบดใบชูลูบให้ละเอียดมีผลทำให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดดังแสดงในภาพที่ 39 เมื่อเทียบสารสกัดจากใบชูลูบที่ผ่านการเก็บรักษาสภาพเป็นเวลา 12 เดือน พบว่ามีค่าปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาถึงการสกัดด้วยน้ำร้อนในลักษณะต่างๆ ข้างต้นถึงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดซึ่งค่าที่ได้มีความสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Cho และคณะ (2012) ที่ทำการศึกษาถึง

สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบใบชูลูและรากชูลู โดยนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง การเจริญของเซลล์มะเร็งสมองและเซลล์มะเร็งปอด และทดสอบถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสาร สกัดจากใบชูลูที่สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 78-80 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 40.4 ± 0.3 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง

ตารางที่ 20 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดใบชูลูอบและผงใบชูลูอบด้วยน้ำร้อน หลังจาก การเก็บรักษาใบชูลูแห้งระยะเวลา 9 เดือน และ 12 เดือน

| สารสกัดใบชูลู | เวลา (นาที) | ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัมสมมูลคาทิซินต่อกรัมตัวอย่าง) | |
|---------------|-------------|---|------------------------|
| | | เก็บรักษา 9 เดือน | เก็บรักษา 12 เดือน |
| ใบชูลูอบ | 3 | $5.41^a \pm 0.00$ | $6.98^a \pm 0.00$ |
| | 10 | $12.47^b \pm 0.68$ | $14.69^b \pm 0.23$ |
| | 20 | $22.41^d \pm 0.91$ | $18.75^c \pm 0.39$ |
| | 30 | $25.28^e \pm 0.60$ | $30.38^f \pm 1.48$ |
| | 60 | $33.52^g \pm 0.99$ | $34.04^g \pm 0.39$ |
| ผงใบชูลูอบ | 3 | $79.40^{hi} \pm 2.36$ | $84.23^{kl} \pm 2.18$ |
| | 10 | $77.43^h \pm 0.82$ | $82.54^{jkl} \pm 1.13$ |
| | 20 | $79.92^{hij} \pm 2.72$ | $83.06^{kl} \pm 1.04$ |
| | 30 | $81.49^{ijk} \pm 1.57$ | $81.88^{jk} \pm 2.04$ |
| | 60 | $126.98^m \pm 1.11$ | $85.02^l \pm 2.39$ |

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (\pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ



ภาพที่ 39 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดใบชูลูอบและผงใบชูลูอบด้วยน้ำร้อน หลังจากการ เก็บรักษาใบชูลูแห้งระยะเวลา 9 เดือน และ 12 เดือน

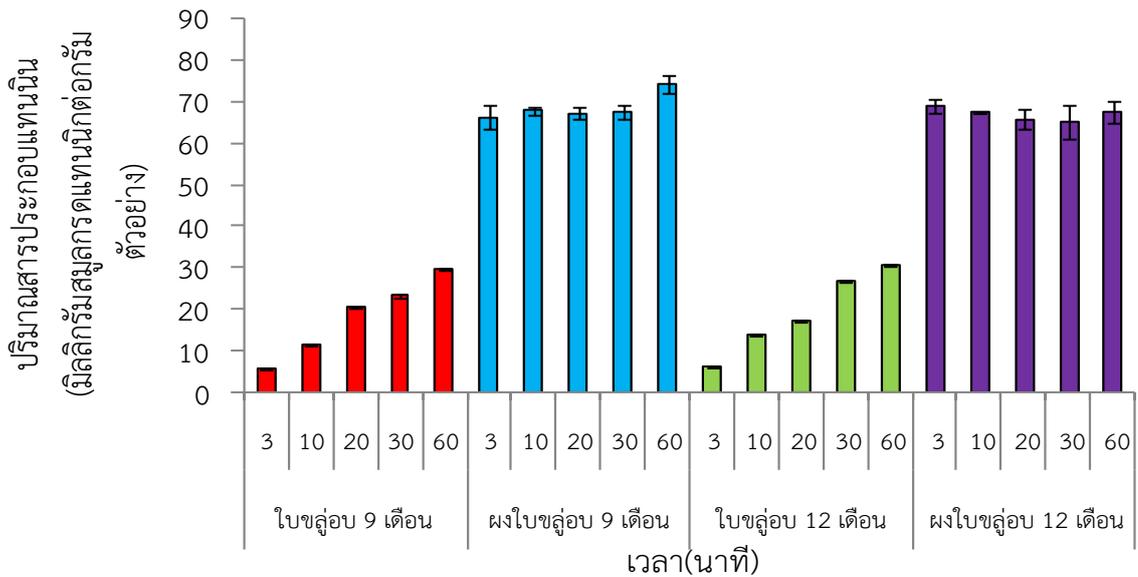
2.2 ปริมาณสารประกอบแทนนิน

จากการทดสอบปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดของสารสกัดจากใบช่อบและฝงใบช่อบที่สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ 3, 10, 20, 30 และ 60 นาที โดยปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดคำนวณเทียบเท่าเป็นน้ำหนักสมมูลสารมาตรฐานกรดแทนนิกจากกราฟมาตรฐานความเข้มข้นระหว่าง 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดจากใบช่อบที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 9 เดือนโดยสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที มีปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดเท่ากับ 29.51 ± 0.10 มิลลิกรัมสมมูลกรดแทนนิกต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำร้อนของใบช่อบที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 12 เดือน ที่ระยะเวลาในการสกัดเท่ากันคือ 30.62 ± 0.26 มิลลิกรัมสมมูลกรดแทนนิกต่อกรัมตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 21 สำหรับสารสกัดจากฝงใบช่อบที่ผ่านการเก็บรักษาใบช่อบระยะเวลา 9 เดือน ที่สกัดด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 60 นาที มีปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดสูงที่สุดคือ 74.21 ± 2.05 มิลลิกรัมสมมูลกรดแทนนิกต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งมีค่ามากกว่าสารสกัดจากฝงใบช่อบที่ผ่านการเก็บรักษาระยะเวลา 12 เดือน ที่สกัดด้วยน้ำร้อนที่ระยะเวลาเท่ากันคือ 67.48 ± 2.59 มิลลิกรัมสมมูลกรดแทนนิกต่อกรัมตัวอย่าง และปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดของสารสกัดใบช่อบที่สกัดด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 30 นาที เท่ากับ 14.34 ± 0.26 มิลลิกรัมสมมูลกรดแทนนิกต่อกรัมตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าการเพิ่มระยะเวลาและการบด ใบช่อบให้ละเอียด มีผลทำให้ปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดดังแสดงในภาพที่ 40 ในการทดสอบเปรียบเทียบสารสกัดจากใบช่อบที่ผ่านการเก็บรักษาสภาพเป็นเวลา 12 เดือน พบว่ามีค่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 21 ปริมาณสารประกอบแทนนินของสารสกัดใบช่อบและฝงใบช่อบด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส หลังจากการเก็บรักษาใบช่อบแห่งระยะเวลา 9 เดือน และ 12 เดือน

| สารสกัดใบช่อบ | เวลา (นาที) | ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัมสมมูลกรดแทนนิกต่อกรัมตัวอย่าง) | |
|---------------|-------------|---|-----------------------|
| | | เก็บรักษา 9 เดือน | เก็บรักษา 12 เดือน |
| ใบช่อบ | 3 | $5.72^a \pm 0.34$ | $6.21^a \pm 0.32$ |
| | 10 | $11.29^b \pm 0.29$ | $13.84^b \pm 0.19$ |
| | 20 | $20.32^d \pm 0.08$ | $16.96^c \pm 0.19$ |
| | 30 | $23.23^e \pm 0.50$ | $26.68^f \pm 0.40$ |
| | 60 | $29.51^g \pm 0.10$ | $30.62^g \pm 0.26$ |
| ฝงใบช่อบ | 3 | $66.22^{hi} \pm 2.76$ | $68.73^i \pm 1.71$ |
| | 10 | $67.79^{hi} \pm 0.92$ | $67.29^{hi} \pm 0.05$ |
| | 20 | $67.18^{hi} \pm 1.48$ | $65.71^{hi} \pm 2.46$ |
| | 30 | $67.54^{hi} \pm 1.49$ | $64.96^h \pm 4.17$ |
| | 60 | $74.21^j \pm 2.05$ | $67.48^{hi} \pm 2.59$ |

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (\pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ



ภาพที่ 40 ปริมาณสารประกอบแทนนินของสารสกัดไบชลู่อบและผงบไชลู่อบด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส หลังจากการเก็บรักษาไบชลู่อบและผงบไชลู่อบด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส หลังจากการเก็บรักษาไบชลู่อบและผงบไชลู่อบด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส หลังจากการเก็บรักษาไบชลู่อบและผงบไชลู่อบด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

3. การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัดจากไบชลู่อบที่ผ่านการเก็บรักษาในรูปแบบแตกต่างกัน

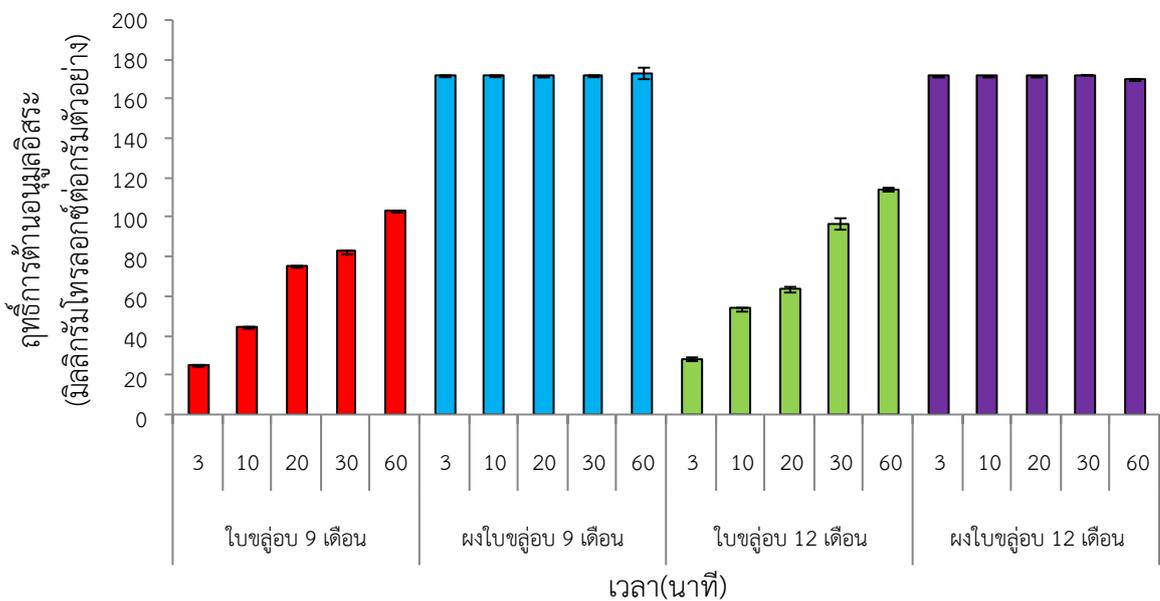
3.1 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากไบชลู่อบและผงบไชลู่อบที่สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ 3, 10, 20, 30 และ 60 นาที ซึ่งค่าที่ได้คิดเทียบเป็นสมมูลของสารละลายมาตรฐานโทรลอคซ์ จากกราฟมาตรฐานโทรลอคซ์ที่ความเข้มข้น 0 - 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดน้ำร้อนของไบชลู่อบที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 9 เดือน โดยแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 60 นาที มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 103.59 ± 0.70 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอคซ์ต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งมีค่าน้อยกว่า สารสกัดน้ำร้อนของไบชลู่อบที่เก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน ที่ใช้เวลาเท่ากัน คือ 114.19 ± 0.82 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอคซ์ต่อกรัมตัวอย่าง สำหรับสารสกัดของผงบไชลู่อบที่เก็บรักษาเป็นเวลา 9 และ 12 เดือน ที่สกัดด้วยน้ำร้อนนั้น พบว่าระยะเวลาที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยให้ค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติดังแสดงในตารางที่ 22 ส่วนฤทธิ์ ในการต้านอนุมูลอิสระของไบชลู่อบมีค่าสูงสุดเมื่อสกัดด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 30 นาที เท่ากับ 57.77 ± 0.13 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอคซ์ต่อกรัมตัวอย่าง จะเห็นว่าฤทธิ์ ในการต้านอนุมูลอิสระของไบชลู่อบจะมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด แต่ระยะเวลาในการสกัดไม่มีผลต่อฤทธิ์ ในการต้านอนุมูลอิสระของผงบไชลู่อบเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH ดังแสดงในภาพที่ 41 จากการศึกษาข้างต้นทำให้ทราบว่าไบชลู่อบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Andarwulan และคณะ (2010) ซึ่งทำการสกัดไบชลู่อบด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 96.4 ± 15.2 ไมโครโมลโทรลอคซ์ต่อกรัมตัวอย่าง

ตารางที่ 22 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดใบขลุ่ยที่เก็บรักษาเป็นเวลา 9 เดือนและ 12 เดือน ด้วยน้ำร้อน

| สารสกัดใบขลุ่ย | เวลา (นาที) | ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัมสมมูลโทรลอคซ์ต่อกรัมตัวอย่าง) | |
|----------------|-------------|--|-----------------------------|
| | | เก็บรักษา 9 เดือน | เก็บรักษา 12 เดือน |
| ใบขลุ่ยอบ | 3 | 25.60 ^a ± 0.32 | 28.42 ^b ± 1.00 |
| | 10 | 44.51 ^c ± 0.35 | 54.04 ^d ± 1.00 |
| | 20 | 75.69 ^f ± 0.70 | 63.80 ^e ± 1.13 |
| | 30 | 82.85 ^g ± 1.00 | 96.96 ^h ± 2.84 |
| | 60 | 103.59 ⁱ ± 0.70 | 114.19 ^j ± 0.82 |
| ผงใบขลุ่ยอบ | 3 | 171.74 ^{kl} ± 0.26 | 171.36 ^{kl} ± 0.23 |
| | 10 | 171.44 ^{kl} ± 0.48 | 171.21 ^{kl} ± 0.35 |
| | 20 | 171.21 ^{kl} ± 0.26 | 171.36 ^{kl} ± 0.00 |
| | 30 | 171.74 ^{kl} ± 0.35 | 171.89 ^{kl} ± 0.13 |
| | 60 | 172.94 ^l ± 2.73 | 170.06 ^k ± 0.35 |

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ



ภาพที่ 41 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดใบขลุ่ยอบที่ผ่านการเก็บรักษาระยะเวลา 9 เดือน และ 12 เดือน

3.2 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

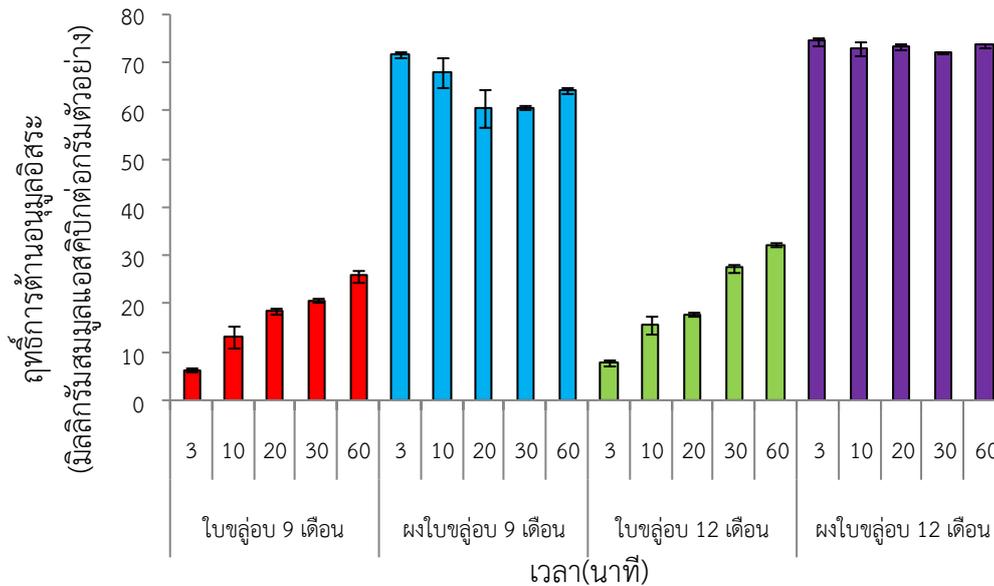
จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดจากใบขลุ่ยอบและผงใบขลุ่ยอบที่สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งค่าที่ได้คิดเทียบเป็นสมมูลของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเมื่อทำการสกัด

ใบช่อบด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 60 นาที สารสกัดจากใบช่อบที่เก็บรักษาระยะเวลา 12 เดือน ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดน้ำร้อนของใบช่อบที่เก็บรักษาเป็นเวลา 9 เดือน โดยมีค่าเท่ากับ 32.39 ± 0.45 และ 26.00 ± 1.19 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดน้ำร้อนของผงใบช่อบที่เก็บรักษา ระยะเวลา 9 เดือน ที่เวลา 3 นาที และผงใบช่อบที่เก็บรักษา ระยะเวลา 12 เดือน ที่ทุกระยะเวลาของการสกัดให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในตารางที่ 23 จะเห็นได้ว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของใบช่อบจะมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ตรงข้ามกับผงใบช่อบที่ระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น ในกรณีของสารสกัดจากผงใบช่อบที่มีอายุเก็บรักษา 12 เดือน ซึ่งให้ค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติในทุกระยะเวลาการสกัดดังแสดงในภาพที่ 42 จากการศึกษาข้างต้นทำให้ทราบว่าใบช่อบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวัดด้วยวิธี ABTS สอดคล้องกับงานวิจัยของ Andarwulan และคณะ (2010) ซึ่งทำการสกัดใบช่อบด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 พบว่าสารสกัดจากใบช่อบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มีค่าเท่ากับ 3.75 ± 0.16 ไมโครโมลโทรลออกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง

ตารางที่ 23 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดใบช่อบที่เก็บรักษา ระยะเวลา 9 เดือน และ 12 เดือน ด้วยน้ำร้อน

| สารสกัดใบช่อบ | เวลา (นาที) | ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมตัวอย่าง) | |
|---------------|-------------|---|-----------------------|
| | | เก็บรักษา 9 เดือน | เก็บรักษา 12 เดือน |
| ใบช่อบ | 3 | $6.44^a \pm 0.29$ | $7.91^a \pm 0.78$ |
| | 10 | $13.17^b \pm 2.26$ | $15.60^c \pm 1.83$ |
| | 20 | $18.54^d \pm 0.55$ | $17.97^d \pm 0.34$ |
| | 30 | $20.91^e \pm 0.35$ | $27.53^f \pm 0.87$ |
| | 60 | $26.00^f \pm 1.19$ | $32.39^g \pm 0.45$ |
| ผงใบช่อบ | 3 | $71.85^k \pm 0.69$ | $7.91^l \pm 0.78$ |
| | 10 | $68.24^j \pm 3.04$ | $15.60^{kl} \pm 1.83$ |
| | 20 | $60.77^h \pm 3.78$ | $17.97^{kl} \pm 0.34$ |
| | 30 | $60.77^h \pm 0.39$ | $27.53^{kl} \pm 0.87$ |
| | 60 | $64.45^i \pm 0.78$ | $32.39^{kl} \pm 0.45$ |

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (\pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ



ภาพที่ 42 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดใบชูลู่ที่เก็บรักษาระยะเวลา 9 เดือนและ 12 เดือน ด้วยน้ำร้อน

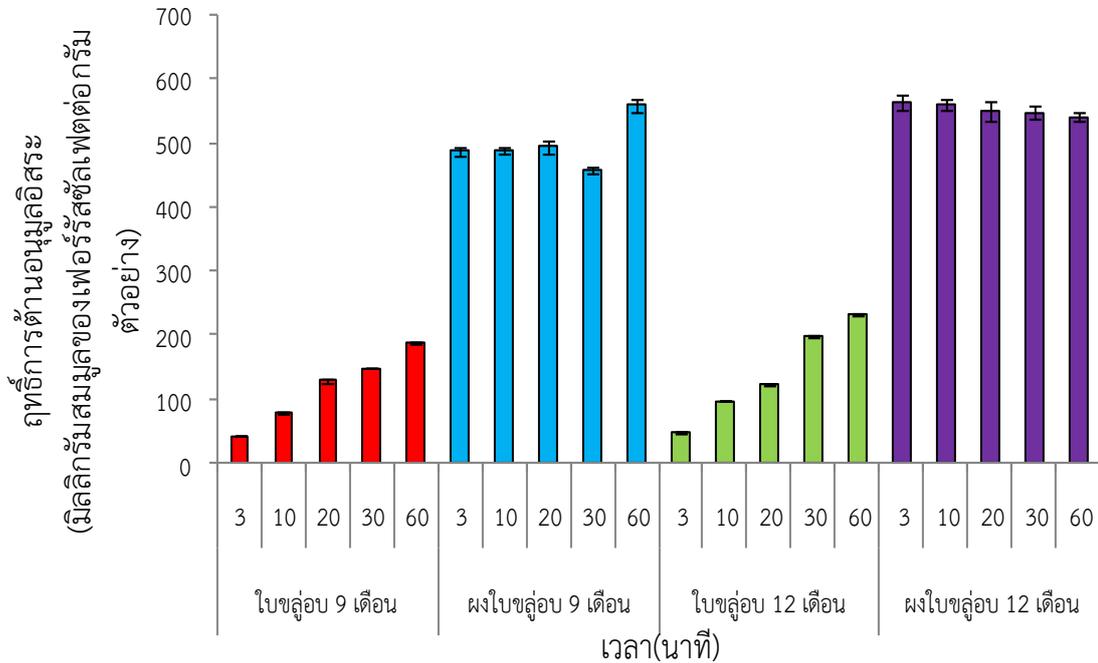
3.3 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดจากใบชูลู่และผงใบชูลู่ที่สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งค่าที่ได้คิดเทียบเป็นสมมูลของสารมาตรฐานเพอร์ร็อกซิไดซ์ไฮดรอกซิลที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดน้ำร้อนของใบชูลู่ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 9 เดือน เป็นเวลาเวลา 60 นาที มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 189.33 ± 1.61 มิลลิกรัมกรัมสมมูลของเพอร์ร็อกซิไดซ์ไฮดรอกซิลต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งมีค่าน้อยกว่าสารสกัดน้ำร้อนของใบชูลู่ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน คือ 231.79 ± 2.36 มิลลิกรัมกรัมสมมูลของเพอร์ร็อกซิไดซ์ไฮดรอกซิลต่อกรัมตัวอย่าง ส่วนสารสกัดน้ำร้อนของผงใบชูลู่ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 9 ที่เวลา 60 นาที มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ คือ 559.04 ± 9.83 มิลลิกรัมกรัมสมมูลของเพอร์ร็อกซิไดซ์ไฮดรอกซิลต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งเมื่อเทียบกับค่าของสารสกัดผงใบชูลู่ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน ที่ทุกระยะเวลาของการสกัด พบว่าให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 24 ส่วนฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของใบชูลู่อบ ที่เวลา 60 นาที มีค่าเท่ากับ 80.49 ± 0.45 มิลลิกรัมกรัมสมมูลของเพอร์ร็อกซิไดซ์ไฮดรอกซิลต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งน้อยกว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของใบชูลู่การคั่วที่เวลา 20-30 นาที มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงไม่แตกต่างกัน เท่ากับ 216.35 ± 3.81 และ 220.47 ± 0.77 มิลลิกรัมกรัมสมมูลของเพอร์ร็อกซิไดซ์ไฮดรอกซิลต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของใบชูลู่อบที่เก็บรักษาเป็นเวลา 9 และ 12 เดือน ใบชูลู่และผงใบชูลู่ที่มีอายุการเก็บ 9 เดือน จะมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ส่วนกรณีของสารสกัดจากผงใบชูลู่อบที่มีอายุเก็บรักษา 12 เดือน ให้ค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติในทุกระยะเวลาการสกัด ดังแสดงในภาพ ที่ 43 จากการศึกษาข้างต้นทำให้ทราบว่าใบชูลู่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวัดด้วยวิธี ABTS สอดคล้องกับงานวิจัยของ Andarwulan และคณะ (2010) ซึ่งทำการสกัดใบชูลู่ด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 พบว่าสารสกัดจากใบชูลู่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีค่าเท่ากับ 81.1 ± 0.6 ไมโครโมลโทรลออกซ์ต่อกรัมตัวอย่าง

ตารางที่ 24 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดใบขลุ่ยที่เก็บรักษาเป็นเวลา 9 และ 12 เดือน ด้วยน้ำร้อน

| สารสกัดใบขลุ่ย | เวลา (นาที) | ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัมกรัมสมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมตัวอย่าง) | |
|----------------|-------------|---|------------------------------|
| | | เก็บรักษา 9 เดือน | เก็บรักษา 12 เดือน |
| ใบขลุ่ยอบ | 3 | 41.38 ^a ± 0.00 | 46.78 ^a ± 1.34 |
| | 10 | 77.66 ^b ± 1.54 | 96.44 ^c ± 0.45 |
| | 20 | 128.35 ^d ± 2.48 | 123.46 ^d ± 1.18 |
| | 30 | 148.42 ^e ± 1.61 | 198.08 ^f ± 1.34 |
| | 60 | 189.33 ^f ± 1.61 | 231.79 ^g ± 2.36 |
| ผงใบขลุ่ยอบ | 3 | 488.28 ⁱ ± 17.56 | 563.67 ^l ± 12.01 |
| | 10 | 488.28 ⁱ ± 4.72 | 559.81 ^{kl} ± 7.72 |
| | 20 | 493.94 ⁱ ± 8.91 | 549.52 ^{jk} ± 15.00 |
| | 30 | 457.15 ^h ± 5.46 | 546.95 ^{jk} ± 10.05 |
| | 60 | 559.04 ^{kl} ± 9.83 | 540.77 ^j ± 6.43 |

หมายเหตุ - ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ



ภาพที่ 43 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดใบขลุ่ยที่เก็บรักษาเป็นเวลา 9 และ 12 เดือน ด้วยน้ำร้อน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

1. สรุปผลการวิจัยในปีที่ 1

จากการทดลองสารสกัดจากใบขลุ่ย 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากใบขลุ่ยสด สารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้ง และสารสกัดจากใบขลุ่ยอบที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 พบว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยทั้ง 3 ชนิด ที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 สามารถสกัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และมีฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH และ ABTS ได้มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 ส่วนในกรณีของปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบีจะให้ปริมาณมากหากสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 สำหรับปริมาตรตัวทำละลายที่แตกต่างกัน คือ 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) พบว่าการสกัดที่ปริมาตร 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลุ่ยสด) สามารถสกัดปริมาณสารสำคัญออกมาได้มากที่สุด จากการเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบขลุ่ยสด ตากแห้ง และอบ พบว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยอบให้ผลดีที่สุด และจากการทดสอบการเก็บรักษาสารสกัดจากใบขลุ่ย 3 ชนิด จะเห็นได้ว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน สารสกัดจากใบขลุ่ยสดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดคงที่ ในขณะที่ฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH และ ABTS เพิ่มขึ้น สารสกัดจากใบขลุ่ยตากแห้งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลง มีฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH และ ABTS คงที่ และสารสกัดจากใบขลุ่ยอบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลง มีฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH เพิ่มขึ้น รวมทั้งมีฤทธิ์การต้านอนุมูล ABTS คงที่ ดังนั้น สารสกัดจากใบขลุ่ยสดจึงเหมาะสมต่อการเก็บรักษาไว้ในเวลา 1 เดือน เนื่องจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดคงที่ และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่า สารสกัดจากใบขลุ่ยสด ตากแห้ง และอบไม่มีผลในการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) สำหรับ สภาวะการสกัดที่ให้ปริมาณสารสำคัญการออกฤทธิ์ และการเก็บรักษาที่ดีที่สุด

2. สรุปผลการวิจัยในปีที่ 2

ตอนที่ 1

จากการทดสอบสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนในสภาวะที่แตกต่างกัน คือ สกัดด้วยการแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน การสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดัน และการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยด โดยนำวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธีมาเปรียบเทียบถึงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบี ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณ

สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสามารถสรุปผลการศึกษาดังนี้

ในการทดสอบหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอทั้งหมดพบว่า การเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีลดลง โดยการสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการสกัด 3 นาทีให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีสูงที่สุด สำหรับการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลา 80 วินาทีให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี สูงสุดเมื่อเทียบกับระยะเวลาต่างๆ ที่สกัดผ่านหัวขง และการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยดมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีต่ำมีค่าเทียบเท่ากับการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันที่ระยะเวลา 120 วินาที ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยการสกัดในขลุ่ด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสระยะเวลาในการสกัด 10 นาทีมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด โดยการเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดส่งผลให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น สำหรับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลา 80 วินาทีมีค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับระยะเวลาต่างๆ ที่สกัดผ่านหัวขง และการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าเทียบเท่ากับการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันที่ระยะเวลา 120 วินาที สำหรับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่า ในการสกัดในขลุ่ด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลาสกัด 5 นาที มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด ซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดส่งผลให้มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น สำหรับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลา 80 วินาทีมีค่าสูงสุดโดยค่าดังกล่าวมีค่าเทียบเท่ากับการสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วนปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยด มีค่าเทียบเท่ากับการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันที่ระยะเวลา 40 วินาที

จากการตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดในขลุ่ด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดส่งผลให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น สำหรับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบขลุ่ที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลา 80 วินาทีมีค่าสูงสุดโดยมีค่าเทียบเท่ากับการสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยดมีปริมาณฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันที่ระยะเวลา 120 วินาที

ส่วนฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าสารสกัดในขลุ่ด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสระยะเวลาในการสกัด 5 นาทีให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด สำหรับสารสกัดจากใบขลุ่ที่สกัดด้วยเครื่องชงอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลา 80 วินาทีมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดโดยมีค่าเทียบเท่ากับการสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสระยะเวลาสกัด 3 นาที และการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยดมีปริมาณฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันที่ระยะเวลา 120 วินาที ซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดส่งผลให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และ **ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP** พบว่าสารสกัดในขลุ่ด้วยน้ำ

ร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสระยะเวลา 10 นาที ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดส่งผลให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น สำหรับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันระยะเวลาสกัด 80 วินาทีมีค่าสูงสุดโดยมีค่าเทียบเท่ากับการสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และการสกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยดมีปริมาณฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับการสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 8 นาที

ดังนั้นในการเลือกสกัดสารสกัดจากใบขลุ่ยอบแห้งถ้าต้องการปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดควรวิธีเลือกสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แต่ถ้าต้องการปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบีในปริมาณสูงควรเลือกวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 นาที โดยที่การสกัดใบขลุ่ยที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันและเครื่องชงกาแฟแบบหยดให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำจึงไม่เหมาะสมสำหรับการสกัด ซึ่งสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการสกัดสารจากใบขลุ่ยด้วยน้ำร้อนแสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 สรุปสภาวะการสกัดใบขลุ่ยด้วยน้ำร้อนที่ให้ปริมาณสารสำคัญและการออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด

| คุณสมบัติของสารสกัดจากใบขลุ่ย | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลาสกัด (นาที) |
|--------------------------------------|-------------------------|-----------------|
| ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์ทั้งหมด | 60 | 3 |
| ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด | 100 | 10 |
| ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด | 100 | 5 |
| ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH | 100 | 3 |
| ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS | 100 | 3 |
| ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP | 100 | 3 |

ส่วนผลของการทดสอบสารสกัดจากใบขลุ่ยที่ผ่านการรักษาสภาพใบขลุ่ยอบแห้งระยะเวลา 3 เดือน พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดคงที่ โดยที่ปริมาณสารประกอบคลอโรฟิลล์เอและบีลดลง ในส่วนของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระคงที่ แต่การทดสอบด้วยวิธี FRAP ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระลดลง นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากใบขลุ่ยที่สกัดด้วยน้ำร้อนไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase)

ตอนที่ 2

จากการสกัดใบช่อบ ใบชู่่นึ่งก่อนอบ และใบชู่่ทางการคั่ว ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมีสองลักษณะคือ แบบใบ และแบบบดละเอียด โดยทำการสกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาแตกต่างกัน แล้วนำมาทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และปริมาณสารประกอบแทนนิน และทดสอบ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP โดยสามารถสรุปผลการศึกษาดังนี้

ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า การบดใบชู่่ให้ละเอียดมีผลทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น แต่ระยะเวลาไม่มีผลต่อวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งมีความมากกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดผงใบชู่่อบที่เวลาในการสกัดเท่ากัน ส่วน **ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด** พบว่าการบดใบชู่่ให้ละเอียดมีผลทำให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น แต่ระยะเวลาที่ไม่มีผลต่อการวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด **เช่นเดียวกับการตรวจสอบปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดให้ผลในทางเดียวกันโดยจ** ะเห็นได้ว่าการบดใบชู่่ให้ละเอียดมีผลทำให้ปริมาณสารประกอบแทนนินเพิ่มขึ้น ซึ่งระยะเวลาในการสกัดไม่มีผลต่อการวัดปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมด

ในการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดของใบชู่่อบ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เมื่อสกัดด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 30 นาที ส่วนฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผงใบชู่่ที่สกัดด้วยน้ำร้อน ในทุกระยะเวลาของการสกัด พบว่าให้ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จะมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อทำการบดใบชู่่ให้ละเอียด และเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดใบชู่่ แต่ระยะเวลาในการสกัดไม่มีผลต่อฤทธิ์ ในการต้านอนุมูลอิสระ ของผงใบชู่่เมื่อวัดด้วยวิธี DPPH ส่วน ในการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่า เมื่อทำการสกัดใบชู่่อบด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 60 นาที ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด แต่มีค่าน้อยกว่าสารสกัดจากผงใบชู่่อบ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดไม่แตกต่างกันเมื่อใช้ เวลาสกัดนาน 3 ถึง 10 นาที จะเห็นได้ว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของใบชู่่จะมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อทำการบดใบชู่่ให้ละเอียด และเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ตรงข้ามกับผงใบชู่่ที่ระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระลดลงเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี **ABTS สำหรับตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP** พบว่า สารสกัดของใบชู่่อบที่เวลา 30 นาที มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด แต่มีค่าน้อยกว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดจากผงใบชู่่อบ ที่เวลา 3 ถึง 10 นาที

บรรณานุกรม

- ธวัชชัย รอดสม. 2536. การศึกษาฤทธิ์ขับปัสสาวะของยาเตรียมจากขลุ้ในอาสาสมัครและผู้ป่วย.
วิทยานิพนธ์. มหาวิทยาลัยมหิดล สาขาเภสัชวิทยา.
- นันทพร นิลวิเศษ, วัลลา วามันัฐจินดา, บุญสม วรรณวีรกุล และพรรณณี พิเดช. 2532. การศึกษาฤทธิ์ขับ
ปัสสาวะของขลุ้. *วารสารเภสัชวิทยา*. 11(1): 1.
- เพ็ญโฉม พิ่งวิชา รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล และสุจิตรา ทองประดิษฐ์โชติ. 2542. ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของ
สารสกัดรากขลุ้. *วารสารสมุนไพร*. 6(2): 18-22.
- พจน์ ศรีบุญลือ และคณะ. (2542). การศึกษาศักยภาพของสมุนไพรในการรักษาและป้องกันโรคนี้่วไต.
รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พัชรี ขุนหลัด ยงยุทธ ตันกุลเวสส ธารารัตน์ ศุภศิริ และวราดูล ฉัตรทอง. (2551). การยับยั้งเอนไซม์ไทโร
ซิเนสของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์จากผงขมิ้น (*Curcuma longa* Linn.). *วารสาร
วิทยาศาสตร์ มศว* , 24(1) ,125-139.
- พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ. (2547). *เครื่องสำอางธรรมชาติ : ผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหน้า Natural cosmetics
products for skin*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ. (2551). *เครื่องสำอางสำหรับผิวหน้า*. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พรีนติ้งเฮาส์.
- พิมพ์วรรณ ทัญทุทพิจารณ์, เฉลิม จันทร์สม, วนิดา จันทร์สม และกรกนก อิงคนินันท์. (2555). ฤทธิ์ต้าน
เอนไซม์โคเลสเตอรอลของสารอัลคาลอยด์จากกรากระย่อม. *Thammasat Medical Journal*.
11(3): 401-408.
- มานิช วามานนท์ และเพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. (2540). *ยาสมุนไพรสำหรับสาธารณสุขมูลฐาน*. พิมพ์ครั้งที่
2. กรุงเทพฯ: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.
- สุภัททิยมย์. (2551). *97 สมุนไพรใกล้ตัว เสริมสุขภาพและความงาม*. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ:
ไทยควอลิตี้บุ๊คส์ (2006).
- อุดมการณ์ อินทุไส และปาริชาติ ทะนานแก้ว. (2549). *สมุนไพรไทย ตำรับยา บำบัดโรค บำรุงร่างกาย*.
กรุงเทพฯ: มติชน.
- โอภา วัชรระคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดดีสินทอง. (2549). *สารต้านอนุมูล
อิสระ*. นนทบุรี: พี. เอส. พรีน.
- ส่วนบริหารการจัดการทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3. 2551. *สมุนไพรในป่าชายเลน*. สงขลา. หาดใหญ่เบสท์
เซลส์ แอนด์ เซอร์วิส จำกัด.
- Andarwulan, N., Batari, R., Sandrasari, D.A., Bolling, B., &Wijaya, H. (2010).Flavonoid content
and antioxidant activity of vegetables from Indonesia.*Food Chemistry*, 121, 1231–
1235.
- Albona, S.M., Liam, A.S., Miguel, M.G., Pedro, L.G., Barroso, J.G. & Figueiredo, C. 2012.
Antioxidant, Anti-5-lipoxygenase and Antiacetylcholinesterase Activities of Essential
Oils and Decoction Water of Some Aromatic Plants. *Rec. Nat. Prod.* 6(1): 35-48.

- Andarwulan N., Batari R., Sandrasari D. A., Bolling B., & Wijaya H. 2010. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry*. 121, 1231–1235.
- Bastianetto, S. & Quirion, R. 2002. Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiology of Aging*. 23: 891-897.
- Cho, J., Cho, C., Kao, C., Chen, C., Tseng, C., Lee, Y., Liao, L., & Hong, Y. (2012). Crude aqueous extracts of *Pluchea indica* (L.) Less. inhibit proliferation and migration of cancer cells through induction of p53-dependent cell death. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(265), 1472-1483.
- Commenges, D., Scotet, V., Renaud, S., Jacqmin-Gadda, H., Barberger-Gateau, P. & Dartigues, J. F. 2000. Intake of flavonoids and risk of dementia. *European Journal of Epidemiology*. 16: 357-363.
- Daniel, O.; Meier, M. S.; Schlatter, J. & Frischknecht, P. 1999. Selected phenolic compounds in cultivated plants: Ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environ. Health Perspect.*, 107, 109-114.
- Franceschi S, Parpinel M, La Vecchia C, Favero A, Talamini R, & Negri E. 1998. Role of different types of vegetables and fruit in the prevention of cancer of the colon, rectum, and breast. *Epidemiology*. 9(3), 338-341.
- Lichtenthaler, H.K. & Wellburn, A.R. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11: 591-592.
- Marina, A.M., Che Man, Y.B., Nazimah, S.A.H. & Amin, I. (2009). Chemical Properties of Virgin Coconut Oil. *American Oil Chemists Society*. 86: 301-307.
- Marinova, D., Ribarova, F. & Atanassova, M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruit and vegetables. *University of Chemical Technology and Metallurgy*. 40(3): 255-260.
- Mata, A. T., Proenca, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F. & Araujo, M. E. M. 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*. 103: 778-786.
- Miller, H. E.; Rigelhof, F.; Marquart, L.; Prakash, R. D. A. & Kanter, M. 2000. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *J. Am. College Nutr.* 19, 312S-319S.
- Mohd Nazri N. A. A., Ahmat N., Adnan A., Syed Mohamad S. A. & Syaripah Ruzaina S. A.. 2011. *In vitro* antibacterial and radical scavenging activities of Malaysian table salad. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(30), 5728-5735.
- Morton, L. W.; Caccetta, R. Abu-Amsha; Puddey, I. B. & Croft, K. D. 2000. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 27, 152-159.

- Mukhapadhyay S, Cordell GA, Ruangrunsi N, Rodkird S, Tantivatana P & Hylands PJ. 1983. Traditional medicinal plants of Thailand IV 3-(2',3'-Diacetoxy-2'-methyl butyryl)-cuanthemone from *Pluchea indica*. *J.Nat.Prod.* 46(5): 671-674.
- Newmark, H. L. 1996. Plant phenolics as potential cancer prevention agents. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 401, 25-34.
- Noridayu, A.R., Hii, Y.F., Faridah, A., Khozirah, S. & Lagis, N. 2011. Antioxidant and Antiacetylcholinesterase activities of *Pluchea indica* Less. *International Food Research Journal.* 18(3): 925-929.
- Orhan, I., Kartal. M., Naz, Q., Ejaz, A., Yilmaz, G., Kan,Y., Konuklugil, B., Sener, B. & Iqbal Choudhary, M. 2007. Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chemistry.* 103: 1247-1254.
- Pramanik, K.C., Bhattacharya, P., Biswas, R., Bandyopadhyay, D.,Mishra, M., &Chatterjee, K. 2006. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of leaf extract of *pluchea indica* Less. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 6(3), 232-236.
- Re, R., Pelligrini, N., Pannala, A., Yang, M. & Evans, C.R. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med.* 9: 1231-1237.
- Scalbert A, & Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 130(8S Suppl), 2073S - 2085S.
- Sen, T., Basu, A., Ray, R.N. & Chaudhuri, A.K.N. 1993. Hepatoprotective effect of *Pluchea indica* (Less.) extract in experimental acute liver damage in rodents. *Phytother Res.* 7: 352-355.
- Sen, T. & Chaudhuri, A.K.N. 1991. Anti-inflammatory evaluation of a *Pluchea indica* root extract. *J Ethnopharmacol.* 19: 379-383.
- Sen, T., Dhara, A.K., Bhattacharjee, S., Pal, S. & Chaudhuri, A.K.N. 2002. Antioxidant activity of the methanol fraction of *Pluchea indica* root extract. *Phytother Res.* 16: 331-335.
- Sharma S. Kr. & Goyal N. 2011. Biological Studies of the Plants from Genus *Pluchea*. *Annals of Biological Research*, 2 (3):25-34.
- Thongpraditchote, S., Matsumoto, K., Tamsiririrkkul, R., Tohda, M., Murakami, Y. & Watanabe, H. 1996. Neuropharmacological actions of *Pluchea indica* Less root extract in socially isolated mice. *Biol Pharm Bull.* 19: 379-383.
- Uchiyama, T. Miyase, T. Ueno, A. & Usmanhany K. 1991. Terpene and lignan glycosides from *Pluchea indica*. *Phytochemistry.* 30(2); 655-657.
- Uchiyama, T. Miyase, T. Ueno, A. & Usmanhany K. 1989. Terpenic glycosides from *Pluchea indica*. *Phytochemistry.* 28(12); 3369-3372.
- Wiert, C. 2006. Medicinal plants of the Asia-Pacific: Drugs for the future? World Science Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore: 629-630.

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก โดยชั่งกรดแกลลิก 0.01 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิก

เตรียมสารละลายกรดแอสคอบิกความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดแอสคอบิก 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ได้สารละลายกรดแอสคอบิกความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูล ABTS

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์

เตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ โดยชั่งสารโทรลอกซ์ 0.025 กรัม ละลายด้วยเอทานอลร้อยละ 99.9 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH

4. การเตรียมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent

เตรียมโดยนำสารละลาย Folin-ciocalteu reagent มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยก่อนใช้ต้องทำการเจือจางสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.9 - 1.0 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

5. การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ที่มีความเข้มข้น 0.15 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนตมา 7.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร ผสมจนละลาย เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

6. การเตรียมสารละลาย ABTS

เตรียม ABTS ให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt อย่างละเอียด 0.0384 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน และปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมโพตัสเซียมเปอร์ซัลเฟตให้มีความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่งโพตัสเซียมเปอร์ซัลเฟตอย่างละเอียด 0.0166 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน และปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ผสมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และสารละลายโพตัสเซียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 12 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน จะได้สารละลาย ABTS เก็บไว้ในที่มืดก่อนทำการทดสอบ 16 - 18 ชั่วโมง โดยก่อนใช้ต้องทำการเจือจางสารละลาย ABTS ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 729 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.9 - 1.0 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูล ABTS

7. การเตรียมสารละลาย DPPH

เตรียม DPPH ให้มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl อย่างละเอียด 0.0390 กรัม ละลายด้วยเอทานอลร้อยละ 99.9 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยก่อนใช้ต้องทำการเจือจางสารละลาย DPPH ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.9 - 1.0 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH

8. การเตรียมสารละลายทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์

เตรียมทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) อะมิโนมีเทน ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยชั่ง ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) อะมิโนมีเทน อย่างละเอียด 1.5150 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยปิเปตกรดไฮโดรคลอริก 1,050 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

นำสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ มาทำการปรับค่าความเป็นกรด - ต่างของสารละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) อะมิโนมีเทน ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ให้ได้เท่ากับ 7.4 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้ง Acetylcholinesterase

9. การเตรียมสารละลายอะซิติลไทโอโคลีน

เตรียมสารละลายอะซิติลไทโอโคลีนไอโอไดด์ (Acetylthiocholine iodide) ที่มีความเข้มข้น 183 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งอะซิติลไทโอโคลีนไอโอไดด์ อย่างละเอียด 0.0529 กรัม ละลายด้วยสารละลายทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) ที่มีค่าความเป็นกรด - ต่าง เท่ากับ 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมจนละลาย เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้ง Acetylcholinesterase

10. การเตรียมสารละลาย DTNB

เตรียม DTNB ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง 5,5'-dithiobis[2-nitrobenzoic acid] อย่างละเอียด 0.0297 กรัม ละลายด้วยสารละลายทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) ที่มีค่าความเป็นกรด - ต่าง เท่ากับ 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมจนละลาย เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้ง Acetylcholinesterase

11. การเตรียมสารละลายมาตรฐานกาแลนทาไมน์ (Galanthamine)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกาแลนทาไมน์ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่ง galanthamine อย่างละเอียด 0.0010 กรัม ละลายด้วยเอทานอลร้อยละ 99.9 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้ง Acetylcholinesterase

12. การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

13. การเตรียมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์

เตรียมอลูมิเนียมคลอไรด์ร้อยละ 10 โดยชั่งอลูมิเนียมคลอไรด์อย่างละเอียด 2.5000 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

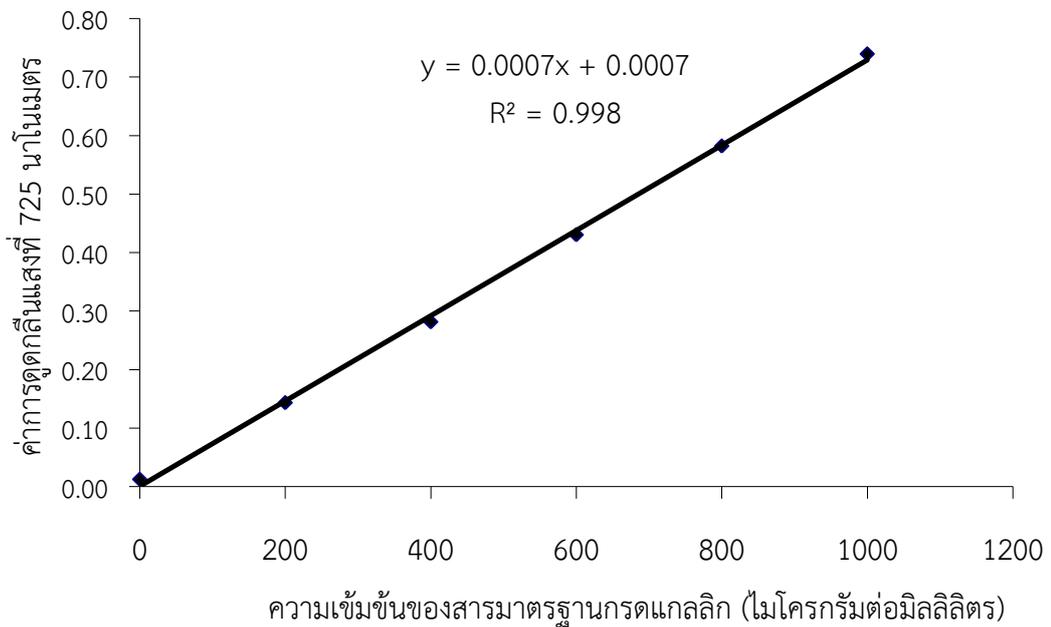
14. การเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตรต์

เตรียมโซเดียมไนไตรต์ร้อยละ 3 โดยชั่งโซเดียมไนไตรต์อย่างละเอียด 0.7500 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

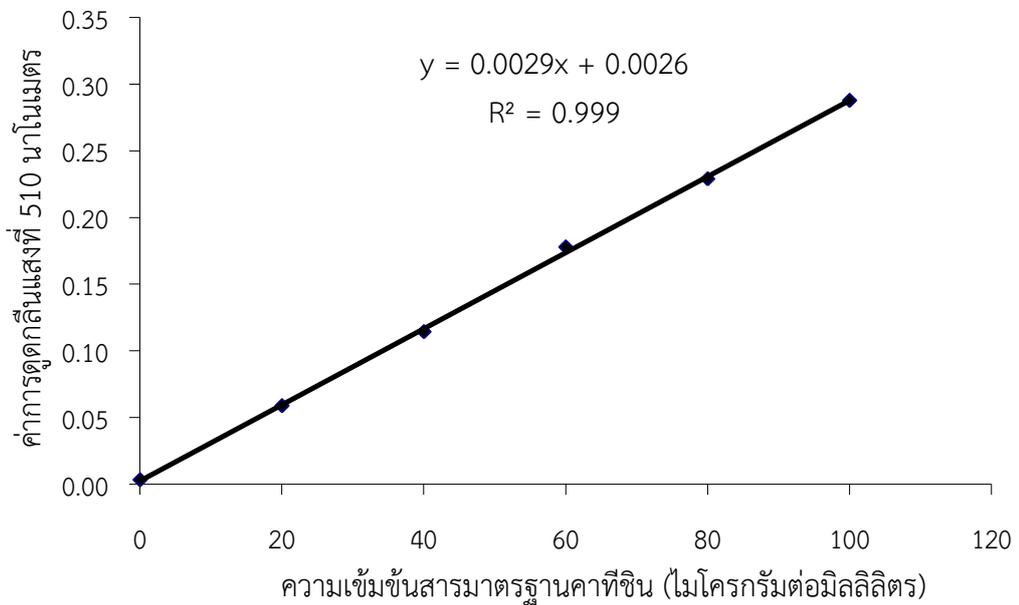
15. การเตรียมสารละลายมาตรฐานคาทีชิน (Catechin)

เตรียมสารละลายมาตรฐานคาทีชินความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งคาทีชินอย่างละเอียด 0.0010 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร ผสมจนละลาย เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

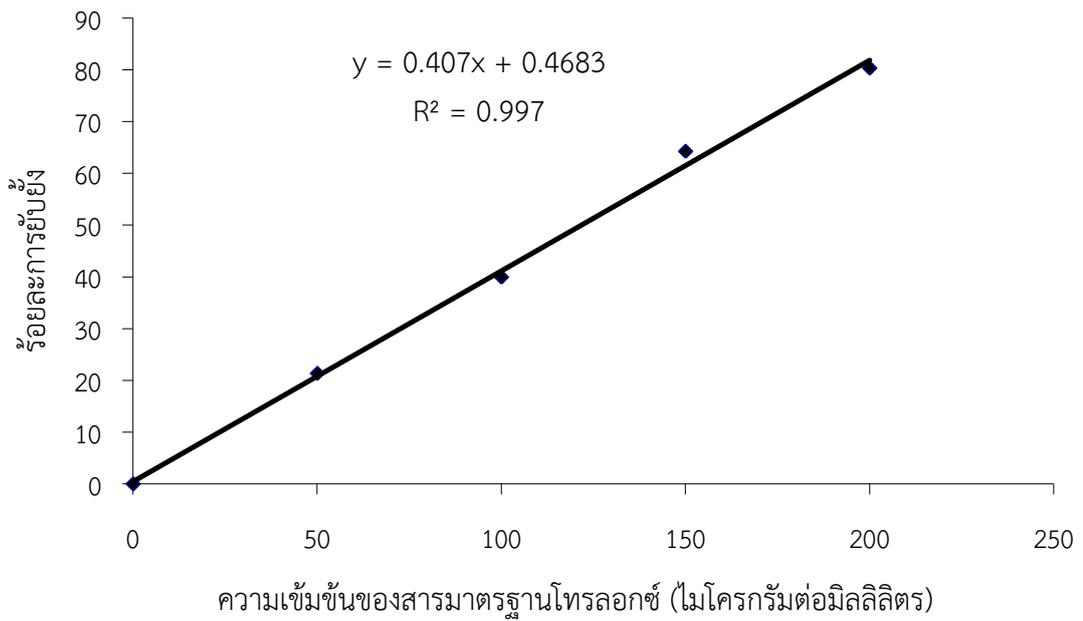
ภาคผนวก ข



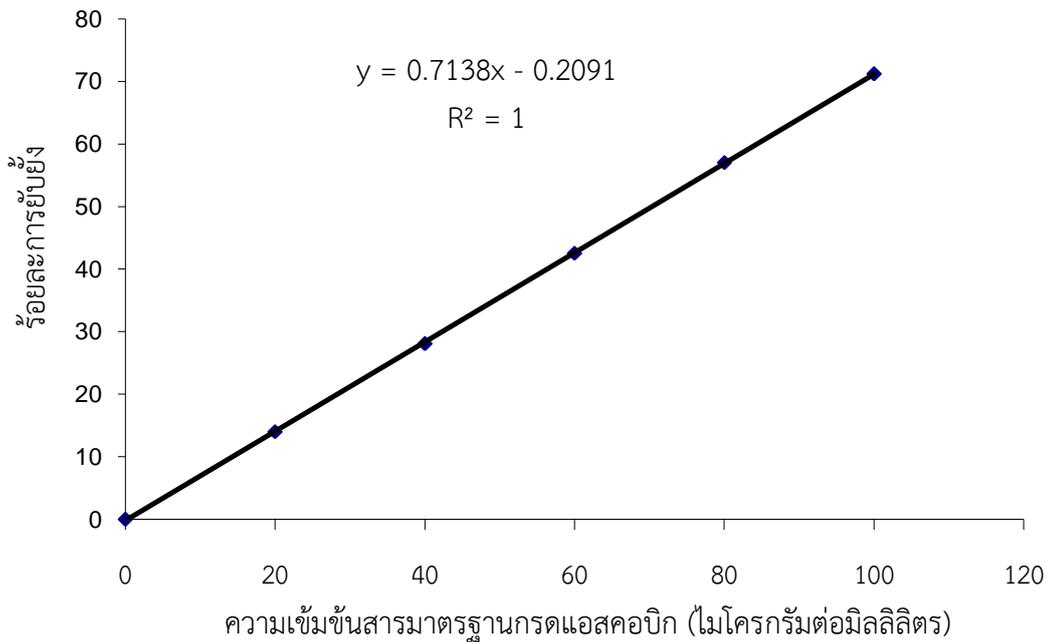
ภาพที่ ข-1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0 - 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด



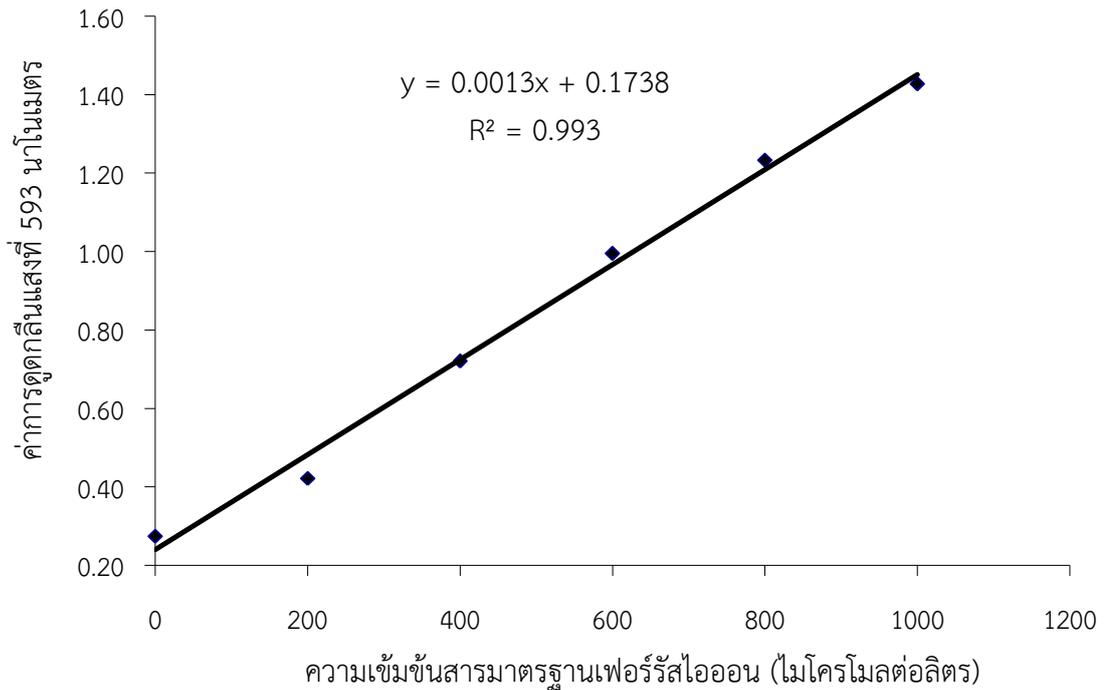
ภาพที่ ข-2 กราฟมาตรฐานของคาทีซินที่ความเข้มข้น 0 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด



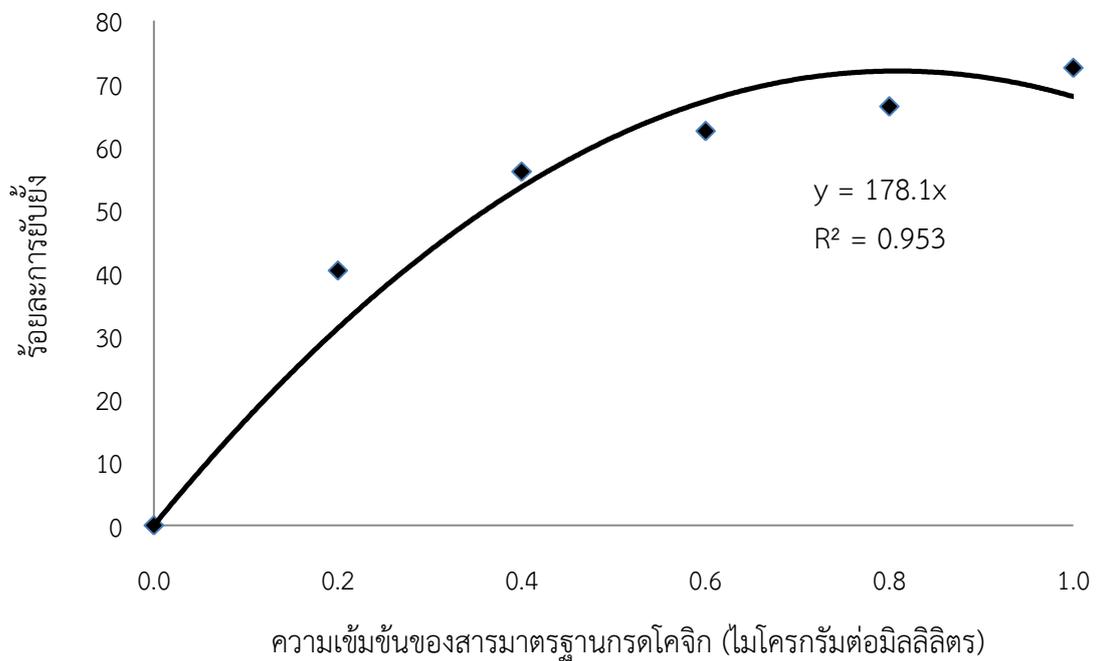
ภาพที่ ข-3 กราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้น 0 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH



ภาพที่ ข-4 กราฟมาตรฐานของกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้น 0 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS



ภาพที่ ข-5 กราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0 – 200 ไมโครโมลต่อลิตรในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP



ภาพที่ ข-6 กราฟมาตรฐานของกรดโคจิกที่ความเข้มข้น 0 – 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนส