รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากขลู่ในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย

Antioxidant capacity and phytochemicals of *Pluchea indica* extracts from different areas of Thailand

โดย

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒ มหาวิทยาลัยบูรพา
(งบบูรณาการวิจัยและนวัตกรรม)

รหัสโครงการ -

สัญญาเลขที่ 37.2/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากขลู่ในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย

Antioxidant capacity and phytochemicals of Pluchea indica extracts from different areas of Thailand

โดย

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

กุมภาพันธ์ พ.ศ. ๒๕๖๓

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยการได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 (งบบูรณาการวิจัยและนวัตกรรม)

ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณนิสิตชั้นปีที่ 4 ของภาควิชาชีวเคมี และนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และสาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ทุกคนที่ร่วมมือร่วมใจกันในการทำวิจัยจนทำให้ได้ผลการวิจัยอันน่าพึงพอใจ ตลอดจนคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้คำแนะนำ และคอยช่วยเหลือในเรื่องอุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในโครงการวิจัยนี้

ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

ผู้วิจัย

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากขลู่ในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) Antioxidant capacity and phytochemicals of *Pluchea indica* extracts from different areas of Thailand

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

บทคัดย่อ

ขลู่ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม สามารถพบได้ตามป่าชายเลน ใบอ่อนและหน่ออ่อนสามารถรับประทานได้ อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับความแตกต่างของพื้นที่ตามแหล่งที่พบกับสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระยังไม่มีการศึกษามากนัก ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบขลู่จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี สมุทรสาคร และอุดรธานี โดยทำการสกัดใบขลู่ในเอทานอลเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ทดสอบค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก และศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ฟลาโวนอยด์รวม รวมทั้งทำการศึกษาเชิงคุณภาพของสารโพลีฟีนอลชนิดต่างๆ โดยวิธีการทำให้เกิดสี และวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) จากผลการทดสอบพบว่า เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ยังพบว่าส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่จังหวัดจันทบุรีมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH สูงที่สุดโดยมีค่า EC_{50} น้อยที่สุดเท่ากับ 0.090±0.009 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิตามินซีและบีเอชทีที่ถูกใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.006±0.004 และ 0.023±0.016 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกพบว่า ส่วนสกัดเอทานอลของขลู่ที่มาจากจังหวัดจันทบุรีถึงแม้จะมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกมากที่สุด (283.582±0.002 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของส่วนสกัดใบขลู่) แต่ก็ไม่แตกต่างจากส่วนสกัดของขลู่ที่มาจากจังหวัดสมุทรสาคร อย่างไรก็ตาม ยังพบว่า ส่วนสกัดเอทานอลของจังหวัดสมุทรสาครมีปริมาณฟีนอลรวมมากที่สุดเท่ากับ 87.840±0.270 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัด อีกทั้งยังพบว่าส่วนสกัดเอทานอลของจังหวัดสมุทรสาครมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดเท่ากับ 317.300±0.001 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซตินต่อกรัมของส่วนสกัด และเมื่อนำทดสอบเชิงคุณภาพทั้งการทดสอบด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ รวมทั้งการทดสอบด้วยวิธี TLC ผลปรากฏว่า ในสารสกัดเอทานอลจากชาใบขลู่จากทั้ง 3 จังหวัดมีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลในกลุ่มฟลาโวน ฟลาโวนอล แซนโทน และแทนนิน อีกทั้งยังมีสารฟลาโวน-โอ-ไกลโคไซด์ ฟลาโวน ซี-ไกลโคไซด์ ฟลาโวนอล โอ-ไกลโคไซด์ นอกจากนี้ยังพบฟลาวาโนน ฟลาโวนอล

และ ฟลาโวนอยด์-อะไกลโคนที่มีขั้วสูง ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่าใบขลู่ในแต่ละพื้นที่ของประเทศไทยอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่แตกต่างกัน และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกันด้วย

Abstract

Khlu (*Pluchea indica* Less.), Asteraceae, is an evergreen shrub that can be found in mangrove forests. Young leaves and shoots are edible and exhibit pharmacological property. However, there is little data about its antioxidant activity in different areas of Thailand. Therefore, this study interested to determine the antioxidant capacity of the *P. indica* leaves from four different areas in Thailand: Chantaburi, Samutsakhon, and Udonthani provinces. In this experiment, ethanolic extracts of *P. indica* leaves were evaluated the antioxidant capacity by DPPH, and ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assays. In addition, the total phenolic (TPC) and total flavonoid contents (TFC) were also investigated. The qualitative study by the color test and TLC analysis was also employed to identify the bioactive compounds in the extracts. For the antioxidant capacity, ethanol extract from Chanthaburi strongly exhibited the DPPH radical scavenging activity with the lowest EC_{50} of 0.089±0.009 mg/ml. Vitamin C and BHT were used as positive controls with the EC_{50} values of 0.006±0.004 and 0.023±0.016 mg/ml, respectively. In addition, ethanol extract from Chantaburi also showed the ability to reduce ferric with the FRAP value of 283.582±0.002 mg ferrous sulfate equivalent/g extract. For TPC and TFC determination, the ethanolic extract of *P. indica* from Samutsakhon had the highest total phenolic and total flavonoid contents of 87.840±0.270 mg gallic acid equivalent (GAE)/g extract and 317.300±0.001 mg quercetin equivalent (QE)/g extract, respectively. Moreover, the flavonoids including flavone, flavonol, xanthone, and tannin were found by the color test. Flavone-O-glycoside, flavone-C-glycoside, flavonol-O-glycoside, and high polarity-aglycone part of flavanone, flavonol, and flavonoids were also identified by TLC analysis. This research demonstrates that the extracts of *P. indica* leave in each area of Thailand are rich in antioxidants and have different antioxidative effects as well. Notably, the extracts from Chantaburi seemed to be the most antioxidant capacity when compared to the other areas.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	7
บทที่ 3 ผลการวิจัย	14
บทที่ 4 อภิปราย และสรุปผลการทดลอง	27
รายงานสรุปการเงิน	31
บรรณานุกรม	32
ประวัตินักวิจัย	36

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 3-1 ลักษณะของผงชาใบขลู่ ก) ผงชาใบขลู่จากจังหวัดสมุทรสาคร ข) ผงชาขลู่จากจังหวัดอุดรธานี ค) ผงชาใบขลู่จังหวัดจันทบุรี 15

ภาพที่ 3-2 ลักษณะของสารสกัดจากชาขลู่ที่ได้มาจากแต่ละพื้นที่ (ก)-(ค) ส่วนสกัดเอทานอลของชาขลู่จากจังหวัดสมุทรสาคร อุดรธานี และจันทบุรี ตามลำดับ (ง)-(ฉ) ส่วนสกัดน้ำของชาขลู่จากจังหวัดสมุทรสาคร อุดรธานี และ จันทบุรี ตามลำดับ 15

ภาพที่ 3-3 ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารละลายวิตามินซี 17

ภาพที่ 3-4 % DPPH scavenging ของส่วนสกัดเอทานอลจากชาใบขลู่จังหวัดสมุทรสาคร ชาใบขลู่จากจังหวัดอุดรธานี และชาใบขลู่จากจังหวัดจันทบุรี 17

ภาพที่ 3-5 กราฟมาตรฐานของสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟตในการหาความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก 18

ภาพที่ 3-6 ค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่จาก (1) จังหวัดจันทบุรี (2) จังหวัดสมุทรสาคร และ (3) จังหวัดอุดรธานี 19

ภาพที่ 3-7 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม 20

ภาพที่ 3-8 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดเอทานอลของชาใบขลู่จาก (1) จังหวัดจันทบุรี (2) จังหวัดสมุทรสาคร และ (3) จังหวัดอุดรธานี 21

ภาพที่ 3-9 กราฟมาตรฐานของสารละลายเควอร์เซตินในการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม 22

ภาพที่ 3-10 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่จาก (1) จังหวัดจันทบุรี (2) จังหวัดสมุทรสาคร และ (3) จังหวัดอุดรธานี 22

ภาพที่ 3-11 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่จาก (1) จังหวัดจันทบุรี (2) จังหวัดสมุทรสาคร และ (3) จังหวัดอุดรธานี 22

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 2-1	ชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้แยกสารโพลีฟีนอล	11
ตารางที่ 2-2	วิธีการตรวจวัดสารฟีนอลชนิดต่างๆ ในเชิงคุณภาพ ด้วยวิธีทำให้เกิดสี	12
ตารางที่ 3-1	ค่าน้ำหนักและ %Yield ของส่วนสกัดน้ำและเอทานอลของใบขลู่	15
ตารางที่ 3-2	ประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH ของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่	16
ตารางที่ 3-3	ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่	19
ตารางที่ 3-4	ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่	20
ตารางที่ 3-5	ปริมาณทีบาร์ของสารสกัดเอทานอลของข้าวแต่ละชนิด	22
ตารางที่ 3-6	การตรวจวัดเชิงคุณภาพของสารโพลีฟีนอลต่างๆ จากส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่จากจังหวัดจันทบุรี สมุทรสาคร และอุดรธานี	23
ตารางที่ 3-7	การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC	25

บทที่ 1

บทนำ

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

ขลู่ (*Pluchea indica* Less) เป็นพืชในวงศ์ Compositae (Asteraceae) เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ขึ้นอยู่รวมกันเป็นกอ มีกิ่งก้านสาขามาก สูง 1-1.5 เมตร มักชอบขึ้นริมน้ำตอนบนป่าชายเลน เติบโตได้รวดเร็วในทุกฤดูกาล แตกกิ่งก้านใหม่ได้มากขึ้นเมื่อมีการหักกิ่งก้านไปใช้ มีประโยชน์ทางด้านสมุนไพรในทุกส่วนของต้น โดยเฉพาะใบมีฤทธิ์แก้อักเสบ แก้แผลอักเสบ แก้โรคริดสีดวงทวาร แก้โรคบิด ขับเหงื่อ แก้เบาหวาน (Yuniarti, 2008)

ใบขลู่ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีชนิดต่างๆ ได้แก่ สเตอรอล (sterols) เทอร์ปีน (terpenes) และลิกแนนไกลโคไซด์ (lignan glycosides) (Biswas et al., 2005; Uchiyama et al., 1989; Uchiyama et al., 1991; Mukhopadhyay et al., 1983) และจากรายงานของ Andarwulan และคณะ (2010) พบว่าในขลู่มีฟลาโวนอยด์อยู่เป็นจำนวนมากซึ่งมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ Biswas และคณะ (2006) รายงานผลของสารบริสุทธิ์ R/J/3 ที่แยกได้จากส่วนสกัดเมทานอลของรากขลู่ พบว่าสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากส่วนสกัดเมทานอลของรากขลู่ คือ β-sitosterol และ stigmasterol สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A2 ในพิษงูแมวเซา สาร β-sitosterol และ stigmasterol ยังแสดงฤทธิ์ต้านพิษงูโดยยับยั้งอัตราการตายจากพิษงูเห่า ยับยั้งพิษต่อระบบประสาท และกล้ามเนื้อหัวใจ รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A2 ในพิษงูเห่า Ohtsuki และคณะ (2008) สกัดสาร quinic acid ester และ quercetin จากใบของต้นขลู่ และพบว่าสารทั้งสองมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ในขณะที่สาร quinic acid ester ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ matrix metalloproteinase-2 และ matrix metalloproteinase-9

มีการค้นพบสารพฤกษเคมีในขลู่ เช่น สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) ที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน ลดความเสี่ยงจากอนุมูลอิสระที่เข้าไปทำลายเซลล์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดต่างๆ มีความสำคัญในการยับยั้งการเกิดมะเร็ง และมีคุณสมบัติต้านหรือยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของสารก่อกลายพันธุ์ได้ในปริมาณที่เหมาะสม Traithip (2548) ศึกษาสารพฤกษเคมีของส่วนสกัดเอทานอลจากใบขลู่ และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay พบว่าสารสกัดของใบขลู่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีโดยมีค่า EC50 = 6.92 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Sen และคณะ (2002) นำส่วนสกัดเมทานอลของรากขลู่มาทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) พบว่า สารสกัดจากขลู่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซี อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีค่า IC_{50} = 10.77, 165.62 และ 61.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ จากผลการวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าขลู่จากจังหวัดจันทบุรีมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างดี ปริมาณฟีนอลรวมของชาขลู่หลังจากเก็บไว้นาน 3 เดือนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเป็น 992.251±0.005 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมของส่วนสกัด และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน (482.76±0.001 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซติน/กรัมของส่วนสกัด) สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันได้โดยค่าเปอร์ออกไซด์ (PV) ณ ตอนเริ่มทำการทดลองเพิ่มขึ้น แต่หลังจากเก็บไว้นาน 3 เดือน ค่า PV กลับลดลงอย่างเห็นได้ชัดที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดใบชาขลู่ที่ใช้ในการทดลอง ยิ่งไปกว่านั้น ค่าคอนจูเกตไดอีน (CD) และ TBARS ลดลงเป็นอย่างมากเมื่อมีสารสกัดจากใบชาขลู่ โดยความสามารถนี้เพิ่มขึ้นตามปริมาณของสารสกัด (Petchlert et al., 2016) ดังนั้นจึงน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาเพิ่มเติมว่า ในพื้นที่อื่นๆ ของประเทศไทย เช่นทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หรือทางแถบจังหวัดสมุทรสงครามจะมีความแตกต่างทั้งในแง่ของสารออกฤทธิ์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไปจากที่จังหวัดจันทบุรีหรือไม่ประการใด

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เป็นสิ่งที่สำคัญ หากแต่การศึกษาหาสิ่งที่จะนำมารักษาหรือลดความเสี่ยงของการเกิดโรคโดยเฉพาะสารที่ได้รับจากธรรมชาตินั้นน่าจะยิ่งมีความสำคัญมากกว่าภายใต้ภาวะของอุบัติการณ์ของโรคร้ายต่างๆ ที่มีอยู่ในปัจจุบันโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเรื้อรังอันเกิดจากความไม่สมดุลของสารต่างๆ ภายในร่างกาย รูปแบบการดำรงชีวิตที่เปลี่ยนไป รูปแบบการบริโภคอาหารที่ล้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคเหล่านี้แทบทั้งสิ้น

จากการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาพบว่า สารอาหารที่ได้รับความสนใจมากและเป็นที่ยอมรับว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็ง คือ ไขมัน ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็ง ไขมันไม่เพียงแต่จะทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญแก่ร่างกายเท่านั้น แต่ยังรวมอยู่เป็นองค์ประกอบในเมมเบรน และทำหน้าที่ควบคุมของเหลวในเมมเบรน ลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเป็นกระบวนการที่กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวและฟอสโฟลิพิดเกิดการเสื่อมสภาพหรือเสียสภาพจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกไซด์ขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ หรือ ลิพิดใน

เลือด และในของเหลวในร่างกายอื่นๆ อนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูลสามารถทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกไซด์เป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา ดังนั้นความเสียหายจะไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะกับเยื่อหุ้มเซลล์เท่านั้น แต่จะขยายวงกว้างไปยังองค์ประกอบอื่นๆ ภายในเซลล์ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้อาจทำให้เกิดการตายของเซลล์ การอักเสบอันจะก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคความเสื่อมต่างๆ ตามมา เช่น โรคหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis) ความดันโลหิตสูง เบาหวาน มะเร็ง อัลไซเมอร์ ต้อกระจก เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาหาสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรที่จะมีผลต่อการลดความเสี่ยงอันอาจจะเกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ เนื่องจากกระบวนการที่จะนำมาอธิบายให้ชัดเจนนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด มีเพียงสมมติฐานที่ตั้งขึ้นมาเป็นแนวทางเพื่อรอการพิสูจน์ต่อไป

ขลู่ *(Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Compositae (Asteraceae) ลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็กขึ้นอยู่รวมกันเป็นกอ มีกิ่งก้านสาขามาก สูง 1-1.5 เมตร มักชอบขึ้นริมน้ำตอนบนป่าชายเลน มีมากในจังหวัดจันทบุรี เติบโตได้รวดเร็วในทุกฤดูกาล แตกกิ่งก้านใหม่ได้มากขึ้นเมื่อมีการหักกิ่งก้านไปใช้ มีประโยชน์ทางด้วยสมุนไพรในทุกส่วนของต้น โดยเฉพาะใบมีฤทธิ์แก้อักเสบ แก้แผลอักเสบ แก้โรคริดสีดวงทวาร แก้โรคบิด ขับเหงื่อ แก้เบาหวาน จากการศึกษาเก็บข้อมูลเบื้องต้นจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชนที่เกิดการรวมตัวจากเวทีประชาพิจารณ์โครงการส่งเสริมจัดทำแผนการจัดการทรัพยากรชีวภาพระดับสถาบันและท้องถิ่น เทศบาลตำบลบ่อ อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี ได้พบว่าชาวบ้านรวมตัวกันทำผลิตภัณฑ์สบู่เหลว ผงสปาขัดผิว ครีมขัดผิวหน้าจากใบขลู่ รวมทั้งมีการทำชาใบขลู่ออกจำหน่าย แต่มีปัญหาในเรื่องการขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์มารองรับการนำไปใช้ จึงทำให้คณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาผลของส่วนสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ที่ได้จากใบขลู่ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้สมุนไพรพื้นบ้านจากขลู่ และเพื่อลดการนำเข้ายาและอาหารเสริมสุขภาพจากต่างประเทศ นอกจากนี้อาจได้สารที่จะนำพัฒนาเป็นยาต้นแบบรักษาโรคต่างๆ ต่อไป นอกจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว ในการวิจัยนี้ผู้วิจัยยังสนใจที่จะทำการศึกษาสารพฤกษเคมีจากสารสกัดขลู่ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต่างๆ ว่าสอดคล้องกันหรือไม่ และจากการที่ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นซึ่งมีความหลากหลายของพืชสมุนไพรมากที่สุดแห่งหนึ่งของโลก โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทยที่เป็นเขตป่าดิบชื้นและป่าชายเลนที่มีความหลากหลายของระบบนิเวศน์และพันธุ์ไม้ต่างๆ อย่างอุดมสมบูรณ์ เป็นแหล่งสำคัญของสมุนไพรหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีหมอยาพื้นบ้านและองค์ความรู้ที่ใช้สมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆ จนถึงปัจจุบัน ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของขลู่ในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยทั้งในภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตกของประเทศไทยด้วย

เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์และการกระจายตัวของสารออกฤทธิ์ในเชิงพื้นที่เพื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาเป็นพื้นฐานที่จะต่อยอดการศึกษาในภาพรวมของประเทศต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การวิจัยรายประเด็นด้านการพัฒนาสมุนไพรที่มีเป้าประสงค์ของการวิจัย คือ มุ่งให้การวิจัยและพัฒนาสมุนไพรของไทยมีการดำเนินการอย่างเป็นระบบ มีคุณภาพ ประสิทธิภาพ และประสิทธิผล รวมทั้งมีความสัมพันธ์กับสภาพแวดล้อมทั้งด้านเศรษฐกิจ สังคม การเมือง และวัฒนธรรม โดยนำไปสู่การบรรลุเป้าประสงค์ที่ต้องการให้สมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรได้รับการพัฒนาสู่การเป็นผลิตภัณฑ์แห่งชาติ สมุนไพรไทยและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีศักยภาพ โดยเฉพาะกลุ่มที่มีผลทางโภชนาการ และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้รับการพัฒนาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร พัฒนาเป็นเครื่องสำอางหรือส่วนประกอบของเครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์สปา

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระและสารพฤกษเคมีจากชาใบขลู่จากทั้งสามพื้นที่คือ จังหวัดสมุทรสาคร อุดรธานี และจันทบุรี เพื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาศึกษาในภาพรวมของประเทศต่อไปอันจะทำให้การวิจัยและพัฒนาสมุนไพรชนิดนี้ของไทยมีการดำเนินการอย่างเป็นระบบ มีคุณภาพ ประสิทธิภาพ และประสิทธิผลมากขึ้น

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

นำใบขลู่แห้งที่ซื้อจากสามพื้นที่ในช่วงเดือนตุลาคม คือ ขลู่จากจังหวัดสมุทรสาคร อุดรธานี และจันทบุรี มาสกัดด้วยเอทานอล แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยดูความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ และทดสอบความสามารถในการคีเลทโลหะ รวมทั้งทำการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม และฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัด นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการกระจายตัวของสารพฤกษเคมีที่เป็นสารออกฤทธิ์ของขลู่ในพื้นที่ทั้งสามแห่งด้วย

1.5 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป ทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

ขลู่ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Compositae เป็นสมุนไพรที่ใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐานของประเทศไทย มีสรรพคุณทางยาหลายด้าน เช่น รักษาผดผื่นคัน ลดระดับน้ำตาลในเลือด ความดัน และโรคหัวใจ รักษาอาการ ขัดเบา ปัสสาวะพิการ ขับปัสสาวะ ริดสีดวงทวาร แก้กระษัย ขับนิ่ว ขับปัสสาวะ ใช้เป็นยา

อายุวัฒนะ แก้ไข้ขับเหงื่อ และแก้เบาหวาน รักษาอาการเส้นตึง หรือนำมาทำเป็นขี้ผึ้งรักษาแผลเรื้อรัง ใบสดตำพอกบริเวณที่เป็นแผล แก้อักเสบ แก้ริดสีดวงจมูก ขับนิ่วในทางเดินปัสสาวะ ใบและราก แก้โรคบิด ขับเหงื่อ แก้แผลอักเสบ รากสดตำพอกบริเวณแผล (มาโนช วามานนท์, เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2540) ในมาเลเซียหมอยาสมุนไพรเชื่อว่าใบขลู่ใช้รักษาโรคบิด ไขข้ออักเสบ ระงับกลิ่นปากและลมหายใจ ระงับกลิ่นตัว แผลพุพองและแผลเปื่อย ส่วนของรากใช้รักษาอาการไข้ อาหารไม่ย่อย และปวดศีรษะ (Ong, 2004) ปัจจุบันมีการนำขลู่มาทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ เช่น ชาขลู่ ผงขัดผิวเพื่อใช้ทำสปาผิว สบู่ ยาสระผม กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในท้องถิ่นที่มีพื้นที่ป่าชายเลน ซึ่งเป็นพื้นที่ที่เหมาะสำหรับการเจริญของต้นขลู่ ถึงแม้จะเป็นที่ทราบกันดีในกลุ่มหมอยาและแพทย์แผนไทยว่าขลู่มีสรรพคุณต่างๆ มากมาย แต่หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่มีรายงานส่วนใหญ่มักจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติในการลดน้ำตาล ลดความดัน และการขับปัสสาวะ และรายงานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ว่าน้ำยาชงขลู่ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักร (มาโนช วามานนท์, เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2540) แต่ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันยังมีค่อนข้างจำกัด ซึ่งทำให้เกิดข้อกังขาได้ว่าการรับประทานผลิตภัณฑ์จากขลู่เป็นประจำเพื่อใช้เป็นยาอายุวัฒนะจะมีผลต่อกระบวนการเหล่านี้หรือไม่ และในกรณีของผู้ป่วยโรคมะเร็งหรือโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ ผลของขลู่จะมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดกระบวนการดังกล่าวหรือไม่ นอกจากนี้ยังมีคำถามต่อไปว่า ขลู่ที่อยู่ในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ต่างกันหรือไม่ เพียงใด ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะทดสอบสมมติฐานดังกล่าว ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำมาใช้เพื่อเป็นหลักฐานสนับสนุนถึงความปลอดภัยและเห็นคุณค่าของการใช้ขลู่เป็นยาสมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐานและส่งเสริมคุณค่าของผลิตภัณฑ์เพื่อเป็นสินค้าเพื่อสุขภาพในลำดับต่อไป อีกทั้งยังสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การวิจัยรายประเด็นด้านการพัฒนาสมุนไพรที่กำหนดวิสัยทัศน์การวิจัยว่า วิจัยและพัฒนา สมุนไพร ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร และผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติของไทยอย่างเป็นระบบ โดยใช้ภูมิปัญญาและการเรียนรู้เพื่อให้ได้ผลติภัณฑ์ที่มีคุณภาพตามมาตรฐาน ความสัมพันธ์และสอดคล้องกับสภาพแวดล้อม และมีศักยภาพ สามารถการแข่งขันกับต่างประเทศได้

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากใบขลู่ จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนคุณค่าทางยาของใบขลู่ เพื่อส่งเสริมให้มีการเพาะปลูกและอนุรักษ์ต้นขลู่มากขึ้น โดยทำการเผยแพร่ผ่านสื่อต่างๆ เช่น รายการวิทยุวิทยาศาสตร์เพื่อประชาชน และวารสารต่างๆ

ขลู่เป็นพืชที่ศักยภาพต่อการพัฒนาในเชิงพาณิชย์ได้ เพราะมีการเจริญเติบโตเร็วเมื่อมีการเก็บเกี่ยว ขึ้นได้ทั่วไปในเขตป่าชายเลนและใกล้เคียง ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ได้จะเป็นสิ่งยืนยันถึงประสิทธิภาพของใบขลู่ในการนำมาใช้เป็นชา หรือเป็นสมุนไพรในเครื่องสำอาง ส่งเสริมการขายให้กลุ่มวิสาหกิจชุมชน ทำให้ผู้ซื้อมีความมั่นใจในผลิตภัณฑ์มากขึ้น และผู้ผลิตสามารถขยายตลาดออกไปสู่วงกว้างมากขึ้น รวมทั้งการนำความรู้นี้ไปประยุกต์ใช้ทำยา เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอย่างอื่นได้อีก

นอกจากนี้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากขลู่ที่แยกได้อาจเป็นสารชนิดใหม่และมีประสิทธิภาพดีกว่าสารแอนติออกซิแดนท์เดิมในอุตสาหกรรมอาหารและยา หลังจากจดสิทธิบัตรแล้วสามารถให้ข้อมูลแก่ภาคธุรกิจได้แก่ องค์การเภสัชกรรม หรือ บริษัทยา เป็นต้น เพื่อนำไปผลิตเป็นสูตรยาในเชิงพาณิชย์ต่อไป

ประชากรทั่วไปของประเทศไทยโดยเฉพาะผู้สูงอายุที่มีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมและโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระกันมาก จะสามารถใช้ยาที่มีคุณภาพมากกว่าเดิม และผลข้างเคียงน้อยลง นอกจากนี้ในโครงการวิจัยนี้เมื่อแล้วเสร็จ คาดว่าจะสามารถผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ภายใต้การศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จำนวนไม่น้อยกว่า 1 คน และเป็นโครงงานวิจัยย่อยแก่นิสิตระดับปริญญาตรีประมาณ 1-2 โครงงาน

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ได้แก่ สถาบันการศึกษาวิจัยทั้งในด้านชีวเคมี เภสัชเคมี เช่น คณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ในการนำผลการศึกษาไปศึกษาต่อยอด และองค์การเภสัชกรรม หรือหน่วยงานบริษัทอุตสาหกรรมยา ในการนำไปพัฒนาเป็นยา เครื่องสำอาง functional food และยังทำให้ประชาชนมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รองรับการใช้สมุนไพรจากใบขลู่

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากใบขลู่จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนคุณค่าทางยาของใบขลู่ หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ได้จากใบขลู่ และนำข้อมูลที่ได้ไปจดแจ้งในรูปสิทธิบัตรได้ทำให้องค์ความรู้นี้เป็นของประเทศไทย และยังสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวารสารวิชาการเป็นการสร้างชื่อเสียงให้แก่ประเทศไทย นอกจากนี้สามารถใช้ข้อมูลที่ได้รับจากงานวิจัยไปเป็นพื้นฐานและองค์ความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอด และผลิตเป็นยาชนิดใหม่ได้ สอดคล้องกับยุทธศาสตร์การวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพรที่กำหนดวิสัยทัศน์การวิจัยว่า วิจัยและพัฒนาสมุนไพร ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร และผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติของไทยอย่างเป็นระบบ โดยใช้ภูมิปัญญาและการเรียนรู้เพื่อให้ได้ผลติภัณฑ์ที่มีคุณภาพตามมาตรฐาน ความสัมพันธ์และสอดคล้องกับสภาพแวดล้อม และมีศักยภาพ สามารถการแข่งขันกับต่างประเทศได้

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 ชุดเครื่องแก้วและเครื่องมือมาตรฐาน

1. Air oven incubator (Bindea, Germany)
2. ปิเปตอัตโนมัติขนาด 0.5-10, 10-100, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร (Labnet, USA)
3. Blender (Electrolux, China)
4. Filter paper number 1 (Whatman, UK)
5. Flask evaporating pear shape (Schott, Germany)
6. Freeze-dryer (GAST, USA)
7. Microplate reader (Versa max, USA)
8. Rotary evaporator (EYELA, Japan)
9. Separating funnel (Witeg, Germany)
10. Vacuum pump (GAST Mfg., USA)
11. 96 well microplate (Costar, USA)
12. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น 713 pH Meter (Metrohm, ประเทศสาธารณรัฐฝรั่งเศส)
13. หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
14. หลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
15. โหลแช่สาร
16. TLC silica gel
17. TLC Chamber Equipment

2.1.2 สารเคมี

1. Ascorbic acid (APS, Australia)
2. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Germany)

3. Distilled water

4. Ethanol (Merck, Germany)

5. Hexane (Honey Well B&J, USA)

6. Methanol (Honey Well B&J, USA)

7. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, Germany)

8. Acetic acid (Carlo erba, Germany)

9. Ferrous sulphate (Lobachemie, India)

10. Folin-Ciocalteu's reagent (Carlo erba, Germany)

11. Hydrochloric acid (Merck, Germany)

12. Silica gel size 0.040-0.063 mm. (Merck, Germany)

13. Sodium carbonate (Carlo erba, Germany)

14. 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ) (Sigma, Germany)

15. TLC silica gel 60 F_{254} aluminium sheet 20×20 cm. (Merck, Germany)

16. Isooctane (MERCK, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

17. Methyl alcohol absolute (Burdick and Jackson, Korea)

18. Potassium chloride (Carlo erba, Germany)

19. Quercetin (Sigma, Germany)

20. Sodium acetate (Carlo erba, Germany)

21. Sodium carbonate (Carlo erba, Germany)

22. Sodium nitrite (Univar, Austria)

23. Trichloroacetic acid (Panreac, EU)

2.2 การเตรียมพืชตัวอย่างและการสกัด

สั่งซื้อพืชตัวอย่างมาจากจังหวัดสมุทรสาคร อุดรธานี และจันทบุรีในช่วงเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน พ.ศ. 2561 โดยเลือกใช้ใบขนาดที่ใช้ในทางยา นำใบขลู่มาทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 50oC และทำการบดให้ละเอียด จากนั้นนำใบขลู่แห้งจากทั้ง 3 แหล่งมาสกัดด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นนำไปกรองและระเหยด้วย rotary evaporator แล้วนำไป freeze dry เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20^{0}C ในที่มืด จนกว่าจะนำมาทำการวิเคราะห์ในขั้นตอน

ต่อไป แบ่งส่วนสกัดส่วนหนึ่งไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ อีกส่วนหนึ่งนำไปศึกษาองค์ประกอบของสารพฤกษเคมีที่มีอยู่ในส่วนสกัดใบขลู่

2.3 การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH

ดัดแปลงจากวิธีของ Srisook et al. (2012) เตรียมสารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ในเมทานอล และละลายส่วนสกัดของใบขลู่ที่ความเข้มข้น 0.0625-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตส่วนสกัดของพืชปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้วิตามินซี (ascorbic acid) เป็นตัวควบคุมแบบบวกทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH จากสมการ (1)

เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH = $[(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / AC_{(0)}] \times 100$ สมการ (1)

โดยที่ $A_{C(0)}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมที่ 0 นาที

ส่วน $A_{A(t)}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างหลังจากบ่มครบ 30 นาที

ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ แสดงผลเป็นค่า EC_{50}

2.4 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์

ดัดแปลงจากวิธีของ Thepmongkon et al. (2013) โดยทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) โดยละลายกรดแกลลิกในเมทานอล เจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.00625 0.0125 0.025 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบโดยเริ่มจากการปิเปตกรดแกลลิก หรือสารสกัดพืชปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์, pH 6.6) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ 1% โพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสด้วยตู้อบควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 30 นาทีแล้วเติม 10% กรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และเก็บสารละลายส่วนบนปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1% เฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืน

แสงแบบไมโครเพลท คำนวณความสามารถในการรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ แสดงความสามารถในการรีดิวซ์ในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัดพืช

2.5 การหาปริมาณฟีนอลรวม

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Thepmongkon et al. (2013) เริ่มจากการเตรียมกรดแกลลิก (gallic acid) ละลายในเมทานอล แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.0625 0.125 0.25 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบโดยเริ่มจากปิเปตน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) หรือส่วนสกัดตัวอย่าง ปริมาณ 0.125 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 7% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายในไมโครเพลท ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัด

2.6 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

ดัดแปลงจาก Bozin et al. (2008) โดยการสร้างกราฟมาตรฐานของเควอร์เซติน โดยละลายเควอร์เซตินในเมทานอล จากนั้นเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.00625 0.0125 0.025 0.050 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบโดยเริ่มจากปิเปตสารละลายมาตรฐานเควอร์เซตินหรือสารสกัดพืช ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม 5% โซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ปริมาตร 0.15 มิลิลิตร จากนั้นเติม 10% อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$) ปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร แสดงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในรูปมิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซตินต่อกรัมของส่วนสกัด

2.7 การตรวจวัดเชิงคุณภาพของสารโพลีฟีนอลชนิดต่างๆ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

การทำ TLC เริ่มด้วยการใช้แผ่น TLC Silica gel 60 F 254 เป็นวัฏภาคนิ่ง จากนั้นเตรียมสารสกัดขลู่เพื่อนำไปแต้ม (spotting) ลงบนแผ่นTLC ให้ห่างจากปลายด้านล่างขึ้นมาประมาณ 0.5-1 เซนติเมตรนำแผ่น TLC ไป

จุ่มลงในขวดแก้วที่มีฝาปิดมิดชิดซึ่งมีตัวทำละลายอยู่ ชนิดของส่วนผสมตัวทำละลายที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แสดงดังตารางที่ 2-1 ตรวจสอบผลโดยการมองด้วยตาเปล่า และนำไปส่องด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร

ตารางที่ 2-1 ชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้แยกสารโพลีฟีนอล

ชนิดของฟลาโวนอยด์	**ชนิดของส่วนผสมตัวทำละลาย**	**อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้**
ฟลาโวนอยด์	คลอโรฟอร์ม:เอทิลอะซิเตท	3:2
ฟลาโวนที่มีหมู่เมทิลไดไฮโดรฟลาโวนอยด์	คลอโรฟอร์ม:เมธานอล	3:1
ฟลาโวนอล โอ-ไกลโคไซด์	คลอโรฟอร์ม:เอทิลอะซิเตท:อะซิโตน	5:1:4
ฟลาวาโนน โอ-ไกลโคไซด์	คลอโรฟอร์ม:กรดอะซิติก คลอโรฟอร์ม:กรดอะซิติก:เมทานอล	100:4 90:5:5

ผลการทดสอบ

1. เห็นสีได้ด้วยตาเปล่า แสดงว่า สารตัวอย่างน่าจะมีส่วนประกอบของแอนโธไซยานิน ชาลโคล หรือออโรน
2. เมื่อนำไปอังกับแอมโมเนีย ให้รายงานผล ดังนี้

    สีเหลือง แสดงว่า สารตัวอย่างประกอบด้วยฟลาโวน

    สีฟ้าเทา แสดงว่า สารตัวอย่างประกอบด้วยแอนโธไซยานิน

    สีส้มแดง แสดงว่า สารตัวอย่างประกอบด้วยชาลโคล และออโรน

3. เมื่อนำไปส่องด้วยแสง UV แล้วพบการเรืองแสงเกิดขึ้น แสดงว่า สารตัวอย่างประกอบด้วยฟลาโวนอลหรือชาลโคล ในขณะที่สารอื่นๆ จะปรากฏเป็นจุดดำบนแผ่นเรืองแสง
4. อังกับแอมโมเนียและส่องด้วยแสง UV ให้รายงานผลดังนี้

    เรืองแสงสีเหลือง แสดงว่า สารตัวอย่างประกอบด้วยฟลาโวนอล ไกลโคไซด์ และฟลาโวน

    เรืองแสงสีเหลืองอ่อน แสดงว่า สารตัวอย่างประกอบด้วยฟลาวาโนน

    เรืองแสงสีฟ้าอ่อน แสดงว่า สารตัวอย่างประกอบด้วยคะเทชิน

2.8 การตรวจวัดเชิงคุณภาพของสารโพลีฟีนอลชนิดต่างๆ โดยวิธีทำให้เกิดสี (colorimetric assay)

เป็นวิธีการนำสารเคมีต่างๆ มาทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง และวัดสีที่เกิดขึ้นหลังจากการเกิดปฏิกิริยานั้น ซึ่งทำได้หลายวิธี ดังแสดงในตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 วิธีการตรวจวัดสารฟีนอลชนิดต่างๆ ในเชิงคุณภาพ ด้วยวิธีทำให้เกิดสี

วิธี	วิธีการ	ผลที่เกิดขึ้น	การแปลผล
การทดสอบด้วยน้ำยา $FeCl_3$	นำสารตัวอย่างมา 2 ml เติม 1% $FeCl_3$ ลงไป 2-3 หยด	ตะกอนสีน้ำเงิน น้ำเงินคล้ำ น้ำเงิน-ม่วง เขียว เขียว-น้ำตาล สีน้ำเงิน	โพลีฟีนอลทุกชนิด กรดแกลลิก
การทดสอบปฏิกิริยากับไซยานิดินส์ หรือ Shinoda test	นำสารตัวอย่างมา 1 ml เติมด้วยผงแมกนีเซียม 0.1 กรัม หรือวงแหวนแมกนีเซียม 3-4 วง หยดกรด HCl เข้มข้น 10 หยด สังเกตสีส้มแดงที่เกิดขึ้น เติมน้ำ 1 ml และ octyl alcohol 1 ml เขย่าและตั้งทิ้งให้แยกชั้น สังเกตสี	สีแดง สีส้ม	ฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่ γ-เบนโซไพโรน เช่น ฟลาโวนอล ฟลาวาโนน ฟลาวาโนนอล แซนโทน ฟลาโวน ชาลโคล ออโรน
การทดสอบของพิว (Pew test)	นำสารตัวอย่างมา 1 ml เติมผงสังกะสี 0.5 กรัม และ 2N กรด HCl เข้มข้น 2 หยด เขย่าให้เข้ากันประมาณ 1 นาที แล้วเติมกรด HCl เข้มข้น 10 หยด	สีแดงเข้มภายใน 2-5 นาที สีจางๆ	ฟลาวาโนนอล ฟลาโวนอล-3-ไกลโคไซด์ ฟลาวาโนน ฟลาโวนอล
การทดสอบปฏิกิริยากับด่าง	นำสารตัวอย่างมา 1 ml เติมสารละลายแอมโมเนีย ความเข้มข้น 9.5-10.5% ทีละหยด สังเกตสี	สีเหลือง จากไม่มีสีกลายเป็นสีส้มแดง สีแดงม่วง สีส้มน้ำตาล	ฟลาโวน ฟลาโวนอล แซนโทน ฟลาวาโนน ชาลโคล ออโรน ฟลาวาโนนอล
การทดสอบความเป็นกรด-ด่าง	นำสารตัวอย่างมา 1 ml เติม 2 N HCl 1 หยด ค่อยๆ เติม 9.5-10.5% สารละลายแอมโมเนีย ทีละหยด	เมื่อเติมกรด HCl จะได้สีแดง เมื่อเติมด่างแอมโมเนียจะเปลี่ยนจากสีแดงมาเป็นสีน้ำเงิน	แอนโธไซยานิน
การทดสอบลิวโคแอนโธไซยานิน	นำสารตัวอย่างมา 1 ml เติม 2N HCl 2 ml ต้มในอ่างอังไอน้ำ	สีเหลืองน้ำตาล ให้สีแดงของแอนโธไซยานิดินส์ซึ่งละลายได้ดีใน amyl alcohol	คะเทชิน ลิวโคแอนโธไซยานิน
การทดสอบด้วยเจลาทิน	นำสารตัวอย่างมา 1 ml เติมน้ำยาเจลาตินเข้มข้น 0.5-1% ถ้าปรับค่า pH ประมาณ 4.0 หรือเติม NaCl เล็กน้อยจะเห็นผลชัดเจนขึ้น	ตะกอน [สารละลายควบคุม คือ เติม NaCl แล้วไม่มีตะกอนเกิดขึ้น]	สารละลายแทนนินทุกชนิด [กรดแกลลิก และซูโดแทนนิน ก็สามารถตกตะกอนได้)

3. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง คำนวณค่า EC_{50} ของการกำจัดอนุมูล DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์ และการคีเลทโลหะ รวมทั้งคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวม ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของชุดข้อมูลด้วยวิธี Student t-Test ($P<0.05$) ด้วยโปรแกรม Minitab เวอร์ชัน 8.0

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การเตรียมสารสกัดชาใบขลู่

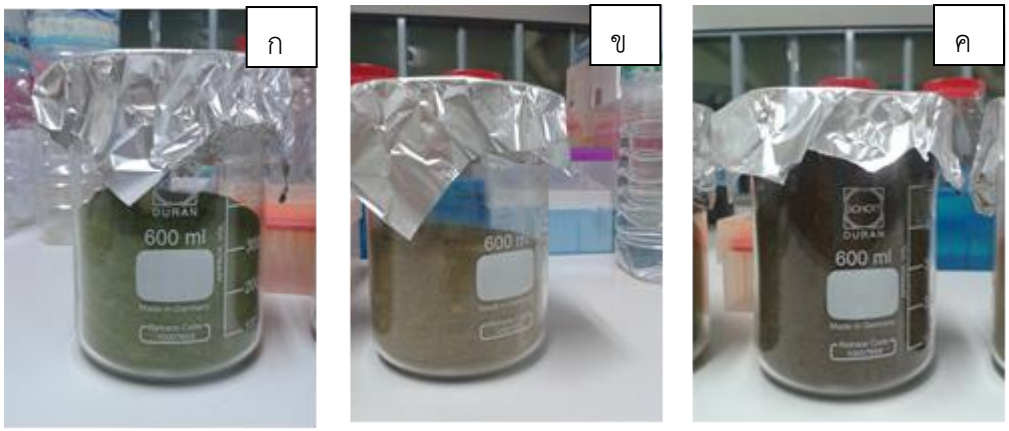
การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างใบขลู่อบแห้ง โดยสั่งซื้อตัวอย่างมาทั้งหมด 4 จังหวัด ได้แก่ จันทบุรี สมุทรสาคร และอุดรธานี เนื่องจากเป็นจังหวัดที่มีสภาพพื้นที่ติดทะเล และมีสภาพพื้นดินเป็นดินเค็มซึ่งเหมาะกับการเติบโตของต้นขลู่ที่มีคุณภาพ อีกทั้งยังมีการจำหน่ายในประเทศไทยในรูปของชาสมุนไพร โดยใช้ตัวอย่างในแต่ละจังหวัด จังหวัดละ 2 กิโลกรัม จากนั้นนำไปอบแห้งที่ตู้อบลมร้อนเพื่อทำให้ตัวอย่างแห้ง ก่อนนำใบขลู่แต่ละจังหวัดมาทำการปั่นด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้เพื่อให้สะดวกต่อการเตรียมเป็นส่วนสกัดและทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทำการสกัดใบขลู่แต่ละจังหวัดที่ได้จากการบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ จากนั้นแบ่งมาห่อด้วยผ้าขาวบางและนำไปแช่ในเอทานอลในอัตราส่วน 1:10 ซึ่งใช้ใบขลู่ 200 กรัม ต่อปริมาณเอทานอล 2000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน ทำซ้ำ 3 ครั้ง กรองด้วยผ้าขาวบางแยกส่วน crude และส่วนที่เป็นของเหลวออกจากกัน นำส่วนที่เป็นของเหลวไประเหยเอทานอลด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ ก่อนนำไป freeze-dry เป็นเวลา 2 วัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ℃ จนกว่าจะทำการวิเคราะห์แล้วนำส่วน crude ไปอบแห้งและชั่งน้ำหนักเพื่อวิเคราะห์หา %yield

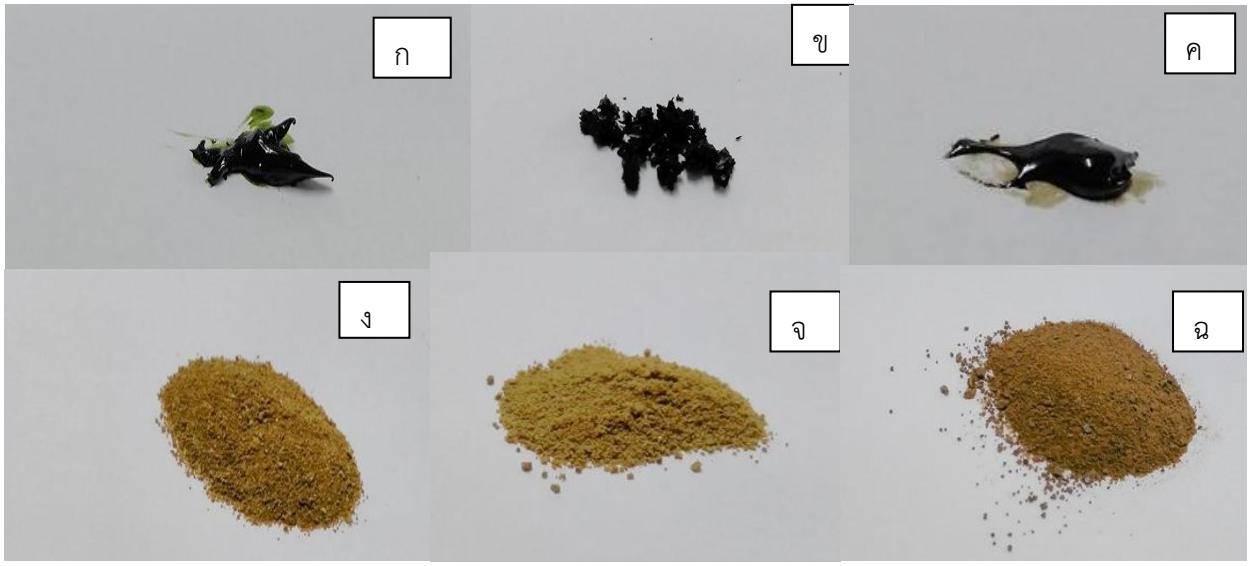
ส่วนสกัดเอทานอลของชาใบขลู่จากจังหวัดอุดรธานีมีลักษณะเป็นผงส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่จากจังหวัดสมุทรสาคร และจากจังหวัดจันทบุรีนั้นจะมีลักษณะหนืด ส่วนชาใบขลู่ส่วนสกัดน้ำนั้นจะมีลักษณะเป็นผง (ภาพที่ 4-2) จากการนำใบขลู่อบแห้งจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี สมุทรสาคร และอุดรธานี ทำการสกัดด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1:10 (w/v) พบว่า ขลู่ที่มาจากจังหวัดจันทบุรีมีน้ำหนักของส่วนสกัดและ %yield มากที่สุดเท่ากับ 11.080 กรัม และ 5.54% รองลงมาคือขลู่ที่มาจากจังหวัด สมุทรสาคร และอุดรธานี ซึ่งมีน้ำหนักของส่วนสกัดเท่ากับ 9.400 และ 8.780 กรัม ตามลำดับ โดยมี %yield เท่ากับ 4.70% และ 4.39% ตามลำดับ ดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 ค่าน้ำหนักและ %Yield ของส่วนสกัดน้ำและเอทานอลของใบขลู่

ส่วนสกัด	จังหวัด	น้ำหนักก่อนสกัด (กรัม)	น้ำหนักหลังสกัด (กรัม)	%Yield
ส่วนสกัดเอทานอล	จันทบุรี	200	11.08	5.54
	สมุทรสาคร	200	9.40	4.70
	อุดรธานี	200	8.78	4.39



ภาพที่ 3-1 ลักษณะของผงชาใบขลู่ ก) ผงชาใบขลู่จากจังหวัดสมุทรสาคร ข) ผงชาขลู่จากจังหวัดอุดรธานี ค) ผงชาใบขลู่จังหวัดจันทบุรี



ภาพที่ 3-2 ลักษณะของสารสกัดจากชาขลู่ที่ได้มาจากแต่ละพื้นที่ (ก)-(ค) ส่วนสกัดเอทานอลของชาขลู่จากจังหวัดสมุทรสาคร อุดรธานี และจันทบุรี ตามลำดับ (ง)-(ฉ) ส่วนสกัดน้ำของชาขลู่จากจังหวัดสมุทรสาคร อุดรธานี และจันทบุรี ตามลำดับ

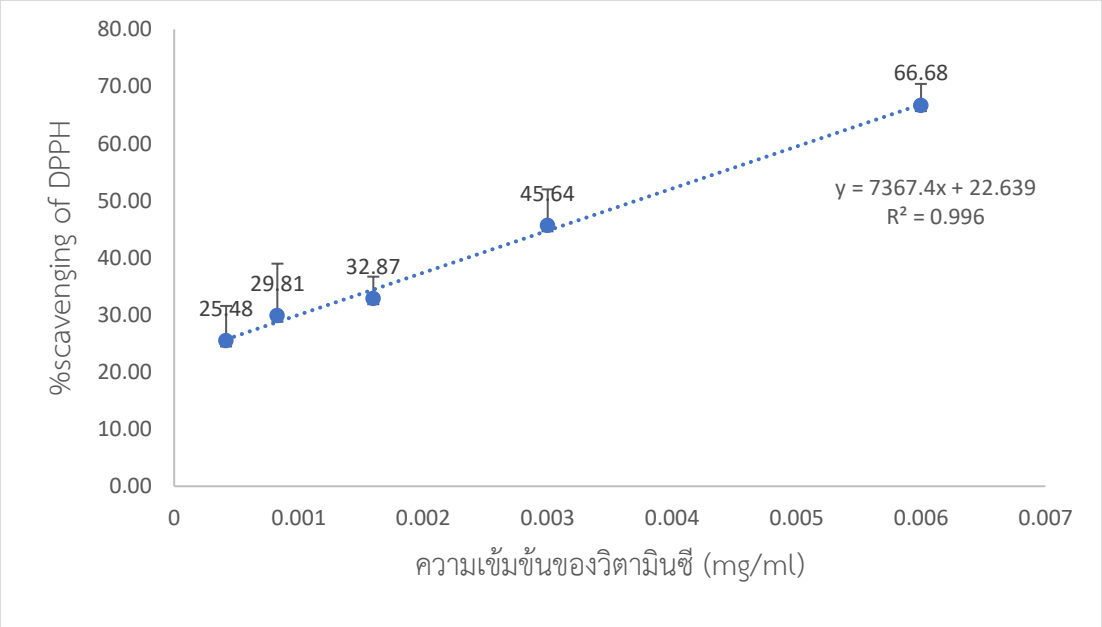
3.2 การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ของใบขลู่จากทั้ง 3 จังหวัดในประเทศไทย ส่วนสกัดเอทานอลของใบชาขลู่ที่มาจากจังหวัดจันทบุรีทำการศึกษาความเข้มข้นในช่วง 0.15-0.015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จังสมุทรสาคร และอุดรธานี ศึกษาในช่วงความเข้มข้น 0.2-0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจากการศึกษาพบว่าฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH มีความสอดคล้องไปในทางเดียวกัน นั่นคือ ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของส่วนสกัด โดยส่วนสกัดเอทานอลของจังหวัดจันทบุรี สมุทรสาคร และอุดรธานีมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.090±0.009 0.119±0.010 และ0.135±0.012 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีวิตามินซี และบีเอชที ที่ถูกใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.006±0.004 และ 0.023±0.016 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3-2)

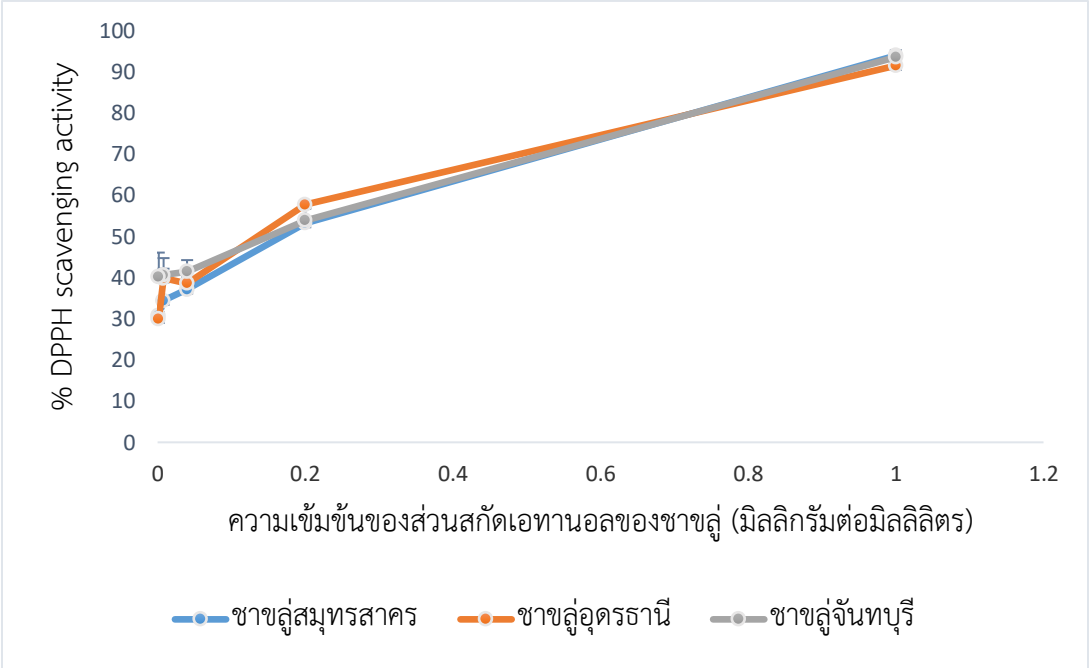
ตารางที่ 3-2 ประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH ของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่

สารสกัด / สารควบคุมเชิงบวก	**EC_{50} ของการกำจัดอนุมูล DPPH (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**
ใบขลู่จากจันทบุรี	0.090 ± 0.009^{c}
ใบขลู่จากสมุทรสาคร	0.119 ± 0.010^{b}
ใบขลู่จากอุดรธานี	0.135 ± 0.012^{a}
วิตามินซี	0.006 ± 0.004^{d}
บีเอชที	0.023 ± 0.016^{e}

หมายเหตุ: $^{a, b, c, d, e}$ แสดงถึงความแตกต่างของข้อมูลในคอลัมน์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของใบขลู่ในแต่ละจังหวัดของส่วนสกัดเอทานอล



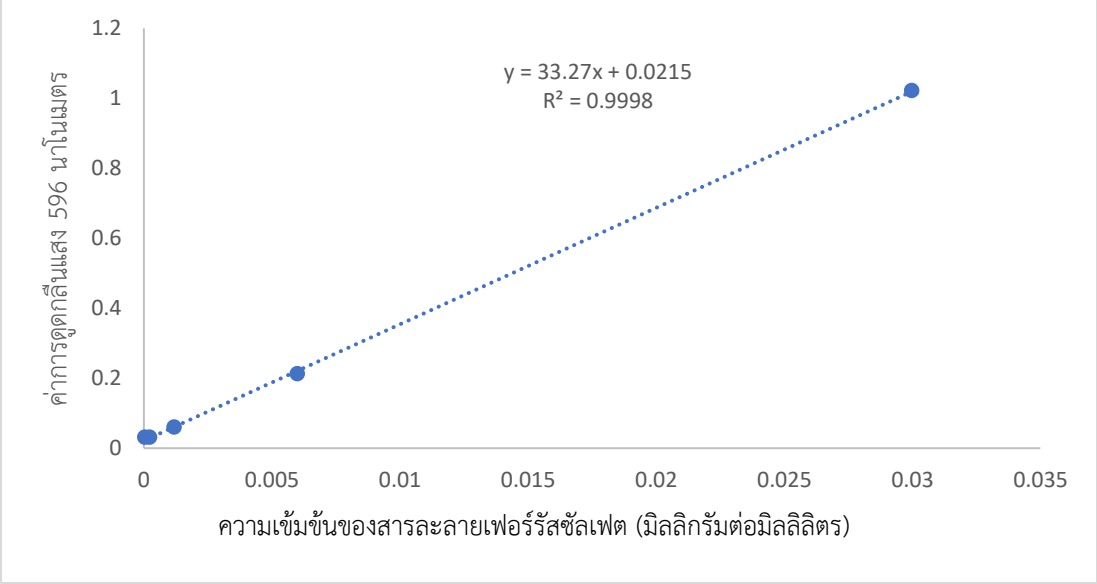
ภาพที่ 3-3 ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารละลายวิตามินซี



ภาพที่ 3-4 % DPPH scavenging ของส่วนสกัดเอทานอลจากชาใบขลู่จังหวัดสมุทรสาคร ชาใบขลู่จากจังหวัดอุดรธานี และชาใบขลู่จากจังหวัดจันทบุรี

3.3 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์

การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก เป็นการทดสอบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของส่วนสกัดใบขลู่ทั้ง 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี สมุทรสาคร อุดรธานี และจังหวัดระนอง ซึ่งสามารถคำนวณค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต (ภาพที่ 3-5) โดยสมการเส้นตรงที่ได้ คือ y = 33.27x + 0.0215 และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9998 ซึ่งจากการหาความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของส่วนสกัดใบขลู่ (ตารางที่ 3-3, ภาพที่ 3-6) โดยในส่วนสกัดเอทานอล ซึ่งใช้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าขลู่ที่มาจากจังหวัดจันทบุรีมีความสามารในการรีดิวซ์เฟอร์ริกมากที่สุดเท่ากับ 283.582±0.002 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของส่วนสกัดใบขลู่ รองลงมาคือขลู่ที่มาจากจังหวัดสมุทรสาคร และอุดรธานี ซึ่งมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกเท่ากับ 270.447±0.005 และ 237.084±0.007 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของส่วนสกัดใบขลู่ ตามลำดับ

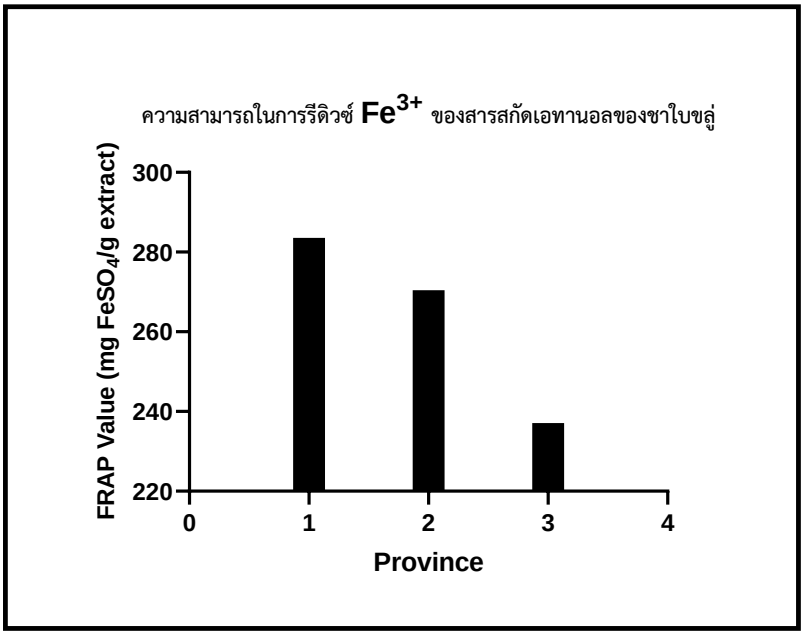


ภาพที่ 3-5 กราฟมาตรฐานของสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟตในการหาความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก

ตารางที่ 3-3 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่

สารสกัด / สารควบคุมเชิงบวก	ค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของส่วนสกัดเอทานอล (0.1 mg/ml) (มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของส่วนสกัด)
ใบขลู่จากจันทบุรี	283.582±0.002[a]
ใบขลู่จากสมุทรสาคร	270.447±0.005[a]
ใบขลู่จากอุดรธานี	237.084±0.007[b]

หมายเหตุ: [a, b] แสดงถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละคอลัมน์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

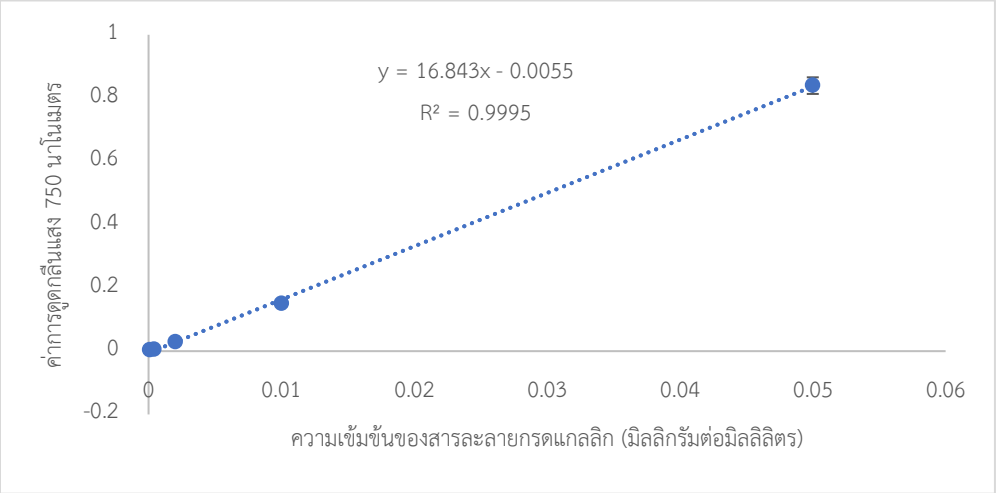


ภาพที่ 3-6 ค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่จาก (1) จังหวัดจันทบุรี (2) จังหวัดสมุทรสาคร และ (3) จังหวัดอุดรธานี

3.4 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของใบขลู่จากพื้นที่ในประเทศไทย 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี สมุทรสาคร และอุดรธานี สามารถคำนวณได้จากสมการของกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (ภาพที่ 1) โดยสมการเส้นตรงที่ได้คือ y = 16.843x – 0.0055 และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9995 จากการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2) โดยใช้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่ที่มาจากจังหวัดสมุทรสาครมีปริมาณสารประกอบฟี

นอลรวมมากที่สุดเท่ากับ 87.840±0.270 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัด รองลงมาคือใบขลู่ที่มาจากจังหวัดจันทบุรี และอุดรธานี มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเท่ากับ 78.511±0.680 และ 65.728±0.420 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัด ตามลำดับ

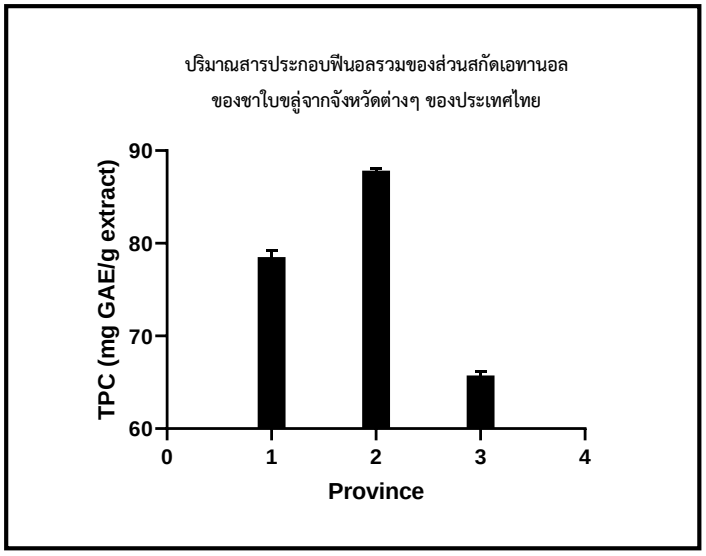


ภาพที่ 3-7 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

ตารางที่ 3-4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่

สารสกัด	**ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัด)**
	ส่วนสกัดเอทานอล (0.5 mg/ml)
ใบขลู่จากจันทบุรี	78.511±0.680[b]
ใบขลู่จากสมุทรสาคร	87.840±0.270[a]
ใบขลู่จากอุดรธานี	65.728±0.420[c]

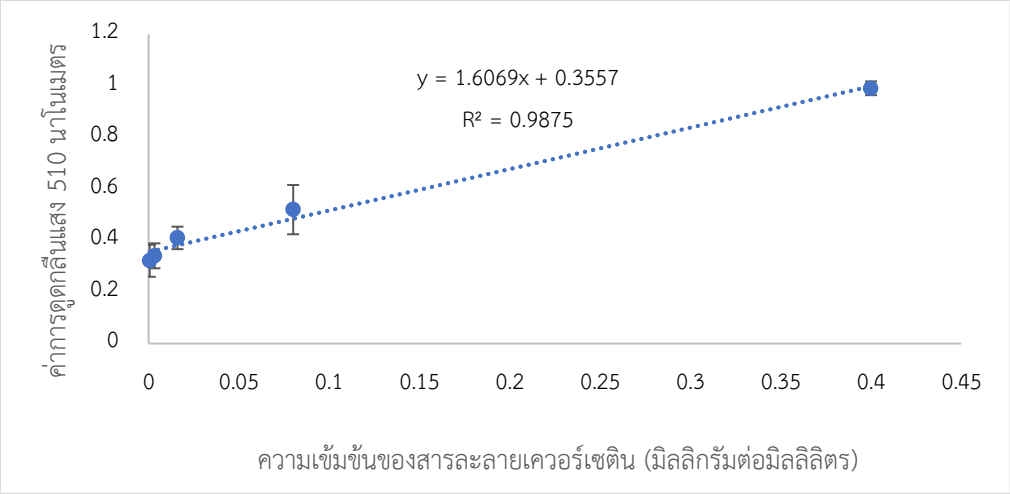
หมายเหตุ: [a, b, c] แสดงถึงความแตกต่างของข้อมูลในคอลัมน์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 3-8 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดเอทานอลของชาใบขลู่จาก (1) จังหวัดจันทบุรี (2) จังหวัดสมุทรสาคร และ (3) จังหวัดอุดรธานี

3.5 การทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของใบขลู่จากพื้นที่ต่างในประเทศไทย 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี สมุทรสาคร และอุดรธานี สามารถคำนวณได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารละลาย เควอร์เซติน (ภาพที่ 3) โดยสมการเส้นตรงที่ได้คือ $y = 1.6069x + 0.3557$ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9875 ซึ่งจากการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 4) โดยส่วนสกัดเอทานอลใช้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าใบขลู่ที่มาจากจังหวัดสมุทรสาครมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดเท่ากับ 317.300±0.001 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซตินต่อกรัมของส่วนสกัด รองลงมาคือใบขลู่ที่มาจากจันทบุรี และอุดรธานี โดยมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 227.900±0.440 และ 184.100±0.001 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซตินต่อกรัมของส่วนสกัด ตามลำดับ

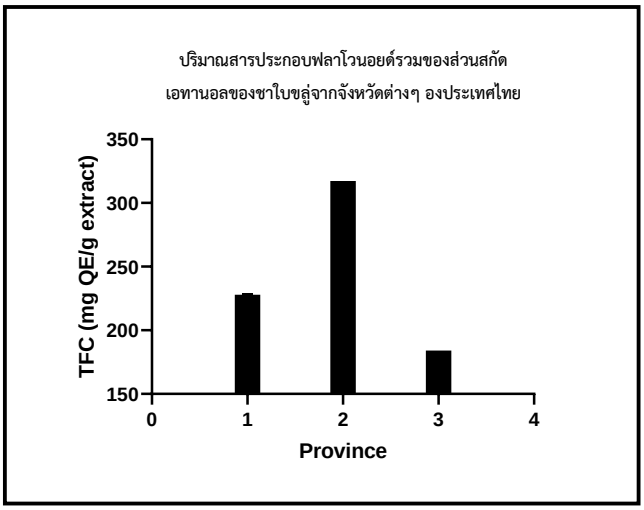


ภาพที่ 3-9 กราฟมาตรฐานของสารละลายเควอร์เซตินในการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

ตารางที่ 3-5 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่

สารสกัด	**ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซตินต่อกรัมของส่วนสกัด)**
	ส่วนสกัดเอทานอล (1 mg/ml)
ใบขลู่จากจันทบุรี	227.900±0.440[b]
ใบขลู่จากสมุทรสาคร	317.300±0.001[a]
ใบขลู่จากอุดรธานี	184.100±0.001[c]

หมายเหตุ: [a, b, c] แสดงถึงความแตกต่างของข้อมูลในคอลัมน์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 3-10 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่จาก (1) จังหวัดจันทบุรี (2) จังหวัดสมุทรสาคร และ (3) จังหวัดอุดรธานี

3.6 การตรวจวัดเชิงคุณภาพของสารโพลีฟีนอลชนิดต่างๆ โดยวิธีการทำให้เกิดสี (colorimetric assay)

จากการหาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่จากจังหวัดจันทบุรี สมุทรสาคร และอุดรธานี พบว่า ส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่มีสารประกอบโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากให้ผลบวกกับการทดสอบด้วยเฟอริกคลอไรด์ และยังพบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เนื่องจากให้ผลบวกกับ Shinoda test และ Pew test นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดทั้ง 3 จังหวัดให้ผลบวกกับการทดสอบปฏิกิริยากับด่าง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจจะมี flavones flavonol หรือ xanthone เป็นองค์ประกอบ และจากการทดสอบด้วยเจลาทินพบสารละลายแทนนินในใบขลู่ แต่จากการทดลองเบื้องต้นนี้ไม่พบแอนโธไซยานินและลิวโคแอนโธไซยานิน เนื่องจากส่วนสกัดทั้งหมดให้ผลลบกับการทดสอบความเป็นกรดด่างและการทดสอบลิวโคแอนโธไซยานิน ตามลำดับ ดังนั้นจากการทดสอบในเบื้องต้นนี้ทำให้ทราบว่าส่วนสกัดเอทานอลจากใบขลู่ทั้ง 3 จังหวัดมีสารพฤกษเคมีที่สำคัญหลายชนิด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3-6

ตารางที่ 3-6 การตรวจวัดเชิงคุณภาพของสารโพลีฟีนอลต่างๆ จากส่วนสกัดเอทานอลของใบขลู่จากจังหวัดจันทบุรี สมุทรสาคร และอุดรธานี

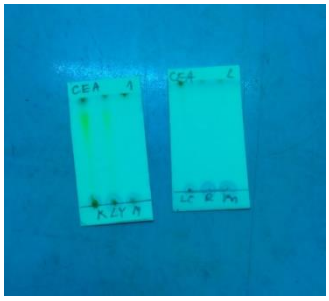
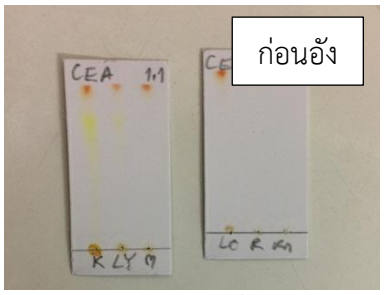
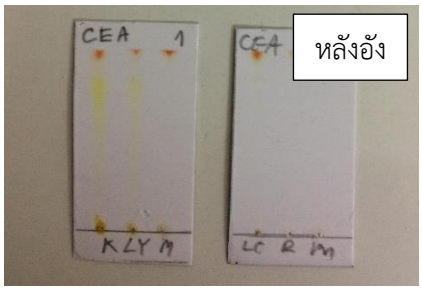
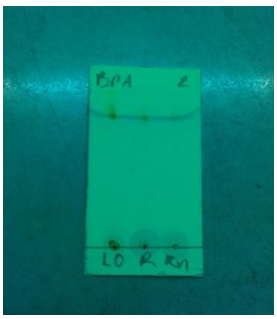
วิธีทดสอบ	พื้นที่			
	Control	จันทบุรี	สมุทรสาคร	อุดรธานี
1. ทดสอบด้วยน้ำยาเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$)	สีเหลือง	+ สีเขียว	+ สีเขียว	สีดำและมีตะกอนสีน้ำเงินดำ
2. Shinoda test	ใสไม่มีสี	++ สีแดง	+ สีแดงอ่อน	+ สีส้ม
3. Pew test	ใสไม่มีสี	++ สีแดง	+ สีแดง	+ สีจางๆ
4.ทดสอบปฏิกิริยากับด่าง	ใสไม่มีสี	++ สีเหลืองเข้ม	+ สีเหลือง	+ สีเหลือง
5. ทดสอบความเป็นกรดด่าง	ใสไม่มีสี	-	-	-
6. Leucoanthocyanidin	ใสไม่มีสี	-	-	-
7. ทดสอบด้วยเจลาทิน	ใสไม่มีสี	+ เกิดตะกอน	+ เกิดตะกอน	+ เกิดตะกอน

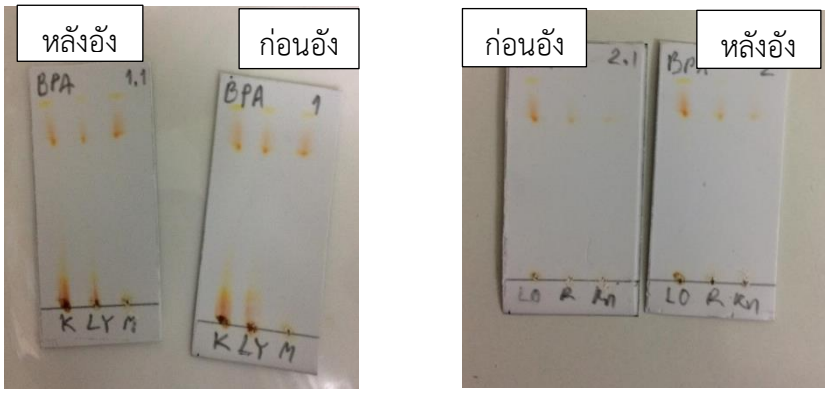
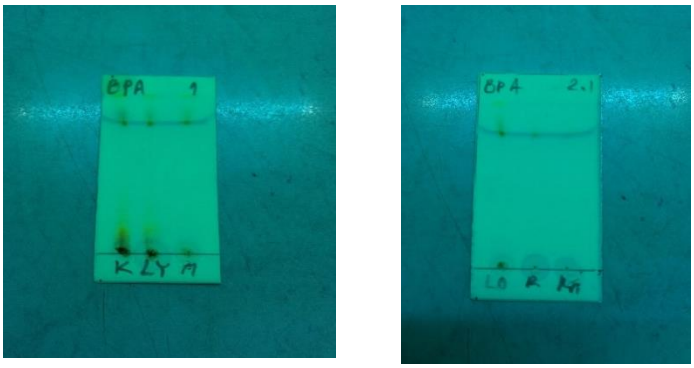
3.7 การตรวจวัดเชิงคุณภาพของสารโพลีฟีนอลชนิดต่างๆ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

การทำ TLC เริ่มด้วยการใช้แผ่น TLC Silica gel 60 F 254 เป็นวัฏภาคนิ่ง จากนั้นเตรียมสารสกัดขลู่เพื่อนำไปแต้ม (spotting) ลงบนแผ่นTLC ให้ห่างจากปลายด้านล่างขึ้นมาประมาณ 0.5-1 เซนติเมตรนำแผ่น TLC ไปจุ่มลงในขวดแก้วที่มีฝาปิดมิดชิดซึ่งมีตัวทำละลายอยู่ ชนิดของส่วนผสมตัวทำละลายที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แสดงดังตารางที่ 3-7 ตรวจสอบผลโดยการมองด้วยตาเปล่า และนำไปส่องด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร

จากการตรวจวัดเชิงคุณภาพของสารประกอบโพลีฟีนอลชนิดต่างๆ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางของสารสกัดเอทานอลจากชาใบขลู่จากทั้ง 3 จังหวัด โดยวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารตัวอย่างในตัวทำละลายและความสามารถในการดูดซับของตัวดูดซับที่มีต่อสารตัวอย่าง เช่น สารตัวอย่างบางชนิดเมื่อนำมาแยกด้วยวิธี TLC แล้วสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า เช่น ชาร์ลโคล ออโรน และแอนโธไซยานิน เป็นต้น แต่สารบางชนิดจะมองเห็นได้เมื่อนำไปส่องด้วยแสง UV เช่น ฟลาโวนอล และชาร์ลโคล หรือสารบางชนิดจะมองเห็นได้เมื่อนำไปอังกับไอแอมโมเนียแล้วส่องด้วยแสง UV เช่น ฟลาโวนอล ไกลโคไซด์ ฟลาโวน ฟลาวาโนน และสารคะเตชิน ซึ่งสารเหล่านี้จัดเป็นสารประกอบโพลีฟีนอล จากตารางที่ 3-7 ทำการทดสอบในสภาวะของระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกัน เช่น ฟลาโวน-โอ-ไกลโคไซด์ ใช้คลอโรฟอร์ม:เอทิลอะซิเตด:อะซีโตน ในอัตราส่วน 5:1:4 แอนโธไซยานิดินส์ ใช้เอทิลอะซิเตด:กรดฟอร์มิก: 2M กรดไฮโดรคลอริก ในอัตราส่วน 85:6:9 จะเห็นได้ว่าเมื่อนำสารตัวอย่างมาแยกด้วยวิธี TLC ในแต่ละสภาวะ เมื่อนำไปอังกับไอแอมโมเนียจะปรากฏสีส้มแดง ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าประกอบด้วยสารออโรน อีกทั้งเมื่อนำไปอังกับไอแอมโมเนียแล้วส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตพบการเรืองแสงสีเหลืองบนแผ่น TLC แสดงว่าสารตัวอย่างอาจจะประกอบด้วยสารฟลาโวนอล ไกลโคไซด์และฟลาโวน จากผลดังกล่าวแสดงว่า สารสกัดเอทานอลจากชาใบขลู่มีองค์ประกอบเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลจำพวกฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนอล และฟลาโวน-โอ-ไกลโคไซด์ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดเอทานอลจากชาใบขลู่มีสารประกอบโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ

ตารางที่ 3-7 การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC

ชนิดของสารฟลาโวนอยด์	ผลการทดสอบ
1. ฟลาโวน-โอ-ไกลโคไซด์, ฟลาโวน ซี-ไกลโคไซด์, ฟลาโวนอล โอ-ไกลโคไซด์ ระบบตัวทำละลาย (คลอโรฟอร์ม:เอธิลอะซิเตด:อะซีโตน)	1.เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต  2.นำไปอังกับไอแอมโมเนีย   3. อังกับไอแอมโมเนียแล้วส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต
2. ฟลาวาโนน, ฟลาโวนอล, ฟลาโวนอยด์ อะกลัย-โคนที่มีขั้วสูง ระบบตัวทำละลาย (เบนซีน:ไพริดีน:แอมโมเนีย)	1. ส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 

ชนิดของสารฟลาโวนอยด์	ผลการทดสอบ
	2. นำไปอังกับไอแอมโมเนีย  3. อังกับไอแอมโมเนียแล้วส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 

บทที่ 4

อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ได้นำชาใบขลู่ที่ซื้อมาจากจังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดอุดรธานี และจังหวัดจันทบุรี ในช่วงเดือนตุลาคม-พฤศจิกายนของปี 2561 มาทำการปั่นเป็นผง พบว่าผงของชาใบขลู่แต่ละพื้นที่มีสีที่แตกต่างกันโดยผงของชาใบขลู่จากจังหวัดสมุทรสาครจะมีสีเขียวอ่อน ลักษณะจะเหมือนผงชาเขียว ผงของชาใบขลู่ที่ซื้อมาจากจังหวัดอุดรธานีจะมีสีน้ำตาลอ่อน และชาใบขลู่ที่ซื้อมาจากจังหวัดจันทบุรีจะมีสีน้ำตาลเข้ม เนื่องจากกระบวนการแปรรูปจากที่แตกต่างกัน คือ ชาใบขลู่จากสมุทรสาครจะมีกรรมวิธีในการนำใบขลู่สดมาตากแดด อบ และคั่ว ส่วนชาใบขลู่ที่ซื้อจากจังหวัดอุดรธานีจะมีกรรมวิธีในการแปรรูปคือ นำใบชาสดมาคั่วเพียงอย่างเดียว และชาใบขลู่ที่ซื้อจากจังหวัดจันทบุรี จะมีกรรมวิธีในการแปรรูปคือ อบและคั่ว หลังจากนั้นจะนำผงชาใบขลู่ไปสกัดด้วยน้ำและเอทานอลในอัตราส่วน 1:10 แล้วนำไประเหยเอทานอลออก และทำให้เยือกแข็งแบบสุญญากาศ เก็บส่วนสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากขั้นตอนการสกัดสารนั้นพบว่า %yield ที่ได้หลังจากการสกัดแล้วของชาใบขลู่ทั้งสองส่วนสกัดสามพื้นที่นั้นแตกต่างกัน โดยชาขลู่จากจังหวัดอุดรธานีส่วนสกัดน้ำและเอทานอล ได้น้ำหนักสารสกัดมากที่สุด คือ 10.86 และ 70.09 กรัม และมี %yield มากที่สุดคือ 5.43 และ 34.45% ตามลำดับ โดยที่น้ำหนักของสารสกัดที่แตกต่างกันอาจขึ้นอยู่กับการเก็บพืช การแปรรูปพืช โดยขั้นตอนการแปรรูปใบขลู่ให้เป็นใบชาขลู่นั้นแตกต่างกัน โดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน เวลาที่ใช้สกัด อุณหภูมิในการสกัด และคุณสมบัติทางเคมีของสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในสารสกัดที่แตกต่างกัน

ชาขลู่ทั้งสองส่วนสกัดสามพื้นที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ส่วนสกัดน้ำของชาใบขลู่จากสมุทรสาคร และส่วนสกัดเอทานอลของชาใบขลู่จากจังหวัดจันทบุรีมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะปัจจัยทางสภาพแวดล้อมมีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และขั้นตอนการแปรรูปชาใบขลู่ที่อาจทำให้สูญเสียสารพฤกษเคมีไปบางส่วน อีกทั้งยังพบว่าความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของกรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ และสมจิตต์ ปาละกาศ (2557) ที่ทดสอบกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ได้แก่สารสกัดจากใบขลู่สด สารสกัดจากใบขลู่ตากแห้ง และสารสกัดจากใบขลู่อบที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 ปริมาตร 5, 10 และ 50 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลู่สด) พบว่า สารสกัดจากใบขลู่สดในทุกการสกัด มีความสามารถในการกำจัด

อนุมูล DPPH ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกัน ส่วนสารสกัดจากใบขลู่ตากแห้งที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ดีกว่าที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 90 ของทุกปริมาตรการสกัด และสำหรับสารสกัดจากใบขลู่อบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 50 และ 10 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนักใบขลู่สด) มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ดีที่สุด ให้ค่าเท่ากับ 66.07 ± 2.53 และ 57.46 ± 2.59 มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัม ซึ่งจะสังเกตเห็นได้ว่าขั้นตอนการแปรรูปชาใบขลู่ที่แตกต่างกันมีผลต่อฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH และเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซีจะเห็นว่า แม้ว่าชาขลู่สองส่วนสกัดทั้งสามพื้นที่จะมีฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH ที่ดี แต่ก็ยังน้อยกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Srisook et al. (2012) ที่พบว่าส่วนสกัดน้ำของชาใบขลู่จากจันทบุรีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าวิตามินซี โดยมีค่า EC_{50} ของชาขลู่เท่ากับ 23.8 ± 1.0 µg/ml ในขณะที่วิตามินซีมีค่า EC_{50} เท่ากับ 13.0 ± 0.2 µg/ml ซึ่งวิตามินซีมีฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH ที่ดีกว่า

การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถของการให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันของสารตัวอย่างโดยเป็นการทดสอบความสามารถของสารตัวอย่างในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+}/Ferric cyanide ไปเป็นรูป Fe^{2+}/Ferrous cyanide ติดตามปริมาณ Fe^{2+} โดยการเกิด Perl's Prussian blue ที่ 700 นาโนเมตร (Senevirathne et al., 2006) ซึ่งจากงานวิจัยนี้ใช้ความเข้มข้นที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อหาความสามารถในการรีดิวซ์ของส่วนสกัดน้ำและเอทานอลของชาใบขลู่จังหวัดสมุทรสาคร ชาใบขลู่จังหวัดอุดรธานี และชาใบขลู่จากจังหวัดจันทบุรี ซึ่งจะเห็นได้ว่าความสามารถการรีดิวซ์ในส่วนสกัดเอทานอลของชาใบขลู่จากจังหวัดสมุทรสาคร ชาใบขลู่จากจังหวัดอุดรธานี และชาใบขลู่จากจังหวัดจันทบุรี มีค่าเท่ากับ 33.60±0.01, 80.39±0.00 และ 50.69±0.02 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมส่วนสกัด ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดเอทานอลของชาใบขลู่จากจังหวัดอุดรธานีนั้นมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนได้ดี ซึ่งผลที่เป็นเช่นนี้อาจเกี่ยวเนื่องมาจากสารพฤกษเคมีที่มีอยู่ในใบขลู่แต่ละพื้นที่แตกต่างกัน แต่จากงานวิจัยของ Srisook et al. (2012) พบว่าน้ำชาขลู่จากจังหวัดจันทบุรีมีความสามารถในการรีดิวซ์ที่ดีซึ่งอยู่ที่ 185.2±2.3 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัด

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมในส่วนสกัดจากใบชาขลู่ 3 พื้นที่สองส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก พบว่า ส่วนสกัดเอทานอลของชาใบขลู่จังหวัดอุดรธานีมีสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุดคือเท่ากับ 134.91±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัด และจากการคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายเควอร์เซติน พบว่า ส่วนสกัดเอทานอลของชาใบขลู่สมุทรสาครมีฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดคือ 849.39±0.00 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซตินต่อกรัมของส่วนสกัด ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นผลมาจากการระเหยของน้ำในชาใบขลู่ในระหว่างการเก็บเป็นเวลานาน อุณหภูมิ แสงแดด และสภาพอากาศ

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยต่างๆ เป็นจำนวนมากที่ส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลในพืช เช่น ระยะเวลาการเก็บ สภาพของสิ่งแวดล้อมที่ปลูก กระบวนการแปรรูป และการเก็บเป็นเวลานานซึ่งอาจจะส่งผลต่อการสลายตัวของสารประกอบในกลุ่มนี้ (ชัชวิน เพชรเลิศ, 2557) อีกทั้งจากงานวิจัยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลรวมกับ ฟลาโวนอยด์รวมทั้ง 3 พื้นที่ พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจะสูงกว่าปริมาณฟีนอลรวม ในบรรดาสารประกอบฟีนอลต่างๆนั้น สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลที่มีมากที่สุดและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างดี ที่สำคัญคือสารประกอบเหล่านี้สามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เป็นผลมาจากอนุมูลอิสระได้ (free radical chain reaction) (ชัชวิน เพชรเลิศ, 2557) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Andarwulan et al. (2010) ที่พบว่าในขลู่มีสารประกอบฟลาโวนอยด์อยู่เป็นจำนวนมาก และเมื่อนำทดสอบเชิงคุณภาพทั้งการทดสอบด้วยน้ำยาทดสอบต่างๆ รวมทั้งการทดสอบด้วยวิธี TLC ผลปรากฏว่า ในสารสกัดเอทานอลจากชาใบขลู่จากทั้ง 3 จังหวัดมีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลในกลุ่มฟลาโวน ฟลาโวนอล แซนโทน และแทนนิน อีกทั้งยังมีสารฟลาโวน-โอ-ไกลโคไซด์ ฟลาโวน ซี-ไกลโคไซด์ ฟลาโวนอล โอ-ไกลโคไซด์ นอกจากนี้ยังพบฟลาวาโนน ฟลาโวนอล และฟลาโวนอยด์ อะไกลโคนที่มีขั้วสูง ซึ่งสารเหล่านี้ล้วนแต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสิ้น

จากการศึกษาของ Traithip (2005) พบว่า สารสกัดของใบขลู่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดี โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 6.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดมาแยกสารสำคัญและพิสูจน์โครงสร้างด้วยวิธีสเปกโตรสโคปี พบว่ามีโมเลกุลของ quercetin (5,7,3',4' tetrahydroxy -flavonol) ซึ่งสามารถวัดค่า EC_{50} เท่ากับ 1.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Andarwulan et al. (2010) ได้ตรวจสอบปริมาณฟลาโวนอยด์จากพืชต่างๆ ในประเทศอินโดนีเซีย พบว่า ขลู่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์คิดเป็น 6.39 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม โดยเป็นสาร quercetin ประมาณ 81 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเป็นสาร myricetin และสอดคล้องกับรายงานของ Suriyaphan (2014) ที่พบว่าใบขลู่นั้นมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าปริมาณฟีนอลรวม อีกทั้งใบขลู่นั้นมีสารประกอบฟีนอล ได้แก่ กรดคลอโรจีนิก กรดคาฟเฟอิก และมีสารประกอบฟลาโวนอยด์ คือ quercetin, kaempferol, myricetin ซึ่งสารเหล่านี้อาจมีมากน้อยแตกต่างกันตามความอุดมสมบูรณ์ของดิน สภาพภูมิอากาศ ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาขลู่ทั้งสามพื้นที่นั้นแตกต่างกัน มีรายงายวิจัยพบว่าการตรวจสอบสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบขลู่ด้วยความร้อน โดยใช้อุณหภูมิและอุปกรณ์ที่แตกต่างกัน การสกัดใบขลู่ด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดคือ 66.92 ± 2.21 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง โดยการสกัดใบขลู่ด้วยเครื่องชงกาแฟอัตโนมัติด้วยแรงดันที่สกัดผ่านหัวชงเป็นเวลา 40 วินาทีมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่ำที่สุดคือ 9.29 ± 0.88 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง และสารสกัดที่สกัดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบหยดมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 29.51 ± 0.17 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งพบว่าอุณหภูมิและอุปกรณ์การสกัดที่ต่างกันมีผลต่อปริมาณฟีนอลิก (กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ และสมจิตต์ ปาละกาศ, 2557)

4.2 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่าส่วนสกัดเอทานอลของชาใบขลู่จากจังหวัดจันทบุรีมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ดีกว่าส่วนสกัดเอทานอลของชาขลู่จากอีกสองจังหวัด และความสามารถในการรีดิวซ์ของส่วนสกัดเอทานอลจากจังหวัดจันทบุรีก็ยังคงมีมากกว่าส่วนสกัดเอทานอลของชาขลู่จากจังหวัดสมุทรสาคร และจังหวัดอุดรธานี และส่วนสกัดเอทานอลของชาขลู่จากจังหวัดจันทบุรีพบว่ายังมีปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมใกล้เคียงกับส่วนสกัดเอทานอลของขลู่จากจังหวัดสมุทรสาครที่มีปริมาณมากที่สุด แต่ส่วนสกัดที่มาจากจังหวัดอุดรธานีนั้นค่อนข้างจะน้อยกว่าสองส่วนสกัดที่กล่าวมาแล้ว ทั้งหมดนี้อาจเนื่องจากพื้นที่ในการปลูกแตกต่างกันจึงทำให้พืชได้รับสารอาหารที่แตกต่างกัน รวมถึงขั้นตอนของการผลิตใบชาที่แตกต่างกัน หรือการเก็บใบขลู่มาแปรรูปในเวลาที่แตกต่างกัน อุณหภูมิในการสกัด เวลาในการสกัด จึงทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมนั้นแตกต่างกันตามไปด้วย

รายงานสรุปการเงิน

ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 (งบบูรณาการวิจัยและนวัตกรรม)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากขลู่ในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน / ผู้วิจัย ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ 29 กุมภาพันธ์ 2563

ระยะเวลาดำเนินงาน 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ 31 กันยายน 2562

<u>รายจ่าย</u>

หมวด	รายจ่ายสะสมจากรายงานครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน	รวมรายจ่ายสะสมจนถึงงวดปัจจุบัน	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	คงเหลือ (หรือเกิน)
1. ค่าตอบแทน	20,000.00	20,000.00	40,000.00	40,000.00	0.00
2. ค่าวัสดุ	78,212.09	218,935.27	297,147.36	168,690.00	-128,457.36
3. ค่าใช้สอย	39,018.57	6,131.39	45,149.96	155,000.00	109,850.04
4. อุดหนุนสถาบัน	20,205.00	16,164.00	36,369.00	40,410.00	4,041.00
รวม	**157,435.66**	**261,230.66**	**418,666.32**	**404,100.00**	**-14,566.32**

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1	181,845 บาท	เมื่อ 22 มกราคม 2562
งวดที่ 2	145,476 บาท	เมื่อ 30 กรกฎาคม 2562
รวม	**327,321 บาท**	

....-.....

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน เจ้าหน้าที่การเงินโครงงานวิจัย

บรรณานุกรม

กรกนก รุ่งเรืองบูรณะกุล, กรรณิการ์ เทพมงคล. (2555). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักพื้นบ้านจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี. ปริญญานิพนธ์. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์, สมจิตต์ ปาละกาศ. (2557). การตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาใบขลู่และผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อความสามารถในการออกฤทธิ์. รายงานวิจัยสนับสนุนโดย งบประมาณแผ่นดิน ประจาปี พ.ศ. 2556-2557 จากมหาวิทยาลัยบูรพา.

โกศล กฤษฎาพรรณ, ดนัย กลิ่นผะกา, พิทักษ์ เชียงกา. (2548). การศึกษาการสกัดสารจากขมิ้นชันโดยใช้ตัวทำละลาย. ปริญญานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ขวัญหทัย รัตนสร้อย. (2555). ผลของตัวทำละลายในสารสกัดต่อฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ และการต้านไทโรซิเนสของใบขลู่. ปริญญานิพนธ์. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ร่วมกับสมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย. (2555). *คู่มือการประชุมปฏิบัตรการเรื่องเทคนิคในการตรวจวัดอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และดัชนีภาวะเครียดออกซิเดชัน.* พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท นพบุรีการพิมพ์ จำกัด : เชียงใหม่.

จรีวรรณ พุ่มพินิจ, สุรีย์ฉาย วงศ์หล้า. (2555). ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากส่วนสกัดน้ำพืชพื้นบ้านทั้ง 7 ชนิดในโครงการพัฒนาชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี. ปริญญานิพนธ์. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

จุไรพร หาญณรงค์, สุภาวดี ไกรมาตย์. (2555). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลังผ่านการย่อยของสารสกัดพืชพื้นบ้านจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี. ปริญญานิพนธ์. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เจนจิรา จิรัมย์, ประสงค์ สีหานาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์, 1,* 59-70.

ชัชวิน เพชรเลิศ. (2557). การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของน้ำชาขลู่ โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เชิดชัย เจียรวนนท์. (2554). *สมุนไพรในป่าฝน เล่ม 1*. โรงพิมพ์ไทยรายวัน: กรุงเทพมหานคร.

โชติอนันต์ อินทุใสตระกูล, (2551). *สมุนไพรไทย สำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน*. พิมพ์ครั้งที่ 1. ดวงกมล พับลิชชิ่ง: กรุงเทพมหานคร.

ฐิติกานต์ ปัญโญใหญ่. (2551). กิจกรรมต้านออกซิเดชันของสาหร่ายเต่า *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kutzing. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. (2556). การตรวจวัดอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และดัชนีความเครียดออกซิเดชัน. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 21*(3), 276-284.

มาโนช วามานนท์, เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. (2540). บรรณาธิการ. *ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน*. พิมพ์ครั้งที่ 2. ม.ป.ท. องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

ศศิธร อุทธตรี. (2549). ฤทธิ์ต้านอนุมูลออกซิเดชัน และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง. ปริญญานิพนธ์. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์. (2548). สารต้านอนุมูลอิสระ จำเป็นต่อร่างกายอย่างไร. *นิตยสารหมอชาวบ้าน, 27*(361), 27-31.

อุไรวรรณ พรทวีวุฒิ เคอแรน. (2552). การเกิดอนุมูลอิสระ และความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง. *วารสารชมรมฟื้นฟูสุขภาพผู้ป่วยโรคมะเร็งแห่งประเทศไทย, 11,* 15-22.

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทนา บุญยะรัตน์, มาลีรักษ์ อัตน์สินทอง. (2550). *สารต้านอนุมูลอิสระ*. พิมพ์ครั้งที่ 2. นิวไทยมิตรการพิมพ์: กรุงเทพมหานคร.

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.

Bast, A., Haeren, G., & Doelmen, C. (1991). Oxidants and antioxidants: state of art. *American Journal of Medicine, 91*, 2-13.

Biswas, R., Dasgupta, A., Mitra, A., Roy, S.K., Dutta, P.K., Achari, B., Dastidar, S.G., & Chatterjee, T.K. (2005). Isolation, purification and characterization of four pure compounds from the root

extract of *Pluchea indica* (L.) Less. and the potentiality of the root extract and the pure compounds for antimicrobial activity. *European Bulletin of Drug Research, 13,* 63-70.

Gressier, B., Lebegue, S., Brunet, C., Luyckx, M., Dine, T., Cazin, M., & Cazin, J.C. (1994). Pro-oxidant properties of methotrexate: evaluation and prevention by an antioxidant drug. Pharmazie, *49*(9), 679-681.

Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., & Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, *33*, 601-617.

Haliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. (1999). Free radical in biology and medicine. *Food Chemistry, 49*, 51-67.

Kim, D.O., Jeong, S.W., & Lee, C.Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry, 81*, 321-326.

Mukhopadhyay, S., Cordell, A.G., & Ruangrungsi, N. (1983). Traditional medicinal plants of Thailand. IV. 3-(2',3'-Diacetoxy-2'-methyl butyryl)-cuauhtehmone from *Pluchea indica*. *Journal of Natural Products, 46,* 671-674.

Nawar, W.W. (1996). Lipid. In Fennema O.R. (editor). *Food Chemistry*. Marcel Dekker. New York. pp. 210-243.

Noridayu, A.R., Hii, Y.F., Faridah, A., Khozirah, S., & Lajis, N. (2011). Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of *Pluchea indica* Less. *International Food Research Journal, 18*(3), 925-929.

Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Product, 63,* 1035-1042.

Senevirathne, M., Kim, S.H., Siriwardhana, N., Ha, J.H., Lee, K.W., & Jeon, Y.J. (2006). Chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *International Journal of Food Science and Technology, 12*(1), 27-38.

Sies, H., Stahl, W., & Sundquist, A. (1992). Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences, 368,* 7-19.

Srisook, K., Buapool, D., Boonbai, R., Simmasut, P., Charoensuk, Y., & Srisook, K. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less herbal tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, *23*, 4077-4081.

Suriyaphan, O. (2014). Nutrition, health benefits and applications of *Pluchea indica* (L.) Less leaves. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences, 41*(4), 1-10.

Traithip, A. (2005). Phytochemistry and antioxidant activity of *Pluchea indica*. Master's thesis. Pharmacognosy. Faculty of Graduate Studies. Mahidol University.

Uchiyama, T., Miyase, T., Ueno, A., & Usmanghani, K. (1989). Terpenic glycosides from *Pluchea indica*. *Phytochemistry, 28,* 3369-3372.

Uchiyama, T., Miyase, T., Ueno, A., & Usmanghani, K. (1991). Terpene and lignan glycosides from *Pluchea indica*. *Phytochemistry, 30,* 655-657.

Valacchi, G., Pagnin, E., Corbacho, A., Olano, E., Davis, P., Packer, L., & Cross, C. (2004). In vivo ozone exposure induces antioxidant stress-related responses in murine lung and skin. *Free Radical Biology and Medicine, 36,* 673-681.

Voest, E.E., Vreugdenhil, G., & Marx, J. (1994). Iron chelating agents in non-iron overload conditions. *Annals of Internal Medicine, 120,* 490-499.

Zhang, X., Huang, H., Yang, T., Ye, Y., Shan, J., Yin, Z., & Luo, L. (2010). Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Journal of Medicinal Plants Research, 41,* 746-752.