สัญญาเลขที่ R2559C177

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาปริมาณสารฟินอลลิกส์ทั้งหมด สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และสารสำคัญในสารสกัดหยาบจากหนอนตายหยาก

Study of total phenolic compounds, antioxidant activity and active compounds in crude extracts from *Stemona tuberose* Lour.

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน ... ธ.ค. 2562
เลขทะเบียน
เลขเรียกหนังสือ ว QD 341 .P5 ป๘๘ร 2560

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญจิรา รัตนากรพิทักษ์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร

กันยายน 2560

สัญญาเลขที่ R2559C177

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาปริมาณสารฟินอลลิกส์ทั้งหมด สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและสารสำคัญในสารสกัดหยาบจากหนอนตายหยาก

Study of total phenolic compounds, antioxidant activity and active compounds in crude extracts from *Stemona tuberose* Lour.

คณะผู้วิจัย สังกัด

ผศ. ดร. บุญจิรา รัตนากรพิทักษ์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดย

งบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีงบประมาณ 2559

Executive Summary

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาปริมาณของสารฟีนอลลิกส์ทั้งหมด, สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญประเภทสารฟีนอลลิกส์ในสารสกัดหยาบจากส่วนของราก ลำต้น และใบของหนอนตายหยาก เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนและเป็นระบบมากขึ้น และในงานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธีดีพีพีเอช แรดิคัล สแคเวนจิง (DPPH; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging activity เป็นวิธีที่ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัดได้ ทั้งนี้เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว [7] และจะเลือกใช้วิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric เป็นวิธีที่ศึกษาหาสารฟีนอลิกทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็วและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย และในการวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจะใช้เทคนิคโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2- ไดฟีนิล-1-ไพคริไฮดราซิล ฟรีแรดิคัล สแคเวนจิง (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging) ของสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากในส่วนของ ราก ลำต้นและ ใบ พบว่าสารสกัดหยาบส่วนของใบของหนอนตายหยากมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 132.07 ppm รองลงมาคือลำต้นและราก ตามลำดับ และในการศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธีฟูลิน-ซิโอคัลเชอ คัลเลอริเมตริก (Folin-Ciocalteu Colorimetric) ของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของแกลลิค แอซิด ผลการทดลองพบว่าปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบส่วนของลำต้นของหนอนตายหยากมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดคิดเป็น 15.58 ppm ในขณะที่สารสกัดหยาบส่วนของรากและใบของหนอนตายหยากมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดคิดเป็น 7.75 และ 8.21 ppm นอกจากนี้เมื่อนำสารสกัดหยาบแต่ละชนิดของหนอนตายหยากทั้งหมดที่เตรียมได้มาทำการสกัดและวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารฟีนอลิกแอซิด และฟลาโวนอยด์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าจากการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญประเภทกรดฟีนอลลิกและสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนที่ประกอบไปด้วยส่วนราก ลำต้นและใบของหนอนตายหยาก ข้างต้นโดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดฟีนอลลิกและสารฟลาโวนอยด์ 12 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสามารถวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญได้ทั้งหมด 8 ชนิดคือ Caffeic acid, p-Coumaric acid, Ferulic acid, Cinnamic acid, p-hydroxybenzoic acid, Luteolin, Quercetin และ Kaemferol ในหน่วยของมิลลิกรัมต่อ100 กรัมแห้งที่แตกต่างกันออกไป โดยในส่วนของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนจะพบสารสำคัญประเภทกรดฟีนอลลิกชนิด *p*-hydroxybenzoic acid ในปริมาณมากที่สุด และนอกจากนี้ยังพบว่าในสารสกัดหยาบในส่วนของรากจะพบชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่มากกว่าในส่วนของสารสกัดหยาบของลำต้นและใบ โดยในสารสกัดหยาบในส่วนของรากจะพบสารสำคัญทั้งหมด 7 ชนิด ในขณะที่ส่วนของสารสกัดหยาบของใบและลำต้นจะพบสารสำคัญทั้งหมด 5 และ 4 ชนิดตามลำดับ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาปริมาณของสารฟีนอลลิกส์ทั้งหมด, สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญประเภทสารฟีนอลลิกส์ในสารสกัดหยาบจากส่วนของราก ลำต้น และใบของหนอนตายหยากโดยการหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจะใช้วิธีไข้วิธีฟูลิน-ซิโอคัลเชอ คัลเลอริเมตริกในขณะที่ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะใช้วิธีดีพีพีเอช แรดิคัล สแคเวนจิง ผลการทดลองพบว่าในส่วนสกัดของรากของหนอนตายหยากมีปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 15.58 ppm ในขณะที่สารสกัดหยาบส่วนของรากและใบของหนอนตายหยากมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดคิดเป็น 7.75 และ 8.21 ppm และการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบแต่ละชนิด พบว่าสารสกัดหยาบส่วนของใบของหนอนตายหยากมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 132.07 ppm นอกจากนี้ในการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญประเภทสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบแต่ละชนิด จะใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าในสารสกัดหยาบจะพบสารสำคัญประเภทสาร ฟีนอลิกและสารฟลาโวนอลด์ทั้งหมด 8 ชนิดคือ กรดคาเฟอิค, กรดพาราคูมาริก, กรดเฟอรูลิก, กรดซินนามิก, กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก, ลูทอีโอลิน, เคอซิติน และ แคมเฟอรอล ในหน่วยของมิลลิกรัมต่อ100 กรัมแห้งที่แตกต่างกันออกไป โดยในส่วนของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนจะพบสารสำคัญประเภทกรดฟีนอลลิกชนิดกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกในปริมาณมากที่สุด

คำสำคัญ: สารฟีนอลิก, สารต้านอนุมูลอิสระ,หนอนตายหยาก, สารฟลาโวนอยด์

Abstract

In this research, the total phenolic contents (TPC), antioxidant activities and analyses of active compounds in *Stemona tuberose* Lour crude extracts including roots, stems and leaved were investigated. The TPC was measured by Folin-Ciocalteu, while antioxidant activities were assessed by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging method. It was found that crude extracts from stem showed highest total phenolic about 15.58 ppm, while roots and leaves crude extracts exhibited the total phenolic about 7.75 and 8.21 ppm, respectively. From the study of antioxidant activity, crude extracts from leaves showed the better antioxidant activity in the IC_{50} value about 132.07 ppm. The analysis of active compounds such as phenolic and flavonoid compounds in crude extracts were carried out via a high performance liquid chromatography (HPLC) technique. The results showed that eight active compounds including caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, cinnamic acid, p-hydroxybenzoic acid, luteolin, quercetin and kaemferol were detected in all crude extracts. The p-hydroxybenzoic acid was major phenolic compound in all crude extracts.

Key words : phenolic, antioxidant activity, *Stemona tuberose* Lour, flavonoid

สารบัญ

บทที่		หน้า
	Executive Summary	ก
	บทคัดย่อ	ข
	Abstract	ข
1	บทนำ	1
	1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
2	หฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
3	วิธีดำเนินการวิจัย	10
	3.1 วัสดุอุปกรณ์	10
	3.2 เครื่องมือ	10
	3.3 สารเคมี	10
	3.4 วิธีการทดลอง	11
	3.4.1 การเตรียมตัวอย่างของหนอนตายหยาก	11
	3.4.2 การสกัดด้วยตัวทำละลายเพื่อศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ	11
	3.4.3 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี ดีพีพีเอช แรดิคัล สแคเวนจิง (DPPH; 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging	11
	3.4.4 3.4.4 การศึกษาปริมาณรวมของสารสำคัญประเภทสารฟีนอลิกในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากด้วยวิธีฟูลิน-ซิโอคัลเซอ คัลเลอริเมตริก (Folin-Ciocalteu Colorimetric)	13
	3.4.5 การสกัดด้วยตัวทำละลายเพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิด	15
4	ผลการทดลองและการอภิปรายผล	16
	4.1 การเตรียมตัวอย่างของหนอนตายหยาก โดยวิธีการอบที่ 70 องศาเซลเซียส	16

บทที่			หน้า
	4.2	การสกัดผงแห้งของราก ลำต้น และใบของต้นหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายเพื่อศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ	16
	4.3	การศึกษาฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging ของสารสกัดหนอนตายหยาก	17
	4.3.1	การศึกษาหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC50) ของสารมาตรฐาน BHT	17
	4.3.2	การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบหนอนตายหยาก	18
	4.4	การศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic) ในสารสกัดหยาบส่วนของราก, ลำต้น และ ใบของหนอนตายหยาก โดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric	21
	4.4.1	กราฟมาตรฐานของแกลลิคแอซิดที่ความเข้มข้นต่างๆ	21
	4.4.2	การศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆของหนอนตายหยาก	21
	4.5	การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารสำคัญประเภท สารประกอบฟีนอลิกแอซิดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิด	22
5	บทสรุป		30
	เอกสารอ้างอิง		31
	ภาคผนวก		34

สารบัญรูป

รูป		หน้า
1	โครงสร้างของ วิตามินซี	3
2	รูปที่ 2 โครงสร้างของ วิตามินอี.....	4
3	รูปที่ 3 โครงสร้างของ วิตามินเอ.....	4
4	โครงสร้างของ แคโรทีนอยด์.....	5
5	โครงสร้างของ Gingerol พบในขิง.....	5
6	โครงสร้างของ Resveratrol พบใน องุ่น	5
7	โครงสร้างของ Capsaicin พบในพริก	5
8	โครงสร้างของ Curcumin พบในขมิ้น	5
9	โครงสร้างของ deoxyclitoriacetal	6
10	สารประเภทdehydrotocopherols ทั้ง 4 ชนิด และ tocopherol	7
11	โครงสร้างของ Stilbenoids	8
12	โครงสร้างของ Neotuberostemonol	8
13	โครงสร้างของ neotuberostemoninol.....	8
14	ขั้นตอนวิธีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธีดีพีพีเอช แรดิคัล สแคเวนจิง (DPPH; 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging	13
15	กราฟแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน BHT ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	13
16	กราฟแสดงค่า %การยับยั้ง ของสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากของแต่ละส่วนที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	20
17	กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแกลลิคแอซิดที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	21
18	สภาวะในการแยกสารมาตรฐานทั้ง 12 ตัว ที่ใช้การชะแบบ Gradient elution โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของ อะซิโตไนไตรล์ และ 0.2%อะซิติกแอซิดในน้ำ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีด เท่ากับ 20 ไมโครลิตร เวลาที่ใช้ เท่ากับ 50 นาที.....	23
19	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทั้ง 12 ตัว ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280, 320 และ 360 นาโนเมตร.....	23

สารบัญรูป(ต่อ)

รูป		หน้า
20	กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน 5 ตัว คือ p-hydroxybenzoic acid (p-hyB), Luteolin (LUT), Quercetin (QUER), Cinnamic acid (CIN) และ Kaempferol (KAE) ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	24
21	กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน 7 ตัว คือ Gallic acid (GA), Catechin (CAT), Ellagic acid (Ella), Epicatechin (EPI), p-Coumaric acid (p-COU), Caffeic acid (CAF) และ Ferulic acid (Fer) ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	24
22	โครงสร้างทางเคมีของกรดฟีนอลลิกและสารฟลาโวนอยด์ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน.....	27
23	ชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลลิกและสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนเปรียบเทียบปริมาณในหน่วย มิลลิกรัม/100 กรัมแห้ง.....	29

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากต้นหนอนตายยากทั้ง 5 ชนิด...	6
2	ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ สารประเภท dehydrotocopherols ทั้ง 4 ชนิดโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน tocopherol.....	7
3	การเตรียมสารละลายมาตรฐานแกลลิคแอซิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	12
4	การเตรียมสารละลายมาตรฐานแกลลิคแอซิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	14
5	น้ำหนักและลักษณะของผงแห้งของหนอนตายหยากแต่ละส่วน.....	16
6	น้ำหนักและลักษณะของสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละส่วน.....	16
7	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงและค่า %inhibition ของสารมาตรฐาน BHT ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	17
8	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และ %การยับยั้ง ของสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากส่วนรากที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	18
9	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และ %การยับยั้ง ของสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากส่วนลำต้นที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	19
10	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และ %การยับยั้ง ของสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากส่วนใบที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	19
11	ค่ายับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากของแต่ละส่วน.....	20
12	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 1000 ppm ของสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆของหนอนตายหยาก.....	22
13	ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมดในรูปของแกลลิค แอซิด ในสารสกัดสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆของหนอนตายหยาก.....	22
14	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) ของสารมาตรฐานทั้ง 12 ตัว.....	25
15	ค่า % recovery ของสารมาตรฐานจากวิธีการวิเคราะห์.....	26
16	ค่า % recovery ของสารมาตรฐานจากวิธีการสกัด.....	27
17	เครื่องมือและสภาวะที่ใช้.....	28

ภาคผนวก

ตารางแผนกิจกรรมที่ทำได้และตารางเปรียบเทียบ output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง..... 34

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

อนุมูลอิสระ (Free Radicle) [1] คือ โมเลกุลที่ไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอน ซึ่งสารเหล่านี้จะก่อให้เกิดผลเสียต่อกระบวนการทำงานภายในร่างกาย เช่น ก่อให้เกิดความผิดในระดับเซลล์ มีผลต่อการอักเสบ และการทำลายเนื้อเยื่อในระยะสั้น หรืออาจจะส่งผลในระยะยาว ซึ่งอาจมีผลต่อความเสื่อมหรือการแก่ของเซลล์ และอาจเป็นสารการก่อมะเร็ง โรคหัวใจ โรคเกี่ยวกับสมอง และต้อกระจก ฯ อนุมูลอิสระเกิดได้ทั้งภายนอกร่างกายและภายในร่างกาย ภายนอกร่างกายเช่น การรับประทานอาหารไม่ตรงเวลา การดื่มสุรา มลพิษในอากาศ ยารักษาโรคบางชนิด รังสี ภายในร่างกายเช่น เกิดจากกระบวนการเผาผลาญอาหารของร่างกาย กระบวนการทางชีวเคมีต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ปกติแล้วร่างกายมนุษย์จะมีกลไกและวิธีการกำจัดสารพวกนี้อยู่ 2 วิธี คือ ใช้เอนไซม์ต่างๆ ในร่างกาย เช่น Superoxide dismultase (SOD) และไม่ใช้เอนไซม์ เช่น วิตามินต่างๆ สารเหล่านี้จะไม่สามารถทำลายได้หมดจึงต้องมีการสรรหาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จากแหล่งอื่นๆเพื่อให้เพียงพอกับอนุมูลอิสระที่มากเกินภายในร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระมีหลายชนิดเช่น สารประกอบฟีโนลิกส์ วิตามินซี วิตามินอี และเบต้าแคโรทีน เป็นต้น [2,3,4] โดยเฉพาะสารประกอบฟีโนลิกส์จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากภายนอก พบได้มากตามธรรมชาติและพบได้ในอาหารและเครื่องดื่มที่ได้จากพืชเช่น ผัก ผลไม้ สมุนไพร ธัญพืชต่างๆ ไวน์ เบียร์ ชา กาแฟ เป็นต้น สารประกอบฟีโนลิกส์มีมากกว่า 8000 ชนิด ซึ่งสารที่อยู่ในกลุ่มสารประกอบ ฟีโนลิกส์ได้แก่ flavonoids, flavones, gallic acid, ellagic acid, ligin, tannin, anthocyanins, carotenoids และอนุพันธ์ของ cinnamic acid [5] สารประกอบฟีโนลิกส์นอกจากจะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้วยังมีคุณสมบัติอื่นๆ เช่น ช่วยขยายหลอดเลือด ลดการอักเสบ กระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกัน ต้านมะเร็ง ต้านโรคภูมิแพ้ ทำลายเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส [3] เมื่อรับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระมากทำให้ร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นในกระแสเลือดซึ่งสามารถป้องกันอันตรายที่เกิดจากการทำลายของอนุมูลอิสระได้ ปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าหาปริมาณของสารฟีนอลลิกและสารต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพรชนิดต่างๆ หลายสายพันธุ์ ซึ่งพบว่าสมุนไพรแต่ละชนิดมีปริมาณของสารฟีนอลลิกส์และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นและให้ความสนใจในการศึกษาหาปริมาณของสารฟีนอลลิก, ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสมุนไพรที่หาได้ง่าย ราคาไม่แพงและมีสรรพคุณในการรักษาโรคใกล้เคียงหรือเทียบเท่ากับยาแผนปัจจุบัน (กลุ่มลำต้น)

ปัจจุบันได้มีนักวิจัยค้นคว้าศึกษาปริมาณของสารฟีนอลลิกส์ทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรต่างๆ เป็นจำนวนมาก ทั้งนี้เนื่องจากพืชสมุนไพรนั้นสามารถหาได้ง่ายและราคาไม่แพง เมื่อเทียบกับยาแผนปัจจุบันที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคใกล้เคียงกัน ซึ่งพบว่าพืชสมุนไพรแต่ละชนิดจะพบปริมาณของสารฟีนอลลิกส์ทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึง

มุ่งเน้นและให้ความสนใจในการศึกษาหาปริมาณของสารฟีนอลลิก, ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสมุนไพรที่หาได้ง่าย ราคาไม่แพงและมีสรรพคุณในการรักษาโรคใกล้เคียงหรือเทียบเท่ากับยาแผนปัจจุบัน

หนอนตายหยาก [6] จัดเป็นพืชสมุนไพรชนิดไม้เลื้อยตามพื้นดินหรือพาดพันตามต้นไม้อื่น หนอนตาย หยากจัดเป็นสมุนไพรที่หาง่ายและเจริญได้ตามทั่วไปและสามารถแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว ปัจจุบันหนอนตายหยากได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ทุกส่วน เช่น ราก สามารถใช้รักษาโรคผิวหนัง น้ำเหลืองเสีย ผื่นคันตามร่างกาย ฆ่าเชื้อโรคพยาธิภายใน มะเร็งตับ เป็นต้น ส่วนของใบนำมาใช้ในการรักษาอาการไอ โรควัณโรค อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีข้อมูลที่แสดงถึงปริมาณของสารฟีนอลลิกส์ทั้งหมดและสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระรวมไปถึงการวิเคราะห์สารสำคัญ เช่น สารฟีนอลลิกส์ในสมุนไพรชนิดนี้อย่างชัดเจน ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในถึงปริมาณของสารฟีนอลลิกส์ทั้งหมด, สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญประเภทสารฟีนอลลิกส์ในสารสกัดหยาบจากส่วนของราก ลำต้น และใบของหนอนตายหยาก และในงานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธีดีพีพีเอช แรดิคัล สแคเวนจิง (DPPH; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging activity เป็นวิธีที่ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัดได้ ทั้งนี้เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว [7] และจะเลือกใช้วิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric เป็นวิธีที่ศึกษาหาสารฟีนอลิกทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็วและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย และในการวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจะใช้เทคนิคโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

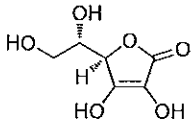
เพื่อศึกษาถึงปริมาณของสารฟีนอลลิกส์ทั้งหมด, สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญประเภทสารฟีนอลลิกในสารสกัดหยาบจากส่วนของราก ลำต้น และใบของหนอนตายหยาก

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

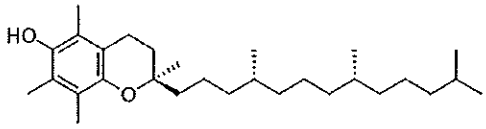
ในปัจจุบันมนุษย์เราให้ความสำคัญกับสารอนุมูลอิสระค่อนข้างมากเนื่องจากสารอนุมูลอิสระ [1] เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้มนุษย์เราเกิดโรคร้ายต่างๆ มากมายซึ่งสารอนุมูลอิสระนั้นอาจเกิดจากภายในร่างกายของเราเอง เช่น การเผาผลาญอาหาร การหายใจ การออกกำลังกายหักโหม การติดเชื้อ ความเครียด และภายนอกร่างกายคือ อาหารไหม้เกรียม สารกันบูด ยาฆ่าแมลง แสงอุลตราไวโอเลต และมลพิษต่างๆ นอกจากนั้นเมื่อคนเราอายุมากขึ้น เซลล์ในร่างกายทุกเซลล์จะผลิตอนุมูลอิสระมากขึ้นและความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระก็ลดลง จึงทำให้ร่างกายเสื่อมโทรมอย่างรวดเร็ว ซึ่งแม้ว่าร่างกายจะสร้างเอนไซม์ที่ใช้กำจัดอนุมูลอิสระได้ โดยการใช้เอนไซม์ต่างๆในร่างกาย เช่น Super oxide dismultase (SOD), Glutathione peroxidase (GPx), Catalase, Oytochrome C Peroxidase (CCP) แต่ถ้ามีอนุมูลอิสระมากเกินกว่าที่ร่างกายจะกำจัดออกไปนั้นจะทำให้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นถูกกำจัดออกไปไม่หมด จะทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อได้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องกินอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มเติมด้วย ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเสามารถพบได้ใน ผัก ผลไม้หรือ พืชสมุนไพรหลายชนิดซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) [8] คือ สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ปฏิกิริยาซิเดชันมีได้หลายรูปแบบ เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ทำให้เหล็กกลายเป็นสนิมปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ทำให้แอปเปิลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืน หรือปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดในร่างกาย เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจ ควันบุหรี่ รังสียูวี ล้วนทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายของเราซึ่งสร้างความเสียหายต่อร่างกายได้ โดยทั่วไปแล้วไม่มีสารประกอบสารใดสารหนึ่งสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้ทั้งหมด แต่ละกลไกอาจต้องใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันในการหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสี่ยงต่อโรคหลายชนิด เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคสมอง (เช่น อัลไซเมอร์) เป็นต้น รวมทั้งช่วยชะลอกระบวนการบางขั้นตอนที่ทำให้เกิดความแก่ได้ สารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ 2 ทาง คือ ลดการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกายและลดอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ แหล่งอาหารที่สำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่

วิตามินซี ที่พบใน ฝรั่ง ส้ม มะขามป้อม มะละกอสุก พริกชี้ฟ้าเขียว บล็อกโคลี ผักคะน้า ยอดสะเดา ใบปอผักหวาน ผักกาดเขียว



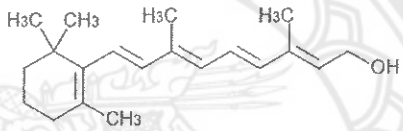
รูปที่ 1 โครงสร้างของ วิตามินซี [9]

วิตามินอี ซึ่งพบใน น้ำมันจากจมูกข้าวสาลี น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันข้าวโพด น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดอกคำฝอย เมล็ดทานตะวัน เมล็ดอัลมอนด์ จมูกข้าวสาลี



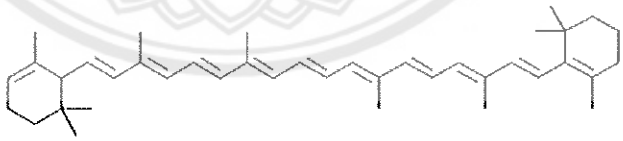
รูปที่ 2 โครงสร้างของ วิตามินอี [10]

วิตามินเอ ซึ่งพบใน ตับหมู ตับไก่ ไข่โดยเฉพาะไข่แดง น้ำนม พืชผักที่มีสีเขียวเข้ม ผลไม้**ที่มีสีเหลืองส้ม เช่น ผักตำลึง** ผักกวางตุ้ง ผักบุ้ง ฟักทอง มะม่วงสุก มะละกอสุก มะเขือเทศ



รูปที่ 3 โครงสร้างของ วิตามินเอ [11]

แคโรทีนอยด์ (บีตาแคโรทีน ลูทีน และไลโคปีน) ซึ่งพบใน ผักที่มีสีเขียวเข้ม ผลไม้ที่มีสี**เหลืองส้ม เช่น ผักตำลึง ผัก**กว้างตุ้ง ผักบุ้ง ฟักทอง มะม่วงสุก มะละกอสุก มะเขือเทศ

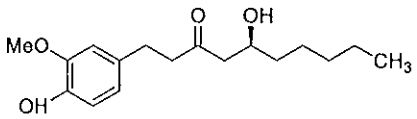


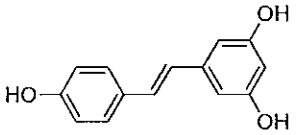
รูปที่ 4 โครงสร้างของ แคโรทีนอยด์ [12]

นอกจากนี้ยังพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระมีอีกหลายชนิด เช่น กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์ โดยสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญ สารประกอบฟีนอลิกหลายตัวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สามารถการป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง โดยสารประกอบฟี

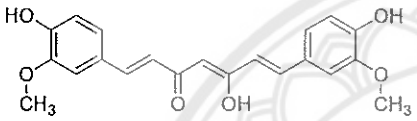
นอลิกจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ (free radical) และไอออนของโลหะที่เร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ โดยใช้ตัวเองเป็นตัวรับอนุมูลอิสระ (free radical) เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่

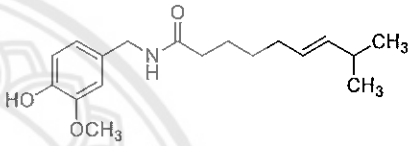
ตัวอย่างของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืช





รูปที่ 5 โครงสร้างของ Gingerol พบในขิง [13] **รูปที่ 6** โครงสร้างของ Resveratrol พบใน องุ่น [14]





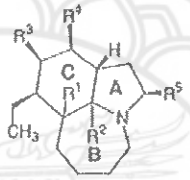
รูปที่ 7 โครงสร้างของ Capsaicin พบในพริก [15] รูปที่ 8 โครงสร้างของ Curcumin พบในขมิ้น [16]

ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสมุนไพรต่างๆ หลายสายพันธุ์รวมถึงศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัดได้จากสมุนไพรต่างๆซึ่งพบว่าพืชสมุนไพรแต่ละชนิดจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันออกไปสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นและให้ความสนใจในการศึกษาหาปริมาณของสารฟีนอลลิก, ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสมุนไพรที่หาได้ง่าย ราคาไม่แพงและมีสรรพคุณในการรักษาโรคใกล้เคียงหรือเทียบเท่ากับยาแผนปัจจุบัน โดยงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะทำการทดลองเพื่อศึกษาถึงปริมาณของสารฟีนอลลิกส์ทั้งหมดและ สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระรวมไปถึงวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญ เช่นสารฟีนอลลิกส์บางชนิดในสารสกัดหยาบสารสกัดหยาบจากส่วนของราก ลำต้น และใบของหนอนตายหยากเนื่องจากหนอนตายยากจัดเป็นสมุนไพรที่หาง่ายและเจริญได้ตามทั่วไปและสามารถแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว และมีสรรพคุณทางยาหลายอย่าง เช่น โรคผิวหนัง น้ำเหลืองเสีย ผื่นคันตามร่างกาย ฆ่าเชื้อโรคพยาธิภายใน มะเร็งตับ ลดระดับน้ำตาลสำหรับโรคเบาหวาน รวมทั้งริดสีดวง ปวดฟัน ปวดเมื่อย โดยในการศึกษาปริมาณของสารฟีนอลลิกและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากหนอนตายยากของงานวิจัยนี้จะใช้วิธี โดยวิธี Folin-ciocalteau Phenol Test และ DPPH Free radical scavenging ตามลำดับ ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และ ราคาไม่แพง โดยวิธี Folin-ciocalteau จะเป็นการคำนวณปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด เทียบจากกราฟมาตรฐานของ gallic acid และเทคนิค DPPH Free radical scavenging เป็นเทคนิคที่ศึกษาเกี่ยวกับการลดลงของปริมาณอนุมูลอิสระ โดยจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm นอกจากนี้งานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญประเภท

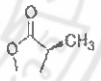
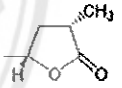
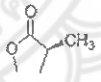
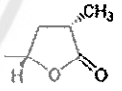
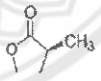
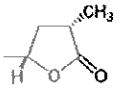
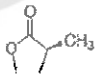
สารฟีนอลลิกส์ในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากโดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

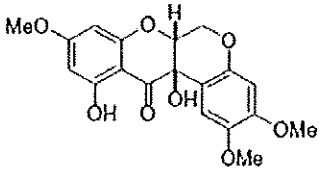
จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากต้นหนอนตายหยากมาบ้างแล้วเช่น ในปี ค.ศ 2003 Chung และคณะ [17] ได้มีการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากต้นหนอนตายยากได้ 5 ชนิด (ตารางที่ 1)คือ neotuberostemonine (1) tuberostemonine J (2) tuberostemonine H (3) epi-bisdehydrotuberostemonine J (4) และ neostenine (5) และศึกษาฤทธิ์ในการระงับการไอขององค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากของสารสกัดหยาบเมทานอลของรากของหนอนตายยากพบว่า สาร neotuberostemonine (1) และ neostenine (5) สามารถแสดงฤทธิ์ในการระงับการไอได้ดีพอสมควร



ตารางที่ 1 โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากต้นหนอนตายยากทั้ง5 ชนิด

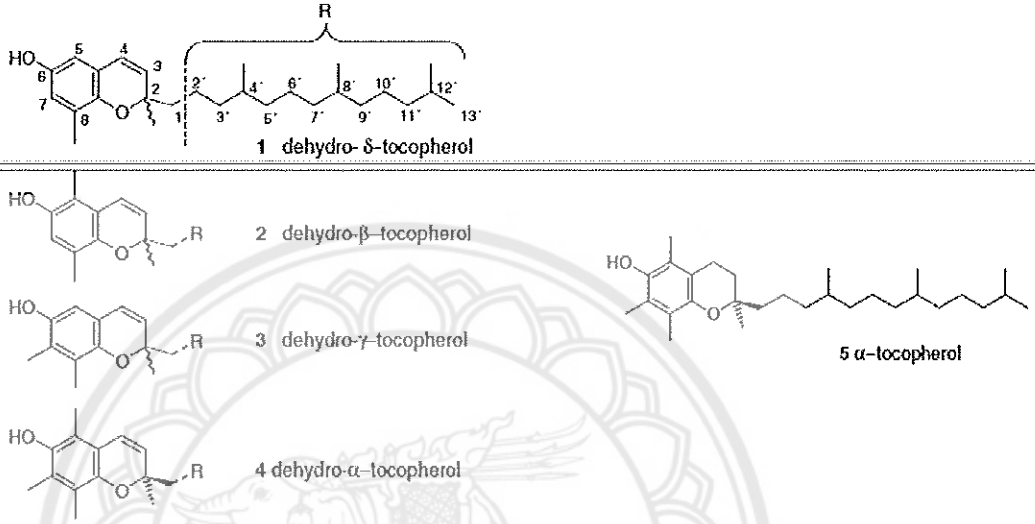
Compound	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
1	—H	—H			
2	···H	···H			
3	—H	···H			
5	—H	—H			—H

ในปีเดียวกัน Roengsumran S. และคณะ[18] พบว่าสารประกอบคาร์โรทีนอยด์ 6-deoxyclitoriacetal ที่สกัดได้จากรากต้นหนอนตาย มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ในขณะที่สารประกอบคาร์โรทีนอยด์อื่น ๆ เช่น Stemonal Stemonacetal และ Stemonone ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง



รูปที่ 9 โครงสร้างของ deoxyclitoriacetal

ในปี ค.ศ. 2004 Greger และคณะ [19] ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ สารประเภทdehydrotocopherols 4 ชนิด (รูปที่ 10) ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จากลำต้นของหนอนตายยากโดยใช้วิธี DPPH Free radical scavenging พบว่าสารดังกล่าวแสดงสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันออกไปเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานชนิด Tocopherol ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 10 สารประเภทdehydrotocopherols ทั้ง 4 ชนิด และ tocopherol

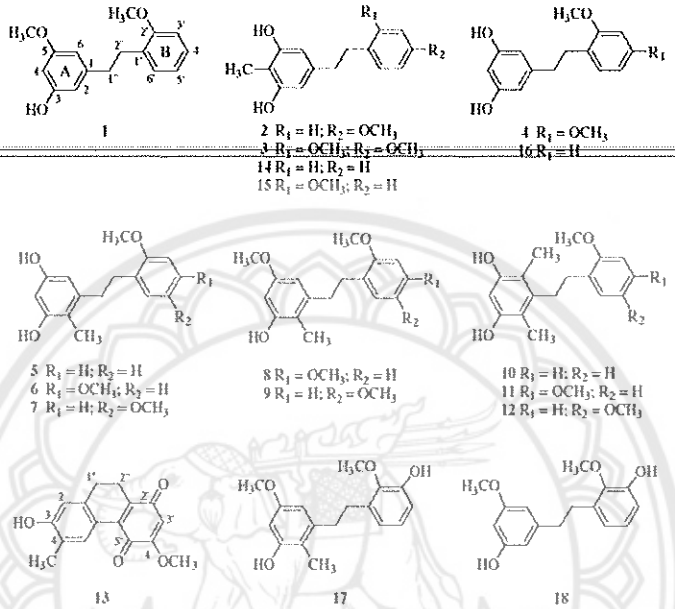
ตารางที่ 2 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ สารประเภท dehydrotocopherols ทั้ง 4 ชนิดโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน tocopherol

Compounds	EC_{50} (95% FL[b]) (μM)	EC_{50} (95% FL[b]) (ppm)
Dehydro-δ-tocopherol (1)[c]	25 (21.5–29.0)	10 (8.6–11.6)
Dehydro-β-tocopherol (2)[d]	25 (21.2–28.2)	10 (8.8–11.7)
Dehydro-γ-tocopherol (3)[e]	21 (14.5–29.2)	9 (6.1–12.1)
Dehydro-α-tocopherol (4)[f]	22 (15.9–30.8)	9 (6.8–13.2)
α-Tocopherol (5)	20 (17.6–22.8)	9 (7.6–9.8)

[a] An ethanolic DPPH· solution with a final concentration of 100 μM was mixed with different concentrations of tocopherols and the absorbance change at 550 nm was measured in a time course with an ELISA-reader. Inhibition of coloration was expressed as percentage, and EC_{50} values were obtained from inhibition curves after 90 min reaction time.
[b] Fiducial limits.
[c] Contaminated with 4% δ-tocopherol.
[d] 10% β-tocopherol.
[e] 1% γ-tocopherol.
[f] 20% α-tocopherol.

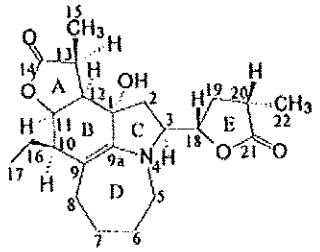
นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2007 Li และคณะ [20] ได้มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย 4 ชนิดคือเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เอทิล อะซิเตทและเมทานอลจาก

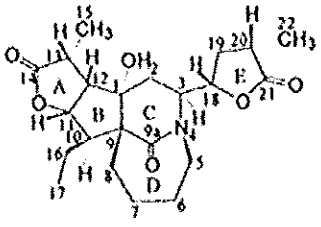
รากของหนอนตายยาก พบว่าสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนแสดงฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งได้ที่สุด และในปี เดียวกันนี้ Li-Gen Lin และคณะ [21] ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านทานไวรัสของสารกลุ่ม stilbenoids จำนวน 17 ชนิด (รูปที่ 11) ที่แยกได้จากรากของต้นหนอนตายหยาก พบว่า Dihydrostilbene สามารถออกฤทธิ์ต้านทานได้ดีที่สุดกับเชื้อไวรัส Bacillus pumilus (MIT 12.5–25 lg/mL) ส่วนในการทดสอบกับสารตัวอื่นสามารถออกฤทธิ์ต้านทานไวรัสได้ในระดับปานกลาง



รูปที่ 11 โครงสร้างของ Stilbenoids

นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2013 Chaliewchalad และคณะ[22] ได้มีงานวิจัยที่ศึกษาถึงฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัสประเภท herpes simplex viruses (HSV) จากสารสกัดหยาบในส่วนของตัวทำละลายเอทานอลของต้นหนอนตายยาก พบว่าสารสกัดหยาบนี้แสดงสมบัติในทำลายเชื้อไวรัสประเภท herpes simplex viruses (HSV) ได้ดีพอสมควรและในปี ค.ศ. 2002 Mak และคณะ [23] ได้ทำการแยกสารสำคัญประเภทอัลคาลอยด์คือ neotuberostemonol และ neotuberostemoninol จากต้นหนอนตายหยาก





รูปที่ 12 โครงสร้างของ Neotuberostemonol **รูปที่ 13** โครงสร้างของ neotuberostemoninol

จากงานวิจัยบางส่วนที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่ายังไม่ค่อยมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาถึงปริมาณของสารฟีนอลลิกส์ทั้งหมดและ สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระรวมไปถึงการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญ เช่นสารฟีนอลลิกส์ของสารสกัดจากต้นหนอนตายยากย่างชัดเจน ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนและเป็นระบบมากขึ้น งานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะศึกษาถึงปริมาณของสารฟีนอลลิกทั้งหมดและสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระรวมไปถึงวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญ เช่นสารฟีนอลลิกส์ของสารสกัดหยาบจากส่วนของราก ลำต้น และใบของหนอนตายหยาก โดยในการศึกษาปริมาณของสารฟีนอลลิกและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนของราก ลำต้น และใบของหนอนตายหยาก ของงานวิจัยนี้จะใช้วิธี โดยวิธี Folin-ciocalteau Phenol Test และ DPPH Free radical scavenging ตามลำดับ ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และ ราคาไม่แพง โดยวิธี Folin-ciocalteau จะเป็นการคำนวณปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด เทียบจากกราฟมาตรฐานของ gallic acid และเทคนิค DPPH Free radical scavenging เป็นเทคนิคที่ศึกษาเกี่ยวกับการลดลงของปริมาณอนุมูลอิสระ โดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงโดยทั่วไปของสารละลาย DPPH ใน ethanol จะเป็นสารละลายสีม่วงซึ่งจัดเป็นสารละลายอนุมูลอิสระที่เสถียร โดยจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ถ้าสารที่มีฤทธิ์ในการดักจับสารละลาย DPPH ฟรีแรดดิคัลได้ดีหรือให้ free radical กับสารละลาย DPPH ฟรีแรดดิคัลได้ดี จะเกิดเป็นสารประกอบที่เสถียรขึ้นทำให้สารละลาย DPPH ฟรีแรดดิคัลมีสีจางลงทำโดยศึกษาจากค่ากรดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm. นอกจากนี้ในการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญประเภทสารฟีนอลลิกของสารสกัดหยาบจะใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100 มิลลิลิตร
2. ขวดก้นกลม (Round bottom flask) ขนาด 50, 100 มิลลิลิตร
3. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 10, 25, 50, 100 มิลลิลิตร
4. หลอดทดลอง (Test tube)
5. หลอดหยด (Dropper)
6. ไมโครปิเปต (Micro pipate) ขนาด 200, 500, 1000 ไมโครลิตร
7. ช้อนตักสาร (Spatula)
8. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
9. ที่วางหลอดทดลอง (Rack)
10. ปิเปต ขนาด 1, 10 มิลลิลิตร (pipette)
11. หลอดเซนตริฟิวก์ (Centrifuge tube)

3.2 เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งสี่ตาแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BS 2245
2. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) ยี่ห้อ Buchi Rotarator รุ่น R-114
3. เครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) ยี่ห้อAgilent technologies รุ่น1200 series
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ sigma 203
5. เครื่อง ยูวีวิสสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Ultraviolet visible spectrophotometer: UV-Vis) ยี่ห้อ Jusco รุ่น V-650

3.3 สารเคมี

1. บีเอชเอ (Butylated hydroxyanisole; BHA, $C_{11}H_{16}O_2$, ACROS)
2. เมทานอล (Methanol; CH_2OH, Labscan)
3. เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate; $C_4H_8O_2$, Labscan)
4. ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether; $(CH_3CH_2)_2O$, Labscan)

5. 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริวไฮดราซิล (2,2-Diphenyl-2-picrylhydrazyl; DPPH, $C_{18}H_{12}N_5O_6$, Fluka)
6. แกลลิคแอซิด (Gallic acid; $C_7H_6O_5$, Fluka)
7. อะซิติกแอซิด (Acetic acid; $C_2H_4O_2$, glacial AR Grad, Labscan)
8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH, CARLO)
9. โฟลิน (Folin-Ciocalteu's reagent, MERCK)
10. โซเดียม คาร์บอเนต (Sodium carbonate; Na_2CO_3, CARLO ERBA)
11. 2,6-ไดเตอร์ทบิวทิว-4-เมทิลฟีนอล (BHT, Fluka)
12. เอทานอล (ethanol; C_2H_5OH, labscan)
13 .แอสคอบิค แอซิด (L-(+) Ascorbic acid, $C_6H_8O_6$, CARLO ERBA)
14. อีดีทีเอ (Ethylene-diamine-tetraacetic acid; EDTA, $C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8.2H_2O$, CARLO ERBA)
15. 37%ไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; 37%HCl, CARLO ERBA reagent

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมตัวอย่างของหนอนตายหยาก

แยกส่วนราก ลำต้น และใบของหนอนตายยาก จากนั้นนำส่วนของราก ลำต้น และใบของหนอนตายหยากแต่ละชนิดที่ตากแห้งแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด เมื่อได้ตัวอย่างส่วนของราก ลำต้น และใบของหนอนตายหยากที่ละเอียดแล้วให้นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

3.4.2 การสกัดด้วยตัวทำละลายเพื่อศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

นำส่วนของราก ลำต้นและใบของหนอนตายหยากแต่ละชนิดมาสกัดด้วย 1% อะซีติก แอซิด (1% acetic acid) ในเมทานอล จากนั้นทำการแยกสารชั้นอินทรีย์เก็บไว้ ทำเช่นเดียวกันจนครบ 3 ครั้ง เมื่อครบแล้วนาสารชั้นอินทรีย์ที่ได้ทั้ง 3 ครั้งมารวมกัน และทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกจะได้สารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิด

3.4.3 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี ดีพีพีเอช แรดิคัล สแคเวนจิง (DPPH; 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging

การทดสอบด้วยวิธีนี้จะนำสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ที่มีความเข้มข้น 3mM ในเอทานอลไปผสมกับสารที่ตัวอย่าง โดยใช้ 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) เป็นสาร

เปรียบเทียบมาตรฐาน (positive control) ความเข้มข้นของสารตัวอย่างเป็นดังนี้ 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 ppm จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm โดยใช้เอทานอลเป็น blank โดย ดังแสดงในรูปที่ 14

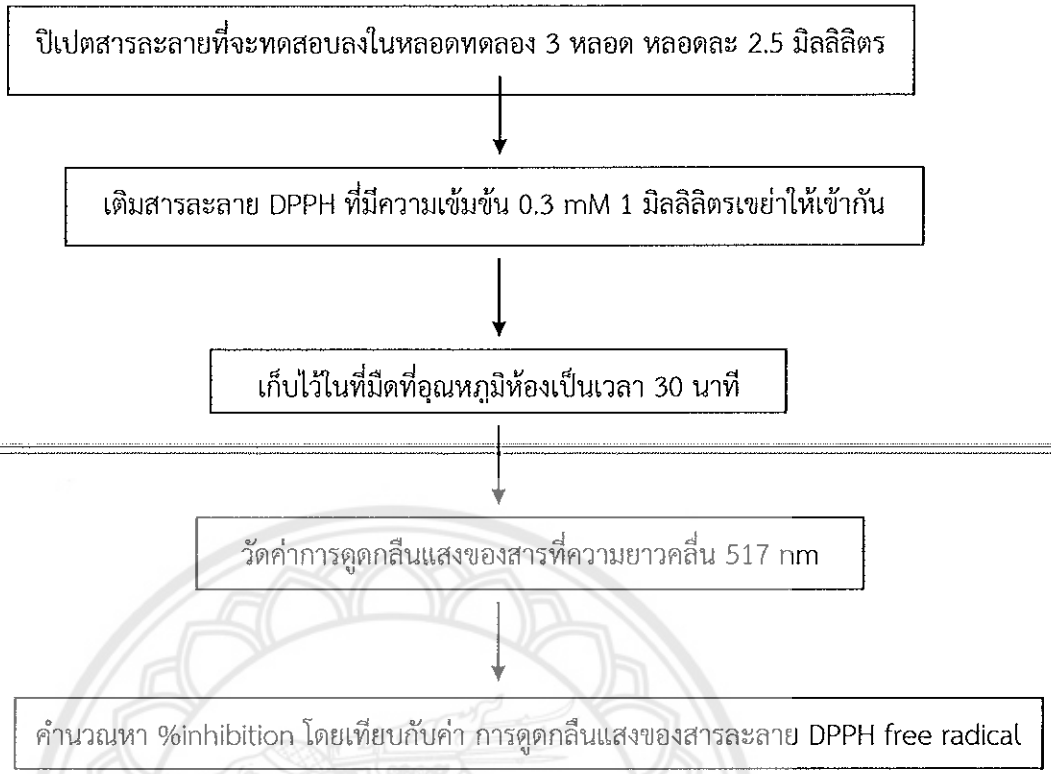
วิธีการเตรียมสาร

1. ชั่งสารสกัดหยาบแต่ละชนิดมา 0.0030 กรัม ละลายใน เอทานอล (ethanol) 3 มิลลิลิตร
2. ชั่ง ดีพีพีเอช (DPPH) 0.0059 กรัม ละลายในเอทานอล (ethanol) ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร สำหรับ ดีพีพีเอช (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระ ถ้าหากได้รับแสงอาจจะทำให้สลายตัวได้จึงต้องใช้กระดาษฟอยล์ห่อหุ้มหลอดทดลอง ดีพีพีเอช (DPPH)
4. เตรียมความเข้มข้นของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดดังตาราง 3

ตาราง 3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแกลลิคแอซิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (ppm)	ปริมาตรสารตัวอย่าง (ml)	เอทานอล (ml)
0	0	10
100	1	9
200	2	8
300	3	7
400	4	6
500	5	5
600	6	4
700	7	3

5. ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วย เอทานอล



รูปที่ 14 ขั้นตอนวิธีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธีดีพีพีเอช **แรดิคัล สแคเวนจิง** (DPPH; 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging

สูตรที่ใช้ในการคำนวณหา เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition)

(ค่าการดูดกลืนแสงของสาร)/(ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH) x100 = % activity

100 - %activity = % inhibition

3.4.4 การศึกษาปริมาณรวมของสารสำคัญประเภทสารฟีนอลิกในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากด้วยวิธีฟูลิน-ซิโอคัลเซอ คัลเลอริเมตริก (Folin-Ciocalteu Colorimetric)

วิธีการเตรียมสาร

ก. สารละลายของสารสกัดหยาบ: นำสารสกัดหยาบแต่ละชนิด 0.005 กรัม มาละลายด้วยเมทานอล (CH_3OH) จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของสารละลายคิดเป็น 1000 ppm)

ข. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต: นำโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 3.750 กรัมมาละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของสารละลายคิดเป็น 7.5 % โดยน้ำหนัก)

ค. สารละลายโฟลิน : นำสารละลายโฟลิน (Folin-Ciocalteu's reagent) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาละลายด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10

ง. สารละลายมาตรฐานแกลลิคแอซิด : นำแกลลิคแอซิด (Gallic acid) 0.005 กรัมมาละลายด้วยเมทานอล แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของสารละลายคิดเป็น 1000 ppm) เพื่อใช้เป็นสารละลายเริ่มต้น (Stock solution) จากนั้นเตรียมความเข้มข้นสารละลายแกลลิคแอซิดให้เป็น 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 ppm ตามลำดับ โดยการปิเปตสารละลายแกลลิคแอซิดจากสารละลายเริ่มต้นมา 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 10 มิลลิลิตร แสดงดังตาราง 4

ตาราง 4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแกลลิคแอซิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (ppm)	ปริมาตรสารละลายแกลลิคแอซิดจากสารละลายเริ่มต้น (mL)	ปริมาตรเมทานอล (mL)
70	0.7	9.3
60	0.6	9.4
50	0.5	9.5
40	0.4	9.6
30	0.3	9.7
20	0.2	9.8
10	0.1	9.9

การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแกลลิคแอซิด

ผสมสารละลายแกลลิคแอซิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ตาราง 2.1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายโฟลินปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 % โดยน้ำหนัก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็นสารละลายแบลงค์ (Blank) โดยการทดลองจะทำทั้งหมด 5 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ระหว่างค่าความเข้มข้น (Concentration, ppm) เป็นแกน X และค่าการดูดกลืนของแสง (Absorbance) ที่ 765 นาโนเมตร เป็นแกน Y เพื่อใช้ในการคำนวณ เทียบหาปริมาณรวมของสารฟีนอลิคในสารสกัดหยาบของผงผักตัวอย่าง

3.4.5 การสกัดด้วยตัวทำละลายเพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิด

นำส่วนของราก ลำต้น และใบของหนอนตายหยากที่ทำการบดเรียบร้อยแล้ว มาสกัดด้วยตัวทำละลาย เมทานอล (Methanol) ที่มีอัตราส่วนของ 2 กรัมต่อลิตร ของบิวทิเลเตดไฮดรอกซีอะนีโซล (Butylated hydroxyanisole BHA) และ 10% อะซิติกแอซิด (10% acetic acid) ในอัตราส่วน (85:15) จากนั้นนำสารสกัดมาทำการคนด้วยเครื่องกวนสาร จากนั้นนำสารสกัดมาปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการสกัดด้วยสารละลายส่วนผสมของ แอสคอบิคแอซิด (ascorbic acid) และ ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA) และ NaOH จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ มาทำการปรับค่า pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc. HCl) และสกัดด้วย ส่วนผสมระหว่าง ไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) และ เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) จากนั้นแยกเอาชั้นสารอินทรีย์เก็บไว้เป็นส่วนที่ 1 และนำอีกส่วนที่เหลือมาเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc. HCl) และนำไปต้ม ที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำสารมาสกัดด้วย ส่วนผสมระหว่าง ไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) และ เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate ตั้งทิ้งไว้ให้แยก จากนั้นทำการแยกชั้นอินทรีย์มารวมกับชั้นอินทรีย์ส่วนที่ 1 และนำชั้นของสารอินทรีย์ที่รวมกันแล้วมาทำการระเหยตัวทำละลายออก ก็จะได้สารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิด จากนั้นนำสารสกัดทำการปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล (Methanol) เพื่อนำไปวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกโดยเทคนิค HPLC

บทที่ 4
ผลการทดลองและการอภิปรายผล

4.1 การเตรียมตัวอย่างของหนอนตายหยาก โดยวิธีการอบที่ 70 องศาเซลเซียสพบว่าได้ผลการทดลองดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 น้ำหนักและลักษณะของผงแห้งของหนอนตายหยากแต่ละส่วน

ส่วนของหนอนตายหยาก	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	% ผงพืช	ลักษณะผงพืช
ราก	200	19.4504	9.73	สีน้ำตาลอ่อน
ลำต้น	200	16.8930	8.45	สีน้ำตาลอ่อน
ใบ	200	13.5119	6.76	สีเขียวเข้ม

4.2 การสกัดผงแห้งของราก ลำต้น และใบของต้นหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายเพื่อศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

นำสารตัวอย่างหนอนตายหยากทั้ง 3 ส่วนที่เป็นผงแห้งมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 1%อะซิติกแอซิดในเมทานอล โดยทำการสกัด 3 ครั้ง ครั้งละ 15.00 มิลลิลิตร แล้วระเหยตัวทำละลายออกและมาทำให้แห้งโดยวิธีการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) พบว่าได้ผลการทดลองดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 น้ำหนักและลักษณะของสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละส่วน

ส่วนของหนอนตายหยาก	น้ำหนักผงแห้ง(กรัม)	น้ำหนักของสารสกัดหยาบ (กรัม)	%สารสกัดหยาบ	ลักษณะของสารสกัดหยาบ
ราก	1.0352	0.5872	56.72	สีน้ำตาลเข้ม
ลำต้น	1.0415	0.6535	62.75	สีน้ำตาลเข้ม
ใบ	1.0342	0.5428	52.49	สีเขียวเข้ม

4.3. การศึกษาฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging ของสารสกัดหนอนตายหยาก

วิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging เป็นวิธีการวัดความสามารถของสารตัวอย่างในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยการใช้ไฮโดรเจนฟรีแรดิคัล กับ DPPH ฟรีแรดิคัล ซึ่งโดยทั่วไปสารละลาย DPPH ฟรีแรดิคัลจะมีสีม่วงที่คงตัว แต่ถ้ามีสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระคือให้ไฮโดรเจนฟรีแรดิคัล กับ DPPH ฟรีแรดิคัล สีม่วงจางลงหรือเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองสามารถตรวจสอบได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm จากนั้นนำไปหาค่าการยับยั้ง (%inhibition) จากการนำสารสกัดหยาบหนอนตายหยากทั้ง 3 ส่วน มาทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging โดยเทียบกับสารมาตรฐานของ BHT ผลการทดลองเป็นดังนี้

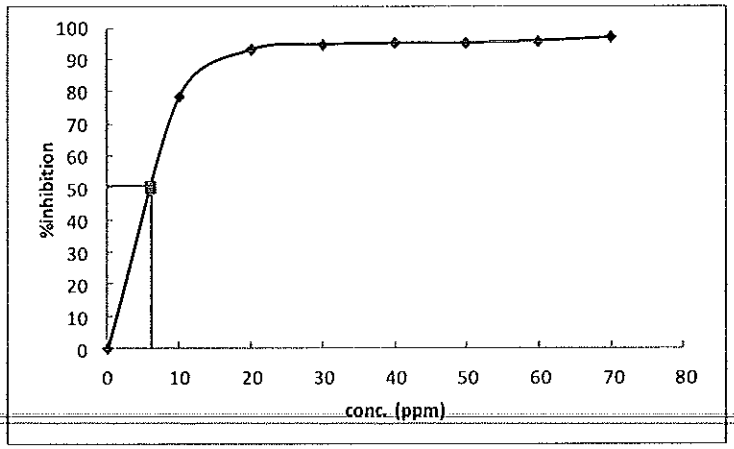
4.3.1 การศึกษาหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของสารมาตรฐาน BHT

จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ BHT ความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 517 nm ได้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงและค่า %inhibition ของสารมาตรฐาน BHT ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางแสดงการทดสอบด้วย DPPH ของสารมาตรฐาน BHT					%การยับยั้ง
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
0	1.0425	1.0687	1.0222	1.0445	0.00
10	0.2297	0.2229	0.2162	0.2229	78.66
20	0.0671	0.0704	0.0771	0.0715	93.15
30	0.0576	0.0535	0.0527	0.0546	94.77
40	0.0539	0.0475	0.0499	0.0504	95.17
50	0.0463	0.0506	0.0525	0.0498	95.23
60	0.0348	0.0479	0.0462	0.0429	95.89
70	0.0321	0.0308	0.0313	0.0314	96.99

จากตารางที่ 7 เมื่อนำมาพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่า %inhibition จะได้กราฟดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 กราฟแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน BHT ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากกราฟจะเห็นได้ว่า ค่า %inhibition ของ BHT จะเพิ่มขึ้นจากความเข้มข้นต่ำไปสูงและจะเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้น 20 ppm เป็นต้นไปความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของ BHT เริ่มคงที่เมื่อความเข้มข้นของ BHT ที่ 20 ppm ดังนั้นจากกราฟสามารถหาค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระของ BHT ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ได้ เท่ากับ 6.00 ppm

4.3.2 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบหนอนตายหยาก

จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบหนอนตายหยากทั้ง 3 ส่วน ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 8, 9 และ 10

ตารางที่ 8 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และ %การยับยั้ง ของสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากส่วนรากที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm				%การยับยั้ง
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
0	0.403	0.400	0.402	0.402	0.00
100	0.367	0.368	0.368	0.368	8.47
200	0.303	0.301	0.300	0.301	24.53
300	0.254	0.226	0.240	0.240	40.22
400	0.210	0.199	0.205	0.205	49.07
500	0.163	0.153	0.158	0.158	60.65
600	0.129	0.115	0.122	0.122	69.61
700	0.081	0.078	0.080	0.080	80.20

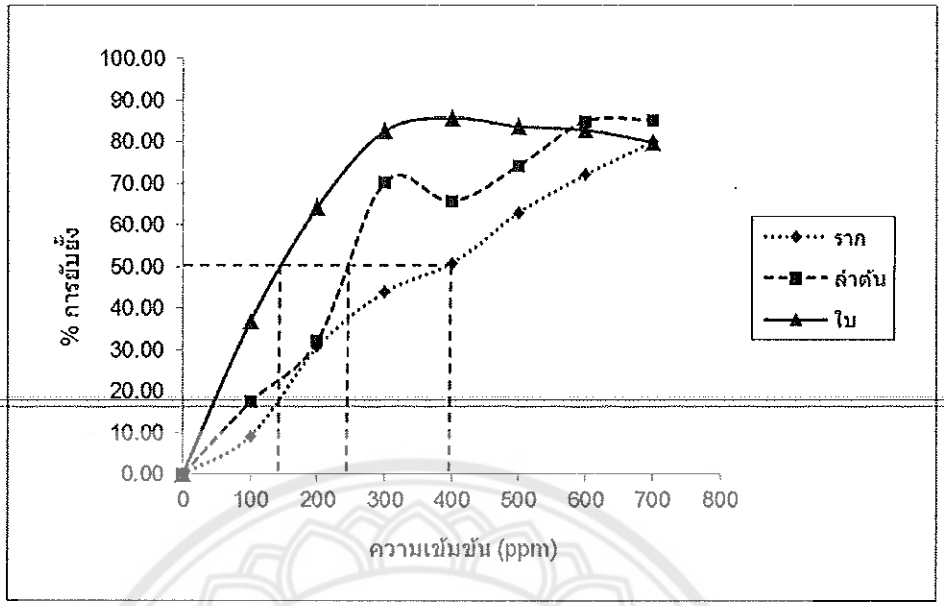
ตารางที่ 9 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และ %การยับยั้ง ของสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากส่วนลำต้นที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm				%การยับยั้ง
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
0	0.403	0.419	0.400	0.407	0.00
100	0.307	0.364	0.338	0.336	17.42
200	0.266	0.285	0.277	0.276	32.24
300	0.131	0.124	0.107	0.121	70.37
400	0.136	0.144	0.138	0.139	65.79
500	0.113	0.107	0.095	0.105	74.22
600	0.058	0.062	0.063	0.061	85.02
700	0.073	0.054	0.053	0.060	85.27

ตารางที่ 10 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และ %การยับยั้ง ของสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากส่วนใบที่ความเข้มข้นต่างๆ

การทดสอบด้วย DPPH ของสารสกัดใบของต้นหนอนตายหยาก					%การยับยั้ง
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
0	0.403	0.400	0.401	0.401	0.00
100	0.286	0.260	0.273	0.273	32.01
200	0.151	0.155	0.153	0.153	61.89
300	0.075	0.071	0.073	0.073	81.82
400	0.060	0.062	0.061	0.061	84.81
500	0.063	0.066	0.064	0.064	83.94
600	0.073	0.074	0.073	0.073	81.69
700	0.078	0.079	0.078	0.078	80.45

เมื่อนำข้อมูลจากตารางที่ 8, 9 และ 10 พลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร (ppm) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) ของสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากของแต่ละส่วน จะได้กราฟดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 กราฟแสดงค่า %การยับยั้ง ของสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากของแต่ละส่วนที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากกราฟจะเห็นได้ว่า ค่า %การยับยั้ง ของสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากของแต่ละส่วนจะเพิ่มขึ้นจากความเข้มข้นต่ำไปสูง และจากกราฟสามารถหาค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดพริกหวานที่เตรียมจากการอบที่ความเข้มข้นต่างๆทั้ง 3 ชนิด ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ได้ดัง ตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ค่ายับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากของแต่ละส่วน

ชนิดของสารสกัดหยาบ	ค่า IC_{50} (ppm)
ราก	398.7
ลำต้น	237.8
ใบ	132.07

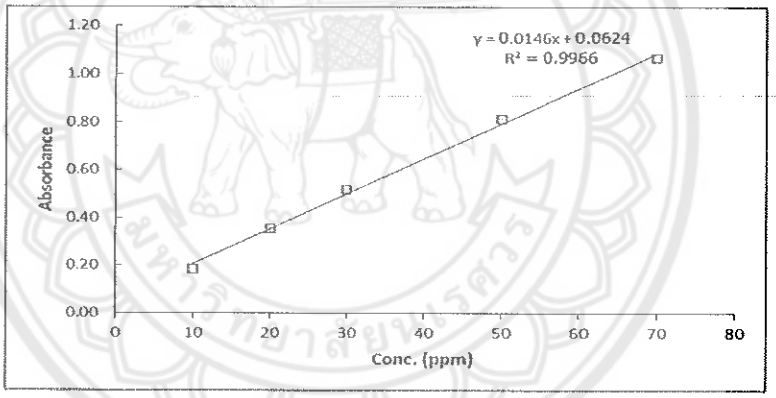
จากค่ายับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากของแต่ละส่วน พบว่าสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากในส่วนของใบมีสมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุด โดยจะมีค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 132.07 ppm รองลงมาคือ สารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากในส่วนของลำต้นและราก ตามลำดับ

4.4 การศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic) ในสารสกัดหยาบส่วนของราก, ลำต้น และ ใบของหนอนตายหยาก โดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric

การหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric อาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด กับ สารละลาย Folin-Ciocalteu ที่ประกอบด้วย phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดยหมู่ไฮดรอกซิลของสารฟีนอลิกของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm โดยในการศึกษาศึกษาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกจะทำการเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานของแกลลิค แอซิด

4.4.1 กราฟมาตรฐานของแกลลิคแอซิดที่ความเข้มข้นต่างๆ

ในการศึกษาหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยจะเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแกลลิค แอซิด ได้ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานแกลลิค แอซิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไว้แล้ว ดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแกลลิคแอซิดที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากกราฟมาตรฐานที่แสดงข้างต้นนี้จะนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมดที่อยู่ในสารสกัดหยาบส่วนของรากของหนอนตายหยาก

4.4.2 การศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆของหนอนตายหยาก

จากการหาสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของสารสกัดหยาบหนอนตายหยากทั้ง 3 ส่วน ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 1000 ppm ของสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆของหนอนตายหยาก

ชนิดของสารสกัดหยาบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
ราก	0.1785	0.1732	0.1764	0.1760
ลำต้น	0.6022	0.5931	0.6050	0.6001
ใบ	0.1842	0.1863	0.1854	0.1853

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆของหนอนตายหยากนำไปเทียบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในรูปของแกลลิคแอซิดจากกราฟมาตรฐานจะได้ผลดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมดในรูปของแกลลิค แอซิด ในสารสกัดสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆของหนอนตายหยาก

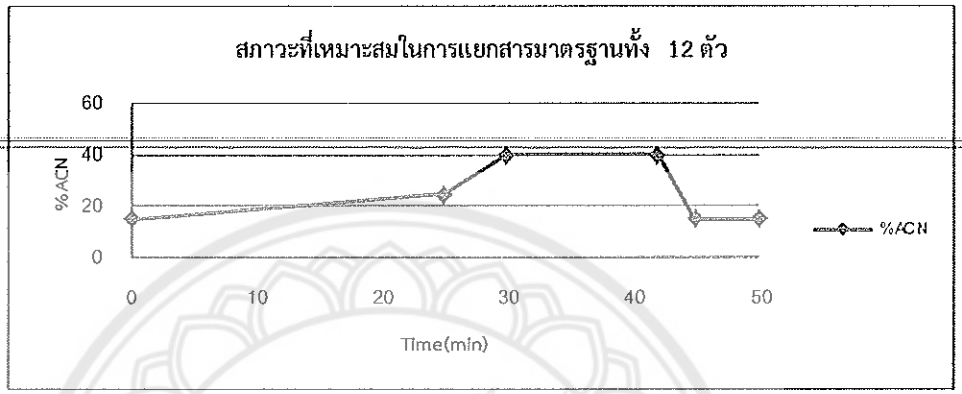
ชนิดของสารสกัดหยาบ	ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมดในรูปของแกลลิค แอซิด (ppm)
ราก	7.753
ลำต้น	15.584
ใบ	8.213

จากตารางที่ 13 พบว่าสารสกัดหยาบในส่วนของลำต้นของหนอนตายหยาก มีปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมดในรูปของแกลลิค แอซิดมากที่สุดคือ 15.584 ppm รองลงมาคือสารสกัดหยาบในส่วนของใบของหนอนตายหยากคิดเป็น 35.78 ppm และ สารสกัดหยาบในส่วนของรากของหนอนตายหยาก คิดเป็น 8.213 ppm ตามลำดับ

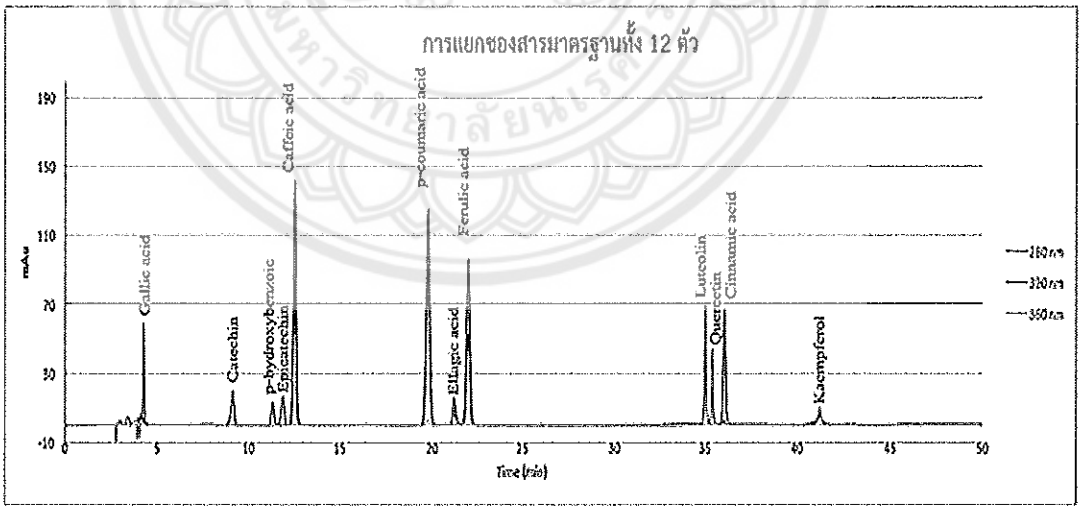
4.5 การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารสำคัญประเภท สารประกอบฟีนอลิกแอซิดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิด

4.5.1 การศึกษาหาชนิดและปริมาณของสารสำคัญของสารประกอบฟีนอลิกแอซิด และสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยเทคนิค HPLC นี้จะทำการเทียบกับสารมาตรฐานที่ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกแอซิด 7 ตัว คือ Gallic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, Ellagic acid, Caffeic acid, *p*-Coumaric acid, Ferulic acid และ Cinnamic acid สารประกอบฟลาโวนอยด์ 5 ตัว คือ Catechin, Epicatechin, Luteolin, Quercetin และ Kaempferol โดยจะทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงของสารที่

ความยาวคลื่น 3 ตำแหน่งคือ 280, 320 และ 360 นาโนเมตร และสภาวะที่ใช้ในการศึกษาคือ สารละลายผสมระหว่าง อะซิโตไนไตรล์ กับ 0.2%อะซิติกแอซิดในน้ำ ด้วยอัตราส่วนที่แตกต่างกันออกไปเป็นเฟสเคลื่อนที่ พบว่าสภาวะในการแยกสารมาตรฐานทั้ง 12 ตัวใช้แบบ Gradient elution ของสารละลายผสมอะซิโตไนไตรล์ และ 0.2% อะซิติกแอซิดในน้ำ ซึ่งอัตราส่วนที่ได้เป็นดัง**รูปที่** 18 และสามารถแยกสารมาตรฐานทั้ง 12 ตัวได้อย่างชัดเจนดังโครมาโตรแกรม**รูปที่** 19



รูปที่ 18 สภาวะในการแยกสารมาตรฐานทั้ง 12 ตัว ที่ใช้การชะแบบ Gradient elution โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของ อะซิโตไนไตรล์ และ 0.2%อะซิติกแอซิดในน้ำ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีด เท่ากับ 20 ไมโครลิตร เวลาที่ใช้ เท่ากับ 50 นาที



รูปที่ 19 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานทั้ง 12 ตัว ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280, 320 และ 360 นาโนเมตร

จ QD
341
ร5
2560

4.5.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) โดยวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้ง 12 ตัว ที่ความเข้มข้นต่ำจำนวน 7 ซ้ำ พบว่าได้ผลการทดลองดังตารางที่ 14

1 ธ.ค. 2562

ตารางที่ 14 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) ของสารมาตรฐานทั้ง 12 ตัว

ค่า LOD และ LOQ ของสารมาตรฐานทั้ง 12 ตัว												
	0.97	0.89	0.99	0.58	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
R^2	98	38	71	74	64	86	17	80	74	81	85	86
ครั้งที่	ความเข้มข้น (ppm)											
	GA	CAT	*p*-hyB	EPI	CAF	*p*-COU	Ella	Fer	LUT	QUER	CIN	KAE
1	4.70	4.70	1.92	3.91	4.74	4.80	4.77	4.74	1.92	1.97	1.92	2.03
2	4.67	4.84	1.95	4.10	4.83	4.93	4.63	4.85	1.92	1.95	1.97	1.98
3	4.71	4.84	1.95	4.05	4.84	4.93	4.64	4.86	1.90	1.94	1.98	1.94
4	4.67	4.86	1.97	4.17	4.86	4.98	4.59	4.90	1.87	1.90	2.00	1.88
5	4.33	4.63	1.95	3.92	4.74	4.87	4.42	4.79	1.87	1.88	1.96	1.91
6	4.84	5.16	2.03	4.42	4.97	5.13	4.63	5.04	1.96	1.96	2.05	2.01
7	4.87	5.31	2.07	4.66	5.00	5.17	4.59	5.08	1.97	1.97	2.07	2.06
AVG.	4.68	4.90	1.98	4.18	4.85	4.97	4.61	4.89	1.92	1.94	1.99	1.97
SD	0.18	0.24	0.05	0.27	0.10	0.13	0.11	0.12	0.04	0.03	0.05	0.07
LOD	0.55	0.77	0.17	0.86	0.31	0.41	0.33	0.39	0.12	0.11	0.16	0.21
LOQ	1.75	2.44	0.54	2.74	1.00	1.32	1.05	1.24	0.39	0.35	0.52	0.66

*p-hyB=*p*-hydroxybenzoic acid, LUT= Luteolin, QUER=Quercetin, CIN=Cinnamic acid, KAE= Kaempferol, GA= Gallic acid, CAT=Catechin, EPI=Epicatechin, CAF=Caffeic acid, *p*-COU=*p*-Coumaric acid, Ella=Ellagic acid, Fer=Ferulic acid

ตัวอย่างการคำนวณค่า LOD และ LOQ

จากค่า SD ของ Caffeic acid มีค่าเท่ากับ 0.10

$$LOD = 3.14 \times SD$$

$$= 3.14 \times 0.10 = 0.31$$

$$LOQ = 10 \times SD$$

$$= 10 \times 0.10 = 1.00$$

4.5.4 การหาค่า % recovery ของสารมาตรฐาน

การทดลองนี้แบ่งเป็น 2 วิธี ดังนี้

ก. การหาค่า % recovery ของสารมาตรฐานจากวิธีการวิเคราะห์

การทดลองทำได้โดยเติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 12 ชนิด ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนลงในสารละลายสกัดผงผักที่ผ่านปฏิกิริยา alkali hydrolysis และ acid hydrolysis กรองสารละลายผสมผ่าน syringe filter nylon membrane ขนาด 13 mm, 0.45 µm นำสารละลายผสมที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนอลลิก และสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค HPLC เปรียบเทียบกับสารละลายสกัดผงผักที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาค่า % recovery ของสารมาตรฐาน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ค่า % recovery ของสารมาตรฐานจากวิธีการวิเคราะห์

สารประกอบกรดฟีนอลลิก	% Recovery	สารประกอบฟลาโวนอยด์	% Recovery
Gallic acid	-	Epicatechin	94.03 - 102.67
p-Hydroxybenzoic acid	54.15 - 61.47	Catechin	96.08 - 101.03
Caffeic acid	97.61 - 101.59	Luteolin	84.21 - 93.83
p-Coumaric acid	87.01 - 91.76	Quercetin	96.35 - 102.35
Ellagic acid	128.69 - 134.74	Kaemferol	101.98 - 104.78
Ferulic acid	88.71 - 91.09		
Cinnamic acid	90.49 - 92.17		

จากตารางข้างต้นเมื่อศึกษาความเสถียรของสารมาตรฐานต่อสภาวะที่ใช้ในการวิธีวิเคราะห์พบว่าสารมาตรฐานส่วนใหญ่เสถียรต่อสภาวะที่ใช้โดยดูได้จากค่า %recovery ซึ่งส่วนใหญ่มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยช่วงที่ยอมรับได้จะอยู่ในช่วง 90-110 % ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีทดสอบและปริมาณของสารตัวอย่าง

ข. การหาค่า % recovery ของสารมาตรฐานจากวิธีการสกัด

การทดลองทำได้เติมสารละลายมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด (*p*-Hydroxybenzoic acid, Caffeic acid, *p*-Coumaric acid, Ferulic acid, และ Cinnamic acid) ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนลงในผงผัก ทำการสกัดสารสำคัญประเภทกรดฟีนอลลิกและฟลาโวนอยด์ ตามวิธีของ Mattila กรองสารละลายสกัดผ่าน syringe filter nylon membrane ขนาด 13 mm, 0.45 µm นำสารละลายสกัดที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนอลลิก และสารฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค HPLC เปรียบเทียบกับสารละลายสกัดผงผักที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาค่า % recovery ของสารมาตรฐานผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 16

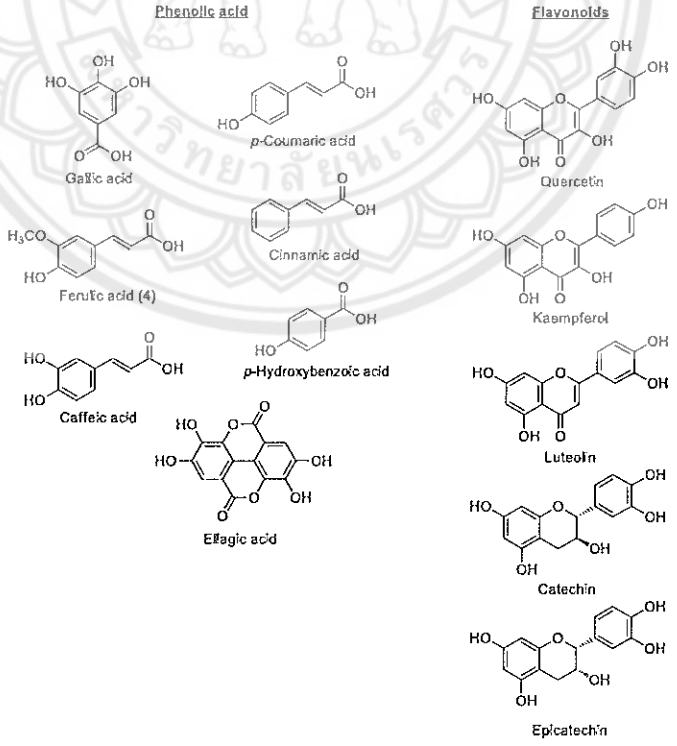
ตารางที่ 16 ค่า % recovery ของสารมาตรฐานจากวิธีการสกัด

สารประกอบฟีนอลิกแอซิด	% Recovery	สารประกอบฟีนอลิกแอซิด	% Recovery
p-Hydroxybenzoic acid	67.48 – 68.26	Ferulic acid	95.58 – 104.49
Caffeic acid	90.06 – 98.60	Cinnamic acid	97.18 – 103.30
p-Coumaric acid	90.98 – 93.49		

จากตารางข้างต้นเมื่อศึกษาความเสถียรของสารมาตรฐานต่อสภาวะที่ใช้ในการวิธีการสกัดพบว่าสารมาตรฐานส่วนใหญ่เสถียรต่อสภาวะที่ใช้โดยดูได้จากค่า %recovery ซึ่งส่วนใหญ่มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยช่วงที่ยอมรับได้จะอยู่ในช่วง 90 – 110 % ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีทดสอบและปริมาณของสารตัวอย่าง

4.5.5 การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารสำคัญประเภท สารประกอบฟีนอลิกแอซิดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ในสารสกัดหยาบจากของหนอนตายหยาก

การศึกษาหาชนิดและปริมาณของสารสำคัญของสารประกอบฟีนอลิกแอซิด และสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยเทคนิค HPLC นี้จะทำการเทียบกับสารมาตรฐานที่ประกอบด้วย สารประกอบฟีนอลิกแอซิด 7 ตัว คือ Gallic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, Ellagic acid, Caffeic acid, *p*-Coumaric acid, Ferulic acid และ Cinnamic acid สารประกอบฟลาโวนอยด์ 5 ตัว คือ Catechin, Epicatechin, Luteolin, Quercetin และ Kaempferol โดยมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 22



รูปที่ 22 โครงสร้างทางเคมีของกรดฟีนอลลิกและสารฟลาโวนอยด์ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน

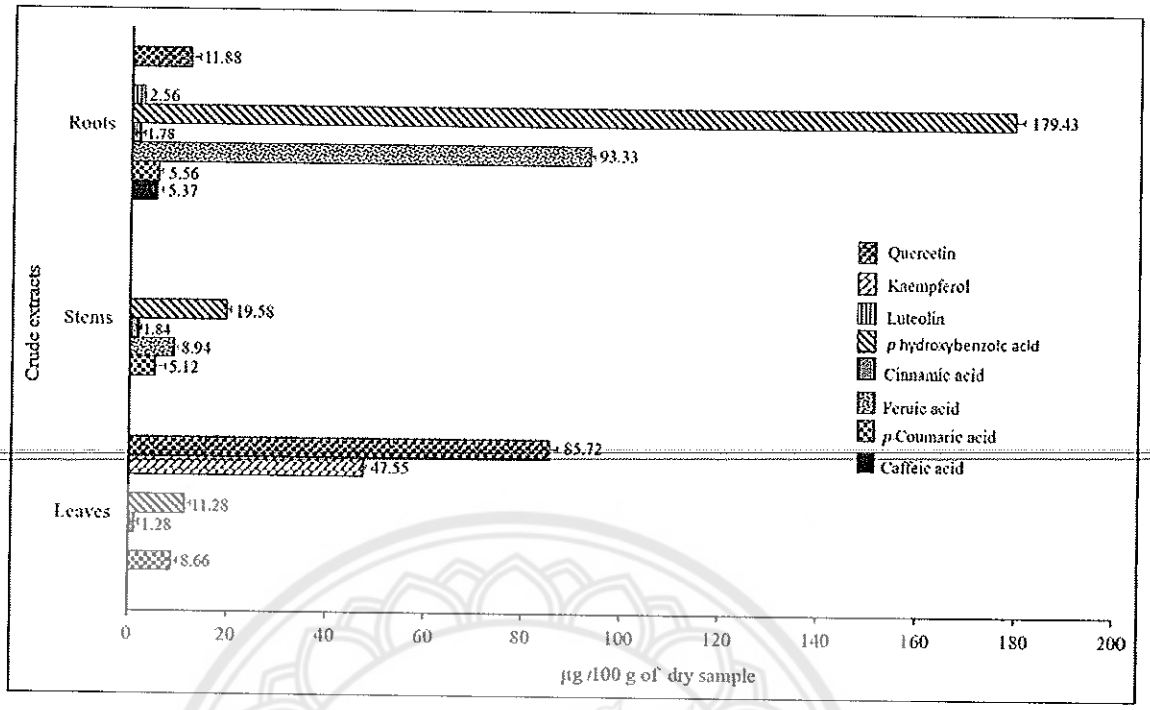
โดยงานวิจัยนี้จะทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 3 ตำแหน่งคือ 280, 320 และ 360 นาโนเมตร และสภาวะที่ใช้ในการศึกษาคือ สารละลายผสมระหว่าง อะซิโตไนไตรล์ กับ 0.2%อะซิติกแอซิดในน้ำ ด้วยอัตราส่วนที่แตกต่างกันออกไปเป็นเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งแสดงในตารางที่ 17 พบว่าสภาวะในการแยกสารมาตรฐานทั้ง 12 ตัวใช้แบบ Gradient elution ของสารละลายผสม อะซิโตไนไตรล์ และ 0.2% อะซิติกแอซิดในน้ำ และสามารถแยกสารมาตรฐานทั้ง 12 ตัวได้อย่างชัดเจน

ตารางที่ 17 เครื่องมือและสภาวะที่ใช้

HPLC	Agilent 1100 Series HPLC
Column	VertiSep UPS C_{18} HPLC COLUMN, 4.6 x 250 mm, 5 µm
Detector	DAD detector at 280, 320, 360 nm reference off bandwidth 4 nm
Mobile phase	Acetonitrile : 0.2% acetic acid in Water
Elution	Gradient
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 µL
Column temperature	25 °C

4.5.6 การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลลิกและสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดตัวอย่างผงผัก

จากการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลลิกและสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนที่ประกอบไปด้วยส่วนราก ลำต้นและใบของหนอนตายหยาก พบว่าสามารถวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญได้ทั้งหมด 8 ชนิด โดยคำณวนในหน่วยของมิลลิกรัมของสารมาตรฐานต่อ 100 กรัมแห้ง โดยแสดงดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 ชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลลิกและสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนเปรียบเทียบปริมาณในหน่วย มิลลิกรัม/100 กรัมแห้ง

จากการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญประเภทกรดฟีนอลลิกและสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนที่ประกอบไปด้วยส่วนราก ลำต้นและใบของหนอนตายหยาก ข้างต้นโดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดฟีนอลลิกและสารฟลาโวนอยด์ 12 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสามารถวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญได้ทั้งหมด 8 ชนิดคือ Caffeic acid, *p*-Coumaric acid, Ferulic acid, Cinnamic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, Luteolin, Quercetin และ Kaemferol ในหน่วยของมิลลิกรัมต่อ100 กรัมแห้งที่แตกต่างกันออกไป โดยในส่วนของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนจะพบสารสำคัญประเภทกรดฟีนอลลิกชนิด *p*-hydroxybenzoic acid ในปริมาณมากที่สุด และนอกจากนี้ยังพบว่าในสารสกัดหยาบในส่วนของรากจะพบชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่มากกว่าในส่วนของสารสกัดหยาบของลำต้นและใบ โดยในสารสกัดหยาบในส่วนของรากจะพบสารสำคัญทั้งหมด 7 ชนิด ในขณะที่ส่วนของสารสกัดหยาบของใบและลำต้นจะพบสารสำคัญทั้งหมด 5 และ 4 ชนิดตามลำดับ

บทที่ 5

บทสรุป

จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2- ไดฟีนิล-1-ไพครีไฮดราซิล ฟรีแรดิคัลสแคเวนจิง (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging) ของสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากในส่วนของ ราก ลำต้นและ ใบ พบว่าสารสกัดหยาบส่วนของใบของหนอนตายหยากมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 132.07 ppm รองลงมาคือลำต้นและราก ตามลำดับ และในการศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธีฟูลิน-ซิโอคัลเซอ คัลเลอริเมตริก (Folin-Ciocalteu Colorimetric) ของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของแกลลิค แอซิด ผลการทดลองพบว่าปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบส่วนของลำต้นของหนอนตายหยากมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดคิดเป็น 15.58 ppm ในขณะที่สารสกัดหยาบส่วนของรากและใบของหนอนตายหยากมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดคิดเป็น 7.75 และ 8.21 ppm นอกจากนี้เมื่อนำสารสกัดหยาบแต่ละชนิดของหนอนตายหยากทั้งหมดที่เตรียมได้มาทำการสกัดและวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารฟีนอลิกแอซิด และฟลาโวนอยด์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าจากการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญประเภทกรดฟีนอลลิกและสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนที่ประกอบไปด้วยส่วนราก ลำต้นและใบของหนอนตายหยากข้างต้นโดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดฟีนอลลิกและสารฟลาโวนอยด์ 12 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสามารถวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญได้ทั้งหมด 8 ชนิดคือ Caffeic acid, p-Coumaric acid, Ferulic acid, Cinnamic acid, p-hydroxybenzoic acid, Luteolin, Quercetin และ Kaemferol ในหน่วยของมิลลิกรัมต่อ100 กรัมแห้งที่แตกต่างกันออกไป โดยในส่วนของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนจะพบสารสำคัญประเภทกรดฟีนอลลิกชนิด p-hydroxybenzoic acid ในปริมาณมากที่สุด และนอกจากนี้ยังพบว่าในสารสกัดหยาบในส่วนของรากจะพบชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่มากกว่าในส่วนของสารสกัดหยาบของลำต้นและใบ โดยในสารสกัดหยาบในส่วนของรากจะพบสารสำคัญทั้งหมด 7 ชนิด ในขณะที่ส่วนของสารสกัดหยาบของใบและลำต้นจะพบสารสำคัญทั้งหมด 5 และ 4 ชนิดตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

[1]. Halliwell, B., The wanderings of a free radical, *Free Radical Biology & Medicine*, 2009, 46, 531–542.

[2] วาริน แสงกิตติโกมล. ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในผัก ผลไม้และสมุนไพร. *วารสารสหเวชศาสตร์*, 2543, 1, 11-18.

[3] นันท์นภัส เติมวงศ์. ความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีโนลิกส์กับความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระในพืช, *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์*, 2551, 8(2) , 115-123

[4] Middleton, E., Jr. Kanaswami C., Theoharides , T.C.. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 2000, 52: 673-839.

[5] Cowan, M.M.. Plant products as Antimicrobial agents. *Clinical microbiology*, 1999, 12, 564-582.

[6] หนอนตายหยาก, http://www.thaigoodview.com/node/18246 (สืบค้นเมื่อวันที่ 28 มิถุนายน 2557)

[7] Mathew, S. and Abraham T. E., Studies on the antioxidant activities of Cinnamon (Cinnamomum verum) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chemistry*, 2006, 94, 520–528.

[8] อนันต์ สกุลกิม, บทความวิชาการเรื่อง อนุมูลอิสระ สารอันตรายต่อสุขภาพและร่างกาย, *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์*, 2551 , 8(1), 28-33

[9] โครงสร้างวิตามินซี, http://th.wikipedia.org/wiki/วิตามินซี (สืบค้นเมื่อวันที่ 5 พฤศจิกายน 2557)

[10] โครงสร้างวิตามินอี, http://th.wikipedia.org/wiki/วิตามินอี (สืบค้นเมื่อวันที่ 5 พฤศจิกายน 2557)

[11] โครงสร้างวิตามินเอ, http://th.wikipedia.org/wiki/วิตามินเอ (สืบค้นเมื่อวันที่ 5 พฤศจิกายน 2557)

[12] โครงสร้างแคโรทีนอยด์, http://th.wikipedia.org/wiki/แคโรทีนอยด์ (สืบค้นเมื่อวันที่ 5 พฤศจิกายน 2557)

[13] โครงสร้างของ Gingerol, http://en.wikipedia.org/wiki/Gingerol (สืบค้นเมื่อวันที่ 5 พฤศจิกายน 2557)

[14] โครงสร้างของ Resveratrol, http://en.wikipedia.org/wiki/ Resveratrol (สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤศจิกายน 2557)

[15] โครงสร้างของ Capsaicin, http://en.wikipedia.org/wiki/ Capsaicin (สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤศจิกายน 2557)

[16] โครงสร้างของ Curcumin, http://en.wikipedia.org/wiki/ Curcumin (สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤศจิกายน 2557)

[17] Chung, H-S. et. al. Antitussive activity of Stemona alkaloid from Stemona Tuberosa, *Planta Med.* , 2003, 69, 914-920.

[18] Roengsumran, S., Khorphueng, P., Chaichit, N., Jaiboon-Muangsin, N. and Petsom, A.. Crystal structure of 6-deoxyclitoriacetal, C19H18O8. *Z. Kristallogr.* 2003, 218, 105–106.

[19] Greger H., et.al. Antioxidant dehydrotocopherols as a new chemical character of Stemona species, *Phytochemistry*, 2004, 65, 2719–2729.

[20] Li Z. X., et. al., The dichloromethane fraction of Stemona tuberose Lour inhibits tumor cell growth and induces apoptosis of human medullary thyroid carcinoma cells, *Biologics: Targets & Therapy*, 2007, 1(4), 455–463.

[21] . Li-Gen, L., Xin-Zhou, Y., Chun-Ping , T., Chang-Qiang , K., Ji-Bao , Zh. and Yang , Y., Antibacterial stilbenoids from the roots of *Stemona tuberosa, Phytochemistry,* 2008, *69. 457–463*

[22] Chaliewchalad P., Thongwai N. and Tragoolpua Y., Inhibitory effect of Rhinacanthus nasutus (Linn.) Kurz. and Stemona tuberosa (Lour.) extracts on herpes simplex virus infection, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2013, 7(2), 76-84.

[23] Mak T. C. W. et. al., Isolation and stereochemistry of two new alkaloids from Stemona tuberose, *Tetrahedron*, 2002, 58, 6705–6712.

[7] Tingyu, Li., Large degree of racemization observed in the amide bond forming reaction on silica gel, *Journal of Chromatography* A, 2000, *878*,165–170.

[8] Kunishima M., Formation of carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new alcohol- and watersoluble condensing agent : DMT-MM, *Tetrahedron*, 2001, *5*,1551-1558.

[9] Han S. and Kim Y., Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis, *Tetrahedron,* 2004, *60,* 2447–2467.

[10] Sameiro M.,Gonc T., Carboxylic fused furans for amino acid fluorescent labeling, *Tetrahedron*, 2006, *62,* 9258–9267.

[11] Dondoni, A.; Franco, S.; Junquera, F.; Mercha´n, F. L.; Merino, P.; Tejero, T. J. Org. Chem. 1997, 62, 5497–5507.

[12] Chen, S.-H.; Farina, V.; Vyas, D. M.; Doyle, T. W.; Long,B. H.; Fairchild, C. J. Org. Chem. 1996, 61, 2065–2070.

[13] Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. J. Org. Chem. 1998, 63, 9678–9683.

[14] Baati R., Exploring the one-pot C-acylation of cyclic 1,3-diones with unactivated carboxylic acid, *Tetrahedron Lett*, **2010**, 5, 2348–2350.

[15] Meng Q., Yu M., Zhang H., Ren J. and Huang D., Synthesis and application of N-hydroxysuccinimidyl rhodamine B ester as an amine-reactive fluorescent probe, *Dyes and Pigments*, **2007**, 73, 254-260.

ภาคผนวก

แผนกิจกรรมที่ทำได้

ขั้นตอนการดำเนินงานของ 6 เดือนแรก

ระยะเวลา	กิจกรรมที่เสนอต่อโครงการ	กิจกรรมที่ทำได้จริง
6 เดือนแรก	1. การเตรียมตัวอย่างของหนอนตายหยาก 2. การสกัดผงแห้งของราก ลำต้น และใบของต้นหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายเพื่อศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ 3. การศึกษาฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี ดีพีพีเอช แรดิคัล สแคเวนจิง (DPPH; 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging ของสารสกัดหยาบหนอนตายหยากแต่ละส่วน	1. สามารถเตรียมตัวอย่างของหนอนตายหยากส่วน ราก ลำต้น และใบ ให้เป็นผงแห้งโดยใช้วิธีการอบที่อุณหภูมิ 70°C 2. สามารถสกัดผงแห้งของราก ลำต้น และใบของต้นหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลาย ได้เป็นสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากแต่ละส่วน 3. ศึกษาฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี ดีพีพีเอช แรดิคัล สแคเวนจิง (DPPH; 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging ของสารสกัดหยาบหนอนตายหยากแต่ละส่วน พบว่าสารสกัดหยาบของต้นหนอนตายหยากในส่วนของใบมีสมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด

ตารางเปรียบเทียบ output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริงของ 6 เดือนแรก

Output		ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%) ให้ท่านระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ท่านดำเนินการ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ/หรือจากการปรับแผน	ผลสำเร็จ (%)	
1.การเตรียมตัวอย่างของหนอนตายหยากและการสกัดผงแห้งของราก ลำต้น และใบของต้นหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายเพื่อศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ	100%	-
2. การศึกษาฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี ดีพีพีเอช แรดิคัล สแคเวนจิง (DPPH;2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging ของสารสกัดหยาบหนอนตายหยากแต่ละส่วน	100%	-

ขั้นตอนการดำเนินงานของ 6 เดือนที่ 2

ระยะเวลา	กิจกรรมที่เสนอต่อโครงการ	กิจกรรมที่ทำได้จริง
6 เดือนที่ 2	1. การสกัดสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายและการทดสอบหาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบโดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric 2. การสกัดสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายเพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิด 3. วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิดด้วยเทคนิค HPLC - การหาสภาวะในการแยกสารมาตรฐานฟีนอลลิค แอซิดและฟลาโวนอยด์ - การสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานฟีนอลลิค แอซิดและฟลาโวนอยด์ - การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) - การหาค่า % recovery ของสารมาตรฐาน - การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกแอซิดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆของหนอนตายหยาก	1. สามารถสกัดสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายและการทดสอบหาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบโดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric 2. สามารถสกัดสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายเพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิด 3. วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิดด้วยเทคนิค HPLC - การหาสภาวะในการแยกสารมาตรฐานฟีนอลลิค แอซิดและฟลาโวนอยด์ - การสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานฟีนอลลิค แอซิดและฟลาโวนอยด์ - การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) - การหาค่า % recovery ของสารมาตรฐาน

ตารางเปรียบเทียบ output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริงของ 6 เดือนที่ 2

Output		ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%) ให้ท่านระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ท่านดำเนินการ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ/หรือจากการปรับแผน	**ผลสำเร็จ (%)**	
1. การสกัดสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายและการทดสอบหาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบโดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric	100%	-
2. การสกัดสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายเพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิด	100%	-
3. วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิดด้วยเทคนิค HPLC	80%	เนื่องจากสารมาตรฐานฟีนอลลิค แอซิด และฟลาโวนอยด์ไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงได้ดำเนินการสั่งซื้อซึ่งระยะเวลาในการส่งสารมาตรฐานใช้เวลาประมาณ 45 วัน ดังนั้นจึงไม่สามารถดำเนินการทันตามที่วางแผนไว้

ขั้นตอนการดำเนินงานของ 6 เดือนที่ 3

ระยะเวลา	กิจกรรมที่เสนอต่อโครงการ	กิจกรรมที่ทำได้จริง
6 เดือนที่ 3	1. การสกัดสารสกัดหยาบของหนอนตาย หยากด้วยตัวทำละลายเพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิด 2. การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกแอซิดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆ ของหนอนตายหยากด้วยเทคนิค HPLC 3. สรุปผลการศึกษาและเสนอผลงาน, ทำการส่งรายงานฉบับสมบูรณ์รวมถึง ดำเนินการตีพิมพ์เพื่อเผยแพร่ผลงาน	1. สกัดสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายเพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิด 2. วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกแอซิดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆ ของหนอนตายหยากด้วยเทคนิค HPLC 3. สรุปผลการศึกษาและเสนอผลงาน, ทำการส่งรายงานฉบับสมบูรณ์รวมถึง ดำเนินการตีพิมพ์เพื่อเผยแพร่ผลงาน

ตารางเปรียบเทียบ output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริงของ 6 เดือนที่ 3

Output		ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%) ให้ท่านระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ท่านดำเนินการ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ/หรือจากการปรับแผน	**ผลสำเร็จ (%)**	
1. สกัดสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากด้วยตัวทำละลายเพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากแต่ละชนิด	100%	-
2. วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกแอซิดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆของหนอนตายหยาด้วยเทคนิค HPLC	100%	-
3. สรุปผลการศึกษาและเสนอผลงาน, ทำการส่งรายงานฉบับสมบูรณ์รวมถึง ดำเนินการตีพิมพ์เพื่อเผยแพร่ผลงาน	100%	-

บทความและผลงานการเผยแพร่

1. เผยแพร่บทความวิจัย เรื่อง Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents and analyses of active compounds in *Stemona collinsae* Craib crude extracts โดยตีพิมพ์ลงใน NU. International Journal of Science ซึ่งเป็นวารสารระดับประเทศ อยู่ในฐาน TCI กลุ่มที่ 1
2. การนำเสนอแบบปากเปล่า ในงานประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 9 ปี 2560 เรื่อง The study of total phenolic compounds, total flavonoid compounds and antioxidant activities, in *Stemona tuberose* Lour. crude extracts

NU. International Journal of Science

September 11th, 2017

Faculty of Science,
Naresuan University,
Phitsanulok 65000, THAILAND.
Tel: +66-55-9631-71 Fax: +66-55-9331-41
E-mail: sumritm@nu.ac.th and suchilap@nu.ac.th
Website: http://www.sci.nu.ac.th/sciencejournal

Dear Boonjira Rutnakornpituk,

Thank you for your response. I am pleased to advise that your paper on
" Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents and analyses of active compounds in *Stemona collinsae* Craib crude extracts."
The article will be published in NU. International Journal of Science 2018;
Vol.15 No.1,(January 2018 – June 2018) : 12 Page.

Many thanks for submitting your paper to NU. International Journal of Science.

Please feel free to contact us with any questions.

Best Regards,

Yours sincerely,

Sumrit Mopoung

Assoc. Prof. Dr. Sumrit Mopoung
Editors-in-Chief

จาก: **ผศ. ดร. รุ่งนภา แซ่เอ็ง** <rungnaph@buu.ac.th>
วันที่: 21 มีนาคม 2560 21:37
เรื่อง: [SRC9] แจ้งผลการตอบรับผลงานวิจัยงานประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ ๙
ถึง: Jantra jantrapirom <Pjantrapirom@gmail.com>

เรียน Jantra jantrapirom:

หลังจากผู้ทรงคุณวุฒิได้ทำการพิจารณาบทความวิจัยในหัวข้อ "The study of total phenolic compounds, total flavonoid compounds and antioxidant activities, in Stemona tuberose Lour. crude extracts"แล้ว ทางฝ่ายวิชาการของงานประชุมฯมีความยินดีที่จะแจ้งให้ผู้ส่งบทความทราบว่าผลงานวิจัยของท่านได้รับการ"ตอบรับ"เพื่อมานำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับชาติ"วิทยาศาสตร์วิจัย"ที่คณะวิทยาศาสตร์ มบูรพาในวันที่ 2017-05-25

ทั้งนี้ขอให้ท่านดำเนินการลงทะเบียนเข้าร่วมงานประชุมและชำระค่าลงทะเบียนตามลิงค์
http://www.sci.buu.ac.th/src9/index.php
เพื่อยืนยันการเข้าร่วมนำเสนอผลงานครั้งนี้

ผลงานที่ได้รับการตอบรับแต่ไม่ได้ชำระค่าลงทะเบียนจะไม่ถูกตีพิมพ์ในงานประชุมครั้งนี้

ขอขอบคุณที่ส่งผลงานเข้าร่วมนำเสนอในงานประชุมฯ และหวังเป็นอย่างยิ่งที่จะได้เห็นงานวิจัยของท่านในงานประชุมฯ

ผศ. ดร. รุ่งนภา แซ่เอ็ง
rungnaph@buu.ac.th

การประชุมวิชาการระดับชาติ
"วิทยาศาสตร์วิจัย"
การประชุมวิชาการระดับชาติ
"วิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 9"
http://sc.buu.ac.th/submission/index.php/SRC/SRC9/index