ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะเดื่อ

อุดมเดชา พลเยี่ยม

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

Antioxidant activity of extracts from *Ficus hispida* Linn.

Udomdeja Polyium

This Research in Funded by Faculty of Science and Technology

Rajamangala University of Technology Phra Nakorn

Fiscal Year 2016

ชื่อเรื่อง : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะเดื่อ
ผู้วิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุดมเดชา พลเยี่ยม
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทคัดย่อ

การวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะเดื่อทำการทดลองโดยนำผลของมะเดื่อมาทำการแยกสารโดยการหมักและสกัดตามลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลายคือเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 3 ชนิด นำสารสกัดหยาบมาทดสอบค่าความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยการใช้ Folin–Ciocalteu method

ผลการวิจัยพบว่า

1. การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากกผลมะเดื่อพบสารกลุ่ม alkaloids condensed tannins phenolic compounds triterpenes steroids cardiac glycosides antraquinones

2. สารสกัดหยาบจากผลของมะเดื่อด้วย Hexane, Ethylacetate และMethanol มีความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ค่า EC_{50} เท่ากับ > 1000, 285 และ 30 μg/ml ตามลำดับ

3. สารสกัดหยาบจากผลของมะเดื่อด้วย Hexane, ethylacetate และMethanol มีปริมาณสารประกอบฟีนอลเท่ากับ 3.09, 55.25 และ 99.59 mg GAE/g dw ตามลำดับ

.

Title : Antioxidant activity of extracts from *Ficus hispida* Linn.
Researcher : Udomdeja Polyium
Faculty of Science and Technology
Rajamangala University of Technology Phra Nakorn

ABSTRACT

The study used the fruit of *Ficus hispida Linn to* separation by maceration and sequential extraction method with hexane, ethyl acetate and methanol to crude extracts. Crude extracts were assessed for their antioxidant activities tested using DPPH radical scavenging assay, total phenolic contents tested using the Folin–Ciocalteu method,

The results showed that

1. Phytochemical examination of the extracts of *F. hispida*, alkaloids, condensed tannins, phenolic compounds, triterpenes, steroids, cardiac glycosides, anthraquinones

2. Hexane, Ethylacetate and Methanol extracts have the ability to reduce the amount of DPPH. The EC_{50} values were> 1000**,** 285 and 30 μg/ml, respectively.

3. Hexane, Ethylacetate and Methanol extracts contained phenolic compounds values of 3.09, 55.25 and 99.59 mg GAE/g dw, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะเดื่อได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 ของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนครที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัยและอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการทางเคมีอินทรีย์สำหรับการทดลองเป็นอย่างดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบบูชาแด่คณาจารย์ทุกท่านที่ประสาทวิชาความรู้แก่คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	**I**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**II**
กิตติกรรมประกาศ	**III**
สารบัญ	**IV**
สารบัญตาราง	**VI**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**3**
2.1 มะเดื่อ	3
2.2 การเตรียมพืชและการสกัดสาร	6
2.3 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี	9
2.4 การแยกสารด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี	13
2.5 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ	15
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	**21**
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	21
3.2 พืชที่ใช้ในการวิจัย	22
3.3 วิธีการทดลอง	22
3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	25
3.5 ระยะเวลาการทดลอง	25
3.6 สถานที่ทำการทดลอง	25
บทที่ 4 ผลการทดลอง	**26**
4.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี	26
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	27

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ **29**

5.1 สรุปผลการทดลอง 29

5.2 อภิปรายผล 29

5.3 ข้อเสนอแนะ 30

บรรณานุกรม **31**

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี	26
ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	27
ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล	28

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

สภาพสังคมและสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงทำให้มีวิถีการดำรงชีวิตที่มีความเสี่ยงต่อการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย มนุษย์ใช้ออกซิเจนในกระบวนการเผาผลาญสารอาหารในร่างกายและเป็นผลให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจนได้ ในสภาวะปกติร่างกายจะมีระบบควบคุมป้องกันอนุมูลอิสระ แต่ร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติได้เมื่อเกิดภาวะความเครียดของออกซิเจน (Oxidative stress) โดยอนุมูลอิสระที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นจะก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายซึ่งจะนาไปสู่การกลายพันธุ์ โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับไขมันที่ผนังเซลล์กับโปรตีน เอนไซม์คาร์โบไฮเดรต และดีเอ็นเอ ดังนั้นการใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกแดนท์ (Antioxidant) จะช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ สารต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งจากการสังเคราะห์และได้จากธรรมชาติ เช่น ในพืช ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ(Biodiversity) เนื่องจากมีลักษณะทางภูมิศาสตร์ตั้งอยู่ในพื้นที่สภาพภูมิอากาศแถบร้อนชื้น จึงก่อให้เกิดสภาพธรรมชาติอันหลากหลายมีพืชหลายชนิดที่เป็นพืชที่มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จึงให้ความสนใจกับการศึกษาคุณประโยชน์ทางยาจากพืชมากขึ้น เนื่องจากมีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับยาสังเคราะห์ ดังนั้นจึงมีความต้องการวิจัยเพื่อการพัฒนาคุณค่าของพืชสมุนไพรให้มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น

ประกอบกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ เน้นการพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสรางความมั่นคงของฐานทรัพยากรและสิ่งแวดลอมโดยใหความสำคัญกับการพัฒนาคุณคาความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปญญาทองถิ่น โดยใชหลักเศรษฐกิจพอเพียงเป็นแนวทางสำคัญในการจัดการองค์ความรูและสรางภูมิคุมกันสงเสริมการใชความหลากหลายทางชีวภาพในการสรางความมั่นคงของภาคเศรษฐกิจทองถิ่นและชุมชนรวมทั้งพัฒนาขีดความสามารถและสรางนวัตกรรมจากทรัพยากรชีวภาพที่ เปนเอกลักษณของประเทศ การวิจัยเพื่อการพัฒนาศักยภาพของมะเดื่อด้านการใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านเพื่อสร้างองค์ความรู้และคุ้มครองภูมิปัญญาท้องถิ่น จึงเป็นประเด็นที่ควรมีการศึกษาเพื่อสืบทอดภูมิปัญญาท้องถิ่น และ เพื่อเพิ่มคุณค่าและพัฒนาศักยภาพการใช้ประโยชน์ของพืชสมุนไพรในประเทศให้เกิดประโยชน์

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะเดื่อที่มีประโยชน์ทางอาหาร การแพทย์และสาธารณสุข เพื่อเพิ่มคุณค่าและพัฒนาศักยภาพของพืชสมุนไพรในประเทศให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งเป็นแนวทางสู่การนำไปเป็นยา อาหารเสริมหรือเครื่องสำอาง ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะเดื่อ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะเดื่อกำหนดขอบเขตดังนี้

1. พืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยคือมะเดื่อ
   ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ficus hispida* Linn.
   ชื่อวงศ์ : Moraceae
2. ส่วนของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาคือ ผล
3. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น
   3.1 การทดสอบกับ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)
   3.2 การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอล (Folin-Ciocalteu's reagent)

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะเดื่อสามารถนำไปพัฒนาด้านอาหารเสริมและเครื่องสำอาง เพื่อนำไปสู่เชิงพาณิชย์ต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะเดื่อผู้วิจัยทำการศึกษาเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

2.1 มะเดื่อ
2.2 การเตรียมพืชและการสกัดสาร
2.3 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี
2.4 การแยกสารด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี
2.5 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะเดื่อ

พืชสกุลไทร-มะเดื่อ (*Ficus)* เป็นพืชสกุลใหญ่อีกสกุลหนึ่งในวงศ์ขนุนMoraceae) ปัจจุบันมีพืชสกุลนี้อยู่ประมาณ 1,000 ชนิด โดยกระจายอยู่ทั่วไปในเขตร้อนทุกภูมิภาคทั่วโลก เป็นพืชประเภทไม้ยืนต้นขนาดกลางที่มีการปลูกกันมาก ทางตะวันตกของทวีปเอเชีย ส่วนการปลูกที่เป็นการค้าของโลกจะอยู่ในแถบลุ่มแม่น้ำ เมดิเตอร์เรเนียน ประเทศอิตาลี โปรตุเกส สเปน ตุรกี และกรีซ บางพันธุ์สามารถปลูกได้ในแคลิฟอร์เนียทางใต้ และพื้นที่แห้งแล้งของประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีความหลากหลายมากที่สุดในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยมีประมาณ 80-100 ชนิด พืชสกุลนี้มีความสาคัญ คือเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์ป่า และแหล่งอาหารหลักของสัตว์ป่าหลายชนิด เช่น ลิง กระรอก ค้างคาว และนกนานาชนิด ไทรและมะเดื่อจัดเป็นพืชที่มีดอกแยกเพศ (Unisexual) อยู่ร่วมกันเป็นช่อดอกแบบปิด เรียกว่า syconium หรือ fig ซึ่งพืชสกุลนี้จา แนกได้เป็นสองกลุ่มชัดเจน โดยอาศัยการเกิดเพศของดอก โดยกลุ่มที่มีดอกแยกเพศอยู่ร่วมต้นเดียวกันเรียกว่า monoecious fig และดอกแยกเพศอยู่คนละต้นกัน เรียกว่า dioecious fig คือต้นเพศผู้ (male tree) และต้นเพศเมีย (female tree) อยู่แยกกัน ในประเทศไทยพืชสกุลไทร - มะเดื่อ มีความหลากหลาย เช่น ไทร, กร่าง, ไกร, ไทรย้อย, ไทรย้อยใบแหลม, โพธิ์, มะเดื่ออุทุมพร, มะเดื่อหอม, มะเดื่อปล้อง และมะเดื่อฝรั่ง นั้น การเรียกชื่อแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ มะเดื่อ และไทร โดยในกลุ่มมะเดื่อส่วนใหญ่จะเป็นพืชที่มีดอกแยกเพศอยู่คนละต้น หรือ dioecious fig ยกเว้นมะเดื่ออุทุมพร (*F. racemosa*) และในกลุ่มไทรจะเป็นพืชที่มีดอกแยกเพศอยู่ร่วมต้นเดียวกัน

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

1. ชื่อ มะเดื่อ
2. ชื่ออื่น เดื่อปล้อง เดื่อป่อง เดื่อสาย เดื่อป้อง ตะเออน่า ฮะกอ สะนียา (นราธิวาส)
3. ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ficus hispida* Linn. f.
4. วงศ์ MORACEAE
5. แหล่งที่พบ พบทุกภาคของประเทศ
6. ประเภทไม้ ไม้ยืนต้น
7. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น ไม้ยืนต้นขนาดกลางสูงประมาณ 5-10 เมตร ลำต้นเดี่ยวตั้งตรงเปลือกหนา กิ่งแขนงแตกเป็นพุ่มทรงกลมทึ้งต้น มีน้ำยางสีขาว ลำต้นมีรอยควั่นเป็นปล้องหรือเป็นข้อๆ คล้ายข้อไม้ไผ่ตลอดจนถึงกิ่ง ใบ ใบเดี่ยวออกตรงข้ามกัน รูปไข่แกมขอบขนานหรือรูปขอบขนานแกมรูปไข่กลับ ผิวสากหนืดมือ คล้ายใบย่อยมีขนนาบกับแผ่นใบสีเขียวสด

ดอก มีสีเหลืองแกมเขียว ออกช่อกระจุกแน่น เจริญอยู่ในฐานรองดอกกลมกลวงเหมือนลูกแพร์ แกมรูปไข่กลับกว้าง ดอกย่อยแยกเพศอยู่บนต้นเดียวกันเป็นสีชมพูอ่อน

ผล กลมแป้นขนาดเล็กติดเป็นกลุ่มแน่น 10-15 ผล สีเขียวสดเมื่อแก่มีสีน้ำตาลปนเขียว

8. ส่วนที่ใช้บริโภค ผลอ่อน
9. การขยายพันธุ์ เมล็ด ตอนกิ่ง
10. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เจริญเติบโตได้ดีในดินทุกชนิด อยู่ตามป่าโปร่งป่าดิบเขาทั่วไป
11. ฤดูกาลที่ใช้ประโยชน์ ตลอดปี
12. การปรุงอาหาร ผลอ่อน รับประทานเป็นผักจิ้มร่วมกับน้ำพริก

(เต็ม สมิตินันทน์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). กรมป่าไม้ 379 หน้า. สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2542. ผักพื้นบ้านภาคใต้ 279 หน้า. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. สารานุกรมสมุนไพรไทย รวมเภสัชกรรมไทย. 2540. 618 หน้า.)

2.1.2 การนำไปใช้ประโยชน์ในท้องถิ่น

ปัจจุบันใช้เป็นอาหารและรักษาโรค เปลือกใช้แก้ท้องร่วง สมานแผล รากใช้แก้ไข้ ขับเสมหะ ใบนาไปผสมกับน้า ผึ้งรับประทานสามารถรักษาโรคตับ ใบมะเดื่อฝรั่งมีสารประเภท phenolics ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Lansky และคณะ, 2008) และที่สา คัญคือผลของมะเดื่อฝรั่งมีคุณค่าทางอาหารสูง ทั้งมีสารป้องกันอนุมูลอิสระ มีแร่ธาตุและวิตามินสูง จึงมีการนาเข้า และส่งเสริมการปลูกเพื่อให้เป็นพืชเศรษฐกิจ

มะเดื่อรสและสรรพคุณในตำรายา ราก รสฝาดเย็น แก้ไข้ กระทุ้งพิษไข้ แก้พิษร้อน กล่อมเสมหะและโลหิต แก้ไข้หัว แก้ไข้กาฬ แก้ท้องร่วง เปลือกต้น รสฝาด แก้ท้องร่วง ต้มชะล้างบาดแผล แก้ประดงผื่นคัน แก้ไข้รากสาดน้อย แก้ธาตุพิการ ดอก รสจืดลดความร้อนในร่างกาย ผล รสฝาดเย็น แก้ท้องร่วง และสมานแผล

วิธีและปริมาณที่ใช้

1. แก้ไข้ กรทุ้งพิษไข้ โดยใช้รากสดประมาณ 20-30 กรัม ล้างให้สะอาด สับเป็นชิ้น ต้มในน้ำเดือด 1 ลิตร เคี่ยวให้เหลือครึ่งหนึ่ง กรองเอาน้ำดื่มวันละ 2 ครั้ง หลังอาหาร

2. แก้ท้องร่วง โดยใช้ผลสดดิบ 2-3 ผล รับประทาน หรืออาจจะจิ้มเกลือด้วยก็ได้

รูปที่ 2.1 ลักษณะลำต้นมะเดื่อ

รูปที่ 2.2 ผลมะเดื่อ

2.2 การเตรียมพืชและการสกัดสาร

2.2.1 การเก็บตัวอย่างพืช รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 59-60) กล่าวโดยสรุปดังนี้

1. พืชที่จะนำมาสกัด ต้องมีการตรวจเอกลักษณ์ให้ถูกต้อง เพราะพืชหลายชนิดมีลักษณะคล้ายกันหรือมีชื่อพ้องกัน โดยเฉพาะพืชที่หายากและขาดแคลน ต้องตรวจสอบอย่างรอบครอบ

2. การเลือกเก็บพืชที่สมบูรณ์ มีอายุตามชนิดของพืช สามารถออกดอกออกผลที่มีจำนวนมากพอ เพื่อให้ได้สารสกัดที่มากพอดังนี้

2.1 รากและเหง้า เก็บหลังจากที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่แล้วและหยุดการเจริญเติบโตหากเป็นพืชล้มลุกควรเก็บเมื่อต้นตาย

2.2 เปลือกต้น เก็บในระยะเวลาที่พืชเจริญเติบโตเติมที่

2.3 ใบและดอก เก็บก่อนที่พืชจะออกดอกหรือก่อนที่ดอกจะบาน

2.4 ดอก เก็บขณะที่ดอกกำลังจะบานหรือก่อนถึงเวลาผสมเกสร

2.5 ผล เก็บเมื่อผลเจริญเติบโตเต็มที่แต่ยังไม่สุกหรือเมื่อสุกเต็มที่ ตามชนิดของพืช

2.6 เมล็ด เก็บเมื่อแก่เต็มที่แล้ว แต่ควรเก็บก่อนที่ผลจะแตกออก

3. เก็บตัวอย่างให้ถูกฤดูกาลของพืชแต่ละชนิด เช่น พวก ขิง ข่า กระชายดำ จะมีเหง้าอยู่ใต้ดิน ในฤดูฝนเหง้าจะมีน้ำปริมาณมาก ทำให้มีปริมาณสารระเหยต่ำ ดังนั้นจึงควรเก็บเกี่ยวในช่วงฤดูแล้ง จะได้ปริมาณสารระเหยที่มากกว่า

4. วิธีการเก็บตัวอย่างต้องเหมาะสมต่อการนำไปแยกสกัดสาร พืชบางชนิดต้องสกัดสด หรือบางชนิดต้องสกัดแห้ง

5. เก็บตัวอย่างในปริมาณที่มากพอ เพื่อเก็บไว้เป็น Original Sample ซึ่งการเก็บจะต้องมีการจดบันทึกข้อมูลที่เกี่ยวข้อง เช่น วันเวลา ฤดูกาลที่เก็บ สถานที่เก็บ เป็นต้น

6. ถ้าต้องการเก็บตัวอย่างจากร้านค้าและผลิตภัณฑ์ ต้องระวัง สิ่งปลอมปน การใช้ชื่ออื่นมาอ้าง และชื่อพ้องกัน

7. เมื่อเก็บตัวอย่างมาแล้วต้องการทำตัวอย่างแห้ง ต้องใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสารออกฤทธิ์

2.2.2 การเตรียมตัวอย่างพืช

1. การเตรียมตัวอย่างแบบสด พืชสดสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ได้ดี โดยนำพืชสดมาต้มกับแอลกอฮอล์เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และป้องกันไม่ให้สารเคมีในพืชเกิดการเปลี่ยนแปลง

2. การเตรียมตัวอย่างแบบแห้ง เป็นการป้องกันการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในพืชสด การเตรียมตัวอย่างแบบแห้งควรทำให้แห้งด้วยวิธีที่รวดเร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะอุณหภูมิที่สูงจะทำให้สารสำคัญเกิดการเปลี่ยนแปลงได้

3. ระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้พืชแห้งโดยทั่วไปดอก ใบ และยอด จะใช้อุณหภูมิที่ 20-40 องศาเซลเซียส ส่วนเปลือกและรากจะใช้อุณหภูมิที่ 30-35 องศาเซลเซียส

4. พืชแห้งควรเก็บในที่แห้ง มืด เย็น และมีอากาศหมุนเวียนและหลีกเลี่ยงการเก็บสมุนไพรไว้เป็นเวลานาน

2.2.3 การทำให้สมุนไพรตัวอย่างมีขนาดเล็กลง

การสกัดพืชต้องย่อยตัวอย่างให้มีขนาดให้เล็กลง (comminution or pulverization) เนื่องจากสารสำคัญจะอยู่ภายในเซลล์ในสภาพผลึกหรือผงละเอียด เมื่อได้สัมผัสกับน้ำยาสกัดที่เหมาะสมองค์ประกอบเหล่านั้นจะละลายออกมา โดยการบดพืชให้เป็นผงละเอียดเพื่อทำลายผนังเซลล์และเพิ่มพื้นที่ผิวของพืชที่จะสัมผัสกับน้ำยาสกัด การสกัดจะสมบูรณ์ ถ้าเซลล์แตกออกและน้ำยาสกัดเข้าไปสัมผัสสารสำคัญได้มากที่สุด

การย่อยพืชให้มีขนาดเล็กลง

1. การหั่นหรือตัดพืชแห้งควรตัดตามยาว (longitudinal cut) หรือตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยม (rectangular or cubical cut) ก่อนบด (grinding) โดยใช้เครื่องบดแบบต่างๆ ตามชนิดของวัตถุดิบและขนาดที่ต้องการหลังการบด เช่น เครื่องบดชนิดค้อน (driven hammer mill) เหมาะสำหรับย่อยขนาดพืชที่แตกหักง่าย เช่นรากหรือหัว ขนาดของพืชที่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดของตระแกรงที่ใช้

ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่จะหมุนเวียนกลับไปย่อยอีก จนได้ขนาดที่เล็กพอที่จะลอดผ่านรูตะแกรง หรือเครื่องบดชนิดตัด (cutting mills) เหมาะสำหรับย่อยใบ เปลือกไม้ และรากที่เหนียวมีเส้นใย ขนาดของพืชที่ต้องการลดขนาดขึ้นกับขนาดของตะแกรงที่ใช้และความเร็วของมอเตอร์ที่ใช้หมุนใบมีด เป็นต้น

2. พืชสดทำได้โดยการหั่น (slicing) โดยใช้มีด หรือพืชที่แช่ในแอลกอฮอล์อาจใช้เครื่องปั่น (waring blender) เป็นต้น

นอกจากนี้อาจทำการย่อยเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เอนไซม์ (enzyme disintegration) หรือโดยใช้สารเคมี (chemical disintegration)

3. การลดขนาดของพืชให้เป็นผงละเอียดควรคำนึงถึงโครงสร้างของพืชเป็นหลัก ถ้าเป็นโครงสร้างแข็งแรง ซึ่งน้ำยาสกัดแทรกซึมเข้าไปได้ยาก เช่น รก เนื้อไม้ ควรบดให้มีขนาดเล็กกว่าส่วนที่มีโครงสร้างอ่อนนุ่ม ซึ่งน้ำยาสกัดแทรกซึมเข้าไปได้ง่าย เช่น ใบ ดอก การบดพืช

4. การย่อยสมุนไพรให้มีขนาดเล็กมากจนเกินไปจะเกิดผลเสียได้ คือทำให้เกิดปัญหาในการอุดตันเครื่องกรองในขบวนการสกัด และทำให้ได้องค์ประกอบที่ไม่ต้องการมากขึ้นอันเนื่องมาจากเซลล์แตกมากเกินไป ซึ่งบางครั้งทำให้สารสกัดขุ่น ขนาดของผงพืชที่เหมาะสมหาได้จากการทดลองซึ่งเป็นขนาดที่ทำให้ได้สารสกัดที่มีองค์ประกอบสำคัญสูงสุด

2.2.4 การสกัดสารแบบมาเซอเรชัน

มาเซอเรชัน (Maceration) เป็นการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายจนเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่มและตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้ การหมักสมุนไพรควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทในตัวทำละลายที่เหมาะสม จะทำเป็นเวลานาน 7 วัน หรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ในระหว่างที่หมักผงสมุนไพรอยู่นั้นควรเขย่าเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรอง แยกกาก (marc) ออกจากตัวทำละลาย วิธีการสกัดนี้เหมาะสมกับพืชที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย จัดเป็นวิธีที่ใช้ตัวทำละลายน้อย และเนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะสมกับการสกัดสารที่ไม่ทนต่อความร้อน แต่วิธีการสกัดนี้มักจะไม่สมบูรณ์เนื่องจากไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย เมื่อสารในสุมนไพรละลายออกมาถึงระดับหนึ่งจะเกิดความสมดุลของ

องค์ประกอบภายในสมุนไพรและตัวทำละลายที่ใช้ ทำให้อัตราเร็วของการสกัดชะงักลง จึงไม่เหมาะที่จะใช้สกัดในกรณีที่ต้องการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรจนสมบูรณ์

การสกัดแบบมาเซอเรชันใช้เวลานาน จึงมีผู้ดัดแปลงใช้มิกเซอร์ (mixer) หรือโฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer) มาช่วยทำให้เซลล์พืชแตกออกมาก่อนทำการสกัด เพื่อลดระยะเวลาการสกัด ต่อมาพัฒนาใช้เสียงที่มีความถี่สูงเกิน 20,000 เฮิรตซ์ ร่วมในการสกัดเรียกวิธีนี้ว่า การสกัดอัลตราซาวน์ (ultrasound extraction) แต่วิธีหลังนี้อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของน้ำไปเป็นเพอร์ออกไซด์ ซึ่งอาจมีผลต่อการสกัด นอกจากนี้อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ต่อสารโดยตรง เพราะขณะที่ใช้การสกัดอัลคราซาวน์ทำให้เกิดช่องว่างและมีอากาศแทรกเข้าไปในตัวทำละลาย(รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547 : 85-89)

2.2.5 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

การทำสารสกัดให้เข้มข้น(concentration) สารสกัดอย่างหยาบที่ได้จะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. การระเหย (Free evaporation) เป็นการนำตัวทำละลายออกจากตัวละลาย โดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือแผ่นความร้อน (hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไป และหากใช้สารอินทรีย์ (organic solvent) ในการสกัด การระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรง (direct heat) บนแผ่นความร้อน อาจเกิดอันตรายได้ง่าย นอกจากนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสลายตัวของสาระสำคัญ เมื่อใช้ความร้อน

2. การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (Distillation in vacuo) เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดเป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากตัวทำละลายสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศ(vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า rotary evaporator ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ 3 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบที่จะกลั่น (distillation flask) ส่วนคอนเดนเซอร์หรือส่วนควบแน่นไอสารละลาย (condenser) และภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่น (receiving flask) โดยสารสกัดอย่างหยาบซึ่งบรรจุในภาชนะแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้และจะหมุน (rotate) ตลอดเวลาที่ทำงาน เพื่อให้มีการกระจายความร้อนอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบนี้จะต้องต่อเข้ากับส่วนควบแน่น ซึ่งมีระบบทำความเย็นหล่ออยู่ตลอดเวลา ปลายของส่วนควบแน่นจะมีภาชนะรองรับ โดยทั้งระบบจะต้อเข้ากับระบบสุญญากาศ สารละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุจะควบแน่นที่บริเวณคอนเดนเซอร์และหยดลงมาในภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่นซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ใหม่ได้

3. การทำให้แห้ง (drying) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากตัวทำละลายจนแห้งได้สารสกัดออกมาในสภาพของเข็งหรือกึ่งของแข็ง มีหลายวิธี เช่น การใช้ความเย็น (lyophilizer หรือ freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (spray dyer)

4. อัลตราฟิลเทรชั่น (ultrafiltration) เป็นการนำสารสกัดด้วยน้ำ ทำให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรน (membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหลักโมเลกุล (molecular weight) สูงกว่า 5,000
รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 101-102)

2.3 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

การตรวจสอบประเภทของสารออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑธรรมชาติจากพืช ต้องทราบว่าปฏิกิริยาการตรวจสอบเหลานี้ไมจำเพาะเจาะจง และการใหผลบวกก็เปนเพียงการบอกถึงประเภทของสารผลิตภัณฑธรรมชาติบางชนิดเทานั้น เพราะสารประกอบบางชนิดมีโครงสรางคลายกันแต่เป็นสารตางกลุมกันจะใหผลบวกลวง ในอีกแงหนึ่งการใหผลลบก็อาจเกิดจากสารประกอบที่นำมาทดสอบมีความเขมขนต่ำเกินไป หรือมีปริมาณไมพอตอการตรวจสอบดวยสารเคมี การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี ดังนี้ (รัตนา อินทรานุปกรณ์ และชุติมา ลิ้มมัทวาภิรัติ์)

การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือการเกิดตะกอน

โดยการนำสารตัวอย่างมาทำปฏิกิริยาเคมีจะปรากฏสี หรือเกิดการขุ่น (turbidity) หรือเกิดตะกอน เป็นวิธีที่มีความไว (sensitive) สูง แต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับกลุ่มสารเคมีและต้องระวังปริมาณน้ำยาตรวจสอบที่ใช้และภาวะที่เหมาะสม

1. กลุ่มคาร์โบไฮเดรตใช้ปฏิกิริยามอลลิช (Molisch's test) การเกิดวงแหวนสีมวงแดงที่รอยตอระหวางชั้นของเหลวกับ Molisch reagent การตรวจสอบสมบัติการเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing agent) ของโมโนแซคคาร์ไรด์ และไดแซ็กคาร์ไรด์ ใช้สารละลายเฟทลิ่ง (Fehling's solution) ถ้ามีจะเกิดตะกอนแดงของคิวปรัสออกไซด์ (cuprous oxide)

การตรวจสอบน้ำตาลดีออกซี (deoxysugar) ใช้ปฏิกิริยาเคอเลอขคิเลียนี (Keller-Kiliani test) โดยละลายน้ำตาลในกรดน้ำส้มที่มีสารเฟอริกคลอไรด์ (ferric chloride) ละลายอยู่เล็กน้อย เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ถ้ามีน้ำตาลดีออกซีจะเห็นสีน้ำตาลแดงเกิดขึ้นตรงรอยต่อของชั้นสารละลายและจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

2. กลุ่มแอลคาลอยด์ อัลคาลอยเปนสารที่มีฤทธิ์เปนดางและมีไนโตรเจนเปนองคประกอบในโมเลกุล true alkaloids ตองมีไนโตรเจนอยู่ใน heterocyclic ring และมีสูตรโครงสรางทางเคมีที่ซับซอน สามารถตรวจสอบดวยน้ำยาทดสอบเบื้องตน เชน Dragendorff's reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีแดงอิฐหรือสีสม Kraut's reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีสมน้ำตาลแดง Marme's reagent (potassium cadmium iodide) เกิด ตะกอนสีขาว และ Hager's reagent (picric acid) เกิดตะกอนสีเหลือง ทั้งนี้สารที่ใชตรวจสอบอัลคาลอยด เชน Mayer reagent, Dragendorff reagent, Wagner reagent และ Ammonium reineckate จะใหผลบวกลวงกับ coumarins, polyphenols, purines, amino acids, proteins และสารประกอบไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ ซึ่งมักพบไดในสาร สกัดจากพืช ในทางตรงกันขามอัลคาลอยดไมทุกชนิดที่อาจพบไดในสารสกัดจากพืชจะใหผลบวกกับสารทดสอบเหลานี้ เพราะลักษณะเฉพาะหรือคุณสมบัติเฉพาะของโครงสรางทางเคมี

3. กลุ่มไกลโคไซด์

3.1 กลุ่มคาร์ดิแอกกลุ่มไกลโคไซด์

ภายในโครงสรางทางเคมีประกอบดวย steroids nucleus, unsaturated lactone ring และ rare sugar ซึ่งมีความสำคัญในการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ การตรวจสอบแตละสวนของโครงสรางทำไดดังนี้

1. Steroid nucleus ใชวิธี Liebermann-Burchard test ใหสีฟาหรือเขียว สารทดสอบตองแหงและปราศจากน้ำ

2. Unsaturated lactone ring ตรวจสอบดวย Kedde reagent หรือ Raymond reagent ใหสีมวง น้ำเงิน หรือ Baljet reagent ใหสีสม-แดง

3. Deoxy sugar ตรวจสอบดวย Killer-Kailiani test ใหวงแหวนสีมวงแดงที่รอยต่อระหวางชั้นของเหลว ทั้งนี้สารประกอบหลายชนิดในกลุม sesquiterpene lactones และ cardiacglycosides ที่มีโครงสราง เปน unsaturated lactones จะใหผลบวกกับการทดสอบดวย Kedde reagent, Baljet reagent และ Legal reagent

3.2 กลุ่มซาโปนินไกลโคไซด์ ซาโปนินไกลโคไซด์เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่มีโครงสร้างทางเคมีแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามชนิดของอะไกลโคน (aglycone) คือ สเตียรอยดอลซาโปจินิน (steroidal sapogenin) และไทรเทอร์พีนอยด์ซาโปจินิน (triterpenoid sapogenic) การตรวจสอบเบื้องต้น จากการเกิดฟองเมื่อเขยากับน้ำ ฟองรูปหกเหลี่ยมจะคงอยูนานกวา 15 นาที และคุณสมบัติการทำใหเม็ดเลือดแดง แตกออก นอกจากนี้ยังตรวจสอบดวย Liebermann-Burchard test โดย steroidal saponins ใหสีฟา-เขียว ในขณะที่ triterpenoid saponins ใหสีมวงแดง

3.3 กลุ่มแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ สารในกลุมนี้ประกอบดวยสวนของ aglycone ของanthraquinones และน้ำตาล ซึ่งanthraquinones มีคุณสมบัติละลายไดดีในดาง แลวเกิดเปนสีชมพูหรือแดง ดังนั้นจึงไฮโดรไลซ anthraquinone glycosides ดวยกรดหรือดาง หรือ $FeCl_3$ หรือ sodium dithionate ใหกลายเปน aglycone ของ anthraquinones แลวจึงสกัดออกมาดวยตัวทำละลายอินทรีย จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายอินทรียมาทดสอบกับดางจะพบสีชมพู-แดง การทดสอบนี้เรียกวา Borntrager test

3.4 กลุ่มไซยาโนจินิกส์ไกลโคไซด์ ทดสอบดวยวิธี Grignard test และ Guaiac-copper sulfate paper วิธีที่นิยมใช้กันมากคือวิธีที่ใช้กระดาษพิเครท เนื่องจากสามารถตรวจหากรดไฮโดรไซยานิกไดแม้ว่ามีปริมาณน้อยขนาด 1 ไมโครกรัมหรือต่ำกว่าได้ ในการจรวจหากรดไฮโดรไซยานิกมีข้อระวัง คือหากผลการตรวจสอบเป็นผลบวก มิได้หมายความว่าในพืชตัวอย่างนั้น มีไซยาโนจินิกไกลโคไซด์อยู่เป็นองค์ประกอบเสมอไป พืชนั้นอาจจะมีไซยาโนจีนิกไลปิด (cyanogenic lipid) ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซ์ได้โดยเอนไซม์ไลเปส (lipase enzyme) ที่อยู่ในพืชนั้นและให้กรดนี้ออกมาหากผลการตรวจสอบให้ผลบวกตั้งแต่ช่วงเวลา 16-24 ชั่วโมง ในกรณีนี้กรดไฮโดรไซยานิกที่ถูกปล่อยออกมาส่วนใหญ่เกิดจากสารเคมีที่ระเหยได้ตัวอื่นๆ มากกว่าจะมาจากไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ สารเคมีเหล่านี้อาจเป็นพวกไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) หรือพวกอัลดีไฮด์ที่ระเหยได้ (volatile aldehydes) หรือแม้แต่พวกสารอินทรีย์ไทโอไซยาเนส (thiocyanates) และไนไทรต์ (nitrites) ก็ให้ผลบวกในการตรวจสอบเช่นเดียวกัน ฉะนั้นช่วงเวลาที่ถือว่าผลการตรวจสอบเป็นผลบวกควรอยู่ในช่วง 15 นาทีถึง 3 ชั่วโมงเท่านั้น

การตรวจหาไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ในพืชตัวอย่างควรทำการเปรียบเทียบกับพืชชนิดเดียวกัน แต่ใช้ภาวะเงื่อนไขที่แตกต่างกัน เช่น หลอดทดลองหนึ่งมีการเติมเอนไซม์อิมัลซิน(emulsion) กับ (linamarase) ลงไป แต่อีกหลอดหนึ่งไม่ต้องเติม เพื่อให้แน่ใจว่าผลการตรวจสอบเป็นผลบวกจริง เนื่องจากพืชบางชนิดถึงแม้จะมีไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบจริง แต่อาจขาดเอนไซม์ เบตา-กลูโคซิเดสร่วมอยู่ในพืชนั้น จึงเติมเอนไซม์ทั้งคู่ลงในหลอดทดลองหลอดหนึ่งเพื่อเปรียบเทียบกัน จะช่วยในการตัดสินใจว่าผลการตรวจสอบนั้นเป็นผลบวกจริง

3.5 กลุ่มไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์ การตรวจหาไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์อาจตรวจในสภาพของไกลโคไซด์หรือตรวจหาผลิตภัณฑ์ของไกลโคไซด์จากการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ (enzymic hydrolytic products) เช่น ตรวจหาน้ำตาลกลูโคสหรือหมู่ซัลเฟตหรือโมเลกุลของไอโซไทโอไซยาเนต

การตรวจหาในสภาพไกลโคไซด์จัดเป็นวิธีที่นิยมและง่ายต่อการตรวจหา โดยนำพืชที่ต้องการมาต้มในแอลกอฮอล์เดือด เพื่อขจัดฤทธิ์ของเอนไซม์ จากนั้นทำการสกัดพืชด้วยน้ำต้มเดือดหรือเอทานอลหรือเมทานอล หากพืชมีองค์ประกอบเป็นพวกไขมันมากควรกำจัดไขมันออก แล้วทำให้เข้มข้นโดยเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (rotary evaporator) และแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) ซึ่งมีอะลูมินา (alumina) เป็นตัวดูดซับหรือมี เรซินชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบได้ (anion exchange resin) เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออน นำไกลโคไซด์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกในสารละลายผสมของแอลกอฮอล์และน้ำ จากนั้นศึกษาเอกลักษณ์ของไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์ด้วยเปเปอร์โครมาโทกราฟีหรือรงคเลขกระดาษ (paper chromatography) ในระบบตัวทำละลาย (solvent system) ของบิวทานอล-กรดแอซิติก- น้ำ (butanol-acetic acid-water) จากนั้นฉีดพ่นด้วย 0.2 โมลาร์ของ ซิลเวอร์ไนเทรต (silver nitrate) และอบให้แห้งด้วย 0.2 โมลาร์ของโพแทสเซียมไดโครเมต (potassium dichromate) ถ้าหากเป็นไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์จะสังเกตเห็นจุดสีเหลือปรากฏขึ้นบนพื้นสีแดง

3.6 กลุ่มฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยดแบ่งออกเป็น typical flavonoids, related flavonoids และ miscellaneous flavonoids การตรวจสอบสารในกลุ่มนี้ ทำได้ดังนี้

1. Shibata’s reaction หรือ Cyanidin test เป็นการตรวจสอบโครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด หากมีโครงสร้างเป็น benzo-pyrone ที่เป็นโครงสร้างสวนสำคัญใน flavones, flavonols, flavanones, flavanonols และ isoflavones จะเกิดปฏิกิริยากับแมกนีเซียมโดยมีกรดไฮโดรคลอริก เขมขนช่วยละลายแมกนีเซียมและเร่งปฏิกิริยา ได้ผลบวกเป็นสารละลายสีส้ม แดง หรือชมพู

2. Pew test ใช้หลักการเดียวกันกับ cyanidin test แต่ใช้สังกะสีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลบวกจะให้สารละลายเป็นสี ส้ม แดง แต่สีที่เกิดขึ้นจางกว่าวิธี cyanidin test

3. Ferric chloride (FCl_3) test เป็นการตรวจสอบ phenolic group ในโครงสร้าง ซึ่งพบได้ใน flavonoids, tannins, coumarins, quinones และสารที่ประกอบด้วย phenolic group ผลบวกจะเกิดตะกอนหรือสารละลายมีสีเขียว น้ำเงิน หรือดำ

4. Bromine water เป็นการตรวจสอบสารในกลุ่ม proanthocyanidins ที่เป็นองค์ประกอบใน condensed tannins ผลบวกเกิดตะกอนสีเหลือง ซึ่ง flavonoids กลุ่มอื่น ๆ จะให้ผลลบ

5. Molisch's test เปนการทดสอบสารกลุมคารโบไฮเดรต หากพบน้ำตาลซึ่งเปนสวนหนึ่งของ glycosides จะพบวงแหวนสีมวงที่รอยตอระหวางชั้นของเหลว และในบางครั้งพบสีมวงกระจายอยูทั่วไปในชั้นลางที่เปนชั้นกรดซัลฟวริก เขมขน

6. การตรวจสอบโดยใชสารละลายกรดและดาง จะพบวาฟลาโวนอยดมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงสีไดตามสภาพความ เปนกรดหรือดาง หากเปนสารกลุม anthocyanins เมื่ออยูในสภาวะกรดจะใหสีแดง และในสภาวะดางจะใหสีมวง หรือน้ำเงิน หากเปนสารกลุม chalcones และ aurones เมื่ออยูในสภาวะกรดจะใหสีแดง และในสภาวะดางจะใหสี สมหรือแดง ทั้งนี้สารในกลุมฟลาโวนอยดจะใหผลบวกกับ Shinoda test และกรดซัลฟวริก ในขณะที่สารพวก polyphenols ชนิดอื่นก็สามารถใหผลบวกลวงกับสารทดสอบเหลานี้ดวย

4. กลุมคูมาริน คูมารินเปนสารที่มีโครงสรางพื้นฐานเปน benzo-pyrone หรือ phenylpropanoid lactone หรือ benzopyran-2-one ตรวจสอบดวยการนำสารสกัดดวยแอลกอฮอลมาละลายในเอธานอลแลวกรอง จากนั้นนำไปชุบดวยกระดาษ กรอง แลวจึงหยดดวย 10% NaOH จะพบการเรืองแสงที่ long wave UV (365 nm)

5. กลุมแทนนิน แทนนิน เปนสารจำพวก polyphenols แบงออกเปน 3 กลุม คือ 1). hydrolyzable tannins ที่โครงสรางทางเคมี ประกอบดวย phenolic acids และน้ำตาล เมื่อตมในกรดหรือใชเอนไซมจะกลายเปน กรดและน้ำตาล 2). condensed tannins มีโครงสรางเปน oligomer หรือ polymer ที่มี monomer เปน catechins (flavan-3-ol) ซึ่งอาจจัดเปน proanthocyanidins ของ flavonoids เมื่อนำไปตมกับกรดจะเกิดตะกอนสีแดงที่เรียกวา phloba phene จึงเรียกสารเหลานี้วา phlobatannins และ 3). pseudotannins เปนสารเชิงเดี่ยวมีขนาดโมเลกุลเล็ก แทนนินมีฤทธิ์ฝาดสมานและ ตกตะกอนอัลคาลอยดได จึงทำใหอัลคาลอยดหมดฤทธิ์ทางชีวภาพ การตรวจสอบแทนนินอาศัยการเกิดตะกอนระหวาง แทนนินกับ gelatin, lead acetate, zinc acetate หรืออัลคาลอยด ไดดังนี้

1. การตรวจสอบดวย gelatin สารจำพวก true tannins จะเกิดตะกอนคงตัวกับ gelatin แตสารจำพวก pseudotannins จะเกิดตะกอนที่ไมคงตัว

2. การตรวจสอบดวย bromine water หากเปน condensed tannins จะเกิดสีเหลืองกับ bromine water

3. การตรวจสอบดวย $FeCl_3$ หากเปน hydrolyzable tannins จะเกิดตะกอนสีน้ำเงิน ในขณะที่ condensed tannins จะเกิดตะกอนสีเขียว สำหรับสารอื่น ๆ ที่ประกอบดวย phenolic group เชน flavonoids และ coumarins จะเกิดสี เขียวหรือน้ำเงิน ในขณะที่สารพวก polyphenols อื่น ๆ จะเกิดตะกอนสีน้ำตาลกับสารละลาย ferric chloride (5%) ในน้ำหรือเอธานอล

4. การตรวจสอบดวย vanillin reagent และกรดไฮโดรคลอริกเขมขน พบวา condensed tannins จะเกิดสีแดง

6. กลุมเทอร์พีนอยด์ การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์อาศัยหลักการเกิดสีกับน้ำยาทดสอบบางชนิด เช่น น้ำยา 2,6-ได-เทอร์-บิวทิว-พารา-ครีซอลในเอทานอล (2,6-di-tert-butyl-p-cresol in ethanol) ใช้ตรวจสอบเพนตาไซคลิกไทรเทอร์พีนอยด์ (pentacyclic trirerpenoids) ให้สีม่วง หรือใช้น้ำยากรดคลอโรซัลโฟนิก (chlorosulfonic acid) ไทรเทอร์พีนอยด์ให้สีแดง เป็นต้น

2.4 การแยกสารด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี

1. Thin layer chromatography (TCL)

Thin layer chromatography สามารถแย่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามลักษณะของวัฏภาคคงที่ คือnormal phase TCL และ reverse phase TCL หากเป็น normal phase TCL สารที่มีขั้วต่ำจะเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าสารที่มีขั้วสูง ในขณะที่ reverse phase TCL สารที่มีขั้วสูงจะเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าสารที่มีขั้วต่ำ โดยทั่วไปนิยมทดลองแยกตัวอย่างด้วย TCL เพื่อหาค่า R_f ที่เหมาะสมของตัวอย่างที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะทำการแยกจริงด้วย column chromatography (CC) ค่า R_f ที่ดีจะต้องเป็นค่าที่ไม่ทำให้สารที่สนใจติดค้างอยู่จุดเริ่มต้นหรือเคลื่อนที่ด้ำกลเกินไปจนใกล้หรือคิดตัก solvent front เมื่อหาสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ได้เหมาะสมแล้วจึงนำตัวอย่างที่ต้องการแยกในปริมาณสูงขึ้นมาแยกในคอลัมน์ต่อไป อย่างไรก็ตามไม่สามารถนำสภาวะหรือสัดส่วนขององค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ได้จาก TCL มาใช้กับ CC ได้โดยตรง เนื่องจากคอลัมน์เป็นการเคลื่อนที่แบบสองทิศทางและมีสมดุลเกิดขึ้นในคอลัมน์ แต่ TCL นั้นมีสมดุลระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคคงที่ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงตลอดระยะทางที่สารเคลื่อนที่ ดังนั้นเมื่อต้องการนำสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ใช้ใน TLC ไปใช้ในการแยกสารด้วย CC จึงแนะนำให้ลดความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ใน TLC ลงเล็กน้อย(ในกรณีที่วัฏภาคคงที่เป็น normal phase) และเพิ่มความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ทีใช้ใน TLC มากขึ้นเล็กน้อย (ในกรณีวัฏภาคคงที่เป็น reverse phase) เพื่อให้การแยกสารในคอลัมน์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

R_f = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ / ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

โดยทั่วไปมักใช้ TLC ร่วมกับ densitometric detector เพราะเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง แยกสารได้รวดเร็วสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณสาร หรือใช้แยกสารเจือปนออกได้ นอกจากนี้ยังได้พัฒนามาเป็น high –performance TLC (HTLC) ซึ่งมีความหนาของวัฏภาคคงที่ที่บางลงและขนาดอนุภาคของวัฏภาคคงที่ที่เล็กลงด้วย จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการแยกสารได้ดีขึ้น

2. Column chromatography (CC)

Column chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารที่ภายในคอลัมน์จะบรรจุวัฏภาคคงที่ชนิดต่างๆ เอาไว้ เมื่อบรรจุ (load) สารตัวอย่างที่ต้อการแยกให้บริสุทธิ์ไปบนคอลัมน์แล้ว จึงชะสารออกจากคอลัมน์ตามแบนด์ (band) ที่ปรากฏอยู่ในคอลัมน์ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมต่อไป

การแยกสารตัวอย่างในคอลัมน์ออกเป็นแบนด์อาศัยหลักการของโครมาโตกราฟีซึ่งหมายถึงการกระจาย (distribution) ของสารระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่กับวัฏภาคคงที่ ดังสมการต่อไปนี้

$$K_D = \frac{[X]_{stationary\ phase}}{[X]_{mobile\ phase}}$$

ความสามารถในการแยกสารเกิดจากอันตรกิริยา (interaction) ของสารกับวัฏภาคคงที่และการแย่งกันจับกับวัฏภาคคงที่ระหว่างสารกับวัฏภาคเคลื่อนที่ วัฏภาคคงที่อาจเป็นของแข็งหรือของเหลว และวัฏภาคเคลื่อนที่อาจเป็นของเหลวหรือก๊าซ ซึ่งจัดเป็น liquid chromatography (CL) และgas chromatography (GC) ตามลำดับ นิยมใช้ GC โดยเฉพาะ Gas-liquid chromatography (GLC)

ในงานวิเคราะห์แต่ไม่สามารถใช้เทคนิคนี้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีโครงสร้างทางเคมีหลากหลายได้ทุกชนิด โดยทั่วไปสามารถแบ่ง LC ออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ การแบ่งตามลักษณะทางกายภาพของระบบ ได้แก่ CC และ planar chromatography (TLC และ paper chromatography) สำหรับ countercurrent chromatography เป็นการแยกสารด้วยของเหลว 2 เฟสที่แบ่งออกเป็นวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ โครมาโทกราฟีส่วนมากมักบรรจุวัฏภาคคงที่ไว้ในคอลัมน์และมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลว และการแบ่งตามลักษณะการแยกสารที่อาศัยแรงกระทำระหว่างโมเลกุล หรือลักษณะการแยกที่แตกต่างกัน เช่น การดูดซับ (adsorption) การแยกส่วน (partition) ประจุ (charge) ขนาด (size) และการจับกันของชีวโมเลกุล (biological affinity) เป็นต้น

การดูดซับ (adsorption) เป็นการแบ่งภาคหรือแยกส่วนของโมเลกุลระหว่างผิวหน้าของวัฏภาคคงที่กับวัฏภาคเคลื่อนที่ ณ ที่สมดุลพลวัต (dynamic equilibrium) ซึ่งจะมีสารเข้าและออกระหว่างวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ในปริมาณที่เท่าๆ กัน เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่า การดูดซับ(sorption) และการคาย(desorption) ตามลำดับ โดยอาศัยแรงทางพันธุเคมีที่เป็นแรงอ่อนๆ เช่น hydrogen bond , Van der Waals force และ dipole-dipole interaction สารที่นิยมนำมาใช้เป็นสารดูดซับ (adsorbent) จะต้องคงตัวและไม่เกิดปฏิกิริยาได้ง่าย เช่น silica, cellulose, styrene, divinylbenzene, alumina และ carbon เป็นต้น

การแยกส่วน (partition) เป็นการแบ่งภาคหรือแยกส่วนของสารที่อาศัยหลักการสกัดระหว่างของเหลวกับของเหลวโดยวัฏภาคคงที่เป็นของเหลวชนิดหนึ่งที่เคลือบอยู่บน solid support เช่น คอลัมน์ของ เซลลูโลสที่เคลือบด้วยน้ำ หรือ silica TLC plate ที่ดูดซับน้ำเอาไว้บนผิวหน้า ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่เข้ากันไม่ได้กับของเหลวที่เป็นวัฏภาคคงที่ จึงทำให้เกิดการสกัดระหว่างขั้นของของเหลว (liquid-liquid extraction) ซึ่งเป็นข้อดีของการแยกสารด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี อย่าไรก็ตามเทคนิคนี้ก็มีข้อเสียคือวัฏภาคคงที่ที่เป็นของเหลวจะถูกชะออกไปจากคอลัมน์พร้อมกับวัฏภาคเคลื่อนที่ และเกิดการละลายของวัฏภาคคงที่ได้

โดยทั่วไปแล้ววัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลวมักเกิดพันธะเคมีกับตัวรองที่เฉื่อย (inert support) ได้เป็น bonded phase ซึ่งหมายถึงพันธะที่คงตัว เช่น พันธะระหว่าง silanol group (Si-OH) บน silica support กับ chlorosilane ซึ่งสารจำพวก silane มักเป็นสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon chain)ที่มีคาร์บอนมาเชื่อมต่อกันยาวประมาณ 1,2,6, 8 หรือ 18คาร์บอน ดังนั้น bonded phase chromatography หรือ modified partition chromatography จึงเป็นการแยกสารที่อาศัยหลักการร่วมกันระหว่างการแยกส่วน (partition) และการดูดซับ (adsorption) สำหรับความแตกต่างระหว่าง normal phase กับ reverse phase คือ normal phase มีวัฏภาคคงที่มีความเป็นขั้วสูงกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ ตัวอย่างเช่น silica column มี silanol group ที่มีขั้วสูงกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ในขณะที่ reverse phase จะมีวัฏภาคคงที่ที่มีขั้วต่ำกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ เช่น สายไฮโดรคาร์บอนที่สร้างพันธะกับ silica support เป็นเสมือนวัฏภาคคงที่ที่มีขั้วต่ำและมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำที่มีขั้วสูง ซึ่งอาจผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น เมธานอลหรืออะซีโตไนไตร์ (acetonitrite) อย่างไรก็ตาม หากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่กำลังแยกอยู่นั้นมีขั้วต่ำและไม่ชอบน้ำ มันจึงอาจติดค้างอยู่ในคอลัมน์ได้ ดังนั้นจึงแนะนำให้ติดตามการชะสารออกจากคอลัมน์โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารที่อยู่ในส่วนสกัดต่างๆ ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย TLC เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสารใดติดค้างอยู่ในคอลัมน์

3. Gradient highperformance liquid chromatography

Gradient high performance liquid chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงความต่างระดับของความมีขั้ว (gradient) ของวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ตลอดเวลา เพื่อแยกของผสมและชะองค์ประกอบทุกชนิดให้ออกมาจากคอลัมน์ตามลำดับความมีขั้ว การชะสารออกจากคอลัมน์ด้วย gradient elution มีข้อดีกว่า isocratic elution ซึ่งมีสัดส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์คงที่ตลอดเวลา ตรงที่สามารถแยกสารที่มีขั้วใกล้เคียงกันมากออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถแยกสารที่มีขั้วสูงและต่ำออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการคู่ต่อมาการใช้ประโยชน์ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเป็นจำนวนมาก เช่น HPLC-UV, GC-MS, HPLC-MS และ HPLC-NMR เป็นต้น การวิเคราะห์สารที่แยกออกมาจาก HPLC column ด้วย UV และ NMR จะสามารถนำสารนั้นกลับคืนมาได้ ในขณะที่การวิเคราะห์ GC และ MS ไม่สามารถนำสารที่ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือดังกล่าวกลับคืนมาได้ อย่างไรก็ตามสารต่างชนิดกันอาจดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันได้ ทำให้ UV มีความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่ำกว่า MS นอกจากนี้ MS ยังมีความไว (sensitivity) ที่สูงกว่า UV จึงสามารถวิเคราะห์สารในปริมาณต่ำมากได้ การแยกสารด้วย GC มีข้อด้อยกว่าการแยกด้วย HPLC เนื่องจาก GC เหมาะสำหรับการแยกสารที่สามารถระเหยได้และทนต่อความร้อน หากสารที่ต้องการแยกระเหยไม่ได้จะต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ที่ระเหยได้เสียก่อน จึงทำให้มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและเสียเวลามาก ดังนั้นในปัจจุบันจึงมักพบว่า HPLC-MS เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในการศึกษาองค์ปีระกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ

2.5 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

2.5.1 อนุมูลอิสระ

อธิป สกุลเผือก,มปป และบุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556 กล่าวว่าถึงอนุมูลอิสระดังนี้ อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มี unpaired electron อย่างน้อย 1 ตัว เกิดขึ้นจากการแตกของพันธะระหว่างอะตอม อนุมูลอิสระนั้นไม่เสถียรและมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้อนุมูลอิสระเดิมเสถียรขึ้น ส่งผลให้โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) อนุมูลอิสระ พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิต และในเซลล์ โดย เฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจนทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา

อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ oxygen radical, อนุพันธ์ของ oxygen radical นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภท ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด (lipid)โปรตีน (protein) เอนไซม์ (enzyme) ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate)เซลล์เมมเบรน (cell membrane) คอลลาเจน (collagen) ไมโตคอนเดรีย (mitocondria) และเนื้อเยื่อ เกี่ยวพัน (connective tissues) ซึ่งเป็นสาเหตุ

ให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคชรา (aging) โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคภูมิแพ้ (allergies) โรคความดันโลหิต โรคเหงือก โรค เกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอดและระบบ ประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับ ความผิดปกติของผิวหนัง และโรคลำไส้อักเสบเป็นต้น อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายใน สิ่งมีชีวิตแล้วอนุมูลอิสระสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อโรคไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (immune diseases) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ เป็นต้น จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่น ควันบุหรี่ แก๊สจากท่อไอเสีย เช่น ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจน ไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ ฝุ่นจากกระบวนการ ประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่ มีอุณหภูมิสูง ๆ กลับมาใช้อีก การทำให้เกิดอาหารประเภทเกรียม ไหม้ หรือเกิดจากการปิ้งย่าง จากยา บางชนิด เช่น โดโซรูบิซิน (doxorubicin) เพนนิซิลลามิน (penicillamine) พาราเซตามอล (paracetamol)

อย่างไรก็ตามสิ่งที่ใช้บอกระดับความเป็นพิษคือความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกาย สารที่มีความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกายเรียกว่า Reactive species (RS) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS) และยังพบในรูปของ reactive chlorine species และ reactive nitrogen species ตามโมเลกุลที่สามารถทาให้เกิดปฏิกิริยา oxidation อาจจะพบได้ในรูปของ lipid radical หรือ genetic radical RS นั้นไม่จำเป็นว่าจะต้องอยู่ในรูปของ free radical เสมอไป สารประกอบบางโมเลกุลที่อยู่ในรูป non-radical แต่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา oxidation

2.5.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ(antioxidants) เป็นสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นและไม่เป็นเอนไซม์ สารที่ละลายในน้ำและสารที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ(radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์(synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์(enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระเป็นต้น

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์(synthetic antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone สารดังกล่าวนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไปสารสังเคราะห์นี้มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติแต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภคขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งเป็นได้ทั้งเอนไซม์ วิตามินและสารอื่น ๆตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น

vitamin C (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาซึม) vitamin E (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เมมเบรน) และglutathione (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาซึมและเมมเบรน) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ได้แก่ glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase และ glutathione transferase ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็น ออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ superoxid dismutase (SOD) สามารถเปลี่ยน O_2 เป็น H_2O_2 สารต้านอนุ-มูลอิสระอื่น ๆ ได้แก่ carotenoids และ ubiquinones เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันอนุมูลอิสระออกซิเจนทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์

ในภาวะปกติร่างกายมีการป้องกันการสะสมอนุมูลอิสระโดยการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และสารต้ายอนุมูลอิสระที่รับประทานเข้าไปจำพวกวิตามินเบต้าแคโรทีน และแคโรทีนอยด์รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล

คุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระ

1. ป้องกันการเกิดขึ้นของ reactive oxygen species ROS ได้
2. สามารถจับกับ ROS ที่เกิดขึ้นก่อนที่ ROS นั้นจะไปทาอันตรายเนื้อเยื่อต่างๆ
3. ต้องไม่เพิ่มความแรงของอนุมูลอิสระหรือไม่เปลี่ยน ROS ที่มีความแรงต่าไปเป็น ROS ที่มีความแรงสูงเช่นไม่เปลี่ยนจาก super oxide ไปเป็น hydroxyl radical เป็นต้น
4. ทาให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการทางานของ antioxidant enzyme หรือสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ
5. เพิ่มการแสดงออกของยีนที่ใช้สร้าง antioxidant enzyme และช่วยในการฟื้นฟูความเสียหายของเซลล์หรือเนื้อเยื่อจากการถูกทาลายด้วยอนุมูลอิสระ

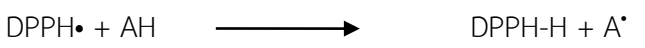
สารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายได้เป็น 4 ประเภทดังนี้

1. Intracellular antioxidants (antioxidant enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆที่ใช้ในการต้านอนุมูลอิสระเช่น catalase glutathione peroxidase superoxide dismutase
2. Extracellular antioxidants ได้แก่ Vitamin C สารที่มีกลุ่ม sulfhydryl groups
3. Membrane antioxidants ได้แก่ Carotenoids Ubiquinone Vitamin E
4. สารที่จาเป็นต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ Copper Manganese Selenium Zinc

2.5.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(antioxidant activity determination)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี diphenylpicryhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay โดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระคืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช ($DPPH^{\bullet}$, diphenyl- picryhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตรมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ $DPPH^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลง ๆจนเป็นสีเหลือง (ดังสมการ 5) ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง)



DPPH radical scavenging (%) = [(A0-As)/A0] x 100
โดย A0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น
และAs = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ คือ โทรล็อกซ์ (trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid)แสดงค่าเป็น TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) มีหน่วยเป็น mM/mg หรือ μM/mg

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว [11] ส่วนข้อเสีย คือ DPPH• ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ [12] อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน(interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรีดิวซ์แล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้เช่นกัน

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์ และคณะ (2546) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากพืชสมุนไพรจังหวัดอุบลราชธานี โดยจากการนำ สารสกัดจาก เอทิลแอซิเตต และ เอทานอล 22 ชนิด ซึ่งได้มาจากพืชในจังหวัดอุบลราชธานี 11 ต้น นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสิ่งสกัดจากใบพอกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปานกลางในการต้านอนุมูลอิสระ และสิ่งสกัดจากเอทานอลของใบการเวก มีฤทธิ์แรงในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ และคณะ (2547) ศึกษาพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงเพื่อใช้ทางยา เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง พบว่าเมล็ดมะเกี๋ยงมีองค์ประกอบของสารกลุ่มฟาโวนอยด์ ซาโปนิน แอนทราควิโนนกลัยโคซายด์และแทนนิน การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี ABTS Assays และ DPPH Assays พบว่าสารสกัดด้วย n-butanol และ ethyl acetate (F3และF4) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าส่วนอื่น โดยมีค่า TEAC เท่ากับ 1.5108 และ 1.3943 กรัม/กรัม ซึ่งมีฤทธิ์น้อยกว่า BHA , Quercetin แต่มีฤทธิ์มากกว่า BHT, Kaempferol และ Rutin และเมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี DPPH Assays พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ น้อยกว่า BHA, Quercetin , BHT แต่มีฤทธิ์มากกว่า Kaempferol

สรศักดิ์ เหลี่ยวไชยพันธุ์ และ ดวงพร เหลี่ยวไชยพันธุ์ (2548) ศึกษาการแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจากผลมะแกว่นป่า โดยใช้วิธี DPPH และ เทคนิคโครมาโทกราฟฟี่ผิวบาง (TLC) พบว่าสารสกัดเมทานอลของผลมะแกว่นป่ามีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระอยู่หลายชนิด การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ใช้คอลัมน์ซิลิกาเจลและคอลัมน์ของเรซิน Diaion HP-20 ตามลำดับ พบว่าสารถแยกสารต้านอนุมูลอิสระได้โดยการใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 70 : 30 และสารต้านอนุมูลอิสระที่แยกได้เป็นสารประกอบพวก Condensed tannin

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ และคณะ (2549) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อสิวของสารสกัดและน้ำหมักของพืชไทย พบว่าสารสกัดและน้ำหมักจากเปลือกมังคุด กระชายดำ มะขามป้อม มะเกี๋ยง ขมิ้นชันและใบบัวบก สามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Propionibacterium acnes* ได้ดีแตกต่างกัน โดยสารสกัดที่ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีคือสารสกัดจากมะขามป้อม เปลือกมังคุด กระชายดำ ขมิ้นชัน ใบบัวบก และมะเกี๋ยง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่ต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* ได้ดีคือสารสกัดจากมะขามป้อม กัดเปลือกมังคุด ขมิ้นชัน กระชายดำ ใบบัวบก และมะเกี๋ยง ตามลำดับ น้ำหมักชีวภาพที่สามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้คือน้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุด มะขามป้อม กระชายดำ ใบบัวบก และมะเกี๋ยง น้ำหมักชีวภาพที่สามารถต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* ได้คือน้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุดเท่านั้น และเมื่อนำน้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุด มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) โดยวิธี Broth dilution พบว่า ค่า MIC ของ *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 1.5625 % และ *Propionibacterium acnes* เท่ากับ 6.25 %

Pornpimon Mayachiew, Sakamon Devahastin(2007) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดจาก gooseberry and galangal โดยการสกัดสารจาก Indian gooseberry (Phyllanthus emblica Linn.) and galangal (Alpinia galanga) ทดสอบกับ Staphylococcus aureus 2 วิธี คือ disc diffusion และ agar dilution methods พบว่ามีค่า MIC 3.97 และ 0.78 mg/ml ตามลำดับ ค่า MBC 13.97 และ 2.34 mg/ ml ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดด้วยวิธี b-carotene bleaching method มีค่าเท่ากับ 86.4% and 70.3% ตามลำดับ ค่าฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocalteu method มีค่า 290.470.7 and 40.970.2 mg/g plant extract (in GAE) ตามลำดับ

Julie Nguyen-Pouplin และคณะ (2005) และคณะศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมาลาเรียและพิษของพืชสมุนไพรที่คัดเลือกจากภาคใต้เวียดนาม มะเดื่อเป็นพืชชนิดหนึ่งของภาคใต้เวียดนามที่ใช้ในการรักษาโรคมาลาเรีย

Krishna Murti และคณะ (2011) ศึกษาเกี่ยวกับการนำสารสกัดจากรากของมะเดื่อมารักษาแผลของหนูเผือกพบว่าสามารถควบคุมบริเวณและรักษาแผลได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

N. Swathi และคณะ (2011) ศึกษาเกี่ยวกับการประเมินฤทธิ์ทาง Nephroprotective Activity ของมะเดื่อพบว่าแสดงผลต่อ cisplatin-Induced

B. Pratumvinit (2012) ศึกษาเกี่ยวกับการนำสารสกัดของมะเดื่อด้วยเอทานอลมายับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมโดยสารสกัดแสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม และเสนอแนะให้ทางการแพทย์แผนนำไปใช้ประโยชน์บางอย่างในการรักษาโรคมะเร็งเต้านมต่อไป

Pravin Suresh Jogi และคณะ (2012) ศึกษาเกี่ยวกับ การประเมินผลองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและการตรวจคัดกรองทางชีวภาพของใบมะเดื่อในภูมิภาคป่า Chandrapur โดยนำใบมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน คือเมทานอล เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม เฮกเซนและน้ำ พบอัลคาลอยด์ เทอร์ปินอยด์ แทนนิน สารประกอบฟีนอลิก คาร์โบไฮเดรต ซาโปนิน แอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ และฟลาโวนอยด์

Amjad Ayad Qatran Al-Khdhairawi และคณะ (2017) พบว่า phenanthroindolizidine alkaloid Compound (+) - 1 แสดงผล cytotoxic ในหลอดทดลองที่คัดเลือกมาจากเซลล์ MDA-MB-468 (IC50 7.4 μM) ในขณะที่สารประกอบ 2 แสดงฤทธิ์ยับยั้ง cytotoxic ในหลอดทดลองทั้ง 3 สายของเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-468, MDA-MB-231 และ MCF7 ค่า IC50 0.038-0.91 μM)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

การวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะเดื่อมีรายละเอียดของการทดลองดังนี้

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1. เครื่องบดไฟฟ้า (Blender)
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
3. ตู้อบ
4. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)
5. เครื่องทำแสง UV
6. เตาไฟฟ้า
7. ชุดคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography)
8. ชุด TLC
9. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
10. อัลตราไวโอเลต วิสเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer)

3.1.2 สารเคมี

1. เฮกเซน (Hexen)
2. เอทานอล (Ethanol)
3. เมทานอล Methanol)
4. เอทิลอะซีเตต (Ethylacetate)
5. ไดคลอโรมีเทน (Dichlorometane)
6.. อะซีโตน (Acetone)
7. ซิลิกาเจล
8. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)
9. BHT (2, 6 – ditertiary –butyl-4-methyl phenol)
10. BHA (Butylated hydroxyanisole)
11. โซเดียมซัลเฟต (Na2SO4 anhydous)
12. กรดแทนนิค (Tannic acid)
13. กรดแกลลิค (Gallic acid)
14. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)
15. สารละลายฟอร์ลิน (Folin ciocalteu reagent)
16. กลุ่มสารทดสอบพฤกษเคมี

3.2 พืชที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 มะเดื่อ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ficus hispida* Linn. f. วงศ์ MORACEAE

รูปที่ 3.1 ผลมะเดื่อ

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเก็บ และการเตรียมพืช

1. ทำการเปรียบเทียบอนุกรมวิธานของพืชตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือมะเดื่อ โดยรับรองพืชตัวอย่างโดยผู้เชี่ยวชาญทางพฤกษศาสตร์ (Voucher Specimens)
2. นำส่วนของมะเดื่อมาทำความสะอาด หั่นให้เล็กแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
3. นำส่วนของมะเดื่อที่แห้งแล้ว ไปบดให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดไฟฟ้า (Blender) และนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

รูปที่ 3.2 ผลมะเดื่อที่บดละเอียด

3.3.2 การสกัดสารพืช

การสกัดสารที่มีองค์ประกอบสำคัญจากพืชตัวอย่างทั้ง 6 ชนิดได้แก่หนามพุงดอ ขลู่ ผักขมหิน เหงือกปลาหมอ ผักเบี้ย และทับแถบ ใช้เทคนิคการสกัด (Extraction) โดยใช้วิธีการหมัก(Maceration) มีขั้นตอนดังนี้

1. นำพืชตัวอย่างแต่ละชนิดมาทำความสะอาด หั่นให้เล็กแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และนำไปบดให้ละเอียด

2. นำพืชตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ในภาชนะปิด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

3. นำของผสมมาแยกสารสกัดและกากออกจากกัน โดยส่วนที่เป็นสารสกัดนำไประเหยแยกตัวทำละลายออกไป ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ทดสอบในขั้นต่อไป

รูปที่ 3.3 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)

3.3.3 การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมี

1. Alkaloids สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 5% HCl 20 ml อุ่น 15 นาที กรอง ทดสอบกับ Dragendorff's test, Marme's test, Mayer's test, Wanger's test, และ Kruat's test สังเกตสีและตะกอนที่เกิดขึ้น

2. Tannins phenolic compounds สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายในน้ำ 20 ml อุ่น 15 นาที กรอง ถ้าขุ่นหยด 4-5 หยด 10% NaCl กรอง นำมาทดสอบกับ gelatin solution, gelatin salt solution, 1% $FeCl_3$, Br_2 water, Vanilin, 40% Formalin / HCl และ Lime water

3. Triterpenes และ **Steroids** สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายด้วย $CHCl_3$ 1-2 ml นำมาทดสอบวิธี Liebermann Burchard test โดย หยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้นค่อยๆ หยด conc. H_2SO_4 1 หยด ลงในหลอดทดลอง สังเกตวงแหวนที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

4. Flavonoids สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน Petoleum ether 4 ml กรอง แล้วเอา residue ละลายใน 80 % ethanol 8 ml นำมาทดสอบ Cyadinin test โดยนำลวด Mg มาใส่ ในหลอดทดลอง 3-4 ชิ้น แล้วค่อยหยด conc. HCl 3 หยด สังเกตฟองที่เกิด ทิ้งไว้ให้ละลายจนหมด จากนั้น เติมน้ำ 1 ml และ Octyl alcohol 1 ml สังเกตสีในชั้นของ Octyl alcohol

5. Antraquinones สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 0.5 M KOH 10 ml แล้วเติม 3% H2O2 1ml ต้มบนหม้ออังไอน้ำ 10 นาที กรอง ทิ้งให้เย็น หยด CH3COOH จนเป็นกรด สกัด ด้วย C6H6 10 ml นำมาทดสอบ Modified Borntragers test โดยนำชั้นของ C6H6 ไปหยด NH3 T.S. ตั้งทิ้งไว้

6. Cardiac glycosides สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 10% Lead acetate 10 ml อุ่น 15 นาที ทิ้งให้เย็น กรอง สกัดด้วย $CHCl_3$ 5ml 3 ครั้ง นำมาทดสอบวิธี Liebermann burchard test โดย หยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้นค่อยๆ หยด conc. H_2SO_4 1-2 หยด ลงใน หลอดทดลอง สังเกตสีที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

1. การเตรียมสารสกัดจากพืชโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย

สกัดสารจากตัวอย่าง โดยทำตัวอย่างพืชให้มีขนาดเล็กและชั่งน้ำหนักตัวอย่างจำนวน100 กรัม นำมาสกัดด้วยเมทานอล 99.8 % ปริมาตร 500 มิลลิลิตร อัตราส่วน 1ต่อ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) เขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยเครื่องเขย่า (Shaker) หลังจากนั้นจึง กรองเอาสารสกัดออกจากกากของตัวอย่างพืช โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 ได้สารละลายที่สกัด แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) เก็บสารสกัดที่ได้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์

2. การทดสอบด้วย สาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยการนำสารสกัดมาทดสอบความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ตามวิธีของ Brand-Williams และคณะ(1995) (อ้างจาก นันทนา อรุณฤกษ์) มีวิธีการทดสอบดังนี้ นำสารละลายตัวอย่าง 100 ml ผสมกับ DPPH solution (4.5 mg DPPH in 100 ml absolute methanol) ปริมาตร 2.9 ml และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำมาวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของสาร DPPH ที่เหลือ ที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยรายงานเป็นค่า EC_{50} ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารทดสอบที่ใช้ในการลดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของสาร $DPPH_{เริ่มต้น}$ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ butylated hydroxytoluene (BHT) เป็น positive control สารตัวอย่างและ BHT ละลายใน DMSO โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

3.การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอล

การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยการใช้ Folin-Ciocalteu's reagent ตามวิธีของ Javanmardi และคณะ (2003) (อ้างจาก นันทนา อรุณฤกษ์) มีวิธีการทดสอบดังนี้นำสารสกัดที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (3 ซ้ำ) ผสมกับ Folin-Ciocalteu's reagent ที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 2.5 ml และสารละลาย Na_2CO_3 (7.5%, w/v) ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ปริมาณสารประกอบฟีนอล รายงานเป็น มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับกรดแกลลิคต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ 1 กรัม

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ได้แก่ ค่าเฉลี่ย และค่าร้อยละ

3.5 ระยะเวลาการทดลอง

1 ตุลาคม 2559 – 30 กันยายน 2560

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การวิจัยเรื่องการวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะเดื่อทำการทดลองโดยนำผลของมะเดื่อมาทำการสกัด และตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ผลการทดลองดังนี้

4.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

Phytochemical screening	ผลการทดสอบ
1. alkaloids	+
2. condensed tannins	+
3. phenolic compounds	++
4. flavonoids	-
5. triterpenes	+
6. steroids	++
7. cardiac glycosides	+
8. antraquinones	++

จากตารางที่ 4.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากกผลมะเดื่อพบสารกลุ่ม alkaloids condensed tannins phenolic compounds triterpenes steroids cardiac glycosides antraquinones

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.2.1 ทดสอบด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

นำสารสกัดจากผลมะเดื่อด้วยเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบค่าความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)ได้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารสกัด	**DPPH EC_{50} (μg/ml)**		
	Hexane	**Ethylacetate**	**Methanol**
Standard (BHT)	8.9		
ผล	> 1000	185	30

จากตารางที่ 4.2 สารสกัดหยาบจากผลของมะเดื่อด้วย Hexane Ethylacetate และ Methanol มีความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ค่า EC_{50} เท่ากับ > 1000, 285 และ 30 μg/ml ตามลำดับ

4.2.2 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล

นำสารสกัดจากผลมะเดื่อด้วยเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยการใช้ Folin-Ciocalteu's reagent ได้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล

สารสกัด	Total Phenolic (mg GAE/g dw)		
	Hexane	Ethylacetate	Methanol
ผล	3.09	55.25	99.59

จากตารางที่ 4.3 สารสกัดหยาบจากผลของมะเดื่อด้วย Hexane, ethylacetate และ Methanol มีปริมาณสารประกอบฟีนอลเท่ากับ 3.09, 55.25 และ 99.59 mg GAE/g dw

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากกผลมะเดื่อพบสารกลุ่ม alkaloids condensed tannins phenolic compounds triterpenes steroids cardiac glycosides antraquinones

5.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.1.2.1 การทดสอบ 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

เมื่อนำสารสกัดจากผลมะเดื่อด้วยเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบค่าความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)

สารสกัดหยาบจากผลของมะเดื่อด้วย Hexane, Ethylacetate และ Methanol มีความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ค่า EC_{50} เท่ากับ > 1000, 285 และ 30 μg/ml ตามลำดับ

5.1.2.2 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล

เมื่อนำสารสกัดจากผลมะเดื่อด้วยเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยการใช้ Folin-Ciocalteu's reagent

สารสกัดหยาบจากผลของมะเดื่อด้วย Hexane, ethylacetate และMethanol มีปริมาณสารประกอบฟีนอลเท่ากับ 3.09, 55.25 และ 99.59 mg GAE/g dw ตามลำดับ

5.2 อภิปรายผล

การวิจัยเรื่องการวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะเดื่อ ทำการทดลองโดยใช้ผลของมะเดื่อมาทำการแยกสารโดยการหมักและสกัดตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลาย 3 ชนิดคือเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ทั้งหมด3 ชนิด จากผลการศึกษาค้นพบประเด็นที่สำคัญดังนี้

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการทดสอบความสามารถในการลดปริมาณ 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่าสารสกัดหยาบจากผลของมะเดื่อชั้นเมทานอลแสดงความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) สูงที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 30 μg/ml

2. การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยการใช้ Folin-Ciocalteu’s reagent พบว่าสารสกัดหยาบจากผลของมะเดื่อ ชั้นเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุด มีค่า 99.59 mg GAE/g dw

5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาวิจัยครั้งต่อไปควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นของราก ใบและดอกของมะเดื่อและทำการแยกสารบริสุทธิ์ในระดับโครงสร้างโมเลกุลต่อไป

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

ธีรศักดิ์ โรจนาราธา และคณะ. 2551. **การประชุมวิชาการจับกระแสการรักษาและยาใหม่ 3**. คณะเภสัชศาสตร์ และชมรมศิษย์เก่าคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

นริศา คำแก่น . 2551. **การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร.** กรุงเทพฯ : ก็อปปี้บอกซ์.

ปัทมาวดี เสตะกัณณะ. **การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพรไทย** วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 44, 2 (2545) : 110-124

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ อุดมภัณฑ์ ขาลสุวรรณ นิสิต กิตติพงษ์พัฒนาและจตุรงค์ รจนากุล.2547. **การศึกษาพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงเพื่อใช้ทางยา เสริมอาหารและเครื่องสำอาง**.รายงานการวิจัยคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์ และ ทรงพร จึงมั่นคง. 2546. **การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากพืชสมุนไพรจังหวัดอุบลราชธานี.** รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. **การตรวจสอบและการสกัดสาระสำคัญจากสมุนไพร.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ราชบัณฑิตยสถานจัดพิมพ์. 2538. **อนุกรมวิธานพืช อักษร ก ฉบับราชบัณฑิตยสถาน.** เพื่อนพิมพ์.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. **เภสัชกรรมไทย รวมสมุนไพร.** พิมพ์ครั้งที่ 2 . กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

ศรีสมพร ปรีเปรม. **รูปแบบของยาที่เตรียมจากพืชสมุนไพร ในการสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง “สมุนไพรกับการพึ่งตนเอง”** มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, 2536.

สุภาพ บุณยะรัตเวช. 2523. **การทดสอบประเภทของสารเคมีในพืชสมุนไพร.** วารสารวิจัยจุฬา. กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สรศักดิ์ เหลี่ยวไชยพันธุ์ และ ดวงพร เหลี่ยวไชยพันธุ์. 2548. **การแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจากผลมะแกว่นป่า**. รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ภาษาอังกฤษ

Amjad Ayad Qatran Al-Khdhairawi et al, 2017. A Bis-benzopyrroloisoquinoline Alkaloid Incorporating aCyclobutane Core and a Chlorophenanthroindolizidine Alkaloid with Cytotoxic Activity from Ficus f istulosa var. tengerensis. J. Nat. Prod. Impress.

Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method**. American Journal Clinical Pathology 45:493-6.

Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. Food Science Technology 28:25-30.

B. Pratumvinit, T. Srisapoomi, P. Worawattananon , N. Opartkiattikul, W. Jiratchariyakul and T. Kummalue., 2009. *In vitro* antineoplastic effect of *Ficus hispida* L. plant against breast cancer cell lines. Journal of Medicinal Plants Research 3(4), 255-261

Changsen C, Franzblau SG, Palittapongarnpim P. **Improved green fluorescent protein reporter gene based microplate screeinig for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter**. *Antimicrob. Agents Chemother*, 47, 2003, 3682-3687.

Ghulam Yaseen et al, 2015.Traditional management of diabetes in Pakistan: Ethnobotanical investigation from Traditional Health Practitioners . Journal Of Ethnopharmacology 174(2015)91–117.

Javanmardi, J., C. Stushnoff, E. Locke, and J. M. Vivanco. 2003. **Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions**. Food Chemistry 83:547-550

Sithisarn,P., Supabphol,R. and Gritsanapan,W.,2005. **Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209)**, Journal of Ethnopharmacology, 99,109–112.

Krishna Murti, Vijay Lambole, Mayank Panchal., 2011. **Effect of *Ficus hispida* L. on normal and dexamethasone suppressed wound healing**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 47,

N. Swathi, A. Sreedevi and K. Bharathi.,2011. **Evaluation of Nephroprotective Activity of Fruits of *Ficus hispida* on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity**. Pharmacognosy Journal 3, 62-68.

Pravin Suresh Jogi., 2012. **Evaluation of phytochemical constituents and biological screening of *Ficus hispida* leaves in Chandrapur forest region**.International Journal of Research in Plant Science 2, 59-61