การสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากตะบูน
The extraction and biological activity of *Xylocarpus granatum* extracts

อุดมเดชา พลเยี่ยม

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ชื่อเรื่อง : การสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากตะบูน
ผู้วิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุดมเดชา พลเยี่ยม
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยเรื่องการสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากตะบูน มีวัตถุประสงคเพื่อศึกษาพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตะบูน โดยนำผลของตะบูนมาทำการสกัดสารสำคัญด้วยการหมักและการสกัดตามลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลายคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 3 ชนิด นำสารสกัดหยาบมาทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยการใช้ Folin–Ciocalteu method และทดสอบค่าความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

ผลการวิจัยพบว่า

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

2. สารสกัดหยาบจากผลของตะบูนชั้นเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุดมีค่า 96.55 mg GAE/g dw

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการทดสอบความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่าสารสกัดหยาบจากผลของตะบูนชั้นเมทานอลแสดงความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ได้ต่ำที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 34 μg/ml

.

Title: The extraction and biological activity of *Xylocarpus granatum* extracts

Researcher: Udomdeja Polyium
Faculty of Science and Technology
Rajamangala University of Technology Phra Nakorn

ABSTRACT

Research project on extraction and bioactivity of *Xylocarpus granatum* extracts. This study aimed to investigate the phytochemicals and antioxidant activities of the *X. granatum* extract. The fruits of *X. granatum* was separation by maceration and sequential extraction method with hexane, ethyl acetate, and methanol to crude extracts. Crude extracts were assessed for their total phenolic contents tested using the Folin–Ciocalteu method and antioxidant activities tested using DPPH radical scavenging assay.

The results showed that,

1. Phytochemical examination of the extracts of *X. granatum* included alkaloids, condensed tannins, phenolic compounds, triterpenes, steroids, cardiac glycosides, and anthraquinones.

2. The crude methanol extract had the highest phenolic content was 96.55 mg GAE /g dw.

3. The crude methanol extract could reduce DPPH; The EC_{50} was 34 μg/ ml.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากตะบูนได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 ของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 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 ตะบูน	3
2.2 การสกัดสารสำคัญ	5
2.3 การตรวจสอบทางพฤกษเคมี	8
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ	12
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	**16**
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	16
3.2 พืชที่ใช้ในการวิจัย	17
3.3 ขั้นตอนการทดลอง	18
3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	20
3.5 ระยะเวลาการทดลอง	20
3.6 สถานที่ทำการทดลอง	20
บทที่ 4 ผลการทดลอง	**21**
4.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี	21
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	22

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ **24**

5.1 สรุปผลการทดลอง 24

5.2 อภิปรายผล 24

5.3 ข้อเสนอแนะ 25

บรรณานุกรม **26**

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1 พฤกษเคมี	21
ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอล	22
ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	23

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

ยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 12 (พ.ศ. 2560-2564) เน้นการพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสรางความมั่นคงของฐานทรัพยากรและสิ่งแวดลอมโดยใหความสำคัญกับการพัฒนาคุณคาความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปญญาทองถิ่น โดยใชหลักเศรษฐกิจพอเพียงเป็นแนวทางสำคัญในการจัดการองค์ความรูและสรางภูมิคุมกันสงเสริมการใชความหลากหลายทางชีวภาพในการสรางความมั่นคงของภาคเศรษฐกิจทองถิ่นและชุมชนรวมทั้งพัฒนาขีดความสามารถและสรางนวัตกรรมจากทรัพยากรชีวภาพที่ เปนเอกลักษณของประเทศ ความหลากหลายทางชีวภาพจึงเป็นจุดแข็งของประเทศไทย มีความเชื่อมโยงกับวิถีชีวิตวัฒนธรรมและภูมิปัญญาท้องถิ่น ความหลากหลายทางชีวภาพเป็นทุนที่มีชีวิต เกี่ยวโยงอยู่ในทรัพยากรทุกอย่าง บ่งชี้ถึงความอุดมสมบูรณ์ และเป็นส่วนที่สำคัญที่สุดของระบบนิเวศ ในขณะที่บริบทการเปลี่ยนแปลงจากภายนอก ทั้งความก้าวหน้าของเทคโนโลยีชีวภาพ กระแสสุขภาพและการนิยมธรรมชาติ จะทำให้เป็นโอกาสของการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพเป็นฐานการสร้างมูลค่าเพิ่มของภาคการผลิตและบริการ และใช้เป็นวัตถุดิบสำคัญสำหรับการสร้างนวัตกรรมที่มีคุณค่าสูงขึ้น

สภาพสิ่งแวดล้อมในปัจจุบันที่มีการเปลี่ยนแปลงทำให้มีวิถีการดำรงชีวิตที่มีความเสี่ยงต่อการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย มนุษย์ใช้ออกซิเจนในกระบวนการเผาผลาญสารอาหารในร่างกายและเป็นผลให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจนได้ ในสภาวะปกติร่างกายจะมีระบบควบคุมป้องกันอนุมูลอิสระแต่ร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติได้เมื่อเกิดภาวะความเครียดของออกซิเจน โดยอนุมูลอิสระที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นจะก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายซึ่งจะนาไปสู่การกลายพันธุ์ โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับไขมันที่ผนังเซลล์กับโปรตีน เอนไซม์คาร์โบไฮเดรต และดีเอ็นเอ ดังนั้นการใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกแดนต์ จะช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ สารต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งจากการสังเคราะห์และได้จากธรรมชาติ เช่น ในพืช ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ(Biodiversity) เนื่องจากมีลักษณะทางภูมิศาสตร์ตั้งอยู่ในพื้นที่สภาพภูมิอากาศแถบร้อนชื้น จึงก่อให้เกิดสภาพธรรมชาติอันหลากหลายมีพืชหลายชนิดที่เป็นพืชที่มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จึงให้ความสนใจกับการศึกษาคุณประโยชน์ทางยาจากพืชมากขึ้น เนื่องจากมีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับยาสังเคราะห์ ดังนั้นจึงมีความต้องการวิจัยเพื่อการพัฒนาคุณค่าของพืชในประเทศให้มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น

การวิจัยเพื่อการพัฒนาศักยภาพของตะบูนจึงเป็นประเด็นที่ควรมีการศึกษาผู้วิจัยจึงมีความสนใจการศึกษาการสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตะบูนซึ่งเป็นพืชชนิดใหม่ที่มีประโยชน์ เพื่อเพิ่มคุณค่าและพัฒนาศักยภาพของพืชในประเทศให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตะบูน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

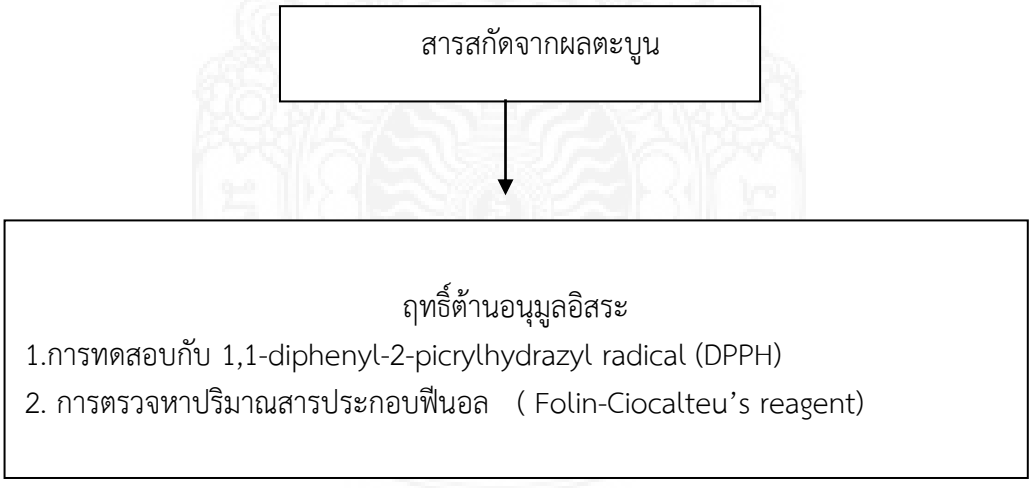
โครงการวิจัยเรื่องการสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากตะบูนกำหนดขอบเขตการวิจัยไว้ดังนี้

1. พืชที่ใช้ในการวิจัยคือตะบูน
   ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Xylocarpus granatum Koen*
   ชื่อวงศ์ : Meliaceae

2. ส่วนของพืชที่ใช้ในการศึกษาคือ ผลของตะบูน

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

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตะบูนสามารถนำไปสู่การพัฒนาด้านอาหาร อาหารเสริม เครื่องสำอาง และการส่งเสริมโอกาสในเชิงพาณิชย์ต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยเรื่องการสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากตะบูนผู้วิจัยตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

2.1 ตะบูน
2.2 การสกัดสารสำคัญ
2.3 การตรวจสอบทางพฤกษเคมี
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ตะบูน

2.1.1 ตะบูน

1. ชื่อวิทยาศาสตร์: *Xylocarpus granatum* Koen
2. ชื่อวงศ์ : MELIACEAE
3. ชื่อพื้นเมือง : ตะบูนขาว กระบูน กระบูนขาว ตะบูน (กลาง,ใต้) หยี่เหร่ (ใต้)

4. ลักษณะทั่วไป : เป็นพรรณไม้ยืนต้น พบมากในป่าชายเลน เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงกลาง สูง 8-20 เมตร ไม่ผลัดใบ ลำต้นสั้น แตกกิ่งใกล้โคนต้นมีพูพอนแผ่ออกคดเคี้ยวต่อเนื่องกับราก หายใจที่แบนคล้ายแผ่นกระดาน เปลือกเรียบบาง สีเหลืองแกมเขียวอ่อน หรือสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลแกมชมพู ลักษณะคล้ายต้นฝรั่งหรือต้นตะแบก เปลือกหลุดออกเป็นแผ่นไม่แน่นอน

5. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น ตะบูน เป็นไม้ยืนต้นไม่พลัดใบ แตกใบใหม่ได้รวดเร็ว ลำต้นมีขนาดเล็กถึงกลาง มีความสูงประมาณ 8-20 เมตร โคนลำต้นเป็นพูพอน และมองเห็นรากแตกออกเป็นแขนง ลำต้นแตกกิ่งสาขาตั้งแต่ระดับต่ำ และแตกกิ่งปานกลาง แต่มีกิ่งแขนงมากจนแลดูเป็นทรงพุ่มหนา และแผ่กว้าง ลำต้นมีรูปทรงไม่แน่นอน และไม่เพลาตรง เปลือกลำต้นบาง แตกร่อนเป็นแผ่น สีน้ำตาลแดงหรือสีเทาอมขาว คล้ายต้นตะแบก เนื้อไม้เป็นไม้เนื้อแข็ง

ใบ ตะบูนเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว แตกใบออกเป็นใบประกอบแบบขนนกชนิดปลายคู่ ไม่มียอดแขนงใบ ใบย่อยมี 1-2 คู่ ในก้านใบหลัก ใบย่อยมีก้านใบสั้น สีน้ำตาล ยาวประมาณ 3-5 มิลลิเมตร แต่ละใบอยู่ตรงข้ามกัน ใบมีลักษณะรูปไข่กลับ โคนใบแสบแคบ แล้วค่อยขยายกว้างที่ปลายใบ ขนาดใบกว้างประมาณ 2-5 เซนติเมตร และยาวประมาณ 4-14 เซนติเมตร แผ่นใบ และขอบใบเรียบ แผ่นใบหนา แต่ค่อนข้างเปราะ มีสีเขียวเข้ม บนแผ่นใบมีเส้นแขนงใบข้างละ 6-9 เส้น

ดอก ดอกตะบูนออกเป็นช่อบริเวณง่ามของซอกก้านใบหลักที่ปลายกิ่ง เส้นผ่าศูนย์กลางของช่อประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร แต่ละช่อแตกออกเป็นช่อแขนงย่อย ช่อแขนงยาวประมาณ 3-8 เซนติเมตร ใน 1 ช่อ มีดอกประมาณ 8-20 ดอก ดอกเป็นดอกแยกเพศ ดอกย่อยมีก้านดอกยาว 0.5-1 เซนติเมตร ตัวดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 4 กลีบ ยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร และกลีบดอก 4 กลีบ แต่ละกลีบแยกออกจากกัน แผ่นกลีบดอกมีสีขาวครีม ด้านในตรงกลางมีเกสรตัวผู้ 8 อัน เมื่อดอกบานจะส่งกลิ่นหอมตั้งแต่บ่ายจนถึงค่ำ ทั้งนี้ ตะบูนจะเริ่มออกดอกตั้งแต่ช่วงเดือนมีนาคม-เมษายน

ผล ผลตะบูนออกเป็นผลเดี่ยวหรือออกเป็นกระจุกในขั้วผลเดียว มีก้านผลสีน้ำตาล ขนาดใหญ่ยาวประมาณ 3-5 เซนติเมตร ผลมีลักษณะกลม ขนาดผลประมาณ 15-20 เซนติเมตร และมีน้ำหนักผลประมาณ 1-2 กิโลกรัม เปลือกผลดิบมีสีเขียว เปลือกผลสุกจะแห้ง แข็ง มีสีน้ำตาลอมแดง คล้ายผลทับทิม ภายในผลแบ่งเป็น 4 พู เท่าๆ กัน แต่ละพูมีเม็ดแทรกอยู่ รวมกันแล้วใน 1 ผล จะมีเมล็ดประมาณ 4-17 เมล็ด เมล็ดมีลักษณะโค้งนูนในด้านหนึ่ง และอีกด้านหนึ่งมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยม ที่ปลายขั้วเมล็ดสอบแคบ ขนาดเมล็ดประมาณ 6-10 เซนติเมตร ผลตะบูนจะเริ่มติดผลในช่วงเดือนมิถุนายน-กุมภาพันธ์

6. ประโยชน์ : ใช้เผาทำถ่าน เป็นแหล่งอาศัยของสัตว์ป่า ต้นมาทำเสาและเป็นโครงสร้างหลักของโรงเรือนที่อยู่อาศัย นำเปลือกมาต้มน้ำย้อมเสื้อผ้า แห อวน เพื่อเพิ่มความคงทนและอายุใช้งาน

ที่มา: https://medthai.com

2.2 การสกัดสารสำคัญ

2.2.1 การเก็บตัวอย่าง 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 การเตรียมตัวอย่าง

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 การทำตัวอย่างให้มีขนาดเล็กลง

การสกัดพืชต้องย่อยตัวอย่างให้มีขนาดให้เล็กลง (comminution or pulverization) เนื่องจากสารสำคัญจะอยู่ภายในเซลล์ในสภาพผลึกหรือผงละเอียด เมื่อได้สัมผัสกับน้ำยาสกัดที่เหมาะสมองค์ประกอบเหล่านั้นจะละลายออกมา โดยการบดพืชให้เป็นผงละเอียดเพื่อทำลายผนังเซลล์และเพิ่มพื้นที่ผิวของพืชที่จะสัมผัสกับน้ำยาสกัด การสกัดจะสมบูรณ์ ถ้าเซลล์แตกออกและน้ำยาสกัดเข้าไปสัมผัสสารสำคัญได้มากที่สุด

การย่อยให้มีขนาดเล็กลง

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 การตรวจสอบทางพฤกษเคมี

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 การตรวจหาไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์ อาจตรวจในสภาพของไกลโคไซด์หรือตรวจหาผลิตภัณฑ์ของไกลโคไซด์จากการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ (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 สารต้านอนุมูลอิสระ

2.4.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มี unpaired electron อย่างน้อย 1 ตัว เกิดขึ้นจากการแตกของพันธะระหว่างอะตอม อนุมูลอิสระไม่เสถียรและมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้อนุมูลอิสระเดิมเสถียรขึ้น ส่งผลให้โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) อนุมูลอิสระ พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิต และในเซลล์โดย 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) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย 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 (อธิป สกุลเผือก,มปป และบุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

2.4.2 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

คุณสมบัติที่ดีของสารต้านอนุมูลอิสระ

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

สารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย แบ่งเป็น 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

2.4.3 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 ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง)

$$DPPH\bullet + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

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 ส่วนข้อเสีย คือ DPPH• ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ [12] อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน(interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรีดิวซ์แล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้เช่นกัน

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวเนื่องกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี การทดสอบกับ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) และ การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอล (Folin-Ciocalteu's reagent) ที่มีประเด็นที่น่าสนใจดังนี้

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

วันเชิง สิทธิกิจโยธิน และ ดวงฤดี เชิดวงศ์เจริญสุข (2554) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว พบว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวมีปริมาณฟีนอลและ ร้อยละการยับยั้งสาร DPPH มากกว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (2) ปริมาณสารประกอบฟีนอลสัมพันธ์กับ ร้อยละการยับยั้งสาร DPPH และ (3) สารฟีนอลและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด

นพวัฒน์ เพ็งคำศรี และคณะ (2554) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเหง้าข่าลิง ทดลองดวย้ DPPH assay ผลการศึกษา: สารสกัดเหง้าข่าลิงในเอทธิลแอซิเตตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลกรวมสูงสุดคือ 120.44 ± 0.01 มคก./มก. ผลการศึกษาความสามารถในการจับอนุมูลอิสระพบค่า IC_{50} เท่ากับ 12.32 ± 0.28 มคก./มก. เมื่อทดสอบด้วย DPPH assay และมีค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity) เท่ากับ 26.02 ± 1.92 มลลิ โมลาร/์ มก.

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

ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ และคณะ (2556) การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำพบว่าใบข่อยดำแห้งที่สกัดด้วยเอทิลแอซีเตตและเอทานอลพบสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฟลาโวนอยด์ และแอลคาลอยด์ แต่ไม่พบแอนทราควิโนน เทอร์พีนอยด์ แทนนิน ซาโปนิน และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและหาปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธีDPPH assay และ Folin-Ciocaltue ตามลำดับพบว่าสารสกัดเอทิลแอซีเตตและเอทานอลมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยรายงานเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 4.46±0.04 และ 4.03±0.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดเอทิลแอซีเตตมีค่าเท่ากับ 258.84±3.84 มิลลิกรัมสมมูล กรดแกลลิก/กรัมสารสกัด ในขณะที่สารสกัดเอทานอลมีค่าเท่ากับ 289.49±1.32 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัม สารสกัด

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

การวิจัยเรื่องการสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากตะบูนมีวิธีดำเนินการทดลองดังนี้

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

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. 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 (Na_2SO_4 anhydous)
12. กรดแทนนิค (Tannic acid)
13. กรดแกลลิค (Gallic acid)
14. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)
15. สารโฟลิน (Folin ciocalteu reagent)
16. กลุ่มสารทดสอบพฤกษเคมี

3.2 พืชที่ใช้ในการวิจัย

รูปที่ 3.1 ผลตะบูน

3.3 ขั้นตอนการทดลอง

3.3.1 ขั้นการเตรียมตัวอย่าง

1. เปรียบเทียบอนุกรมวิธานของตะบูนโดยการรับรองพืชตัวอย่างโดยผู้เชี่ยวชาญทางพฤกษศาสตร์ (Voucher Specimens)
2. นำผลของตะบูนมาทำความสะอาด หั่นให้เล็กลง นำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
3. นำส่วนของตะบูนที่แห้งแล้ว ไปบดให้ละเอียด

3.3.2 ขั้นการสกัดสารสำคัญ

การสกัดสารที่มีองค์ประกอบสำคัญจากตัวอย่าง ใช้เทคนิคการสกัดโดยใช้วิธีการหมัก (Maceration) ดังนี้

1. นำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ในภาชนะปิด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จะได้ของผสม
2. ทำการกรองแยกของผสมมาแยกสารสกัดและกากออกจากกัน นำส่วนที่เป็นสารสกัดไประเหยแยกตัวทำละลายออกไป ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ทดสอบในขั้นตอนถัดไป

รูปที่ 3.2 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)

3.3.3 ขั้นการทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมี

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 ขั้นการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

3.3.5.1 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

3.3.5.2 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

3.3.5.3 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 ระยะเวลาดำเนินการทดลอง

1 ตุลาคม 2560 – 30 กันยายน 2561

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการทางเคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทที่ 4
ผลการทดลอง

โครงการวิจัยเรื่องการวิจัยเรื่องการสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากตะบูน โดยนำผลของตะบูนมาสกัด ตรวจสอบพฤกษเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ผลดังนี้

4.1 การตรวจสอบพฤกษเคมี

ตารางที่ 4.1 พฤกษเคมี

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

การตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากกผลตะบูน พบสารกลุ่ม alkaloids condensed tannins phenolic compounds triterpenes steroids cardiac glycosides antraquinones

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.2.1 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล

การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยนำสารสกัดจากผลตะบูนด้วยเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทำการทดสอบหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลโดยการใช้ Folin-Ciocalteu's reagent ได้ผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอล

สารสกัด	Total Phenolic (mg GAE/g dw)		
	Hexane	Ethylacetate	Methanol
ผล	2.95	65.20	96.55

พบว่าสารสกัดหยาบจากผลของตะบูนด้วย Hexane, ethylacetate และMethanol มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลเท่ากับ 2.95, 65.20 และ 96.55 mg GAE/g dw

4.2.2 การทดสอบด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

การทดสอบด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) โดยนำสารสกัดจากผลตะบูนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งเรียงลำดับจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูงจะได้สารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต และสารสกัดชั้นเมทานอล เมื่อมาทดสอบค่าความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารสกัด	**DPPH EC_{50} (μg/ml)**		
	Hexane	**Ethylacetate**	**Methanol**
Standard (BHT)	8.9		
ผล	> 1000	98	34

พบว่าสารสกัดหยาบจากผลของตะบูนด้วย Hexane Ethylacetate และMethanol แสดงความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ค่า EC_{50} เท่ากับ > 1000, 98 และ 34 μg/ml ตามลำดับ

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 พฤกษเคมี

จากการตรวจสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากกผลตะบูนพบสารกลุ่ม alkaloids condensed tannins phenolic compounds triterpenes steroids cardiac glycosides antraquinones โดยเฉพาะ phenolic compounds แสดงในปริมาณมากอย่างชัดเจน

5.1.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.1.2.1 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล

สารสกัดจากผลตะบูนด้วยเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล เมื่อนำมาทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยการใช้ Folin-Ciocalteu's reagent

พบว่าสารสกัดหยาบจากผลของตะบูนด้วย Hexane, ethylacetate และMethanol มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลเท่ากับ 2.95, 65.20 และ 96.55 mg GAE/g dw

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

สารสกัดจากผลตะบูนด้วยเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล เมื่อนำมาทดสอบค่าความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)

พบว่าสารสกัดหยาบจากผลของตะบูนด้วย Hexane Ethylacetate และMethanol แสดงความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ค่า EC_{50} เท่ากับ > 1000, 98 และ 34 μg/ml ตามลำดับ

5.2 อภิปรายผล

การวิจัยเรื่องการสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากตะบูน โดยนำผลของตะบูนมาทำการแยกสารด้วยการหมักและสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความมีขั้วของจำนวน 3 ชนิดคือเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ทั้งหมด 3 ชนิด จากผลการวิจัยนั้นมีประเด็นที่สำคัญที่นำมาอภิปรายดังนี้

การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลด้วย Folin-Ciocalteu's reagent พบว่าสารสกัดหยาบจากผลของตะบูนชั้นเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุดมีค่า 96.55 mg GAE/g dw และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการทดสอบความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่าสารสกัดหยาบจากผลของตะบูนชั้นเมทานอลแสดงความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) ได้ดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 34 μg/ml นั้นแสดงให้เห็นถึงสารประกอบฟีนอลในผลของตะบูนนั้นสามารสกัดได้ดีด้วยตัวทำละลายเมทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง อีกทั้งยังแสดงผลในการลดปริมาณ DPPH ได้ดีที่สุด

5.3 ข้อเสนอแนะ

สำหรับการวิจัยครั้งต่อไปควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่างๆ ของตะบูนได้แก่ ดอก ราก และ ใบ รวมไปถึงแยกสารบริสุทธิ์ในระดับโมเลกุลต่อไปเพื่อจะได้ข้อมูลสำหรับการนำไปพัฒนาต่อไป

บรรณานุกรม

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

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

นพวัฒน์ เพ็งคำศรี และคณะ. 2554. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเหง้าข่าลิง. ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ. ปีที่ 6 ฉบับ 3, กค. – กย. 2554. 195-201.

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. **การตรวจสอบและการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพร.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

วันเชิง สิทธิกิจโยธิน และ ดวงฤดี เชิดวงศ์เจริญสุข. 2554. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 16 (1) : 47-55.

ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ และคณะ. 2556. การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ. ว.วิทย. มข. 41(3) 723-730.

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.

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.

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

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