ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดง

Antioxidant Activity and Total Phenolic Compound of Leaves of *Bauhinia sirindhorniae*

บงกชวรรณ พาคำวงค์[1] ภาพตะวัน ทองดี[1] ทิมพิกา พรพรม[1] นฤดล ภูศรี[1] สมจินตนา ทวีพานิชย์[1]
กัมปนาท ฉายจรัส[1] สายสมร ลำลอง[1] ประจักกิจ ระวี[1] จิตรลดา เดชาติวงศ์[1] จิดาภา แสงสวันต์[2]
กาญจนา แปงจิตต์[3] พฤทธิ์ คำศรี[4] อรดี พันธ์กว้าง[4] คมสันต์ สุทธิสินทอง[5]
ประสาท กิตตะคุปต์[6,7,8] และ พรพรรณ พึ่งโพธิ์[1*]

Bongkochawan Pakamwong[1], Paptawan Thongdee[1], Thimpika Pornprom[1], Naruedon Phusi[1], Somjintana Taveepanich[1],
Kampanart Chayarus[1], Saisamorn Lumlong[1], Prajakkit Rawee[1], Jitlada Dechatiwong[1], Jidapa sangswan[2],
Kanjana Pangjit[3], Pharit Kamsri[4], Auradee Punkvang[4], Khomson Suttisintong[5],
Prasat Kittakoop[6,7,8] and Pornpan Pungpo[1*]

[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[3]วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[4]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม
[5]ศูนย์นาโนเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
[6]สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
[7]สถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์ ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์
[8]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อมและพิษวิทยา
[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University
[2]Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University
[3]College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University
[4]Division of Chemistry, Faculty of Science, Nakhon Phanom University
[5]National NanoTechnology Center, National Science and Technology Development Agency (NSTDA)
[6]Chulabhorn Research Institute
[7]Chulabhorn Graduate Institute, Chemical Biology Program, Chulabhorn Royal Academy
[8]Center of Excellence on Environmental Health and Toxicology (EHT), OPS, Ministry of Higher Education,
Science, Research and Innovation
[*]E-mail: pornpan_ubu@yahoo.com

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดง โดยใบประดงแดงสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP ทั้ง 3 วิธี พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลของใบประดงแดง ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 91.84 93.03 เปอร์เซ็นต์ และ 598.61 มิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีปริมาณฟีนอลิกรวมที่ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 980.96 มิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ดังนั้น ผลการศึกษาสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายของเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี ซึ่งเป็นการพัฒนาสมุนไพรพื้นบ้านให้เกิดมูลค่าในอนาคต

คำสำคัญ: ใบประดงแดง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดหยาบ

Abstract

The purpose of this work study antioxidant activity and total phenolic compound of leaves of *Bauhinia sirindhorniae*. The leaves of *Bauhinia sirindhorniae* were extracted from hexane, dichloromethane, and methanol. The antioxidant activity using DPPH radical scavenging activity (DPPH assay), ABTS cation radical scavenging activity (ABTS assay), and ferric reducing antioxidant power (FRAP assay) were determined. Three methods (DPPH, ABTS and FRAP) showed the highest antioxidant activity of 91.84%, 93.03%, and 598.61 mg ascorbic acid/g, respectively for the crude extract of leaves of *Bauhinia sirindhorniae*. Moreover, the total phenolic compound for crude methanol extract of leaves of *Bauhinia sirindhorniae* is the best value of 980.96 mg tannic acid/g. Thus, the antioxidant activity and total phenolic compound of crude methanol extract of leaves of *Bauhinia sirindhorniae* are good for the development of herbs for future high-value products.

Keywords: Leaves of *Bauhinia sirindhorniae*, Antioxidant Activity, Crude

บทนำ

สิรินธรวัลลี (*Bauhinia sirindhorniae*) หรือประดงแดง จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae มีชื่อพื้นเมืองว่า สามสิบสองประดง จัดเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ และที่สำคัญยังเป็นสมุนไพรท้องถิ่นของจังหวัดหนองคาย สิรินธรวัลลีเป็นไม้เถาเนื้อแข็งขนาดใหญ่ ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยวเรียงเวียนสลับ หลังใบเขียวเข้มเป็นมัน ท้องใบเกลี้ยง ดอกออกเป็นช่อ กลีบดอกสีเหลืองอมส้มถึงแดงมี 5 กลีบผลเป็นฝักแบนรูปขอบขนานเมล็ดสีน้ำตาลดำรูปกลมขนาดเล็ก (Puechkaset, 2559) พืชชนิดนี้มีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพรใช้บำรุงรักษาระบบประสาท สมอง และการไหลเวียนของโลหิตในร่างกายให้ดีขึ้นป้องกันโรคความดันโรคเบาหวาน และมีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (ณัฏฐา, 2012) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านอักเสบในอาการปวดกล้ามเนื้อ มีรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของสิรินธรวัลลี ได้แก่ กลุ่มไซยาโนจีนิค กลูโคไซด์ (Cyanogenic glucoside) ฟลาแวน (Flavan) ฟลาวาโนน (Flavanone) ฟลาวานอล (Flavanol) ฟลาโวน (Flavone) ชาลโคน (Chalcone) โครโมน (Chromone) ลิกแนนไกลโคไซด์ (Lignan glycoside) ไตรเทอร์พีนอยด์ (Triterpenoid) สเตียรอยด์กลูโคไซด์ (Steroid glucoside) (Ruangrungsi et al., 2003)

จากการมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดจากประดงแดงพบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ผลดี ซึ่งสารอนุมูลอิสระ (Free radical) คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว และไม่เสถียรจึงพยายามหาอิเล็กตรอน จากสารชีวโมเลกุลอื่นมาจับคู่เพื่อความเสถียรทำให้เกิดความว่องไว ในการเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ มีผลทำให้คุณสมบัติการทำงานของสารชีวโมเลกุลเปลี่ยนไป เกิดการบกพร่องหรือเซลล์ถูกทำลาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรค เช่น โรคมะเร็ง ภาวะความแก่ชรา โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคธาลัสซีเมีย (ศรมนและคณะ, 2016)

ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อหาสารสกัดจากธรรมชาติมาประยุกต์ในการรักษาโรคธาลัสซีเมียหรือโรคโลหิตจาง ซึ่งเป็นโรคพันธุกรรมที่มีการสร้างโปรตีนโกลบินชนิดใดชนิดหนึ่งน้อยกว่าปกติ จึงทำให้เกิดการเสียสมดุล เนื่องจากในสภาวะที่มีความผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น จนทำให้เกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบของเซลล์ที่อยู่ภายในร่างกาย และเป็นสาเหตุให้เซลล์ตายได้รวมทั้งอาจทำให้เกิดโรคในระบบต่าง ๆ ภายใน

ร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารประกอบธรรมชาติหลายชนิดในพืชที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประเภทฟลาโวนอยด์ เคอร์คูมินอยด์ (Curcuminoid) เควอซิติน (Quercetin) เป็นต้น สารเหล่านี้มีคุณสมบัติต้านออกซิเจนที่แรงกว่าวิตามินอีอย่างมาก ในปัจจุบันจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาผลของการให้สารธรรมชาติเหล่านี้ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (อิศรางค์, 2004) ดังนั้นงานวิจัยนี้ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) ของสมุนไพรใบประดงแดง ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นหายาก และยังไม่มีผู้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคธาลัสซีเมียต่อไป

วิธีการวิจัย

1. การสกัดสารตัวอย่างด้วยวิธี Soxhlet extraction

นำใบประดงแดงมาล้างด้วยน้ำสะอาด และนำไปอบให้แห้งด้วยตู้อบ จากนั้นนำใบประดงแดงที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ดังภาพที่ 1 ชั่งตัวอย่างใบประดงแดงละเอียดมาประมาณ 7 กิโลกรัม นำใบประดงแดงมาห่อด้วยผ้าขาวบางใส่ลงในโหล สกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ตามลำดับ ปริมาณ 40 ลิตร นำฟอยล์มาหุ้มและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน นำมากรองด้วยกรวยกรองและนำไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่อง Rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ระเหยตัวทำละลายในตู้ดูดควัน บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนและหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิต

ภาพที่ 1 ใบประดงแดงบดละเอียด

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี DPPH Radical Scavenging Activity (DPPH assay)

2.1 การเตรียมสารทดสอบ สารมาตรฐาน และสารตัวอย่าง

การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 60 ไมโครโมลาร์ โดยชั่ง DPPH 0.0024 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล (Analytical grade) ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) เก็บไว้ในที่มืดไม่ให้โดนแสงโดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์หุ้มไว้

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (Stock standard solution) ของโทรล็อกซ์ (Trolox) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่ง Trolox 0.0100 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้ได้ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เก็บไว้ไม่ให้โดนแสง โดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์หุ้มไว้

การเตรียมสารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ (Working standard solution) ของ Trolox ความเข้มข้น 200, 150, 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ (Trolox) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.00, 1.50, 1.00 และ 0.50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

การเตรียมสารตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั่งสารสกัดหยาบจากใบประดงแดง 1.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ (Microcentrifuge tube) เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงโดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์หุ้ม

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง โดยใช้วิธี DPPH

สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 60 ไมโครโมลาร์ ปิเปตปริมาตร 2.90 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย Trolox หรือสารตัวอย่าง ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง เมื่อครบ 1 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง และสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ความเข้มข้น 200, 150, 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลาย Trolox กับค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) จะได้กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ การต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงดังสมการ

$$\%\text{DPPH Radical Scavenging Activity} = \left[\frac{(A_{control} - A_{standard/sample})}{A_{control}}\right] \times 100$$

เมื่อ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

A_{stdard} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดง (สิริเพ็ญและคณะ, 2564; สุดาพร, 2562)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี ABTS Cation Radical Scavenging Activity (ABTS assay)

3.1 การเตรียมสารทดสอบ สารมาตรฐาน และสารตัวอย่าง

การเตรียมสารละลาย ABTS ชั่ง ABTS 0.0496 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI (Deionized water) ให้ได้ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงโดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์หุ้มไว้ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง การเตรียมสารละลาย $K_3S_5O_8$ ชั่ง $K_3S_5O_8$ 0.0166 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงโดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์หุ้มไว้ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง

การเตรียมสารละลายผสมของ ABTS และ $K_3S_5O_8$ ซึ่งปิเปตสารละลาย ABTS ผสมกับสารละลาย $K_3S_5O_8$ ในอัตราส่วน 1:0.5 จากนั้นเจือจางสารละลายให้ได้ 20 เท่า แล้วนำเป็นวัดค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.7-1.0

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั่ง Trolox 0.0499 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เก็บไว้ไม่ให้โดนแสง โดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์หุ้มไว้

การเตรียมสารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ของ Trolox ความเข้มข้น 200, 150, 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ (Trolox) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.00, 1.50, 1.00 และ 0.50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

การเตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั่งสารสกัดหยาบจากใบประดงแดง 1.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงโดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ห่อไว้

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง โดยใช้วิธี ABTS

สารละลาย ABTS ปิเปตปริมาตร 2.90 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย Trolox หรือสารตัวอย่าง ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด 20 นาที เมื่อครบ 20 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง และสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ความเข้มข้น 200, 150, 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารละลาย Trolox กับค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) จะได้กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS จากสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงดังสมการ

$$\%\text{ABTS Cation Radical Scavenging Activity} = \left[\frac{(A_{control} - A_{standard/sample})}{A_{control}}\right] \times 100$$

เมื่อ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS

A_{stdard} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดง (กุลิสราและวัลลภา, 2565)

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP assay)

4.1 การเตรียมสารทดสอบ สารมาตรฐาน และสารตัวอย่าง

การเตรียมสารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ เตรียม Working FRAP reagent โดยผสมสารละลายทั้ง 3 ชนิด ดังนี้ 300 มิลลิโมลาร์ Acetate buffer pH 3.6: 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ (2,4,6-Tris (2-pyridyl-1,3,5-triazine) ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl: 20 มิลลิโมลาร์ $FeCl_3.6H_2O$ ในอัตราส่วน 10:1:1

1) 300 มิลลิโมลาร์ Acetate buffer pH 3.6 ชั่ง Sodium acetate 0.0850 กรัม ละลายด้วย Acetic acid 0.80 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2) 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl ชั่ง TPTZ 0.0312 กรัม ละลายด้วย 1 โมลาร์ HCl 4.00 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3) 20 มิลลิโมลาร์ $FeCl_3.6H_2O$ ชั่ง $FeCl_3.6H_2O$ 0.0540 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย DI ให้ได้ 10 มิลลิลิตร

การเตรียมสารมาตรฐานวิตามินซี (L-ascorbic acid) ความเข้มข้น 1,000, 500, 250 และ 100 ไมโครโมลาร์ และการเตรียมสารตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั่งสารสกัดหยาบชนิดละ 5.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำ DI ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตรในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ เก็บไว้ไม่ให้โดนแสง โดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ห่อไว้

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดง โดยใช้วิธี FRAP

สกัดหยาบจากใบประดงแดงและ L-ascorbic acid ปิเปตปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Working FRAP reagent ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตน้ำ DI ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร ใส่ใน Cuvette เพื่อใช้เป็น Blank วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้เทคนิค UV-visible spectroscopy สร้างกราฟมาตรฐานของ L-ascorbic acid ความเข้มข้น 1,000, 500, 250, 100 และ 50 ไมโครโมลาร์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของ L-ascorbic acid กับค่าการดูดกลืนแสงจะได้กราฟมาตรฐาน การคำนวณโดยใช้สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานคำนวณจากสมการ

$$y = mx + C$$

เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากใบประดงแดง

m คือ ค่าความชัน

C คือ ค่าจุดตัดแกน y เมื่อแทนค่าในสมการ จะได้ค่า x

x คือ ค่า FRAP value (สิริเพ็ญและคณะ, 2564; กิตติพัฒน์และปานทิพย์, 2560)

5 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธีใช้ Folin-Ciocalteu

5.1 การเตรียมสารทดสอบ สารมาตรฐาน และสารตัวอย่าง

การเตรียม Folin-Ciocalteu reagent (1 นอร์มอล) ละลาย Folin-Ciolcalteu reagent (2 นอร์มอล) ในน้ำ DI (อัตราส่วน 1:1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้นของกรดแทนนิก (Tannic acid) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั่ง Tannic acid 0.02 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เก็บไว้ไม่ให้โดนแสง โดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์หุ้มไว้ การเตรียม 7% Sodium carbonate ชั่ง Sodium carbonate 1.49 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร การเตรียมสารตัวอย่างเข้มข้นของสารสกัดหยาบแต่ละชนิด ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั่งสารสกัดหยาบชนิดละ 5.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ เก็บไว้ไม่ให้โดนแสง โดยใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ห่อไว้

5.2 การทดสอบเพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Tannic acid ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครลิตร ปิเปต Sodium carbonate ปริมาตร 1,250 ไมโครลิตร Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และเติมน้ำ DI จนครบปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร เก็บไว้ 40 นาที วัดค่าการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เทคนิค UV-Visible spectroscopy นำสารละลายที่ครบ 40 นาที แล้วมาวัดค่าการดูดกลืนแสง สร้างกราฟมาตรฐานของ Tannic acid ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครโมลาร์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของ Tannic acid กับค่าการดูดกลืนแสง จะได้กราฟมาตรฐาน การคำนวณโดยใช้สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานคำนวณจากสมการ

$$y = mx + C$$

เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากใบประดงแดง

m คือ ค่าความชัน

C คือ ค่าจุดตัดแกน y เมื่อแทนค่าในสมการ จะได้ค่า x

x คือ ค่า ค่าปริมาณฟีนอลิกรวม (สิริเพ็ญและคณะ, 2564)

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดหยาบใบประดงแดง

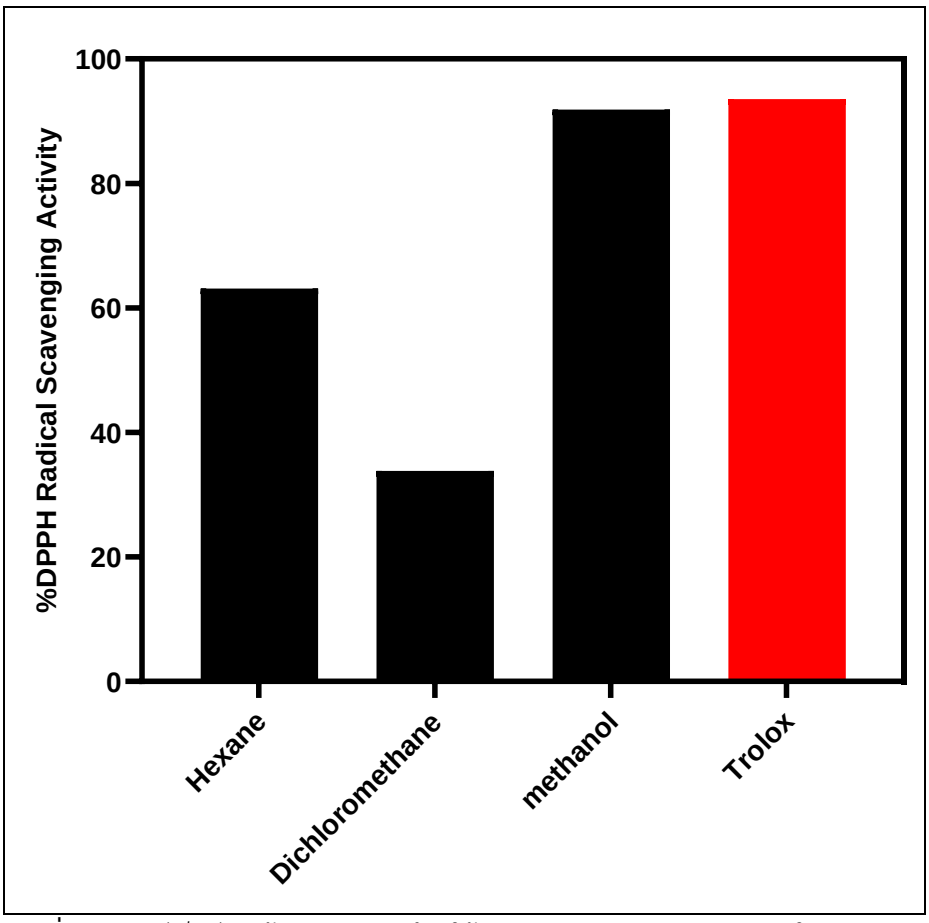
การสกัดใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ใช้อัตราส่วนตัวอย่างใบประดงแดง 7 กิโลกรัมต่อตัวทำละลาย 20 ลิตร โดยสกัดแบบแช่หมักและระเหยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล โดยเครื่อง Rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบของใบประดงแดง น้ำหนักและร้อยละน้ำหนักสุทธิแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำหนักและร้อยละน้ำหนักสุทธิ (Percentage of yield) ของสารสกัดหยาบใบประดงแดง

น้ำหนักสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย (กรัม)			ผลผลิตร้อยละ (%yield)		
เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เมทานอล	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เมทานอล
19.20	17.92	76.07	0.27	0.26	1.09

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงโดยใช้วิธี DPPH

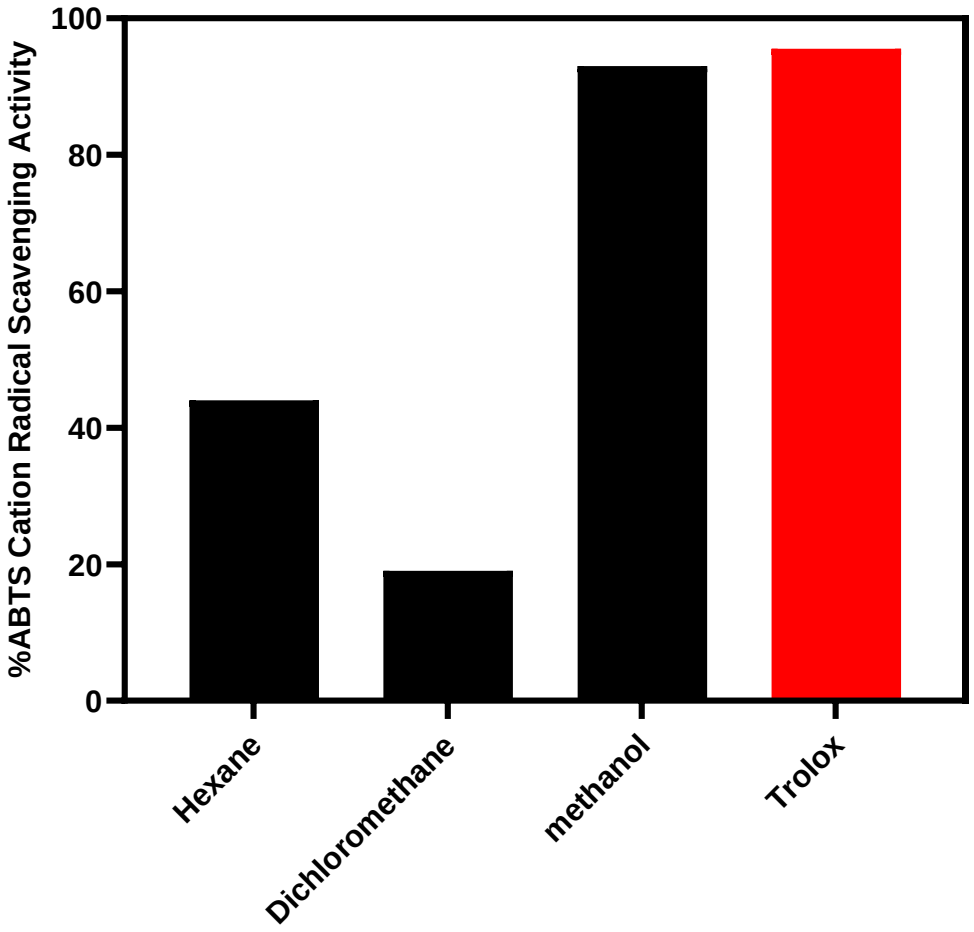
ผลการศึกษาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดง โดยใช้วิธี DPPH พบว่าสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 63.12, 33.82 และ 91.84 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 2 และภาพที่ 2 จากการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ซึ่งมีค่าการออกฤทธิ์ร้อยละ 93.55



ภาพที่ 2 ค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH ของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดง

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงโดยใช้วิธี ABTS

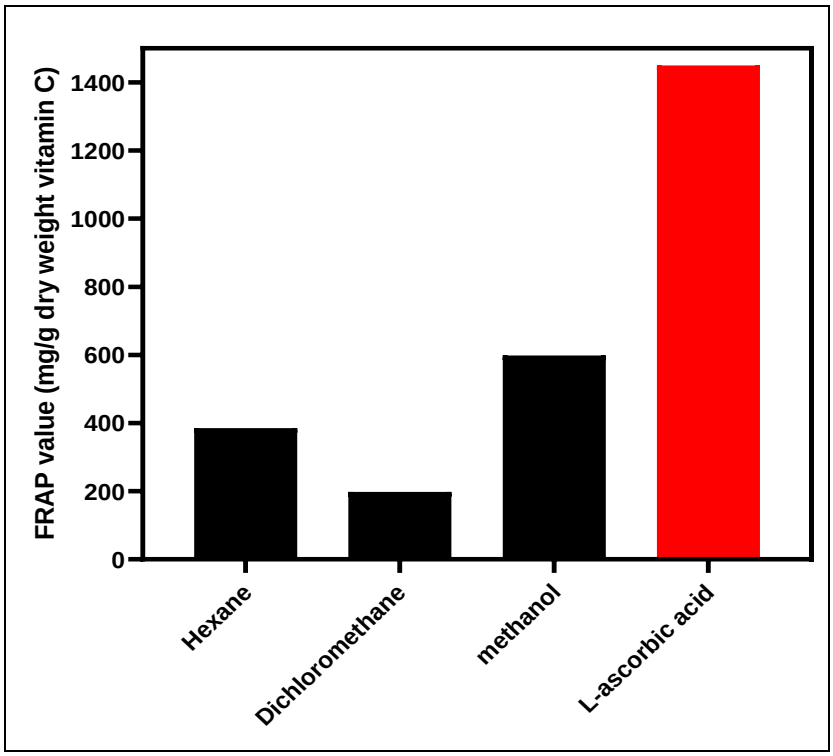
ผลการศึกษาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดง โดยใช้วิธี ABTS พบว่าสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 44.02, 19.05 และ 93.03 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 2 และภาพที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบเมทานอลมีต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ซึ่งมีค่าการออกฤทธิ์ร้อยละ 95.55



ภาพที่ 3 ค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี ABTS ของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดง

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงโดยใช้วิธี FRAP

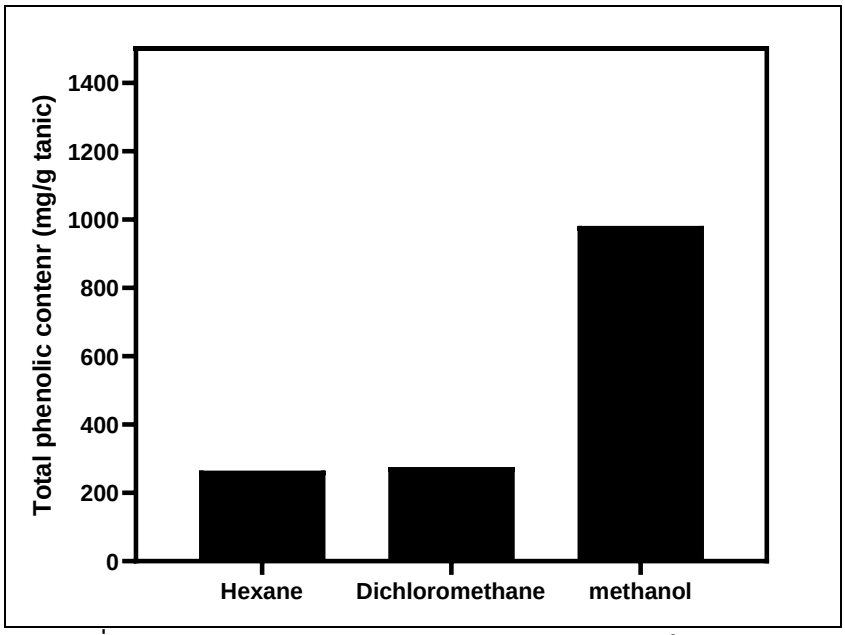
ผลการศึกษาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดง โดยใช้วิธี FRAP พบว่า สารสกัดหยาบจากใบประดงแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 384.86, 197.65 และ 598.61 มิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 2 และภาพที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1,450 มิลลิกรัม กรดแอสคอร์บิกต่อกรัมของสารสกัด



ภาพที่ 4 ค่าการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี FRAP มิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมของสารสกัดหยาบใบประดงแดง

5. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงโดยวิธี Folin-Ciocalteu

ผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดง พบว่าสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 265.05, 275.59 และ 980.96 มิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังนั้นจากผลการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม สารสกัดหยาบจากใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด



ภาพที่ 5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดง

ตารางที่ 2 ผลการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบใบประดงแดง

ตัวทำละลาย	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ			ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg TAE/g ± SD)
	วิธี DPPH (%DPPH ± SD)	วิธี ABTS (%ABTS ± SD)	วิธี FRAP (mg/g dry weight vitamin C ± SD)	
เฮกเซน	63.12 ± 2.05	44.02 ± 0.01	384.86 ± 0.03	265.05 ± 0.55
ไดคลอโรมีเทน	33.82 ± 18.64	19.05 ± 0.02	197.65 ± 0.09	275.59 ± 2.10
เมทานอล	91.84 ± 1.93	93.03 ± 0.02	598.61 ± 0.02	980.96 ± 1.23
ตัวควบคุม	93.55 ± 0.08	95.55 ± 0.01	1450.00 ± 0.10	-

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการสกัดใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล โดยสกัดแบบแช่ จะได้สารสกัดหยาบจากใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล มีผลผลิตร้อยละ 0.27, 0.26 และ 1.09 ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีผลผลิตร้อยละดีกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล พบว่า สารสกัดหยาบที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS พบว่า ทั้งสองวิธีให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน โดยสารสกัดหยาบเมทานอลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ร้อยละ 91.84 และ 93.03 ตามลำดับ รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบจากใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด เมื่อเทียบกับรายงานของ เนื่องจากเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง จึงทำให้สารสกัดหยาบจากใบประดงแดงมีความสามารถในการละลายสารสำคัญเป็นสารประกอบกลุ่ม ฟีนอลิกที่มีขั้วสูง ซึ่งทั้งสองวิธีให้ผลที่สอดคล้องกัน เพราะมีกลไกปฏิกิริยาในการจับกับอนุมูลอิสระที่เหมือนกัน (ไอลดาและสุปรานี, 2563)

การศึกษาความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์โดยวิธี FRAP ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ให้ผลที่สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ซึ่งให้ค่า FRAP ของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงตัวทำละลายเมทานอล เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน เท่ากับ 598.61, 384.86 และ 197.65 มิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากผลการศึกษาความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ด้วยวิธี FRAP สารสกัดหยาบจากใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี มีความสอดคล้องกันว่า สารสกัดหยาบจากใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีความสามารถในการเป็นเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีกว่าตัวทำละลายอื่น จึงทำให้สารสกัดหยาบจากใบประดงแดงมีความสามารถในการละลายสารสำคัญที่มีขั้วสูง เช่นกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์กับอนุมูลอิสระที่ดี (David et al., 2014)

การศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด คือสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีค่า 980.96 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเฮกเซน มีค่า 275.59 และ 265.05 มิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากผลการศึกษาเมื่อเทียบกับรายงาน มีความสอดคล้องกันว่าสารสกัดจากใบประดงแดงด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมที่สูงกว่าตัวทำละลายอื่น เนื่องจากเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงที่สุด จึงทำให้มีความสามารถในการละลายสารสำคัญที่มีขั้วสูงซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก กรดฟีนอลิก ลิกนิน ฟลาโวนอยด์ ออกมาได้มากทำให้มีปริมาณฟีนอลิกที่สูง (ไอลดาและสุปรานี, 2563) ซึ่งจากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบประดงแดงด้วยวิธีการสกัดแบบแช่หมักด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ที่ดีกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นและสามารถนำความรู้ที่ได้ไปต่อยอดเพื่อนำไปพัฒนาศึกษาฤทธิ์การจับเหล็กและพัฒนาเป็นยารักษาโรคธาลัสซีเมียต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (Royal Golden Jubilee PhD. Program) (PHD/0155/2560) ที่สนับสนุนเงินทุนแก่ นางสาวบงกชวรรณ พาคำวงค์ และส่งเสริมให้เกิดความร่วมมือในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) เพื่อสนับสนุนงานวิจัยมูลฐาน (Fundamental Fund) ประจำปีงบประมาณ 2566 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัย ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำหรับเงินทุนสนับสนุนตลอดการทำวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ได้ให้การสนับสนุนในด้านห้องปฏิบัติการเคมี เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ สารเคมี และอำนวยความสะดวกต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

กุลิสรา อุ่นเจริญ และวัลลภา ลีลานันทกุล. (2565). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของสารสกัดตำรับประสะขมิ้นอ้อยและสมุนไพรในตำรับ. *วารสารสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดขอนแก่น, 4*(2), 225-238.

กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ และปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ. (2560). การสกัดและวิธีวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉลียวเฉลิมพระเกียรติ*, *3*(1), 86-94.

ณัฏฐา นิธิกุลวรวงศ์. (2555). ประสิทธิภาพของสารสกัดสิรินธรวัลลีต่อความต้านทานเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล. *วารสารวิจัย มข. (ฉบับบัณฑิตศึกษา)*, *17*(5), 715-724.

สุดาพร นนท์ศิริ. (2562). *การศึกษาปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระของข้าวไทย* [สารนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี].

สิริเพ็ญ โหมดม่วง, ศิรินทิพย์ แสงสว่าง, ฉัตริยา ภูติยา, จุฑารัตน์ ทำโยธา, รัตน์ชนิดา เจริญสมประสงค์, ชญาณิลห์ หาญวลินโรจน์, ภาพตะวัน ทองดี, อิสราภรณ์ เสียงล้ำ, ดรุณี สุขชิต, ประจักกิจ ระวี, ดวงดาว สัตยากูล, สมจินตนา ทวีพานิชย์, สายสมร ลำลอง, จิดาภา แสงสวันต์, กาญจนา แปงจิตต์, พฤทธิ์ คำศรี, วรายุทธ สะโจมแสง และพรพรรณ พึ่งโพธิ์ ใน ชวลิต ถิ่นวงศ์พิทักษ์ (บ.ก.), *Future trends of research and innovation. การประชุมวิชาการประชุมระดับชาติ มอบ.วิจัย ครั้งที่ 15* (น. 127-132).

ศรมน สุทิน, พัชรี ภคกษมา, กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ, ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ และ นพวัฒน์ เพ็งคำศรี. (2559). คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ*, *5*(1), 30-40.

อิศรางค์ นุชประยูร. (2547). อนุมูลอิระและโรคโลหิตจางธาลัสเมีย. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต*, *14*(2), 84-89.

ไอลดา แกนุ และสุปรานี กองคำ. (2563). ผลของการสกัดด้วยเอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแก่นฝาง. *Thai Journal of Science and Technology*, *10*(1), 98-108. http://doi.org/ 10.14456/tjst.2021.8.

David Raj C., Dhinesh M.G., Lavanya R., and Brindha P. (2014). Studies on Antiproliferative and Antioxidant efficacy of *Caesalpinia sappan L.* heartwood. *Asian Journal of Chemistry*, *26*(12), 3683-3686.

Puechkaset. (2559, 17 พฤศจิกายน). *สิรินธรวัลลี/ประดงแดง ประโยชน์ และสรรพคุณสิรินธรวัลลี*. http://www.puechkaset.com/สิรินธรวัลลี

Athikornkulcha, S., Ruangrungsi N., Sekine, T., Sumino, M., Igarashi, K., and Ikegami, F. (2003). Chemical Censtituents of Bauhinia sirintthorniae. *Natural Medicines*, *57*(4).