

บทความวิจัย (Research Article)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง โครมาโทกราฟีของเหลว
สมรรถนะสูง และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบกระดุกไก่ดำ
Chemical composition analysis with TLC, HPLC and antioxidant activity from
Justicia gendarussa Burm.f. leaf extract

วริษา ผลาหาร¹ นฤวัตร ภักดี¹ ปานิชา พงศ์นราทร¹ จตุพร ประทุมเทศ¹ และ รณชัย ภูวนันนา^{1*}
Varisa Phalaharn¹, Naruwat Pakdee¹, Panicha Pongnaratorn¹, Jatuporn Prathumtet¹
and Ronnachai Poowanna^{1*}

¹สาขาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร

¹Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan,
Sakon Nakhon Campus

*Corresponding author; email: Ronnachai.pw@rmuti.ac.th

วันที่รับบทความ (Received)

1 สิงหาคม 2568

วันที่ได้รับบทความฉบับแก้ไข (Revised)

11 กันยายน 2568

วันที่ตอบรับบทความ (Accepted)

19 กันยายน 2568

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากใบกระดุกไก่ดำ (*Justicia gendarussa* Burm.f.) แบบสดและแห้ง โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC) โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ผลการวิเคราะห์ด้วย TLC พบว่าใบสดและใบแห้งแสดง Spot ที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Apigenin ($R_f = 0.56$) ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้เป็นแนวทางเบื้องต้นในการสร้างลายพิมพ์ทางเคมีของสารสกัดพืชสมุนไพร ขณะที่ผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC-DAD ยืนยันการมีอยู่ของ Apigenin ที่ $\lambda_{max} = 338$ โดยพบพีคที่ Retention time 23.21 นาที ตรงกับสารมาตรฐาน การวิเคราะห์ปริมาณ Apigenin ในสารสกัดใบสดเท่ากับ 34.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ร้อยละ 3.44) และสารสกัดใบแห้งเท่ากับ 22.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ร้อยละ 2.21) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบสดมีประสิทธิภาพสูงกว่า โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 995.38 ± 34.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากใบแห้งมีค่า IC_{50} เท่ากับ $1,416.71 \pm 107.76$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สรุปได้ว่าใบกระดุกไก่ดำมีสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิกที่สำคัญ ได้แก่ Apigenin ซึ่งมีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใบสดมีศักยภาพสูงกว่าใบแห้งอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้ใบกระดุกไก่ดำเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อการดูแลสุขภาพและการประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรมในอนาคตได้

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง, กระดุกไก่ดำ, อะพิจินิน

Abstract

This study aimed to analyze the chemical composition and evaluate the antioxidant activity of methanol extracts from fresh and dried leaves of *Justicia gendarussa* Burm.f. using thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC) and the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay. TLC analysis revealed that fresh and dried leaf extracts exhibited spots with R_f values corresponding to the standard compounds apigenin ($R_f = 0.56$), which was clearly observed under UV light at 254 nm, providing preliminary chemical fingerprints. HPLC-DAD analysis confirmed the presence of apigenin, showing a peak at a retention time of 23.21 min with λ_{max} at 338 nm, consistent with the standard. Quantitative analysis demonstrated that the apigenin content was higher in the fresh leaf extract (34.45 $\mu\text{g/mL}$, 3.44%), than in the dried leaf extract (22.14 $\mu\text{g/mL}$, 2.21%). Antioxidant evaluation using the DPPH assay indicated that the fresh leaf extract had significantly stronger activity, with an IC_{50} value of $995.38 \pm 34.67 \mu\text{g/mL}$, compared to $1,416.71 \pm 107.76 \mu\text{g/mL}$ in the dried extract. In conclusion, *J. gendarussa* leaves contain phenolic compounds, particularly apigenin that contribute to antioxidant potential. The fresh leaves exhibited superior antioxidant potential than dried leaves, suggesting their promise as a natural source of bioactive compounds for future development of herbal health products and pharmaceutical applications.

Keywords: Antioxidant activity, Thin layer chromatography, High-performance liquid chromatography, *Justicia gendarussa*, apigenin

บทนำ

กระดุกไก่ดำ (*Justicia gendarussa* Burm.f.) อยู่ในวงศ์ Acanthaceae [1] เป็นพืชที่ชอบร่มเงา เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศจีน และได้แพร่พันธุ์อย่างกว้างขวาง พบมากในเขตร้อน [2, 3] *J. gendarussa* เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 0.5 - 1.5 เมตร มีลำต้นเรียบ ใบเป็นรูปหอกเรียวและเรียบ ดอกมีขนาดเล็ก สีขาวมีจุดสีชมพูหรือม่วงด้านใน พืชชนิดนี้ชอบสภาพแวดล้อมที่ชื้นและอบอุ่น มักพบตามป่ารก ริมแม่น้ำ มีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity) [4, 5] ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidant activity) [4, 6] ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity) [7] ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Anticancer activity) [8] ฤทธิ์ปกป้องตับ (Hepatoprotective activity) [9] และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ (Anti-angiogenic activity) [10] ในการแพทย์พื้นบ้านมีสรรพคุณใช้รักษาอาการปวดศีรษะ หอบหืด ไข้ใน ปวดบวมตามข้อ หลอดลมอักเสบ อาการอาหารไม่ย่อย โรคตา ท้องอืด ไข้ อาการตกขาว เป็นต้น [11] นอกจากนี้ยังพบว่าสารสำคัญ ได้แก่ Vitexin, Apigenin และ Caffeic acid [12, 13] มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อจุลินทรีย์ รักษาโรคปวดข้อและข้อบวม โดยออกฤทธิ์ผ่านกลไกเดียวกันกับยาต้านการอักเสบชนิดไม่สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs) หรือ ยากลุ่ม NSAIDs โดยไปยับยั้งเอนไซม์ทั้ง Cyclooxygenase (COX) และ Lipoxygenase (LOX) pathways [14] ทำให้มีผลยับยั้งการหลั่งสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบหลายชนิด เช่น Histamine และ Prostaglandins [1] นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดกระดุกไก่ดำออกฤทธิ์ที่ Opioid receptor ผ่านกลไกเดียวกับมอร์ฟิน แต่มีฤทธิ์ลดปวดน้อยกว่ามอร์ฟินประมาณ 2 - 5 เท่า [15]

อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนอิสระ มีความไวต่อปฏิกิริยาและไม่เสถียรสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ในร่างกาย เช่น โปรตีน อนุมูลอิสระสามารถออกซิไดซ์กรดอะมิโนบางชนิด เช่น Cysteine และ Methionine

ซึ่งทำให้โปรตีนสูญเสียโครงสร้างสามมิติและหน้าที่ ๆ เกี่ยวข้อง เช่น เอนไซม์และตัวรับสัญญาณ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้นำไปสู่การสะสมของโปรตีนที่ถูกออกซิไดซ์ที่สัมพันธ์กับการเสื่อมของเซลล์และการเกิดโรคเรื้อรัง [16] อนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ Reactive oxygen species (ROS) [17] เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ อนุมูลไฮดรอกซิล และเปอร์ออกซิล และ Reactive nitrogen species (RNS) เช่น ไนโตรเจนไดออกไซด์ และไนตริกออกไซด์ [18, 19] โดย ROS และ RNS เกิดขึ้นตามธรรมชาติในกระบวนการเผาผลาญพลังงานของเซลล์ แม้ว่าในระดับต่ำจะช่วยกระตุ้นกระบวนการต่าง ๆ เช่น การแบ่งเซลล์และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน [20, 21] อนุมูลอิสระโดยเฉพาะ ROS [17] เช่น Hydroxyl radicals จะทำให้เกิดกระบวนการ Lipid peroxidation ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความสมบูรณ์และความยืดหยุ่น ทำให้เซลล์รั่วหรือแตกและเกิดสารพิษระดับเซลล์ เช่น Malondialdehyde (MDA) [22] และ DNA ทำให้เกิดการแตกของสาย DNA (Strand breaks) การเปลี่ยนแปลงเบส (Base modifications) และการเกิดพันธะข้ามสาย (Crosslinking) ความเสียหายนี้ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ หากไม่ได้รับการซ่อมแซมที่เหมาะสม อาจนำไปสู่การตายของเซลล์ [23] และจะนำไปสู่การทำลายโปรตีน ไขมัน และ DNA เป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคเรื้อรังหลายชนิด เช่น มะเร็ง เบาหวาน โรคหัวใจ และโรคระบบประสาทเสื่อม [21, 24, 25]

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพรจึงได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากพืชสมุนไพรเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ สามารถช่วยลดความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และลดความเสี่ยงของโรคเรื้อรัง เช่น โรคหัวใจ มะเร็ง และโรคอ้วนเรื้อรัง โดยมีความปลอดภัยมากกว่าสารสังเคราะห์ [25, 26] งานวิจัยนี้จึงนำเทคนิคการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาประยุกต์ใช้กับสารสกัดใบกระดุกไก่ดำ เพื่อประเมินศักยภาพในการเป็นแหล่งสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงเพื่อทดสอบคล่องกับการวิเคราะห์สารสำคัญในพืชสมุนไพรด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง โดยใช้สาร Apigenin และ Caffeic acid เป็นสารมาตรฐาน และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ Apigenin เป็นสารมาตรฐาน เนื่องจากสารทั้ง 2 ชนิดมีรายงานพบว่าสามารถพบได้ในต้นกระดุกไก่ดำ [1, 13] ซึ่งสามารถใช้ในการควบคุมคุณภาพและการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในอนาคตโดยสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ที่มาจากสมุนไพร ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี ซิลิเนียม เบต้าแคโรทีน วิตามินเอ เป็นต้น มีบทบาทสำคัญในการปกป้องเซลล์จากอนุมูลอิสระและลดความเสี่ยงต่อโรคเรื้อรัง [27, 28] เพื่อให้ร่างกายได้รับสารต้านอนุมูลอิสระพอเพียง ร่างกายจึงต้องได้รับสารที่มาจากธรรมชาติ [29, 30, 31] อย่างไรก็ตาม วิธีการสกัดที่เหมาะสมมีผลโดยตรงต่อปริมาณและความคงตัวของสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิก โดยเฉพาะ Apigenin และ Caffeic acid ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์หลักที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้การสกัดด้วยเมทานอล ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถดึงสารฟลาโวนอยด์ออกมาได้ในปริมาณสูง และลดการสูญเสียความคงตัวของสารเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ [32, 33] นอกจากนี้ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบกระดุกไก่ดำ โดยเฉพาะคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ มีความสำคัญต่อการประยุกต์ใช้ในหลายด้าน เนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นตัวกระตุ้นกระบวนการเกิดออกซิเดชันที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของเซลล์และการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด เบาหวาน และมะเร็ง [34, 35] ดังนั้นการพิสูจน์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากกระบวนการสกัดนี้ไม่เพียงช่วยยืนยันถึงคุณค่าทางชีวภาพ แต่ยังแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการนำสารสกัดใบกระดุกไก่ดำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ผลิตภัณฑ์สมุนไพร หรือเครื่องสำอางเชิงสุขภาพที่เน้นการชะลอวัยและการปกป้องเซลล์จากความเสียหายที่เกิดจากออกซิเดชัน

ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจที่จะศึกษาสารสกัดจากใบกระดุกไก่ดำ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบางและโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC-DAD) เพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ทางเคมีและยืนยันการมีอยู่ของสารสำคัญ รวมทั้งการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ทั้งนี้การศึกษานี้ยังมุ่งเน้นการเปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่างใบสดและใบแห้ง ซึ่งเป็นประเด็นใหม่ที่ยังไม่ค่อยมีรายงาน และสามารถนำไปสู่การพัฒนามาตรฐานคุณภาพของสมุนไพรและการประยุกต์ใช้เชิงสุขภาพได้ในอนาคต ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์สารพฤกษเคมี (Phytochemical screening) เนื่องจากมีความ

รวดเร็ว ใช้งานง่าย และใช้ปริมาณสารน้อย [36] ซึ่งผลการศึกษาสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้นในการตัดสินใจเลือกสมุนไพรมาใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพหรือเครื่องสำอางจากสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ตลอดจนใช้ในการควบคุมคุณภาพและมาตรฐานสารสกัดจากใบกระตือรือร้นในอนาคต เพื่อส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรไทยอย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงจากสารสกัดใบกระตือรือร้นแบบสดและแห้ง
2. เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดใบกระตือรือร้นแบบสดและแห้ง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบกระตือรือร้น ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC) และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

1.1 การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

เก็บตัวอย่างใบกระตือรือร้นจากสวนสมุนไพร โรงพยาบาลเขาชะเมาเฉลิมพระเกียรติ 80 พรรษา จังหวัดระยอง ดังภาพที่ 1 โดยเก็บส่วนเหนือดินมาแยกเฉพาะส่วนใบ นำไปล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาดและผึ่งลม แล้วอบที่อุณหภูมิ 20 - 40 องศาเซลเซียส



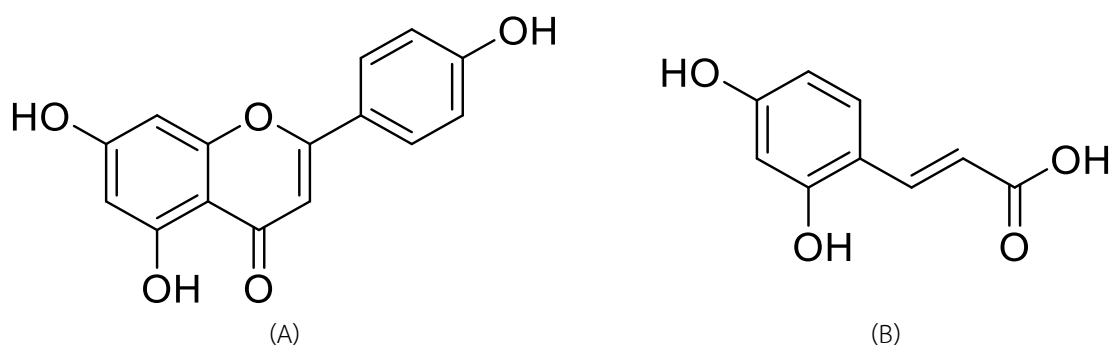
ภาพที่ 1 ต้นกระตือรือร้น

1.2 การเตรียมสกัดสารสมุนไพร

ชั่งใบกระตือรือร้นสดและแห้ง อย่างละ 500 กรัม แช่ในเมทานอล 95% ปริมาตร 2.5 ลิตร (อัตราส่วน 1:5) ใส่ในโหลแก้วที่ปิดฝาสนิท เป็นเวลา 7 วัน ทำการเขย่าทุกวัน วันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) เมื่อครบ 7 วัน นำมากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แรงดัน 150 มิลลิเมตรปรอท อัตราการหมุน 50 รอบต่อนาที จนตัวทำละลายระเหยหมด จะได้สารสกัดที่มีลักษณะเหนียวข้น นำสารสกัดใส่ในขวดเก็บสาร และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยคำนวณค่าร้อยละผลผลิต (%Yield) ของสารสกัดหยาบ ได้จากสมการที่ 1

$$\text{ร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดที่ได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด (กรัม)}} \times 100$$

สมการที่ 1 การคำนวณร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบ (%Yield)



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ Apigenin (A) และ Caffeic acid (B)

1.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

เตรียมสารสกัดจากใบกระตือรือร้นแบบสดและแบบแห้งที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารมาตรฐาน Apigenin และ Caffeic acid มีโครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 2 ละลายด้วยเมทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น Spot สารมาตรฐาน Apigenin, Caffeic acid, สารสกัดใบกระตือรือร้นแห้ง และสารสกัดใบกระตือรือร้นสด ลงบนแผ่นโครมาโทกราฟีแบบผิวบางที่เคลือบด้วย Silica gel 60 GF 254 (Merck) ขนาด 8 × 10 เซนติเมตร โดยวิธภาคเคลื่อนที่คือ เอทิลอะซิเตท : โทลูอีน : เมทานอล : กรดฟอร์มิก (Ethyl acetate : Toluene : Methanol : Formic acid) ในอัตราส่วน 4 : 4 : 0.7 : 0.1 จากนั้นวางใน TLC Tank รอให้วิธภาคเคลื่อนที่ไปจนถึง Solvent front และนำแผ่น TLC ออกมาวางให้แห้งแล้วตรวจสอบผลการแยกสารภายใต้แสงขาว แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาค่า R_f ของ Spot สารสกัดที่พบ

1.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

เตรียมสารสกัดจากใบกระตือรือร้นแบบสดและแห้ง ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเมทานอล กรองผ่าน Membrane syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร การเตรียมวิธภาคเคลื่อนที่คือ น้ำ (Water type-1, A) และเมทานอล (Methanol HPLC grade, B) ระบบการแยกแบบ Gradient แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำคั่นความถี่สูง 30 นาที เพื่อไล่ฟองอากาศ ตั้งค่าวิธภาคเคลื่อนที่ ดังนี้ 0.1 นาที (A=95%) 10 นาที (A=80%) 23-30 นาที (A=0%) จากนั้นฉีดสารตัวอย่าง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC – DAD system (Shimadzu, Kyoto, Japan) ใช้คอลัมน์ C18 (5 ไมโครเมตร, 4.6 × 250 มิลลิเมตร) อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที คำนวณหาปริมาณ Apigenin เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Apigenin ในช่วงความเข้มข้น 3.125-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณ Apigenin ในตัวอย่างใบกระตือรือร้นแห้ง ในหน่วยกรัมต่อน้ำหนัก 100 กรัม (g/100 g)

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity) ดัดแปลงจากวิธี ของ Widowati et al. [37]

2.1 การเตรียมสารละลาย DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

เตรียมสาร DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่งสาร 7.886 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล 95% เป็น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

2.2 การเตรียมสารมาตรฐาน Trolox

เตรียมสารมาตรฐาน Trolox โดยการชั่งสารหนัก 10 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล 95% ให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3 การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง

เตรียมสารสกัดใบกระดุกไก่ดำแบบสดและแบบแห้ง ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นตั้งต้น จากนั้นนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นดังนี้ สารสกัดกระดุกไก่ดำแบบสด เท่ากับ 0.046, 0.094, 0.188, 0.375, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดกระดุกไก่ดำแบบแห้ง เท่ากับ 0.063, 0.125, 0.25, 0.50, 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบแต่ละครั้ง ได้เตรียมหลุม (Well) แยกกันสำหรับสารมาตรฐาน Trolox และสำหรับสารสกัดใบกระดุกไก่ดำในแต่ละความเข้มข้น โดยเติมสารละลาย DPPH 0.2 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม จากนั้นเติมสารมาตรฐาน Trolox หรือสารสกัดใบกระดุกไก่ดำ 100 ไมโครลิตร แยกเป็นอิสระต่อกัน แล้วบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งมีการวัดซ้ำ 3 ครั้ง ค่าที่ได้ถูกนำไปสร้างกราฟความเข้มข้นของสารสกัดกับร้อยละการยับยั้ง DPPH ดังสมการที่ 2 และคำนวณค่า IC_{50} ของสารสกัดจากสมการเส้นตรงของกราฟ (ภาพที่ 6) โดยใช้ Trolox เป็น Positive control

$$\text{ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (\%)} = [1 - (A_{\text{Sample}} / A_{\text{Control}})] \times 100$$

สมการที่ 2 การหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ

A_{Sample} = ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารผสมระหว่างสารละลาย DPPH กับสารตัวอย่าง

A_{Control} = ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ผลการสกัดสารสกัดจากใบกระดุกไก่ดำ

จากตารางที่ 1 การสกัดด้วยเมทานอล 95% จากใบกระดุกไก่ดำแบบสดและแบบแห้ง พบว่าร้อยละของสารสกัดหยาบใบกระดุกไก่ดำสดมีร้อยละของสารสกัดหยาบเท่ากับ 2.64 และใบกระดุกไก่ดำแห้ง มีร้อยละของสารสกัดหยาบเท่ากับ 1.44 สอดคล้องกับรายงานของ Das et al. (2010) ซึ่งระบุว่าในการทำแห้งวัสดุพืชสมุนไพรสามารถทำให้สารออกฤทธิ์บางชนิดสลายตัวหรือสูญเสียไปบางส่วนจากความร้อน แสง หรือปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่งผลให้ปริมาณของสารสกัดหยาบลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากพืชสด [38] นอกจากนี้การที่ใบสดให้สารสกัดหยาบสูงกว่าอาจเนื่องมาจากโครงสร้างทางเคมีของพืชที่ยังคงความชุ่มชื้นและความสมบูรณ์ของสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) [39, 40] ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการเลือกตัวอย่างพืชสมุนไพรในขั้นตอนการเตรียมก่อนการสกัด เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงและคงคุณภาพของสารออกฤทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพ

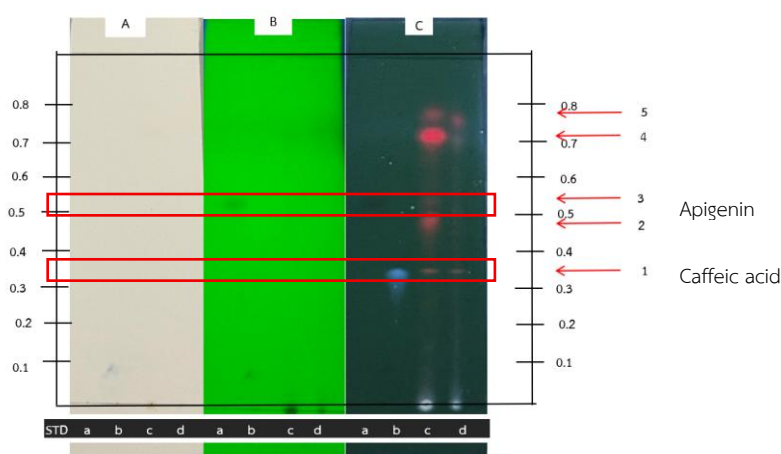
อย่างไรก็ตามการใช้ใบแห้งในการสกัดยังคงเป็นแนวทางที่สะดวกในการเก็บรักษาวัตถุดิบและควบคุมความแปรปรวนของความชื้น แต่จำเป็นต้องพิจารณาวิธีการอบแห้งที่เหมาะสม เช่น การอบที่อุณหภูมิต่ำ หรือการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) เพื่อคงคุณภาพของสารสำคัญให้ได้มากที่สุด [41]

ตารางที่ 1 แสดงค่าร้อยละของสารสกัดหยาบ (%Yield) ใบกระดุกไ่ดำ

สารสกัด	ลักษณะทางกายภาพ	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละสารสกัดหยาบ
ใบกระดุกไ่ดำสด	สีเขียวเข้ม หนืด	13.22	2.64%
ใบกระดุกไ่ดำแห้ง	สีเขียวเข้ม หนืด	7.21	1.44%

2. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

จากภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่า โครมาโทแกรมชนิดแผ่นบางเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คือ Apigenin และ Caffeic acid ในใบกระดุกไ่ดำสดและใบกระดุกไ่ดำแห้ง พบ Spot ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ไม่ชัดเจน (ภาพที่ 3B) ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร (ภาพที่ 3C) พบจำนวน 5 และ 4 Spot ตามลำดับ โดยมีค่า R_f ใกล้เคียงกัน เช่น Apigenin ($R_f = 0.56$), Caffeic acid ($R_f = 0.37$), กระดุกไ่ดำสด ($R_f = 0.37-0.85$), และกระดุกไ่ดำแห้ง ($R_f = 0.37-0.82$) แสดงว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ (Ethyl acetate : Toluene : Methanol : Formic acid = 4 : 4 : 0.7 : 0.1) สามารถแยกองค์ประกอบฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกในสารสกัดใบกระดุกไ่ดำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เห็นตำแหน่ง Spot ที่สัมพันธ์กับสารมาตรฐาน Apigenin และ Caffeic acid ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการสร้างลายพิมพ์ทางเคมี อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังไม่ได้เปรียบเทียบกับวัฏภาคเคลื่อนที่ระบบอื่น ซึ่งควรทำในงานวิจัยต่อไปเพื่อยืนยันความเหมาะสมเชิงเปรียบเทียบ

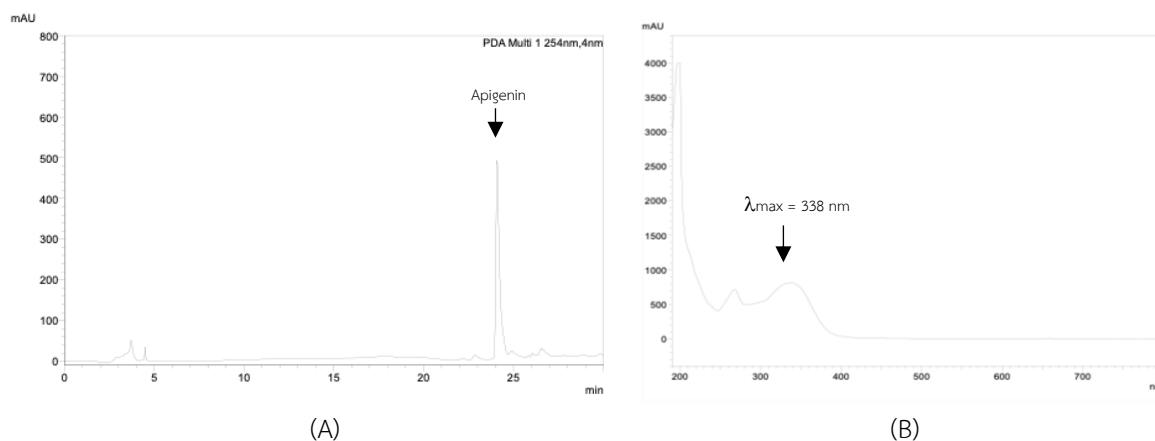


ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบสารมาตรฐาน คือ Apigenin (a) และ Caffeic acid (b) กระดุกไ่ดำสด (c) และกระดุกไ่ดำแห้ง (d) บน TLC plate

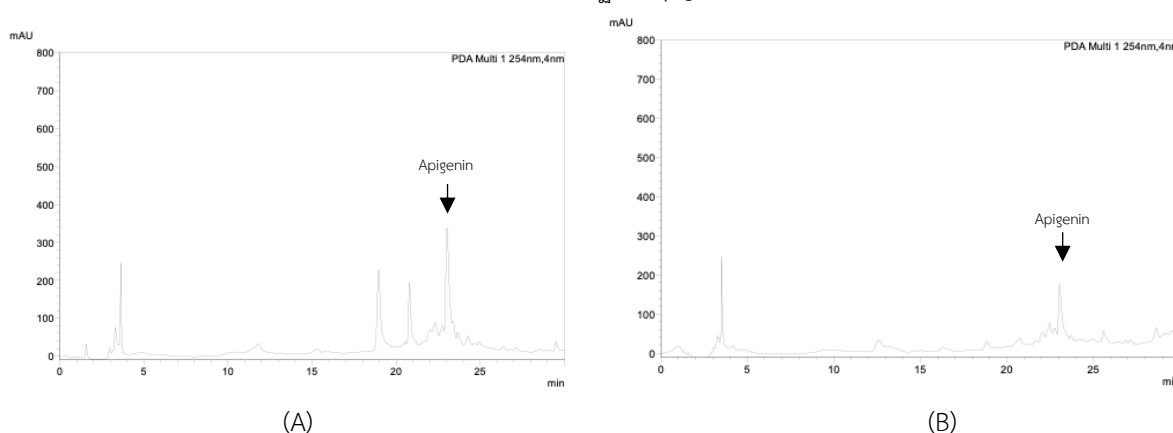
*ตรวจสอบด้วยแสงสีขา (A) UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (B) UV ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร (C)

วัฏภาคเคลื่อนที่ : Ethyl acetate : Toluene : Methanol : Formic acid (4 : 4 : 0.7 : 0.1)

จากผลการวิเคราะห์ TLC พบว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ Ethyl acetate: Toluene: Methanol: Formic acid (4 : 4 : 0.7 : 0.1) สามารถแยก Spot ของสารสำคัญออกได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งถือเป็นกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระสำคัญในพืชสมุนไพร [26, 42] โดยพบว่าค่า R_f ของ Apigenin และ Caffeic acid อยู่ในช่วง 0.56–0.60 และ 0.37 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับงานของ Yadav et al. (2017) [43] ที่ใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ Toluene : Ethyl acetate : Formic acid ในการวิเคราะห์สารจากใบกระดุกไก่ดำด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบางทำให้ได้โปรไฟล์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น โดยผลการตรวจสอบด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร พบ Spot ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน แต่ความชัดเจนค่อนข้างต่ำ ซึ่งเกิดจากการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกที่มีปริมาณไม่สูงนัก หรืออาจจะเกิดจากปริมาณสารเข้มข้นน้อยเกินไป ขณะที่การตรวจสอบที่ 366 นาโนเมตร พบ Spot ชัดเจนกว่า แสดงถึงคุณสมบัติการเรืองแสงของ Apigenin ที่สอดคล้องกับคุณสมบัติทางสเปกโทรสโกปีของฟลาโวนอยด์ที่มักเรืองแสงได้ดีในช่วงคลื่นยาว (366 นาโนเมตร) จึงใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเปรียบเทียบคุณภาพของสารสกัด โดยพบ Spot ของสารสกัดจากใบสดมีความเข้มและหนากว่าใบแห้งอย่างชัดเจน [43] ซึ่งเกิดจากการสูญเสียของสารออกฤทธิ์ระหว่างกระบวนการทำแห้ง [44, 45] ซึ่งสอดคล้องกับการที่ฟลาโวนอยด์ เช่น Apigenin มีความไวต่อแสงและความร้อน [17] และการเปรียบเทียบค่า R_f ของสารจากใบกระดุกไก่ดำแสดงถึงความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารในระบบโครมาโทกราฟี ซึ่งขึ้นอยู่กับโครงสร้างเคมีของสาร โดย Apigenin มีลักษณะโครงสร้างที่มีขั้วกลาง ๆ เมื่อเทียบกับ Caffeic acid ทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าในตัวทำละลายที่มีความสมดุลระหว่างความมีขั้วและไม่ขั้ว [46] ซึ่งช่วยแยกสารได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นพื้นฐานในการระบุสารออกฤทธิ์ในงานพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร [39] เมื่อเปรียบเทียบกับงานของ Wulansari et al. (2025) ที่รายงานว่าสารสกัดจากกระดุกไก่ดำที่วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบางมีหลาย Spot ที่แสดงคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ [47] ในงานวิจัยนี้มีข้อสังเกตสำคัญคือ ความเข้มของ Spot ในใบสดมีความเด่นชัดกว่าใบแห้ง ซึ่งอาจบ่งบอกถึงปริมาณสารสำคัญที่สูงกว่า โดยเฉพาะกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติระเหยง่ายหรือเสื่อมสภาพได้ง่ายจากความร้อน [48] การอบแห้งใบอาจลดปริมาณสารสำคัญลงได้ ดังนั้นจึงมีผลต่อประสิทธิภาพทางชีวภาพของที่ได้จากวัตถุดิบ ดังนั้นการใช้เทคนิค TLC และการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay เป็นการบูรณาการที่มีประสิทธิภาพและมีศักยภาพในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์คุณภาพวัตถุดิบสมุนไพรในระดับอุตสาหกรรมและงานวิจัย [49, 50] อย่างไรก็ตามจากค่า R_f และการตรวจสอบภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต พบว่า Spot บางตำแหน่งมีความใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Apigenin และ Caffeic acid แม้ Caffeic acid มักแสดงการดูดกลืนที่ 254 นาโนเมตร แต่ในตัวอย่างนี้ Spot ของสารดังกล่าวไม่ปรากฏชัดเป็นจุดมืดที่ 254 นาโนเมตร แต่กลับให้สัญญาณเรืองแสงสีน้ำเงินที่ 366 นาโนเมตร ซึ่งเป็นผลจากปัจจัยความเข้มข้นของตัวอย่างเมทริกซ์ที่ทำให้เกิด quenching หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีบนแผ่น TLC ดังนั้นผล TLC ถือเป็นข้อมูลเบื้องต้นเท่านั้น และการยืนยันด้วยวิธีการวิเคราะห์ HPLC-DAD เพื่อตรวจสอบและยืนยันการมีอยู่ของ Apigenin ทั้งในใบสดและใบแห้ง ทั้งนี้การพิสูจน์ชนิดของสารในระดับโครงสร้างยังจำเป็นต้องใช้เทคนิคขั้นสูงเพิ่มเติม เช่น LC-MS/MS หรือ NMR ในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 4 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน Apigenin (A) และลักษณะสเปกตรัม (B)



ภาพที่ 5 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดใบกระดุกไก่ดำสด (A) และแห้ง (B)

3. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

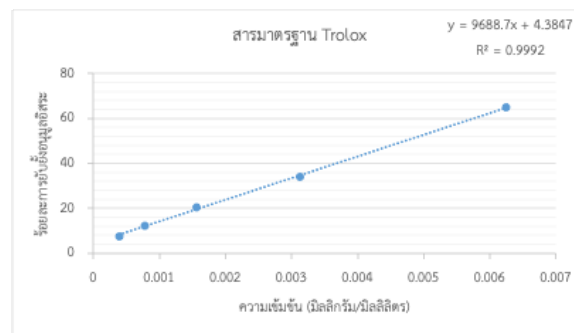
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC-DAD) โดยตรวจสอบลักษณะโครมาโทแกรมและลักษณะสเปกตรัมจากสารสกัดใบกระดุกไก่ดำ ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารมาตรฐาน Apigenin มี Retention time ที่ 24.10 นาที ขณะที่สารสกัดหยาบจากใบกระดุกไก่ดำ แสดงพีคที่เวลา 23.21 นาที โดยมีค่า Retention time ใกล้เคียงกันมาก การบันทึกสเปกตรัมการดูดกลืนแสงโดยตัวตรวจจับ DAD (200–400 nm) ยืนยันว่ารูปแบบสเปกตรัมของพีคตัวอย่างตรงกับสารมาตรฐาน Apigenin ไม่เพียงแต่ที่ $\lambda_{\max}$ (338 นาโนเมตร) เท่านั้น แต่รวมถึงลักษณะสเปกตรัมโดยรวมด้วย ซึ่งสอดคล้องกับค่ามาตรฐานของ Apigenin ที่รายงานหลายฉบับพบว่า Apigenin มักแสดง $\lambda_{\max}$ ระหว่าง 334–338 นาโนเมตร ในระบบ HPLC-DAD) ซึ่งสนับสนุนการยืนยันพีคดังกล่าวเป็น Apigenin ได้อย่างมีประสิทธิภาพเชิงสเปกโทรสโกปี [51]

เมื่อทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟสารมาตรฐาน คือ $y = 5E+07x - 32017$ ($R^2 = 0.9995$) พบว่า Apigenin ในสารสกัดหยาบจากใบสดมีปริมาณ 34.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (3.44% w/v) ขณะที่ใบแห้ง มีปริมาณ 22.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (2.21% w/v) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณ Apigenin ในตัวอย่างใบสดสูงกว่าใบแห้งประมาณร้อยละ 50 เมื่อคำนวณจากค่าที่ได้ การลดลงของปริมาณ Apigenin หลังจากการอบแห้งอาจมีสาเหตุร่วมจากหลายปัจจัย เช่น ความไวต่ออุณหภูมิของสารพฤกษเคมี การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน การเกิดไอโซเมอริเซชันหรือตรึงกับ

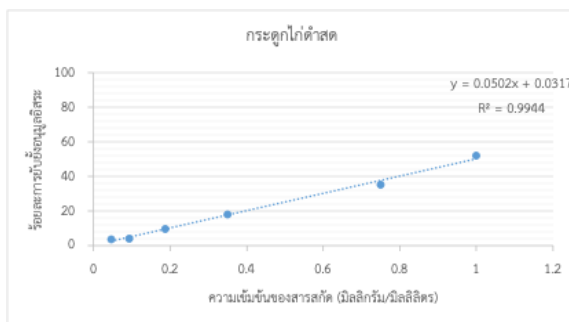
องค์ประกอบเมทริกซ์ระหว่างการอบแห้ง ตลอดจนการสูญเสียสารบางส่วนในรูประเหยหรือการสลายตัวขณะได้รับความร้อน [52, 53]

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระ

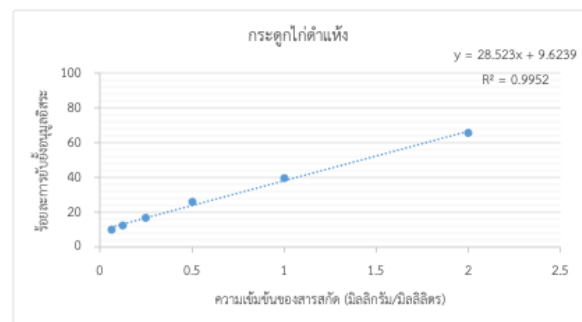
การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสกัดของใบกระดุกไก่ดำแบบสดและแบบแห้ง มีสมการเส้นตรงคือ $y = 0.0502x + 0.0317$ และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9944 ค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 995.38 ± 34.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม แสดงดังภาพที่ 6 และใบกระดุกไก่ดำแห้งมีสมการเส้นตรงคือ $y = 0.0285x + 9.6239$ และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9952 ค่า IC_{50} ได้เท่ากับ $1,416.71 \pm 107.76$ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม แสดงดังภาพที่ 7



ภาพที่ 6 กราฟฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Trolox



(A)



(B)

ภาพที่ 7 กราฟฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกระดุกไก่ดำสด สด (A) และแห้ง (B)

ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} จากสารสกัดใบกระดุกไก่ดำแบบสดและแห้ง

สารสกัด	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)
ใบกระดุกไก่ดำสด	995.38 ± 34.67
ใบกระดุกไก่ดำแห้ง	$1,416.71 \pm 107.76$
Trolox	4.708 ± 0.040

พบว่าสารสกัดใบกระดุกไก่ดำแบบสด แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระพบว่าค่า IC_{50} เท่ากับ 995.38 ± 34.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และกระดุกไก่ดำแห้งเท่ากับ $1,416.71 \pm 107.76$ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และสารมาตรฐาน

Trolox มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.708 ± 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการวิเคราะห์พบว่า สารสกัดใบกระดุกไก่ดำสดมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าใบแห้ง ประมาณ 1.42 เท่า และจากการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สารสกัดกระดุกไก่ดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างต่ำ (Low activity) แสดงดังตารางที่ 2

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดจากใบกระดุกไก่ดำ แสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างสารสกัดจากใบสดและใบแห้ง โดยสารสกัดจากใบสดมีค่า IC_{50} น้อยกว่าสารสกัดจากใบแห้งซึ่งค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่าแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า [54] ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น Apigenin มีปริมาณหรือความคงตัวสูงกว่าในสารสกัดจากใบสด ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการวิเคราะห์เชิงปริมาณความแตกต่างดังกล่าวอาจมีสาเหตุมาจากกระบวนการอบแห้งและการเก็บรักษา ซึ่งมีผลต่อโครงสร้างและความเสถียรของสารพฤกษเคมี โดยเฉพาะกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติไวต่อความร้อน แสง และออกซิเจน [44, 55] งานวิจัยของ Kashyap et al. (2022) ยืนยันว่า Apigenin จะสูญเสียฤทธิ์ทางชีวภาพเมื่อสัมผัสความร้อนหรือเก็บรักษาไว้นาน ทำให้ประสิทธิภาพในการจับอนุมูลอิสระ (ROS scavenging activity) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ [34] ซึ่งกลไกการต้านอนุมูลอิสระของ Apigenin นั้นครอบคลุมหลายมิติ ไม่ว่าจะเป็นการกำจัดอนุมูลอิสระโดยตรง (Free radical scavenging) การจับโลหะ (Metal chelation) การเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ และการกระตุ้นสัญญาณ Nrf2 ซึ่งเป็น Transcription factor ที่ควบคุมการตอบสนองต่อ Oxidative stress [35, 56] Apigenin จึงเป็นสารที่มีศักยภาพสูงในการป้องกันเซลล์จากอนุมูลอิสระ นอกจากนี้มีรายงานว่า Apigenin ที่สกัดจากใบกระดุกไก่ดำ ยังแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านการอักเสบ ผ่านกลไกการยับยั้งการแสดงออกของ NF- κ B, COX-2 และ Cytokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ TNF- α และ IL-1 β [57]

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Apigenin ที่วัดได้ด้วย HPLC และผลการทดสอบทางชีวภาพ (DPPH) มีความสอดคล้องกันโดยสารสกัดจากใบสดที่มีปริมาณ Apigenin สูงกว่ามีค่า IC_{50} ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบแห้ง ซึ่งสอดคล้องกับบทบาทของ Apigenin เป็นสารในกลุ่ม Flavone ที่สามารถทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ [51, 58] ดังนั้นการลดลงของ Apigenin จึงสามารถอธิบายได้ว่าเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญที่ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของตัวอย่างแห้งลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างสด

สรุปผล

ผลการสกัดสมุนไพรพบว่าใบกระดุกไก่ดำแบบสดให้ปริมาณสารสกัดสูงกว่าใบที่ผ่านการทำแห้ง การทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่าใบสดและแห้งมี Spot ที่ตรงกับสารมาตรฐาน Apigenin และ Caffeic acid การวิเคราะห์ Apigenin ด้วยเทคนิค HPLC แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบสดมีปริมาณสูงกว่า (3.44% w/v) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ซึ่งสารสกัดจากใบสดมีค่า IC_{50} ต่ำกว่าแบบแห้งอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ควรพัฒนาวิธีการสกัดหรือการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิค LC-MS/MS หรือ NMR เพิ่มเติม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ที่อำนวยความสะดวกในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- 1 Kumar KS, Sabu V, Sindhu G, Rauf AA, Helen A. Isolation, identification and characterization of apigenin from *Justicia gendarussa* and its anti-inflammatory activity. International Immunopharmacology. 2018; 59: 157-67. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.04.004>
- 2 Aye MM, Aung HT, Sein MM, Armijos C. A review on the phytochemistry, medicinal properties and pharmacological activities of 15 selected Myanmar medicinal plants. Molecules. 2019; 24(2). <https://doi.org/10.3390/molecules24020293>
- 3 Wiart C. Medicinal plants of Asia and the Pacific. Boca Raton: CRC press; 2006. 336 p.
- 4 Saleem TK, Azeem AK, Dilip C, Sankar C, Prasanth NV, Duraisami R. Anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Gendarussa vulgaris* Nees. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2011; 1(2): 147-9. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60014-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60014-2)
- 5 Pitiporn S, Musigavong N, Chitkrisadakul S, Kattalee U, Pengpon T, Kwankhao P. Efficacy and safety of *Justicia gendarussa* Burm.f. medicated spray and topical diclofenac spray for the treatment of mild to moderate soft tissue injury: a randomized double-blinded controlled trial. Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine. 2022; 20(2): 223-34. <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/JTTAM/article/view/247422>
- 6 Nirmalraj S, Perinbam K. Studies on Phytochemical Screening and in vitro Antioxidant Activity of Ethyl Acetate Leaf Extract of *Justicia gendarussa* Burm. F. Research Journal of Botany. 2015; 10(1): 30-6. <https://scialert.net/abstract/?doi=rjb.2015.30.36>
- 7 Nirmalraj S, Ravikumar M, Mahendrakumar M, Bharath B, Perinbam K. Antibacterial and anti-inflammatory activity of *Justicia gendarussa* Burm. f. leaves. Journal of Plant Sciences. 2015; 10(2): 70-4. <https://doi.org/10.3923/jps.2015.70.74>
- 8 Kashyap D, Sharma A, Tuli HS, Sak K, Punia S, Mukherjee TK. Kaempferol - A dietary anticancer molecule with multiple mechanisms of action: recent trends and advancements. Journal of Functional Foods. 2017; 30: 203-19. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.01.022>
- 9 Mondal M, Hossain MM, Rahman MA, Saha S, Uddin N, Hasan MR, et al. Hepatoprotective and antioxidant activities of *Justicia gendarussa* leaf extract in carbofuran-induced hepatic damage in rats. Chemical Research in Toxicology. 2019; 32(12): 2499-508. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00345>
- 10 Periyannayagam K, Umamaheswari B, Suseela L, Padmini M, Ismail M. Evaluation of antiangiogenic effect of the leaves of *Justicia gendarussa* (Burm. f.) (Acanthaceae) by chorio allontoic membrane method. American Journal of Infectious Diseases. 2009; 5(3): 180-2. <https://doi.org/10.3844/ajidsp.2009.180.182>
- 11 Roy P, Joseph LJ. Bioactive constituents and pharmacological profile of willow-leaved *Justicia*: a review. Natural Resources for Human Health. 2022; 2(4): 450-61. <https://doi.org/10.53365/nrfhh/146769>

- 12 Raghu MG, Agrawal P. The isolation and structural determination of flavonoids from *Justicia gendarussa*. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 2016; 11(6): 73-9.
<https://doi.org/10.9790/3008-1106037379>
- 13 Pawar AB. Herbal approaches to arthritis: a review of therapeutic plants and their bioactive compounds. International Journal of Pharmacognosy 2025; 12(5): 378-86.
[https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.12\(5\).378-86](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.12(5).378-86)
- 14 Paval J, Kaitheri SK, Potu BK, Govindan S, Kumar RS, Narayanan SN, et al. Anti-arthritic potential of the plant *Justicia gendarussa* Burm f. Clinics (Sao Paulo). 2009; 64(4): 357-62.
<https://doi.org/10.1590/s1807-59322009000400015>
- 15 Ratnasooriya WD, Deraniyagala SA, Dehigaspitiya DC. Antinociceptive activity and toxicological study of aqueous leaf extract of *Justicia gendarussa* Burm. f. in rats. Pharmacognosy Magazine. 2007; 3(11): 145-55.
- 16 Stadtman ER. Protein oxidation and aging. Science. 1992; 257(5074): 1220-4.
<https://doi.org/10.1126/science.1355616>
- 17 Kozłowska M, Ścibisz I, Przybył J, Ziarno M, Żbikowska A, Majewska E. Phenolic contents and antioxidant activity of extracts of selected fresh and dried herbal materials. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. 2021; 71(3): 269-78. <https://doi.org/10.31883/pjfn/139035>
- 18 Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Current Biology 2014; 24(10): R453-62. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- 19 Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016; 2016: 1245049.
<https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
- 20 Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2017; 2017: 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- 21 Juan CA, Perez de la Lastra JM, Plou FJ, Perez-Lebena E. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(9).
<https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- 22 Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2014; 2014: 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- 23 Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2003; 17(10): 1195-214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>

- 24 Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*. 2023; 97(10): 2499-574. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>
- 25 Cai Y, Sun M, Corke H. Antioxidant activity of betalains from plants of the amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(8): 2288-94. <https://doi.org/10.1021/jf030045u>
- 26 Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. 2013; 2013: 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- 27 Institute of Medicine Panel on Dietary Antioxidants Related Compounds. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington (DC): National Academies Press; 2000.
- 28 Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009; 2(5): 270-8. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- 29 Anderson JW, Baird P, Davis RH, Jr., Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, et al. Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*. 2009; 67(4): 188-205. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x>
- 30 Reynolds A, Mann J, Cummings J, Winter N, Mete E, Te Morenga L. Carbohydrate quality and human health: a series of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet*. 2019; 393(10170): 434-45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31809-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31809-9)
- 31 Slavin JL. Dietary fiber and body weight. *Nutrition*. 2005; 21(3): 411-8. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.08.018>
- 32 Lee JE, Jayakody JTM, Kim JI, Jeong JW, Choi KM, Kim TS, et al. The influence of solvent choice on the extraction of bioactive compounds from Asteraceae: a comparative review. *Foods*. 2024; 13(19): 3151. <https://doi.org/10.3390/foods13193151>
- 33 Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*. 2016; 21(7): 901. <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/7/901>
- 34 Kashyap P, Shikha D, Thakur M, Aneja A. Functionality of apigenin as a potent antioxidant with emphasis on bioavailability, metabolism, action mechanism and in vitro and in vivo studies: a review. *Journal of Food Biochemistry*. 2022; 46(4): e13950. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13950>
- 35 Zhou X, Wang F, Zhou R, Song X, Xie M. Apigenin: a current review on its beneficial biological activities. *Journal of Food Biochemistry*. 2017; 41(4): e12376. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfbc.12376>
- 36 Wagner H, Heur YH, Obermeier A, Tittel G, Bladt S. [DC- and HPLC-Analysis of Eleutherococcus.]. *Planta Medica*. 1982; 44(4): 193-8. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971445>

- 37 Widowati W, Fauziah N, Herdiman H, Afni M, Afifah E, Kusuma HSW, et al. Antioxidant and anti aging assays of *Oryza sativa* extracts, vanillin and coumaric acid. Journal of Natural Remedies. 2016; 16(3): 88-99. <https://doi.org/10.18311/jnr/2016/7220>
- 38 Das K, Tiwari R, Shrivastava D. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. Journal of medicinal plants research. 2010; 4(2): 104-11. <https://doi.org/10.5897/JMPR09.030>
- 39 Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines. 2011; 8(1): 1-10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238476>
- 40 Zakaria NNA. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. Medicinal and Aromatic plants. 2015; 4(3): 196. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- 41 Ratti C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. Journal of Food Engineering. 2001; 49(4): 311-9. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00228-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00228-4)
- 42 Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. Journal of Nutritional Science. 2016; 5: e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- 43 Yadav D, Reshi MS, Uthra C, Shrivastava S, Srivastava N, Narayana SKK, et al. Botanical and chemical fingerprinting of medicinal roots of *Justicia gendarussa* Burm f. Pharmacognosy research. 2017; 9(2): 208-14. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.204643>
- 44 Zhao G, Etherton TD, Martin KR, West SG, Gillies PJ, Kris-Etherton PM. Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. The Journal of Nutrition. 2004; 134(11): 2991-7. <https://doi.org/10.1093/jn/134.11.2991>
- 45 Tisania A, Rafi M, Syukur M, Nurcholis W. Impact total of harvesting age on phenolic content, flavonoid level, and antioxidant capacity in *Justicia gendarussa* leaves. International Journal of Agricultural Technology. 2025; 21(1): 339-48. <https://li04.tci-thaijo.org/index.php/IJAT/article/view/5490>
- 46 Oldoni TLC, Silva RC, Carpes ST, Massarioli AP, Alencar SM. Antioxidant activity and development of one chromatographic method to determine the phenolic compounds from agroindustrial pomace. Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 2020; 92(3): e20181068. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020181068>
- 47 Wulansari L, Wahyuni WT, Nurcholis W, Rafi M. TLC fingerprint analysis and evaluation of α -glucosidase inhibitory and free radical scavenging activity of *Justicia gendarussa* from different growth locations. Jurnal Kimia Valensi. 2025; 11(1): 150-61. <https://doi.org/10.15408/jkv.v11i1.43662>

- 48 Capecka E, Mareczek A, Leja M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. Food Chemistry 2005; 93(2): 223-6.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.020>
- 49 Chan EWC, Kong LQ, Yee KY, Chua WY, Loo TY. Antioxidant and antibacterial properties of some fresh and dried Labiatae herbs. Free Radicals and Antioxidants. 2012; 2(3): 20-7.
<https://doi.org/https://doi.org/10.5530/ax.2012.3.3>
- 50 Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. Journal of Separation Science. 2007; 30(18): 3268-95. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>
- 51 Hostetler GL, Riedl KM, Schwartz SJ. Endogenous enzymes, heat, and pH affect flavone profiles in parsley (*Petroselinum crispum* var. neapolitanum) and celery (*Apium graveolens*) during juice processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012; 60(1): 202-8.
<https://doi.org/10.1021/jf2033736>
- 52 Chen P, Chen F, Guo Z, Lei J, Zhou B. Recent advancement in bioeffect, metabolism, stability, and delivery systems of apigenin, a natural flavonoid compound: challenges and perspectives. Frontiers in Nutrition. 2023; 10: 1221227. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1221227>
- 53 Yuan J, Hao L-J, Wu G, Wang S, Duan J-a, Xie G-Y, et al. Effects of drying methods on the phytochemicals contents and antioxidant properties of chrysanthemum flower heads harvested at two developmental stages. Journal of Functional Foods. 2015; 19: 786-95.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.008>
- 54 Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology. 1995; 28(1): 25-30.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- 55 Kumar SS, Manoj P, Shetty NP, Giridhar P. Effect of different drying methods on chlorophyll, ascorbic acid and antioxidant compounds retention of leaves of *Hibiscus sabdariffa* L. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2015; 95(9): 1812-20. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6879>
- 56 Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, Mashino T, Kasahara T. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, apigenin, luteolin and fisetin. International Immunopharmacology. 2011; 11(9): 1150-9. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.03.012>
- 57 Wang J, Liu YT, Xiao L, Zhu L, Wang Q, Yan T. Anti-inflammatory effects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF-kB pathway. Inflammation. 2014; 37(6): 2085-90. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9942-x>
- 58 Ningsih IY, Purwanti DI, Wongso S, Prajogo BE, Indrayanto G. Metabolite profiling of *Justicia gendarussa* Burm. f. leaves using UPLC-UHR-QTOF-MS. Scientia Pharmaceutica. 2015; 83(3): 489-500. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1511-08>