

ผลของตัวทำละลายต่างชนิดที่ใช้ในการสกัดลำต้นโคลงเคลงต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารพฤกษเคมี

Effect of Various Solvents Used for Extraction on Antioxidant Activities and Phytochemical Screening of *Melastoma malabathricum* L. Stem Extract

รัตนา วงศ์ชูพันธ์^{1*}, พิณพิศา เทพราช², กมลชนก สุริยามาตร², เพ็ญภา ชูยงค์² และ แฉ่งน้อย แสงเสนห์³

Rattana Wongchuphan^{1*}, Pinpisa Theprat², Kamonchanok Suriyamas², Pennapa Chooyong² and

Naengnoi Saengsane³

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

² คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

³ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

¹ Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University

² Faculty of Education, Suratthani Rajabhat University

³ Faculty of Science and Technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University

*Corresponding author; E-mail: rattana.won@sru.ac.th

Received: 21 October 2023 /Revised: 17 April 2024 /Accepted: 17 April 2024

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบของลำต้นโคลงเคลงที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ การหาปริมาณของปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TPC และ TFC) จะตรวจวัดโดยวิธีคัลเลอรีเมตรีด้วยรีเอเจนต์ Folin-Ciocalteu และอะลูมินัมคลอไรด์ ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทดสอบด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay ผลการตรวจสอบชนิดของสารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่เป็นองค์ประกอบในลำต้นโคลงเคลง พบฟลาโวนอยด์ คูมาริน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และไกลโคไซด์ในสารสกัดทั้งหมด การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีร้อยละผลผลิตและปริมาณฟีนอลน้อยกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำกว่า แต่เอทานอลสามารถสกัดฟลาโวนอยด์ได้ปริมาณสูงสุด $1,793 \pm 16$ มิลลิกรัมสมมูลเคอชิตินต่อกรัมของสารสกัด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 107 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่สารสกัดเอซีโตนมีร้อยละการสกัดสูงสุด 3.50 และปริมาณฟีนอลิก $2,421 \pm 14$ มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด โดยสรุป การสกัดสารพฤกษเคมีสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นผลมาจากการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยมีขั้วปานกลางถึงสูง

คำสำคัญ: การสกัดด้วยตัวทำละลาย ต้นโคลงเคลง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดีพีพีเอช สารพฤกษเคมี

Abstract

This research aimed to investigate antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of the *M. malabathricum* crude extracts obtained by using different extracting solvents. The quantification of total phenolic and flavonoid contents (TPC and TFC) employed colorimetry with Folin-Ciocalteu and aluminum chloride reagents, respectively. Additionally, the antioxidant activity was assessed using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay. Preliminary phytochemical screening of *M. malabathricum* stem confirmed the presence of flavonoids, coumarins, tannins, terpenoids, steroids and cardiac glycosides in all extracts. Solvent extraction with ethanol had a lower percent yield and phenolic content than extraction with a lower polarity solvent. Ethanol was able to extract the highest content of flavonoids of $1,793 \pm 16$ milligrams equivalent to quercetin per gram of extract. Also, antioxidant activity with an IC_{50} value of 107 milligrams per liter was observed. While the acetone extract had the highest extraction percentage of 3.50 and phenolic content of $2,421 \pm 14$ mg gallic acid equivalent per gram of extract. In conclusion, the extraction of important phytochemicals with antioxidant activity results from the use of appropriate solvents with medium to high polarity.

Keywords: Solvent extraction, *M. malabathricum*, Antioxidant activity, DPPH, Phytochemicals

บทนำ

พืชในวงศ์โคลงเคลง (Melastomataceae) เป็นกลุ่มพืชหนึ่งที่มีความอุดมสมบูรณ์และความหลากหลายมากที่สุดในเอเชียเขตร้อน เขตอบอุ่น และหมู่เกาะแปซิฟิก เช่น ประเทศไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย สิงคโปร์ ฟิลิปปินส์ จีน อินเดีย และบังคลาเทศ¹⁻³ Joffry et al. ระบุถึงชื่อเรียกทั่วไปว่า จะแตกต่างกันไปตามถิ่นที่อยู่อาจจะเป็นชุมชนหรือชนเผ่าด้วยวัตถุประสงค์ทางการแพทย์พื้นบ้านในประเทศไทย โคลงเคลงซึ่งเรียกกันทั่วไปว่า มังเคร (Mang kre) มังเร (Mang re) เบร (Bre) และคาดูดา (Kadu da) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า

Melastoma Malabathricum L. และเป็นหนึ่งใน 22 สายพันธุ์ที่พบในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และถือเป็นยาสมุนไพร ส่วนใบ ยอด เปลือก เมล็ด และรากของโคลงเคลงสามารถใช้รักษาอาการท้องเสีย บิด ริดสีดวงทวาร บาดแผล ปวดฟัน และปวดท้องได้⁴ ผลแก่แตกของโคลงเคลงดังกล่าวซึ่งมีดอกสีม่วงจากพื้นที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เมื่อสกัดด้วยน้ำ จะมีปริมาณแอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอลิก และน้ำตาลมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับผลอ่อน และผลแก่⁵ อาอีเซาะส์ เบ็ญหาวัน และสุนีย์ วัฒนะ รายงานว่าแอซีไธนสามารถสกัดสารสำคัญจากผล

โคลงเคลง จังหวัดยะลา จำนวน 4 ชนิด คือ คาเทชิน (Catechin) กรดแกลลิก (Gallic acid) ลูทีโอลิน (Luteolin) และเคอร์เซติน (Quercetin) ซึ่งทุกชนิดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ส่วนอื่น ๆ ของโคลงเคลงไม่ว่าจะเป็นใบ ก้าน และราก พบสารสำคัญเพียงสองชนิดเท่านั้น⁶ นอกจากนี้ส่วนสกัดเมทานอลจากใบและกิ่งโคลงเคลงยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* (*E. coli*) ในระดับปานกลาง⁷

อำเภอไชยา จังหวัดสุราษฎร์ธานีเป็นอีกสถานที่ที่พบต้นโคลงเคลง โดยมีลักษณะทั่วไปสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้รวบรวมไว้ ว่าโคลงเคลงเป็นไม้พุ่มขึ้นกลางแจ้ง ใบเดี่ยวติดตรงข้ามและอาจมีหลายใบติดรอบข้อ ดอกสมบูรณ์เพศ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกอย่างละ 3, 4 หรือ 5 กลีบ แขนงอับเรณู ยึดยาวหรือเป็นรยางค์ อับเรณู แตกโดยมีรูที่ปลาย รังไข่ติดใต้วงกลีบหรือกึ่งใต้วงกลีบมี 4 หรือ 5 ช่อง ไข่อ่อนจำนวนมากติดที่แกนผนังรังไข่ ผลแห้งแบบแก่แตก หรือผลมีเนื้อหลายเมล็ด⁸ เนตรชนก นุ้ยสีรุ่ง และไพโร มัทธวรรตน์⁹ รายงานผลการศึกษาชีววิทยาของดอกและพัฒนาการของผลโคลงเคลงสายพันธุ์กลีบดอกสีขาวที่ปลูกในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ซึ่งยังคงมีลักษณะเด่นของพืชในวงศ์นี้โดยช่อดอกเป็นแบบช่อกระจุกซ้อน (Compound cymes) เกิดที่ปลายยอดของกิ่งและใช้เวลาเจริญเติบโตตั้งแต่ตูมดอกจนถึงผลแก่สุกเปลือกผลแตกออกใช้เวลาเฉลี่ยประมาณ 40-45 วัน หมอยาสมุนไพรรพบ้านอำเภอไชยาให้ข้อมูลทางยาของโคลงเคลงว่า ส่วนกิ่งและก้านรวมกันนำมา

ต้มน้ำดื่มหรือต้มน้ำดื่ม รากนำมาต้มเป็นยาบำรุงตับ และใบนำมาต้มโปะแผลเป็นหนอง การสกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันมีผลทำให้องค์ประกอบทางเคมีที่สกัดได้แตกต่างกันด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่อชนิดของสารพฤกษเคมี ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ปริมาณ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระส่วนของลำต้นโคลงเคลงที่ได้ตลอดทั้งปี

วิธีการวิจัย

1. สารเคมี และเครื่องมือ

สารเคมีเกรดวิเคราะห์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เช่น ยี่ห้อ Loba Chemie จากประเทศอินเดีย ส่วนยี่ห้อ Merck และ Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมนี ได้แก่ Ferric chloride hexahydrate, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Folin & Ciocalteu's phenol reagent, กรดแกลลิก (Gallic acid), เคอร์เซติน (Quercetin) และ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดและการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ได้แก่ เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Biochrom Libra S50 UV/Vis Spectrophotometer) ตู้อบลมร้อน (Binder hot air oven) เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator, RC900, KNF) และอ่างน้ำร้อน (Water bath, LAUDA, GFL Technology)

2. แหล่งที่มาของพืช

ส่วนลำต้นโคลงเคลงเก็บในช่วงเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม พ.ศ. 2565 บริเวณพื้นที่ตำบลปากหมาก อำเภอไชยา จังหวัดสุราษฎร์ธานี

เนื่องด้วยเป็นพื้นที่ภูเขาที่มีสภาพอากาศชื้นตลอดทั้งปี เป็นแนวภูเขาอุทยานแห่งชาติและสภาพพื้นดินเป็นดินร่วนเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของโคลงเคลง แสดงลักษณะเป็นไม้พุ่มของโคลงเคลง และขึ้นตามที่โล่งแจ้งในบริเวณสวนยางกลีบดอกสีม่วงสวยงาม ใบเดี่ยวติดตรงข้ามรอบข้อ ส่วนดอกจะออกเป็นช่อ ดอกแก่จะกลายเป็นผล (Figure 1) กองกานดา ชยามฤต^๑ ระบุลักษณะเด่นของโคลงเคลงว่า เกสรเพศผู้มีก้านเรียงเป็นวง 2 วง และมีรังไข่ และเมล็ดสุกแตกกระจายขยายพันธุ์ได้ง่าย พืชที่นำมาศึกษาครั้งนี้ได้รับการยืนยันจากหมอสุมไพพรพื้นที่บ้านที่อาศัยอยู่ในเขตอำเภอไชยา จังหวัดสุราษฎร์ธานี (หมอบัญญา เมฆลัย) ว่าคือพืชที่คนในพื้นที่เรียกว่าโคลงเคลง

3. การเตรียมสารสกัดจากลำต้นโคลงเคลง

งานวิจัยนี้ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดในการสกัดสารจากลำต้นโคลงเคลงด้วยวิธีการหมัก (Maceration) คือ เอทานอล แอซีโตน และเอทิลแอซีเตต ลำต้นโคลงเคลงชิ้นเล็กที่ตากจนแห้งในอากาศ จะถูกนำไปอบให้แห้งสนิทในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นลำต้นโคลงเคลงให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร แล้วแช่ตัวอย่างพืชอบแห้งที่ชั่งน้ำหนักแน่นอน (460-470 กรัม) ในตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันและมีการคนอย่างทั่วถึงทุกวัน เมื่อกรองแยกกากตัวอย่างพืชออกทั้งหมดแล้ว นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนที่ความเร็ว 25 รอบ/นาที ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 0-50 Psi และตั้งทิ้งไว้ในขวดขนาดเล็กสีชาจนตัวทำละลายระเหยหมด บันทึกน้ำหนักของสารสกัดที่

ได้ทั้งหมดจากแต่ละส่วน และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยไม่ให้โดนแสง ร้อยละการสกัดคำนวณได้จากสมการ (1)

$$\text{ร้อยละการสกัด} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบ (g)}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างพืชอบแห้ง (g)}} \times 100 \quad (1)$$



Figure 1. General characters of *M.*

malabathricum in a particular study site (A), leaves (B), flowers (C) and fruits (D).

4. การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบหาชนิดของสารพิษเคมี 9 กลุ่มในสารสกัดลำต้นโคลงเคลงด้วยตัวทำละลายต่างกันจำนวน 3 ชนิด อาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอนตามวิธีมาตรฐาน¹⁰⁻¹³ ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ชาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ดำเนินการดังนี้

4.1 การตรวจสอบสารกลุ่มแอลคาลอยด์ โดยวิธี Wagner's test มีขั้นตอนดังนี้ ละลายสารสกัด 0.02 กรัม ด้วย 10% H_2SO_4 (1.0 มิลลิลิตร) และนำหลอดทดลองไปอุ่นบนอ่างน้ำร้อน (5 นาที) กรองส่วนที่ไม่ละลายออก เมื่อของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtration) เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม Wagner's reagent จำนวน 5 หยด หากผลการทดสอบเป็นตะกอนสีน้ำตาลแดง แสดงว่าสารสกัดหยาบมีแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ

4.2 การตรวจสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยวิธี Shinoda test มีขั้นตอนดังนี้ ละลายสารสกัด 0.02 กรัม ใน 50% เอทานอล จำนวน 3 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ใส่หลอดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ (2-3 ชิ้น) หลังจากนั้นนำไปให้ความร้อนบนอ่างน้ำร้อนประมาณ 5 นาที และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) หากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ส้ม หรือแดง แสดงว่าสารสกัดหยาบมีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ ส่วนการตรวจสอบฟลาโวนอยด์โดยวิธี Ferric chloride test มีขั้นตอนดังนี้ ละลายสารสกัด 0.02 กรัม ด้วย 1% $FeCl_3$ จำนวน 5 หยด ในหลอดทดลอง หากเกิดตะกอนสีน้ำเงินหรือเขียว แสดงว่าสารสกัดหยาบมีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ

4.3 การตรวจสอบสารกลุ่มแอนทราควิโนน โดยวิธี Modified Borntrager's test มีขั้นตอนดังนี้ นำสารสกัด 0.02 กรัม ในหลอดทดลอง มาเติม 10% H_2SO_4 จำนวน 2.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนอ่างน้ำร้อน เป็นเวลา 5 นาที และกรอง เมื่อสารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนที่เป็นของเหลวไปสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนจำนวน 3 มิลลิลิตร ตามด้วยการเติม 10% NH_3 จำนวน

5 หยด เขย่าอย่างแรงประมาณ 30 วินาที หากปรากฏสารละลายสีชมพู สีแดง หรือสีม่วง แสดงว่าสารสกัดหยาบมีแอนทราควิโนนเป็นองค์ประกอบ

4.4 การตรวจสอบสารกลุ่มคูมารินโดยวิธี NaOH test มีขั้นตอนดังนี้ ละลายสารสกัด 0.02 กรัม ใน 50% เอทานอล (1 มิลลิลิตร) ในหลอดทดลอง กรอง และเติม 6 M NaOH จำนวน 1.0 มิลลิลิตร หากปรากฏสารละลายสีเหลือง แสดงว่าสารสกัดหยาบมีคูมารินเป็นองค์ประกอบ

4.5 การตรวจสอบสารกลุ่มซาโปนินโดยวิธี Foam test มีขั้นตอนดังนี้ นำสารสกัด 0.02 กรัม ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นจำนวน 2.0 มิลลิลิตร และนำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อน (5 นาที) ปิดจุกยาง แล้วเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 1 นาที หากปรากฏฟองนาน 30 นาที แสดงว่าสารสกัดหยาบมีซาโปนินเป็นองค์ประกอบ

4.6 การตรวจสอบสารกลุ่มแทนนินโดยวิธี Braymer's test มีขั้นตอนดังนี้ นำสารสกัด 0.02 กรัม และน้ำกลั่นจำนวน 3 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ไปอุ่นในอ่างน้ำร้อน (5 นาที) หลังกรองขณะร้อน นำส่วนที่เป็นของเหลวมาเติม 1% $FeCl_3$ จำนวน 5 หยด หากปรากฏสารละลายสีเขียวแกมน้ำเงิน แสดงว่าสารสกัดหยาบมีแทนนินเป็นองค์ประกอบ

4.7 การตรวจสอบสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์มีขั้นตอนดังนี้ ละลายสารสกัด 0.02 กรัม ด้วยคลอโรฟอร์ม (1 มิลลิลิตร) ตามด้วยการเติมกรดแอซีติกกลั่น (Glacial acetic acid) และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร หากปรากฏสารละลายสีน้ำตาลแดง แสดงว่าสารสกัดหยาบมีเทอร์ปีนอยด์เป็นองค์ประกอบ

4.8 การตรวจสอบสารกลุ่มสเตียรอยด์มีขั้นตอนดังนี้ ละลายสารสกัด 0.02 g ด้วยคลอโรฟอร์ม จำนวน 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองตามด้วยการเติม conc. H_2SO_4 จำนวน 3 หยด ลงไปตามผนังหลอด หากปรากฏสารละลายสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียว แสดงว่าสารสกัดหยาบมีสเตียรอยด์เป็นองค์ประกอบ

4.9 การตรวจสอบสารกลุ่มคาร์ดิแอกไกลโคไซด์โดยวิธี Keller-Kiliani test มีขั้นตอนดังนี้ เติมสารสกัด 0.02 กรัม ลงในหลอดทดลอง เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่า กรอง และนำของเหลวที่ได้จากการกรองมาเติม CH_3COOH จำนวน 5 หยด ตามด้วยการเติม 5% $FeCl_3$ จำนวน 5 หยด และ conc. H_2SO_4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หากปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อ แสดงว่าสารสกัดหยาบมีคาร์ดิแอกไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบ

5. การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content, TPC) ในลำต้นโคลงเคลงที่สกัดได้ หาโดย Folin-Ciocalteu colorimetric method ซึ่งปรับเปลี่ยนจากวิธีของ Singleton et al.¹⁴ และภาศิริ ม่วงศิริกุล¹⁵ และใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน

5.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกสารละลายกรดแกลลิกในเอทานอลเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสารละลายตั้งต้นสำหรับเจือจางให้เป็นสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายความเข้มข้นละ 0.5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น (9.5 มิลลิลิตร) จำนวน 8 หลอด ตามด้วย

การเติม 10% Folin-Ciocalteu จำนวน 0.5 มิลลิลิตร และ 10% $NaCO_3$ ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ดังนั้นของผสมในแต่ละหลอดจึงมีปริมาตรรวมเป็น 12.5 มิลลิลิตร หลังจากตั้งไว้ที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที รีเอเจนต์ Folin-ciocalteu ออกซิไดซ์ฟีนอลอิสระในสารสกัดจากลำต้นโคลงเคลงและเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มแล้วนำสารละลายทั้ง 8 หลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ($n = 3$) หาค่าเฉลี่ยและนำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดแกลลิก

5.2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดลำต้นโคลงเคลง

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากลำต้นโคลงเคลง มีขั้นตอนเหมือนกัน แต่ใช้สารละลายตัวอย่างในเอทานอลเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แทนสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก การทดลองดำเนินการ 3 ซ้ำ และนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของกรดแกลลิก ซึ่งคำนวณจากสมการ (2) และรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mg GAE/g extract)

$$TPC = \frac{C \times V \times D}{W} \quad (2)$$

เมื่อกำหนดให้ C คือ ความเข้มข้นของกรดแกลลิกที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร), V คือ ปริมาตรของสารสกัด (มิลลิลิตร), D คือ dilution factor และ W คือ น้ำหนักของสารสกัด (กรัม)

6. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid content, TFC) หาได้โดย Aluminum chloride colorimetric method และใช้เคอชิตินเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งเป็นวิธีการที่ปรับเปลี่ยนบางส่วนจากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้¹⁶

6.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอชิติน

สารละลายเคอชิตินในเอทานอลเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสารละลายตั้งต้นสำหรับเจือจางเป็นสารละลายมาตรฐานเคอชิตินที่มีความเข้มข้น 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280 และ 320 มิลลิกรัมต่อลิตร การเตรียมกราฟมาตรฐานมีขั้นตอนดังนี้ หลอดทดลองบรรจุน้ำกลั่นจำนวน 8 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ตามด้วยการเติมสารละลายเคอชิตินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร, 5% NaNO_2 จำนวน 0.15 มิลลิลิตร, 10% AlCl_3 ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร และ 1 M NaOH จำนวน 2 มิลลิลิตร ของผสมในแต่ละหลอดมีปริมาตรรวมเป็น 3.80 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV/Vis Spectrophotometer ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ($n = 3$) หาค่าเฉลี่ยและนำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของเคอชิติน

6.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดลำต้นโคลงเคลง

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากลำต้นโคลงเคลงมีขั้นตอนเหมือนกัน แต่ใช้สารละลายตัวอย่างในเอทานอลเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแทนสารละลายเคอชิติน การทดลองดำเนินการ 3

ซ้ำและนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นที่สมมูลกับความเข้มข้นของเคอชิติน (มิลลิกรัมสมมูลของเคอชิตินต่อกรัมของสารสกัด) คำนวณจากสมการ (3)

$$\text{TFC} = \frac{C \times V \times D}{W} \quad (3)$$

เมื่อกำหนดให้ C คือ ความเข้มข้นของเคอชิตินที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร), V คือ ปริมาตรของสารสกัด (มิลลิลิตร), D คือ dilution factor และ W คือ น้ำหนักของสารสกัด (กรัม)

7. การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากลำต้นโคลงเคลงหาโดยใช้ DPPH radical scavenging assay ที่ปรับเปลี่ยนจากวิธีของ Brand-Williams et al.¹⁷ สารละลาย DPPH มีสีม่วงเข้มซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเข้มเป็นสีเหลือง ดังนั้นการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH บ่งบอกความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากลำต้นโคลงเคลง และใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน

7.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิก

สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละขวดตามลำดับเตรียมได้จากการเจือจางสารละลายตั้งต้นกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่มีความเข้มข้นต่างกันจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย

0.2mM DPPH จำนวน 2.5 มิลลิลิตร และนำไปปรมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด หลอดควบคุมเตรียมโดยการผสมเอทานอล 0.5 มิลลิลิตร กับ สารละลาย 0.2 mM DPPH จำนวน 2.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำทั้ง 6 หลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer (n=3) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแสดงเป็นค่า IC_{50} ซึ่งเรียกว่าความเข้มข้นของการยับยั้งที่ร้อยละ 50 ในที่นี้หมายถึงความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกที่จำเป็นในการทำดองอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 สูตรคำนวณร้อยละของการยับยั้ง (Percentage of inhibition) ดังสมการ (4)

$$\%Inhibition = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad (4)$$

เมื่อกำหนดให้ A_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control (เอทานอล 0.5 มิลลิลิตร + สารละลาย DPPH 2.5 มิลลิลิตร), A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกรดแอสคอร์บิก และ %Inhibition คือ ร้อยละของการยับยั้ง

7.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากลำต้นโคลงเคลง

สารละลายของสารสกัดจากลำต้นโคลงเคลง เข้มข้น 40, 80, 160, 320, 840, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละขวดตามลำดับ เตรียมโดยการเจือจางสารละลายตั้งต้นของสารสกัดในเอทานอลเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังจากนั้น นำสารละลายของสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างกัน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ

สารละลาย 0.2mM DPPH จำนวน 2.5 มิลลิลิตร และนำไปปรมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในที่มีวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายของสารสกัดที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer (n=3) ค่า IC_{50} ของสารสกัดคำนวณจากกราฟของความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดลำต้นโคลงเคลงเทียบกับร้อยละการยับยั้ง ส่วนร้อยละการยับยั้งคำนวณโดยใช้สูตรเดียวกันกับการดองแอสคอร์บิก แต่แทนค่า A_s ด้วยค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายของสารสกัดลำต้นโคลงเคลง

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง และนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การเปรียบเทียบทางสถิติวิเคราะห์ด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ TPC และ TFC

ผลการวิจัย

1. ผลของตัวทำละลายต่อชนิดของสารพฤษเคมี

Table 1 แสดงผลการตรวจสอบสารพฤษเคมีจำนวน 9 ชนิดในสารสกัดลำต้นโคลงเคลงด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้กันทั่วไปในการหมักพืชสมุนไพรเพื่อสกัดสารองค์ประกอบ¹⁸ ได้แก่ เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว (0.654) ส่วนเอซีโตนและเอทิล แอซีเตตเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง แต่ความมีขั้วของเอทิล แอซีเตต (0.228) น้อยกว่าเอซีโตน (0.355)

Table 1. Types of phytochemicals found in different solvent extracts

Phytochemicals	Solvents used for extraction		
	Ethanol	Acetone	Ethyl acetate
Alkaloids	+	-	-
Flavonoids	+	+	+
Anthraquinone	-	-	+
Coumarin	+	+	+
Saponin	+	-	-
Tannin	+	+	+
Terpenoids	+	+	+
Steroids	+	+	+
Cardiac glycosides	+	+	+

+ (Positive test) is "Found"

- (Negative test) is "Not found"

ถึงแม้ว่าสารสกัดหยาบจากลำต้นโคลงเคลงมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเขียวแกมดำเหมือนกัน แต่ร้อยละการสกัดและชนิดของสารพฤษเคมีต่างกัน ร้อยละการสกัดเรียงลำดับจากมากไปน้อยตามชนิดของตัวทำละลาย ดังนี้ สารสกัดเอซีโตน สารสกัดเอทานอล และสารสกัดเอทิล แอซีเตต

(Table 2) อย่างไรก็ตามชนิดของสารพฤษเคมีที่ปรากฏในสารสกัดเอทานอลมีจำนวนมากที่สุด หากต้องการสารกลุ่มแอนทราควิโนนจากลำต้นโคลงเคลง สามารถสกัดได้โดยใช้เอทิลแอซีเตต เนื่องจากไม่พบสารกลุ่มนี้ในสารสกัดเอทานอลและเอซีโตน

Table 2. Appearance and extraction yield of *M. malabathricum* solvent extractions

Solvents	Appearance	Weight of crude extract (g)	Extraction yields
Ethanol	Black-green, viscous liquid	13.10	2.83
Acetone	Black-green, viscous liquid	16.31	3.50
Ethyl acetate	Black-green, viscous liquid	3.81	0.81

การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม วิธีการสกัด และการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นเป็นขั้นตอนสำคัญในการเตรียมพืชสมุนไพรสำหรับหาปริมาณขององค์ประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวัตถุประสงค์การนำไปใช้ประโยชน์ที่แตกต่างกัน¹⁸ สารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ส่วนใหญ่จะมีสรรพคุณทางยา เช่น อัลคาลอยด์ (Alkaloid) แอนทราควิโนน (Anthraquinone) และน้ำมันหอมระเหย (Essential oil) เป็นต้น สารประเภทนี้เกิดจากขบวนการชีวสังเคราะห์ และเป็นสารประกอบที่พบในพืชต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ Zakaria et al.¹⁹ รายงานการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูง คือ น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดสารจากใบโคลงเคลงที่พบในประเทศมาเลเซียและพบองค์ประกอบที่เป็นฟลาโวนอยด์ ไตรเทอร์พีน เทนินิน ซาโปนิน และสเตียรอยด์ แต่ไม่มีแอลคาลอยด์ สำหรับการทดสอบฤทธิ์แก้ปวด ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ลดไข้ (Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic properties) เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงรองจากน้ำและถูกนำมาใช้ในการสกัดสารจากรากโคลงเคลงในรายงานวิจัยของ Faravani et al.²⁰ สารทุติยภูมิ

ที่สกัดออกมาได้ มีดังนี้ กรดเฮกซาโคซานอิก (Hexacosanoic acid) กรดแกดลิก ฟลาโวนอยด์ และฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ ฟีนอลิก ไตรเทอร์พีน เทนินิน ซาโปนิน และสเตียรอยด์

2. ผลของตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากลำต้นโคลงเคลงด้วย Folin-Ciocalteu colorimetric method และใช้กรดแกดลิกเป็นสารมาตรฐาน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากลำต้นโคลงเคลงคำนวณจากสมการถดถอยของกราฟมาตรฐาน ($y = 0.0038x + 0.2703$; $R^2 = 0.993$) จาก Table 2 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทานอล แอซีโตน และเอทิลอะซีเตต ในพืชสมุนไพรชนิดเดียวกัน พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดจากสารสกัดแอซีโตนสูงกว่าสารสกัดเอทิลแอซีเตตและสารสกัดเอทานอล สารประกอบฟีนอลหลายชนิดแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้⁶ ดังนั้นฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดในการสกัดแอซีโตนจากลำต้นโคลงเคลง จึงน่าจะเป็นบทบาทของสารประกอบฟีนอล

Table 3. Percentage of extraction yield, TPC, TFC, and IC₅₀ in DPPH radical scavenging activity of *M. malabathricum* stem crude extract obtained by using three different solvents

Extracts	% extraction yield	TPC (mg GAE/g extract)	TFC (mg QE/g extract)	IC ₅₀ (mg/L)
Ethanol	2.83	331±10 ^c	1,793±16 ^a	107
Acetone	3.50	2,421±14 ^a	783±13 ^c	126
Ethyl acetate	0.80	1,805±17 ^b	1,242±11 ^b	2,619

อักษร a, b และ c ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงการเปรียบเทียบค่าระหว่างตัวทำละลายที่แตกต่างกันโดย ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$

ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดส่วนลำต้นของต้นโคลงเคลงด้วย Aluminum chloride colorimetric method และใช้เคอชิตินเป็นสารมาตรฐาน ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากลำต้นโคลงเคลงคำนวณจากสมการถดถอยของกราฟมาตรฐาน ($y = 0.0026x + 0.0188$; $R^2 = 0.999$) แสดงใน Table 2 พบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์อยู่ในช่วง 783–1793 มิลลิกรัมสมมูลของเคอชิตินต่อกรัมสารสกัด โดยปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุดอยู่ในสารสกัดเอทานอล สารฟลาโวนอยด์เป็นสารพฤษเคมีที่มีโครงสร้างเป็นพอลิฟีนอลและอยู่ในพืชหลายชนิด รวมถึงศักยภาพทางการแพทย์โดยมีประโยชน์ทางเภสัชกรรมหลายประการ รวมถึงคุณสมบัติต้านมะเร็ง สารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านไวรัส นอกจากนี้ยังมีผลป้องกันระบบประสาทและป้องกันหัวใจด้วย²¹ ความมีชีวิตของตัวทำละลายให้ค่า TFC และ TPC แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ .05 ดังนั้นข้อของตัวทำละลายแต่ละชนิดมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์เชิงปริมาณ²²

3. ผลของตัวทำละลายต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเอทานอล แอซีโตน และเอทิลแอซีเตต (Table 2) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดลำต้นโคลงเคลงด้วยเอทานอลแสดงฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด คือ 107 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือสารสกัดแอซีโตน และสารสกัดเอทิลแอซีเตต อย่างไรก็ตามสารสกัดเอทานอลจากลำต้นโคลงเคลงมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่ากรดแอสคอร์บิก ($IC_{50} = 38$ มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน ดังนั้นฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดี

ที่สุดในสารสกัดเอทานอลจากลำต้นโคลงเคลงสัมพันธ์กับปริมาณสารฟลาโวนอยด์ เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Sasadara and Wirawan ปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุดปรากฏในสารสกัดจากพืชเมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย²³

อภิปรายผล

โคลงเคลงเป็นพืชสมุนไพร ส่วนต่าง ๆ ของพืชชนิดนี้ได้รับการระบุว่ามีความค่าทางยาจากการมีสารออกฤทธิ์หรือสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ บางครั้งอาจหมายถึงทุกส่วนของพืชทั้งต้นก็ได้²⁴ การค้นพบคุณค่าทางยาของโคลงเคลงมีหลายด้าน ได้แก่ การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส ฤทธิ์ต้านปรสิต ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการรักษาบาดแผล (Wound healing activity) เป็นต้น และมีความสอดคล้องกับการรักษาของหมอยาสมุนไพร (หมอภูมิปัญญา เมฆลย์) ซึ่งอาศัยในเขตพื้นที่อำเภอไชยา จังหวัดสุราษฎร์ธานี ส่วนกิ่งและก้านรวมกันมาต้มเพื่อรักษาโรคเรื้อรังผิวหนัง รากนำมาต้มเป็นยาบำรุงตับ และใบนำมาต้มโปะแผลเป็นหนอง

ในงานวิจัยนี้ ร้อยละการสกัดสูงสุดได้จากสารสกัดแอซีโตน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Do et al.²⁵ ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยเทคนิคทางสเปกโทรโฟโตเมตริก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH แสดงให้เห็นว่า การสกัดสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดียังคงเป็นของตัวทำละลายมีขั้วปานกลางถึงสูง นั่นคือ เอทานอลและแอซีโตน ในสารสกัดเอทานอลจากลำต้นโคลงเคลงมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด และแสดงออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด

ซึ่งอธิบายได้ว่าแอลกอฮอล์เป็นโมเลกุลมีขั้ว จึงสามารถสกัดสารทุติยภูมิที่มีขั้วออกมาได้²⁶ ข้อดีของการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ได้แก่ การเป็นสารกันเสียเมื่อความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 20 และไม่เป็นพิษที่ความเข้มข้นต่ำ รวมถึงการใช้ความร้อนเพียงเล็กน้อยสามารถทำให้สารสกัดเข้มข้นได้²⁷ กรณีของสารสกัดแอซีโตนจากลำต้น โคลงเคลงมีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดและแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีรองลงมาจากเอทานอล ฟลาโวนอยด์ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างเป็นพอลิฟีนอลนั้นมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเช่นกัน และระดับการออกฤทธิ์ มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับโครงสร้างโมเลกุลที่เป็น องค์ประกอบในพืชแต่ละชนิด²⁸ ดังนั้นวิธีการสกัด สารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญอาจจำเป็นต้องใช้ชนิด ของตัวทำละลายและวิธีการสกัดที่เหมาะสม รวมถึงความปลอดภัยในการใช้สารสกัดหลังจาก ระเหยตัวทำละลายออกแล้ว ทุกส่วนของต้น โคลงเคลงไม่ว่าจะเป็นผล ใบ ก้าน ราก และลำต้น งานวิจัยนี้ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถ ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้โดยสามารถสกัด ออกมาได้ดีด้วยการใช้ตัวทำละลายมีขั้วปานกลาง ถึงสูง ดังนั้นการสกัดสารพฤษเคมีต่าง ๆ ด้วยตัว ทำละลายที่มีขั้วต่างกัน และการสกัดอย่างต่อเนื่อง สามารถเป็นวิธีที่ดีในการสกัดสารพฤษเคมี ทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง พืช²⁹ และโคลงเคลงจึงเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่ทุกส่วน มีสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เหมือนพืชอีกหลายชนิด³⁰

สรุปผลการวิจัย

การสกัดลำต้นโคลงเคลงด้วยตัวทำละลาย ที่มีความเป็นขั้วแตกต่างกัน จะให้สารสกัดที่มี ความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้แตกต่างกันด้วย สารสกัดเอทานอลจากลำต้นโคลงเคลงแสดงฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดและสัมพันธ์กับการมี ปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุด ดังนั้นลำต้นโคลงเคลง จึงเป็นแหล่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการต้าน อนุมูลอิสระที่มีศักยภาพในการพัฒนาทางเภสัช กรรมและเครื่องสำอาง ฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชที่ ตรวจพบสามารถแตกต่างกันได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ สภาพแวดล้อมและช่วงเวลาการศึกษา ส่วนวิธีการหา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ เช่น FRAP และ ABTS เป็นต้น อาจนำมาใช้เพิ่มเติม เพื่อหาความสัมพันธ์ กับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ ทั้งหมดของสารสกัดลำต้นโคลงเคลงด้วยตัวทำ ละลายต่างชนิดกัน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี และคณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่งบประมาณ สนับสนุน และให้ออกาสทำงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วง ด้วยดี ขอขอบคุณการให้คำแนะนำเกี่ยวกับการ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของอาจารย์กชกร เพ็งศรี สาขาวิชาเทคโนโลยีดิจิทัล คณะวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี ขอขอบคุณการอำนวยความสะดวกทุก ด้านของคุณรัตติญา มังกรฤทธิ์ คุณณลินี รักเพชร และคุณณัฐพันธ์ สงวนศักดิ์บารมี นักวิทยาศาสตร์ สังกัดศูนย์เครื่องมือกลาง และศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ตลอดจนการทำงาน วิจัยในห้องปฏิบัติการทางเคมี



เอกสารอ้างอิง

1. Clausen G, Renner SS. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: Implications for character evolution. *Am J Bot* 2001;88:486-98.
2. Joffry SM, Yob NJ, Rofiee MS, Affandi MM, Suhaili Z, Othman F, et al. *Melastoma malabathricum* (L.) Smith ethnomedicinal uses, chemical constituents, and pharmacological properties: A Review. *Evid Based Complementary Altern Med* 2012;258434.
3. Wong KM. Studies in Southeast Asian *Melastoma* (Melastomataceae), Morphological variation in *Melastoma malabathricum* and notes on rheophytic taxa and interspecific hybridisation in the genus. *Gard Bull Singapore* 2015;67:387-401.
4. กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สิมานันท์, ปริญญา เกตุกุล, เอกรัฐ ศรีสุข, กาญจนา หิริมเพ็ง, เบญจวรรณ ชิวปรีชา, และคณะ. ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. *ววน* 2560;304-11.
5. ศิริพรรณ สุขช่วง, ชมนาด เกิดคง, ไพโร มัทธวรรตน์, เนตรชนก น้อยสีรุ่ง. ปริมาณแอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอลิก และน้ำตาลของผลโคลงเคลง (*Melastoma malabathricum* L.) จากแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 56 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*; 6-9 กุมภาพันธ์ 2561; มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร: 2561. หน้า 274-81.
6. อาธิเชาะส์ เบ็ญหาวัน, สุนีย์ แวมะ. การศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากต้นโคลงเคลงด้วยเทคนิค HPTLC และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มจร* 2564;6:81-90.
7. Ang SS, Molyde C. การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านเชื้อ *Escherichia coli* จากสารสกัดหยาบใบ และกิ่งจากต้นโคลงเคลง ชะมวง บุนหาสำหรับ และฟิลังกาสา. *ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา*; 2563
8. กองกานดา ชยามฤต. ลักษณะประจำวงศ์พรรณไม้. กรุงเทพมหานคร: ชุมชมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2548.
9. เนตรชนก น้อยสีรุ่ง, ไพโร มัทธวรรตน์. ชีววิทยาของดอกและการพัฒนาการของผลโคลงเคลงสายพันธุ์กลีบดอกสีขาว. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 14; 7-8 ธันวาคม* 2560; มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม. 2560. หน้า 2485-91.
10. ศรีนรัตน์ ฉัตรธีระนันท์, วรางคณา สบายใจ, สิริมาศ นิยมไทย. การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ. *ว วิทย มข* 2556;41:723-30.
11. Trease GE, Evans WC. *Phytochemicals*. In: Evans WC, Evans D, Trease GE,

- editors. Trease and Evans' Pharmacognosy, 15th ed. Edinburgh: WB Saunders; 2002. p. 42-393.
12. Ayoola GA, Coker HAB, Adesegun SA, Adepoju-Bello AA, Obaweya K, Ezennia EC, et al. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for Malaria therapy in southwestern Nigeria. Trop J Pharm Res 2008;7:1019-24.
13. Joshi A, Bhohe M, Saatarkar A. Phytochemical investigation of the roots of *Grewia microcos* Linn. J Chem Pharm Res 2013;5:80-7.
14. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Meth Enzymol 1999;299:152-78.
15. ภาศิริ ม่วงศิริกุล. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดอินทผลัม [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต; 2562.
16. วัชรภรณ์ ประภาสโนบล, พิขีด สุดตา. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแอลคาลอยด์ของสารสกัดลำต้นนกกระลิงแดง. ว วิทย มข 2560;45:531-42.
17. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Sci Technol 1995;28:25-30.
18. Abubakar AR, Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. J Pharm Bioallied Sci 2020;12:1–10.
19. Zakaria ZA, Raden Mohd Nor RNS, Hanan Kumar G, Abdul Ghani ZDF, Sulaiman MR, Rathna Devi G, et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic properties of *Melastoma malabathricum* leaves aqueous extract in experimental animals. Can J Physiol Pharmacol 2006;84:1291-9.
20. Faravani M. The population biology of Straits Rododendron (*Melastoma Malabathricum* L.) [dissertation]. Kuala Lumpur, Malaysia: University of Malaya; 2009.
21. Ullah A, Munir S, Badshah SL, Khan N, Ghani L, Poulson BG, et al. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. Molecules 2020;25:5243. <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>.
22. Moo-Huchin VM, Canto-Pinto JC, Cuevas-Glory LF, Sauri-Duch E, Pérez-Pacheco E, Betancur-Ancona D. Effect of extraction solvent on the phenolic compounds

- content and antioxidant activity of Ramon nut (*Brosimum alicastrum*). Chem Pap 2019;73:1647–57.
23. Sasadara MMV, Wirawan IGP. Effect of extraction solvent on total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Bulung Sangu (*Gracilaria* sp.) Seaweed. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2021;712:012005.
24. Rungsung W, Ratha KK, Dutta S, Dixit AK, Hazra J. Secondary metabolites of plants in drugs discovery. World J Pharm Res 2015;4:604–13.
25. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. J Food Drug Anal 2014;22: 296-302.
26. Das K, Tiwari RK, Shrivastava DK. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: Current methods and future trends. J Med Plants Res 2010;4:104-11.
27. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and extraction: A review. Int Pharm Sci 2011;1:98–106.
28. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. J Nutr Sci 2016;5:e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
29. Nawaz H, Shad AM, Rehman N, Andaleeb H, Ullah N. Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. Braz J Pharm Sci 2020;56: e17129.
30. Indarti K, Apriani EF, Wibowo AE, Simanjuntak P. Antioxidant activity of ethanolic extract and various fractions from green tea (*Camellia sinensis* L.) Leaves. Pharmacogn J 2019;11:771-6.