

การแยกสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากผลสดุดำดิบ*

Fractionation of phenolic compounds and their antioxidant capacities from
Jatropha curcas Linn. raw fruit.

อิสระวัฒน์ ฤทธนพวงศ์**

เฉลิม เรืองวิริยะชัย**

บทคัดย่อ

สดุดำ (*Jathapha curcas* Linn.) เป็นพืชในวงศ์ *Euphorbiaceae* ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์ได้หลากหลายทั้งทางอุตสาหกรรมและการแพทย์ สดุดำนั้นมีน้ำมันในเมล็ดที่สามารถผลิตน้ำมันดีเซลชีวภาพ และการวิเคราะห์ทางเคมียังแสดงให้เห็นว่าส่วนต่างๆ ของสดุดำยังมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารประเภท สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และสารประกอบอัลคาลอยด์ ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระยับยั้งจุลชีพ ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ และต้านเนื้องอก เป็นต้น ซึ่งวัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาสถานะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากผลสดุดำดิบ โดยการเปรียบเทียบจากปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยเทคนิค Folin- Ciocalteu แล้วคำนวณผลการทดลองเป็นค่า Gallic acid equivalent เทียบกับปริมาณตัวอย่าง จากผลการวิจัย พบว่าสถานะในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากผลสดุดำดิบคือ เมทานอลเข้มข้น 60% (v/v) ที่ pH ≈ 2 อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายอินทรีย์คือ 1:100 ใช้เวลาในการสกัด 45 นาที หลังจากกระดมหตัวทำละลายออกได้สารสกัดหยาบ หลังจากนั้น ทำการแยกส่วนประกอบของส่วนสกัดหยาบที่ได้ด้วยการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง โดยใช้คาร์ทริดจ์ชนิด Hydrophilic lipophilic balance (HLB) เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของแต่ละส่วนประกอบที่แยกได้ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน (F_1) ไดคลอโรมีเทน (F_2) คลอโรฟอร์ม (F_3) เอทิลอะซีเตต (F_4) และเมทานอล (F_5) ตามลำดับด้วยเทคนิค 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ phenanthroline จากผลการทดลองของทั้งสองวิธี พบว่า F_5 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ซึ่งได้ค่า $IC_{50} = 0.04 \pm 0.02$ ไมโครกรัมของสารสกัด และ 207.53 ± 2.58 ไมโครโมลของเหล็กต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ

* บทความนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทฉบับที่ เรื่อง การศึกษาสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากผลสดุดำดิบ โดยได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาภายใต้คณบดีวิจัยนํ้ามันเชื้อเพลิงชีวภาพ โดยมี รองศาสตราจารย์ ดร. เฉลิม เรืองวิริยะชัย อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา

** นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: i.l.pongsaton@gmail.com และ รองศาสตราจารย์ ดร.เฉลิม เรืองวิริยะชัย อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail: chal_ru@kku.ac.th

Abstract

Jatropha curcas Linn. is a multipurpose plant in the *Euphorbiaceae* family, with several industrial and medicinal applications. *J. curcas* has been considered a potential source of seed oil for the production of biofuel. The phytochemical analyses have shown that different parts of *J. curcas* plant contain phenolic, flavonoid, saponin and alkaloid compounds due to their therapeutic potential as antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and anticancer activities. The objective of this study was to optimized conditions for phenolic extraction from *J. curcas* Linn. raw fruit. The total phenolic contents in the extracts was determined spectrometric method according to the Folin-Ciocalteu procedure and calculated as Gallic acid equivalents (GAE). Methanol 60% (v/v) at pH $\approx$ 2 solid-to-solvent ratio with 1:100 and extraction time for 45 min were the optimum conditions for extraction of phenolic compounds. Under optimum conditions, the crude extract obtained was fractionated using a hydrophilic lipophilic balanced (HLB) cartridge and then eluted with different solvents in the order of hexane (F_1), dichloromethane (F_2), chloroform (F_3), ethyl acetate (F_3) and methanol (F_5), respectively. Then, antioxidant activity of the crude extract under optimum conditions and its fractions were determined by phenanthroline (Phen) method and 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging method. The result show F_5 have highest antioxidant activity compare by value of DPPH and Phen method with $IC_{50} = 0.04 \pm 0.02$ μ g of extract and 207.53 ± 2.58 μ mol Fe/g of extract, respectively.

บทนำ

สบู่ดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* Linn. อยู่ในวงศ์ *Euphorbiaceae* เช่นเดียวกับยางพารา สบู่แดง หรือสบู่เลือด ปัตตาเวีย หนุมานนั่งแท่น โป๊ยเซียน ละหุ่ง มันสำปะหลัง เป็นต้น สบู่ดำเป็นพืชที่ชาวบ้านในชนบทปลูกไว้ตามหัวไร่ปลายนาหรือปลูกเป็นรั้ว เพื่อป้องกันสัตว์เลื้อยไม่ให้เข้าไปทำลายพืชผลในแปลง เนื่องจากในลำต้น ใบและเมล็ดนั้น มีสารไฮโดรไซยานิก (hydrocyanic) ซึ่งมีกลิ่นเหม็นเขียว สัตว์เลื้อยไม่ชอบกัดกิน (ระพีพันธุ์ ภาสบุตร และ สันต์ สุทธิผลไพบุลย์, 2543) ปัจจุบัน สบู่ดำกำลังเป็นพืชน้ำมันอีกชนิดหนึ่งที่มีความสนใจอย่างแพร่หลาย ซึ่งน้ำมันที่ได้จากเมล็ด สบู่ดำสามารถนำมาทำเป็นไบโอดีเซลโดยใช้กับเครื่องยนต์รอบต่ำได้ทันที โดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ใดๆ (Pramanik, 2003) ในการวิจัยทางเคมีได้มีการรายงานว่า ในส่วนต่างๆของสบู่ดำมีสารเคมีที่เป็นประโยชน์หลายประเภท เช่น ฟีนอลิก (Phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซาโปนิน (Saponins) และสารประกอบอัลคาลอยด์ (Alkaloids) ซึ่งสารทั้งหมดนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจได้แก่

ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งจุลชีพ ด้านการผื่นคัน ด้านการเกิดมะเร็ง และด้านการเกิดเนื้องอก เป็นต้น (Oskoueian และคณะ, 2011)

ในช่วงสิบปีที่ผ่านมา มนุษย์มีความใส่ใจในเรื่องสุขภาพมากยิ่งขึ้น ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเสริมสุขภาพที่ดีต่อร่างกาย จึงได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะงานวิจัยเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระ(Free radical) คือ โมเลกุลที่ไม่เสถียรและมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีในลักษณะปฏิกิริยาลูกโซ่ สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่ส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ ไม่ว่าจะเป็นการทำลายโครงสร้าง DNA การเปลี่ยนสภาพโปรตีนหรือไขมันเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติ หรือสร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีนหรือเอนไซม์เหล่านั้นผิดปกติ (Ames และคณะ, 1993) เป็นสาเหตุสำคัญให้เกิดโรคต่างๆหลายชนิด เช่น มะเร็ง เนื้องอก ความแก่ชราก่อนวัย ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ก่อให้เกิดการอักเสบ การทำลายเนื้อเยื่อ เกิดต่อกระดูกในผู้สูงอายุ และเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น (Gillman และคณะ, 1995; Valko และคณะ, 2007 และ Block และคณะ, 1992) อนุมูลอิสระมีแหล่งที่มาทั้งจากภายนอกและภายในร่างกาย ซึ่งแหล่งภายนอกนั้นเกิดจาก มลพิษทางอากาศ ควันบุหรี่ แสงแดด รังสีแกมมา คลื่นความร้อน โอโซน และอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวหรือธาตุเหล็กในปริมาณสูงกว่าปกติ เป็นต้น (Scott และคณะ, 2005) และการเกิดจากภายในร่างกาย ได้แก่ การเกิดเมตาบอลิซึมของออกซิเจนภายในเซลล์หรือกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว สามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระภายในร่างกายทั้งสิ้น (Bagchi และคณะ, 1998)

ดังนั้น สารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, 2009) โดยมีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (Scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับกับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ (Sies, 1992) โดยทั่วไป สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และสารประกอบไนโตรเจน เป็นต้น (Veliloglu และคณะ, 1998) โดยสามารถแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิด ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidant) เช่น Butylated hydroxyl anisole (BHA) และ Butylated hydroxyl toluene (BHT) เป็นต้น ซึ่งนิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนไป เป็นต้น ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidant) เช่น วิตามินซี และวิตามินอี เป็นต้น ซึ่งสารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากเชื่อว่า มีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากสารสังเคราะห์ (Pokorny และคณะ, 2001 และ Yim และคณะ, 2013)

ส่วนต่างของสบู่นำมาสามารถใช้ประโยชน์ได้แทบทั้งหมด มีการนำมาใช้ในภูมิปัญญาชาวบ้านมาช้านาน เช่น รากใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ ดอกใช้เลี้ยงผึ้งเพื่อผลิตน้ำผึ้ง ลำต้นนำมาต้มน้ำให้เด็กกิน แก้ซาง ตาลขโมย และใบสามารถมานึ่งรับประทานได้ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยนำส่วนต่าง ๆ ของ

สบู่ดำมาใช้ประโยชน์ยังมีอีกแพร่หลาย เช่นงานวิจัยของจรูญญา งามขำ และคณะ (2009) ที่ได้ศึกษาสารสกัดจากรากสบู่ดำในการยับยั้งการเกิดมะเร็งเต้านม ซึ่งผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดจากรากสบู่ดำสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ Oskoueian และคณะ (2011) ได้นำ ใบ เปลือกลำต้น ราก และยางของสบู่ดำมาสกัดด้วยเมทานอลและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านผื่นคัน และสารต้านมะเร็ง จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากใบและยางสบู่ดำมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งได้ทดสอบด้วยวิธี DPPH และยังศึกษารากและยางของสบู่ดำที่สามารถใช้เป็นสารต้านการผื่นคัน นอกจากนั้น รากยังมีความสามารถในการเป็นสารต้านมะเร็ง และในปีเดียวกัน Oskoueian และคณะ ยังได้ศึกษาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านจุลชีพ และสารต้านมะเร็งจากเนื้อของเมล็ดสบู่ดำ โดยการสกัดด้วยเมทานอล จากผลวิจัยแสดงให้เห็นว่า สารที่สกัดได้มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งจุลชีพ สารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านการก่อมะเร็งได้ โดยวิเคราะห์ห่อองค์ประกอบทางเคมีได้ด้วยเครื่อง GC-MS นอกจากนั้นส่วนต่างๆ ของสบู่ดำยังมีประโยชน์ในทางการแพทย์ที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงการสรุปในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนต่างๆของสบู่ดำที่ใช้ในทางการแพทย์ (Pandey และคณะ, 2012)

no.	Usable plant parts	Diseases curing
1	Seeds	To treat gout, arthritis and jaundice, wound-healing, fractures, burns, purge
2	Seed oil	Eczema, skin diseases, soothe rheumatic pain, purgative action
3	Stem	Toothache, gum inflammation, gum bleeding, pyorrhoea
4	Stem bark	Infectious diseases, including sexually transmitted diseases
5	Plant sap	Dermatomucosal diseases
6	Water extract of branches	HIV, tumors
7	Plant extract	Wound healing, allergies, burns, cuts and wounds, inflammation, leprosy
8	Leaves and latex	Refractory ulcers, septic gums, styptic in cuts and bruises
9	Latex	Reduced the clotting time of human blood, sore mouth, oral thrush, fish barb wounds, snake-bites, infected sores, treating newborns' umbilical cords, coughs, mouth and throat sores
10	Root powder	In the treatment of inflammation
11	Leaf	Scabies, Eczema, Syphilis, blood cleansing, headache, flu, cough, congestion, evil eye, cleansing house
12	Fruit	Stroke, toothache, numbness after bug sting, to clean mother's and baby blood during the pregnancy

ในปี ค.ศ.2012 Thongpoothorn และคณะ ได้ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพและสารประกอบเคมีในน้ำมันสบู่นำมาจากการสกัดด้วยเมทานอล แล้วแยกส่วนประกอบของสารที่สกัดได้ด้วยวิธีการของแข็งชนิด Hydrophilic lipophilic balance (HLB cartridge) โดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นขั้วต่างกัน และได้ทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านจุลชีพ พร้อมทั้งสามารถระบุเอกลักษณ์ของสารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค GC-MS โดยผลของการวิจัย พบว่าสารสกัดจากน้ำมันสบู่นำมาที่มีฤทธิ์ในการเป็นสารยับยั้งจุลชีพ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากผลสบู่นำมาดิบ ว่า ในขณะที่ต้นสบู่นำมาที่กำลังเจริญเติบโตได้ผลดีสืบเนื่องนั้น จะมีการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระออกมาหรือไม่ ก่อนจะไปเปลี่ยนไปเป็นผลสบู่นำมาสุก ที่มีสีเหลืองและสีน้ำตาล ตามลำดับ โดยศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในแต่ละส่วนประกอบที่ได้ หลังจากการสกัดด้วยวิธีการของแข็ง โดยใช้คาร์ทริดจ์ชนิด HLB ด้วยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และวิธี Phenanthroline (Phen)

วิธีการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น 8453 บริษัท Agilent จำกัด จากประเทศเยอรมัน ส่วนคาร์ทริดจ์ชนิด HLB ขนาด 6 มิลลิกรัม หรือ 500 มิลลิกรัม ซื้อจากบริษัท Waters จำกัด จากประเทศไอร์แลนด์ สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทั้งหมดเป็น Analytical grade (AR grade) ได้แก่ 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) กรดแกลลิก และ 1,10-phenanthroline เป็นของบริษัท Sigma-Aldrich จำกัด จากประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ส่วน 2, 6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) บริษัท Acros Organic จำกัด จากประเทศสหรัฐอเมริกา และเมทานอล เอทานอล อะซีโตน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตต โซเดียมคาร์บอเนต เพอร์ริกคลอไรด์ รวมทั้ง Folin-Ciocalteu's reagent ของบริษัท Carlo Erba จำกัด จากประเทศอิตาลี สำหรับตัวอย่างผลสบู่นำมาดิบที่มีอายุหลังการเกิดดอกแล้ว 60-90 วัน ได้รับความอนุเคราะห์มาจากศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น ต.บ้านเป็ด อ.เมือง จ.ขอนแก่น

2. การเตรียมตัวอย่างผลสบู่นำมาดิบ

นำผลสบู่นำมาดิบที่เก็บได้มาหั่นให้มีขนาด 1-2 เซนติเมตรแล้ว อบด้วยเตาอบ (บริษัท Thermo Fisher Scientific จากสหราชอาณาจักร) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดจนละเอียดโดยผ่านตะแกรงร่อนขนาด 35 เมช (500 ไมโครเมตร) และเก็บตัวอย่างไว้ในโถสุญญากาศ

3. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากผลสบู่นำมาดิบ

สำหรับการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกนั้น ผู้วิจัยได้ศึกษาตัวแปรจากการกำหนดชนิดหรือปริมาณของตัวแปรดังแสดงในตารางที่ 2 โดยได้กำหนดอัตราเร็วในการเขย่าคงที่ไว้ที่ 150 รอบต่อนาที และสกัดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman, No. 1)

ต่อจากนั้นนำไปประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (รุ่น R200 บริษัท BUCHI จำกัด จากประเทศสวิตเซอร์แลนด์) ที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส จนสุดท้ายได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) เก็บไว้ในขวดสีชา โดยรักษาสภาพไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่อไปด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในแต่ละตัวแปรที่เหมาะสมในการศึกษา ตามตารางที่ 2 ตามลำดับ

4. การศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu นั้นได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Chan และคณะ (2009) ก่อนที่ทำการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต้องทำการเจือจางสารสกัดหยาบที่ได้ลงให้เหมาะสมด้วยเมทานอล จากนั้นปิเปตสารละลายที่เจือจางแล้วปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดปริมาตร 15 มิลลิลิตร เติม Folin-Ciocalteu's reagent เข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเติมโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 7.5% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผสมที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร สำหรับการรายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดนั้น ได้คำนวณเปรียบเทียบค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ในช่วงความเข้มข้น 50-250 ppm เพื่อรายงานค่าในหน่วย Gallic acid equivalents ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้งหนัก 1 กรัม (GAE/g dry sample) และทำการทดลองซ้ำ อีก 2 ครั้ง

ตารางที่ 2 ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากตัวอย่างสบู่ดำ

ที่	ตัวแปรที่ศึกษา	ชนิด/ช่วงที่ศึกษา
1	ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์	เมทานอล เอทานอล อะซิโตน
2	ความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ (% v/v)	40, 60, 80, 100
3	pH ของตัวทำละลายอินทรีย์	2, 3, 4, 5, 6
4	อัตราส่วนของตัวอย่างแห้งต่อตัวทำละลายอินทรีย์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)	1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:100, 1:200
5	เวลาในการสกัด (นาที)	15, 30, 45, 60, 75

5. การสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวัฏภาคของแข็ง

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากตัวอย่างสบู่ดำที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดแล้ว จากนั้น ได้แยกส่วนประกอบต่างๆ ของสารสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง โดยใช้คาร์ทีดจ์ชนิด HLB ซึ่งการแยกสารสกัดนั้นได้พิจารณาจากการเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกัน โดยพิจารณาจากที่มีขั้วต่ำสุดไปยังที่มีขั้วมากขึ้น ตามที่ได้ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Thongpoothorn และคณะ (2012) ดังนี้ เฮกเซน (Hexane) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) และ เมทานอล

(Methanol) ตามลำดับ โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในการสกัด จากนั้นระเหยสารที่แยกได้จนแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส ซึ่งสารที่สกัดแยกตามความเป็นขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ จะเรียกว่า สารสกัดแยก (Fractionation extracts) โดยจะได้ F₁, F₂, F₃, F₄, และ F₅ โดยสกัดด้วย Hexane Dichloromethane Chloroform Ethyl acetate และ Methanol ตามลำดับ แล้วทำให้เป็นสารละลายอีกครั้งด้วยเมทานอลให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา และรักษาสภาพในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของส่วนประกอบต่างๆที่แยกได้ด้วยวิธี DPPH และ Phen ต่อไป

6. การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ได้ศึกษาจากสารสกัดแยก F₁, F₂, F₃, F₄, และ F₅ ที่ได้จากเทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง และสารสกัดหยาบ เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้ 2 วิธี ดังนี้

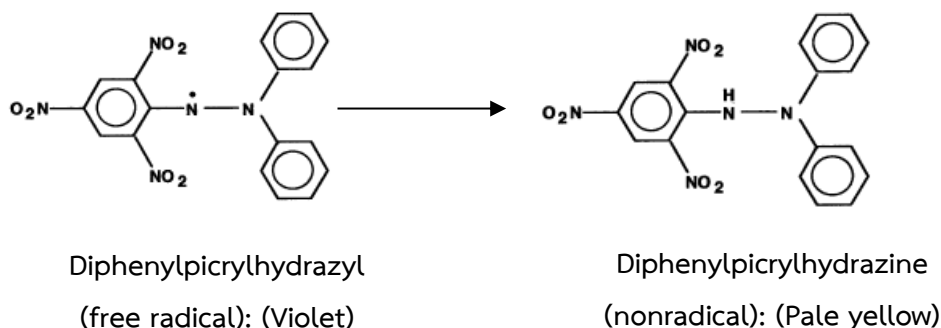
6.1 วิธี DPPH

การหาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยา ดังรูปที่ 1 โดยได้ดัดแปลงจากวิธีของ Zhou และคณะ (2009) ก่อนการหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจำเป็นต้องเจือจางสารสกัดทั้งหมดที่ได้ให้เหมาะสม โดยปิเปตสารละลายที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 1 μ M ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ลงไป เขย่าและเก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผสมที่เกิดขึ้น ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (สีม่วง) และทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง หลังจากนั้นได้คำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ จากสมการข้างล่าง ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{100(A_c - A_s)}{A_c}$$

โดย A_s = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

A_c = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม



รูปที่ 1 การเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ DPPH แสดงให้เห็นสีม่วงและเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองเมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ

6.2 วิธี Phen

การหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Phen โดยได้ดัดแปลงวิธีของ Szydtowska-Czeriak และคณะ (2008) โดยปีเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ลงในขวด ปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม เฟอร์ริก คลอไรด์ เข้มข้น 0.2% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม 1, 10-Phenanthroline เข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป จากนั้นปรับปริมาตรสารผสมให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล เขย่าและเก็บสารผสมไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงของ สารผสมที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (สีแดงส้ม) และทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง สำหรับการรายงาน ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระนั้นได้คำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัส ซัลเฟต ในช่วงความ เข้มข้น 10-100 μM

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

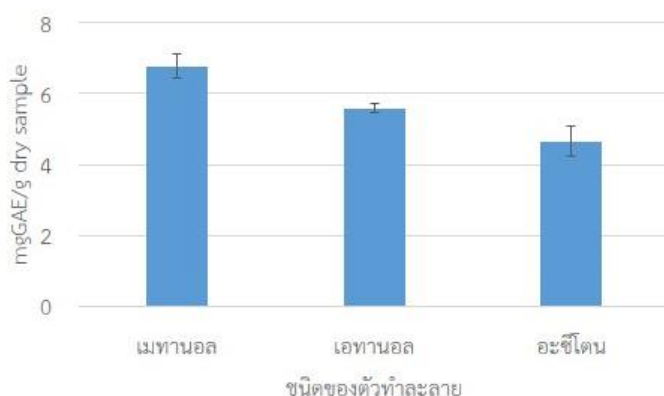
ในแต่ละการทดลองได้ทำการศึกษารวม 3 ครั้ง และข้อมูลที่ได้จากการทดลองนั้นได้นำมา วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS version 18 ในการวิเคราะห์ (ทิพย์สุตา จันทรแจ่มหล้า, 2556)

ผลการวิจัยและอภิปราย

1. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากผลสับุดำดิบ

1.1 ผลของชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์

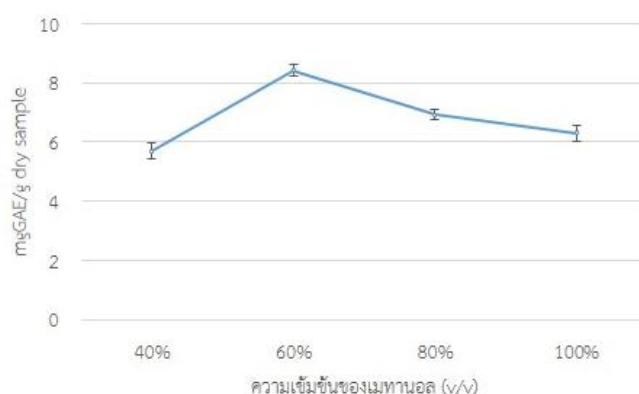
การเลือกตัวทำละลายในการสกัด พบว่า ตัวแปรนี้เป็นตัวแปรที่สำคัญสำหรับการ ศึกษาวิจัยอย่างมาก เพราะสามารถเป็นตัวกำหนดปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จาก สับุดำ ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ที่เลือกพิจารณา 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และอะซิโตน ซึ่งตัวทำ ละลายทั้ง 3 ชนิด ได้มีงานวิจัยที่นิยมใช้มากที่สุดในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากตัวอย่างทาง พฤกษศาสตร์ (มยุรี สมบูรณ์, 2553; Hayouni และคณะ, 2007; Pinelo และคณะ, 2005 และ Mazandarani และคณะ, 2012) โดยจากรูปที่ 2 นั้นเป็นการแสดงผลการทดลองการสกัดโดยใช้ตัวทำ ละลายอินทรีย์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ซ้ำตัวอย่างแห้งหนัก 1 กรัม และใช้เวลาในการสกัด 45 นาที พบว่า เมทานอลสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้มากที่สุด (6.77 ± 0.34 mg GAE/g dry sample) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้เมทานอลในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งสอดคล้องกับผลวิจัยของ Oskoueian และคณะ (2011) ที่ได้ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกจากยาง ใบ และกิ่งของสับุดำ



รูปที่ 2 การเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

1.2 ผลของความเข้มข้นของของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เลือกใช้

ผลของความเข้มข้นของตัวทำละลายในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากผลสุบุดำดิบ แสดงใน รูปที่ 3 นั้น ได้ใช้เมทานอลที่ความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยการสกัดที่ปริมาตร 25 มิลลิลิตรโดยใช้ตัวอย่างแห้งหนัก 1 กรัม และเวลาในการสกัด 45 นาที พบว่า เมทานอลที่ความเข้มข้น 60% (v/v) ให้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด (8.41 ± 0.20 mg GAE/g dry sample) จึงได้เลือกเมทานอลที่ความเข้มข้น 60% (v/v) เพื่อใช้สกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากผลสุบุดำดิบ

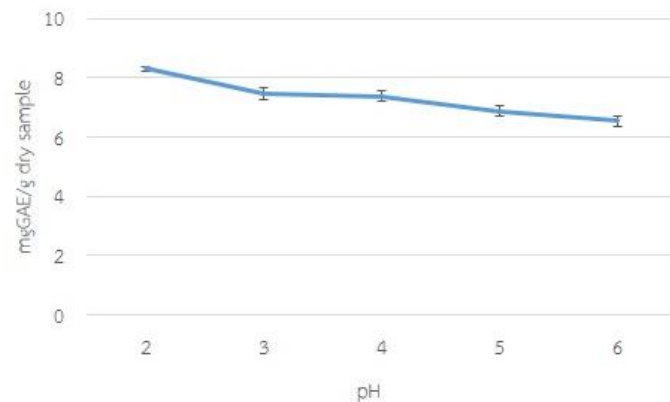


รูปที่ 3 การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยเมทานอลที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

1.3 ผลของ pH ของตัวทำละลายอินทรีย์

การปรับ pH ของตัวทำละลายอินทรีย์มีผลให้การสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีปริมาณสูงขึ้นนั้น การศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้กรดไฮโดรคลอริกเจือจางในการปรับเพื่อให้ตัวทำละลายมีความเป็นกรด เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์ค่อนข้างเป็นกรด ผลของ pH ตัวทำละลายในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากผลสุบุดำดิบ สามารถแสดงดังรูปที่ 4 โดยได้ใช้เมทานอล เข้มข้น 60% (v/v) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใช้ตัวอย่างแห้งหนัก 1 กรัม และเวลาในการสกัด 45 นาที พบว่า ที่ $\text{pH} \approx 2$ ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด ซึ่งความเป็นกรดจะช่วยสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ใน

ผลสับดูตัวอย่างได้ดี ดังนั้นจึงเลือกใช้เมทานอล เข้มข้น 60% (v/v) ที่ pH ≈ 2 เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกในงานวิจัยครั้งนี้



รูปที่ 4 การเปรียบเทียบ pH ของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อการสกัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

1.4 ผลของอัตราส่วนของตัวอย่างแห้งต่อตัวทำละลายอินทรีย์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลายอินทรีย์เป็นอีกตัวแปรที่สำคัญ ที่ผู้วิจัยจำเป็นต้องศึกษา เนื่องจากอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่สูง พบว่า เป็นการสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้มากขึ้น ผลลัพธ์เหล่านี้มีความสอดคล้องกับหลักการโอนมวลที่เป็นแรงผลักดันสำหรับการถ่ายโอนมวลมากขึ้นเมื่ออัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายอินทรีย์มากขึ้น (Tan และคณะ, 2011) ดังนั้นอัตราส่วนของตัวอย่างแห้งต่อตัวทำละลายอินทรีย์สูง สามารถส่งเสริมให้การสกัดมีความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของอัตราการผลิตแพร่กระจายมากขึ้น (Al-Farsi และ Chang, 2007)

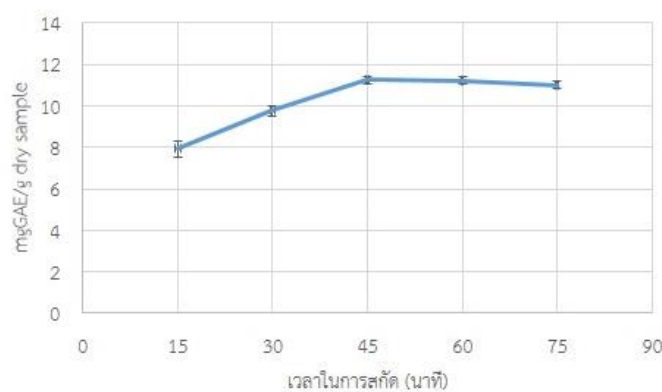
ตารางที่ 3 ผลของอัตราส่วนตัวอย่างแห้งต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

อัตราส่วนตัวอย่างแห้งต่อตัวทำละลายอินทรีย์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g dry sample)
1:10	1.956±0.03
1:20	4.372±0.10
1:30	6.496±0.21
1:40	7.960±0.21
1:50	9.532±0.24
1:100	11.278±0.25
1:200	11.188±0.43

ดังนั้นผลของอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายอินทรีย์ ที่ใช้เมทานอล เข้มข้น 60% (v/v) ที่ $\text{pH} \approx 2$ และใช้เวลาในการสกัด 45 นาที พบว่า ที่อัตราส่วน 1:100 ได้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมาก ใกล้เคียงกับการศึกษาที่อัตราส่วน 1:200 (ดังตารางที่ 3) จึงได้เลือกที่อัตราส่วน 1:100 ในการศึกษานี้ เนื่องจากเป็นการลดปริมาตรของเมทานอลและง่ายต่อการระเหยสารที่สกัดได้ ซึ่งสารที่สกัดได้มีความเข้มข้นต่ำลง เมื่อใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายสูงขึ้น (Ho และคณะ, 2008)

1.5 ผลของเวลาต่อการสกัด

Lapornik และคณะ (2005) ได้กล่าวไว้ว่า เวลาในการสกัดเป็นอีกหนึ่งตัวแปรหลักสำคัญ ไม่ว่าจะใช้เวลาสั้นเพียงไม่กี่นาทีหรือนานเป็นวันก็ตาม และจากการศึกษาในครั้งนี้ (รูปที่ 5) พบว่าการสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่ใช้ตัวอย่างหนัก 0.25 กรัม สกัดด้วยเมทานอล เข้มข้น 60% (v/v) ที่ $\text{pH} 2$ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พบว่า ที่เวลา 15-45 นาที มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ และในเวลา 45-75 นาที ได้ผลการทดลองค่อนข้างใกล้เคียงกัน ดังนั้น เพื่อเป็นการลดเวลาในการสกัดลง จึงได้เลือกใช้เวลาที่ 45 นาที ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Silva และคณะ (2007) ที่กล่าวว่า ถ้าเวลาในการสกัดมากเกินไปไม่ได้ช่วยให้สกัดสารฟีนอลิกได้มากขึ้น และยังอธิบายด้วยกฎการแพร่ข้อที่ 2 ของฟิค (Fick's second law) ที่ว่า เมื่อถึงความเข้มข้นที่สมดุลสุดท้ายระหว่างของแข็งและของเหลว ก็จะเป็นการแพร่ที่สมบูรณ์ นอกจากนั้นการใช้เวลาในการสกัดที่นาน อาจเกิดการออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก อันเนื่องมาจากแสงและออกซิเจนอีกด้วย (Chan และคณะ, 2009)



รูปที่ 5 เวลาที่แตกต่างกันที่ใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากผลสับุดำดิบ

ดังนั้น จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากผลสับุดำดิบจากผลการทดลองทั้งหมดในครั้งนี้ สามารถกล่าวสรุปดังนี้ ได้ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ความเข้มข้น 60% (v/v) ที่ $\text{pH} 2$ โดยใช้อัตราส่วนของน้ำหนักตัวอย่างต่อเมทานอล ที่ 1:100 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และใช้เวลาในการสกัด 45 นาที

2. ผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

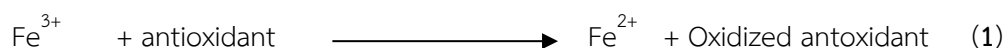
งานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธี DPPH และ Phen ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของผลสุบุดำดิบ เนื่องจากทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น และใช้สารปริมาณน้อยในการวิเคราะห์ (Mishra et al., 2012)

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH นั้น เป็นวิธีที่นิยมอย่างแพร่หลาย โดยมีหลักการง่ายๆดังนี้ สารละลาย DPPH ที่เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร (มีสีม่วง) เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ถูกรีดิวซ์ด้วยโปรตอนจากสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้ ทำให้มีสีเข้มลง (เป็นสีเหลือง) ซึ่งบ่งบอกถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ (Abdel-Hameed, 2009 และ Ramli และคณะ, 2008) โดยฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจะแสดงค่าออกมาเป็นค่า IC_{50} กล่าวคือ จะเป็นปริมาณที่จำเป็นของสารสกัดที่ทำให้เกิดการลดลงของความเข้มข้น DPPH ที่ความเข้มข้น 50% (Erkan และคณะ, 2008) ผลของการศึกษาในครั้งนี้สามารถแสดงได้ใน ตารางที่ 4 ซึ่งพบว่า เมทานอลมีค่า $IC_{50} = 0.04 \pm 0.02$ ไมโครกรัมของสารสกัด ซึ่งหมายถึงมีการยับยั้งอนุมูลอิสระของ DPPH ได้ดีที่สุด แสดงว่า เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่นๆที่ได้แยกออกมาอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thongpoothorn และคณะ (2012) ซึ่งสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากน้ำมันสบู่ดำ ซึ่งสารสกัดในจากเมทานอลแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด แสดงให้เห็นว่า สารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่ค่อนข้างมีความเป็นขี้สูง

ตารางที่ 4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดต่างๆ ด้วยวิธี DPPH และ Phen

ตัวอย่างสารสกัด	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ	
	วิธี DPPH (IC_{50} , mg of extract)	วิธี Phen (μg Fe/ g of extract)
Crude extract	0.06 ± 0.04	179.46 ± 6.26
F ₁	15.40 ± 2.06	1.34 ± 0.21
F ₂	7.40 ± 1.56	9.50 ± 1.25
F ₃	1.06 ± 0.41	33.95 ± 4.02
F ₄	4.90 ± 1.13	50.68 ± 3.42
F ₅	0.04 ± 0.02	207.53 ± 2.58

ส่วนวิธี Phen นั้น การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระวัดได้อาศัยการเปรียบเทียบความสามารถในการรีดิวซ์โลหะได้ โดยอาศัยการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) ด้วยสารสกัดที่ได้จากสบู่ดำ ให้ไปเป็นเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) แล้วทำปฏิกิริยากับ 1-10-phenanthroline เกิดเป็นสารเชิงซ้อนสีแดง ดังแสดงในสมการที่ 1 ซึ่งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนั้นจะแปรผันตามค่าการดูดกลืนแสงที่สามารถแสดงถึงการเป็นตัวรีดิวซ์หรือการต้านอนุมูลอิสระที่ตนเอง (Szydłowska-Czerniak และคณะ, 2008)



จากผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4 พบว่า สารสกัดแยก F_5 นั้น สามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} มีค่าเท่ากับ 207.53 ± 2.58 ไมโครกรัมเหล็กต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดแยกตัวอื่นๆ และสารสกัดหยาบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารต้านอนุมูลอิสระนั้นส่วนใหญ่จะเป็นสารที่ค่อนข้างมีความเป็นขั้วสูง เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนั้น ประกอบไปด้วยหมู่ฟีนอลซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นขั้วสูง และเมื่อเปรียบเทียบผลของการศึกษากับวิธี Phen แล้ว ผลที่ได้จะสอดคล้องกับวิธี DPPH ดังได้กล่าวข้างต้น

สรุป

จากการศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากผลสบู่ดำดิบ เมื่อทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้มากที่สุด โดยใช้เมทานอลเป็นตัวละลายอินทรีย์ ที่มีความเข้มข้น 60% (v/v) ที่ pH ≈ 2 อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างแห้งต่อเมทานอลเท่ากับ 1:100 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และใช้เวลาการสกัดที่เหมาะสมนาน 45 นาที เมื่อนำสารที่สกัดได้จากสภาวะที่เหมาะสมมาแยกด้วยเทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งโดยใช้คาร์ทริดจ์ชนิด HLB แล้วชะด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วต่างกัน แล้วทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมทรี โดยใช้วิธี DPPH และ Phen ซึ่งพบว่า สารสกัดแยก F_5 มีความสามารถในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระของ DPPH โดยพิจารณาเปรียบเทียบจากค่า IC_{50} (0.04 ± 0.02 ไมโครกรัมของสารสกัด) แสดงถึงการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ Crude extract F_3 F_4 F_2 และ F_1 ตามลำดับ ส่วนวิธี Phen นั้นพบว่าสารที่สามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้ดีที่สุดคือ $\text{F}_5 > \text{Crude extract} > \text{F}_4 > \text{F}_3 > \text{F}_2$ และ F_1 ตามลำดับ ซึ่ง

แสดงให้เห็นว่าจากการทดลอง สารสกัดแยก F_5 มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุดและทั้งสองวิธี DPPH และวิธี Phen ให้ผลการทดลองในทิศทางเดียวกัน เพราะฉะนั้นสารสกัดจากผลสุปุดำดิบจึงเป็นอีกทางเลือกในการประยุกต์เพื่อนำไปเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ และยังเป็นการส่งเสริมให้เกษตรกรมีการปลูกสุปุดำเพิ่มมากขึ้นอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาภายใต้คลังเตอร์วิจัยน้ำมันเชื้อเพลิงชีวภาพ ในด้านทุนการศึกษาและทุนวิจัย รวมทั้งศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น ต.บ้านเปิด อ.เมือง จ.ขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างผลสุปุดำดิบ พร้อมทั้งขอบคุณาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและสารเคมีบางตัว

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

จรรย์ญา งามขำ, วารี เนื่องจำนงค์, มติ เจริญกิจการ และ พรทิพา พิชชา. “การประเมินศักยภาพของการสกัดจากรากสุปุดำต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด Apoptosis ในเซลล์มะเร็งเต้านม.” วารสารโรคมะเร็ง 29, 3 (2552); 90-101.

ทิพย์สุดา จันทรแจ่มหล้า. การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS [ออนไลน์]. อ้างเมื่อ 14 มิถุนายน 2556. เข้าถึงได้จาก

<http://suanpalm3.kmutnb.ac.th/teacher/FileDL/tipsuda88255119340.pdf>.

มยุรี สมบูรณ์. “การวิเคราะห์หมักสีน้ำเงินจากปากกาถูกลิ้นด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีและการวิเคราะห์ภาพ.” Veridian E – Journal, Vol. 3, 1 (2553); 262-275.

ระพีพันธุ์ ภาสบุตร และ สุชนันต์ สุทธิผลไพบุลย์. สูปุดำพลังงานทดแทน [ออนไลน์]. อ้างเมื่อ 20 มิถุนายน 2556. เข้าถึงได้จาก <http://www.baanjommyut.com/library/sabu/index.html>.

ภาษาต่างประเทศ

Abdel-Hameed, E.S. “Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples.” Food Chem. no. 114 (2009): 1271 - 1277.

Al-Farsi, M.A. and Chang, Y.L. “Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds.” Food Chem. no. 108 (2007): 977-985.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. “Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging.” Proc. Natl. Acad. Sci. USA no. 90 pp. 7915-7922, Sep. 1993.

Bagchi, K. and Puri, S. “Free radicals and antioxidants in health and disease.” East Mediterr. Health J. no. 4 (1998): 350-360.

Block, G., Patterson, B. and Subar, A. “Fruits vegetables and cancer preventive; a review of the epidemiological evidence.” Nutr. Cancer. no. 18 (1992): 1-29.

- Chan, S.W., Lee, C.Y., Yap, C.F., Wan Alda, W.M. and Ho, C.W. "Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels." Int. Food Res. J. no. 16 (2009): 203-213.
- Erkan, N., Ayranci, G., and Ayranci, E. "Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol." Food Chem. no. 110 (2008): 76-82.
- Gillman, M.W., Cupples, L.A. Gagnon, D., Posner, B.M., Ellison, R.C., Castelli, W.P. and Wolf, P.A. "Protective effect of fruits and vegetables on development of stroke in men." JAMA. no. 273 (1995): 13-17.
- Halliwell, B. "The wandering of a free radical." Free Rad. Biol. Med. no. 46 (2009): 261 - 272.
- Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M. and Hamdi, M. "The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts." Food Chem. no. 105 (2007): 1126-1134.
- Ho, C.H.L., Cacace, J.E. and Mazza, G. "Mass transfer during pressurized low polarity water extraction of lignans from flaxseed meal." J. Food Eng. no. 89 (2008): 64-71.
- Lopornik, B., Prosek, M. and Wondra, A.G. "Comparison of extracts prepared from plant by products using different solvents and extraction time." J. Food Eng. no. 71 (2005): 214-222.
- Mazandarani, M., Zarghami Moghaddam, P., Zolfaghari, M.R., Ghaemi, E.A. and Bayat, H. "Effect of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in *Onosma dichroanthum* Boiss." J. Med. Plants Res. no. 28 (2012): 4481-4488.
- Mishra, K., Ojha, H. and Chaudhury, N.K. "Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results." Food Chem. no. 130 (2012): 1036-1043.
- Oskoueian, E., Abdullah, N., Saad, W.Z., Omar, A.R., Ahmad, S., Kuan, W.B., Zolkifli, N.A., Hendra, R. and Ho, Y.W. "Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Jatropha curcas* Linn." J. Med. Plant Res. no.5 (2011): 49-57.
- Oskoueian, E., Abdullah, N., Ahmad, S., Saad, W.Z., Omar, A.R., and Ho, Y.W. "Bioactive compound and biological activities of *Jatropha curcas* L. kernel meal extract." Int. J. Mol. Sci. no. 12 (2011): 5955-5970.
- Pandey, V.C., Singh, K., Singh, J.S., Kumar, A., Singh, B. and Singh, R.P. "*Jatropha curcas*: A potential biofuel plant for Sustainable environmental development." Renew. Sust. Energy Re. no. 16 (2012): 2870-2883.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J. and Nunez, M.J. "Effect of solvent, temperature, solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extract

- from different component of grape pomace.” J. Agric. Food Chem. no. 53 (2005): 2111-2117.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N and Gordon, M. Antioxidant in Food: practical applications. New York: CRC Press, 2001.
- Pramanik, K. “Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine.” Renew. Energy no. 28(2) (2003): 239-248.
- Ramli, S. Bunrathep, S., Tansaring, T. and Ruangrunsi, N. “Screening for free radical scavenging activity from ethanolic extract of Mimosaceae plants endemic to Thailand.” J. Health Res. no. 22 (2008): 55-59.
- Scott, D.A., Poston, R.N., Wilson, R.F., Coward, P.Y. and Palmer, R.M. “The influence of vitamin C on systemic markers of endothelial and inflammatory cell activation in smokers and non-smokers.” Inflamm. Res. no. 5 (2005): 138-144.
- Silva, E.M., Rogez, H. and Larondelle, Y. “Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology.” Sep. Purif. Technol. no. 55 (2007): 381-387.
- Sies, H., Stahl, W. and Sundquist, A. “Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids.” Ann. N. Y. Acad. Sci. No. 368 (1992): 165-171.
- Tan, P.W., Tan, C.P. and Ho, C.W. “Antioxidant properties: effect of solid-to-solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of Pegaga (*Centella asiatica*).” Int. Food Res. J. No.18 (2011): 553-558.
- Tongpoothorn, W., Chanthai, S., Sriuttha, M., Saosang, K. and Ruangviriyachai, C. “Bioactive properties and chemical constituents of methanolic extract and its fraction from *Jatropha curcas* oil.” Ind. Crop. Prod. no. 36 (2012): 437-444.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. and Telser J. “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.” Int. J. Biochem. Cell Biol. no. 39(1) (2007): 44-84.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B.D. “Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products.” J. Agri. Food Chem. no. 46 (1988): 4113-4117.
- Yim, H.S., Chye, F.Y., Liow, M.L. and Ho, C.W. “Antioxidant potential of *Pleurotus porrigens* extract and application in sunflower oil during accelerated storage.” Chiang Mai J. Sci. no. 40 (2013): 34-48.
- Zhou, S., Fang, Z., Lu, Y., Chen, J., Liu, D. and Ye, X. “Phenolics and antioxidant properties of bayberry (*Myrica rubra* Sieb.et Zucc.) pomace.” Food Chem. no. 122 (2009): 394-399.