

นิพนธ์ต้นฉบับ

**การตรวจคัดกรองปริมาณสารประกอบทางเคมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้ง
การสร้างไนตริกออกไซด์ในสารสกัดอ้อยดำและเตยหอม
สำหรับใช้เป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ**

อริสา ฤทธิธณ¹ ณัฐวดี กันพิพิธ² และ สุธาสนี ทัพพสารพงศ์^{3*}

¹เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³เภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*ผู้รับผิดชอบการติดต่อ E-mail: sutpit1@kku.ac.th

Received date: November 14, 2022; Revised date: November 16, 2022; Accepted date: December 27, 2022

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันได้นำอ้อยดำ (*Saccharum sinense* Roxb.) มาทำเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพโดยมีการผสมกับใบเตย (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) เพื่อช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอมน่ารับประทาน จึงทำการศึกษาข้อมูลทางด้านองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ของสารสกัดอ้อยดำหรือผสมกับใบเตยจากเครื่องดื่มสมุนไพรเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษา คือตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำร้อน ได้แก่ น้ำต้มอ้อยดำใบเตย (BPT) น้ำต้มอ้อยดำ (BT) น้ำต้มใบเตย (PT) และ ตัวอย่างที่สกัดด้วย 50%เอทานอล ได้แก่ สารสกัดอ้อยดำ (BE50) และ สารสกัดใบเตย (PE50) นำมาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารทางพฤกษเคมี หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (TPC) สารประกอบฟลาโวนอยด์ (TFC) แอนโทไซยานิน (TAC) ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ผลการวิจัยพบว่ามีลักษณะลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของสารแต่ละชนิดที่แตกต่างกันแสดงถึงองค์ประกอบของสารสำคัญแตกต่างกัน โดยสารสกัด 50%เอทานอลจะมีปริมาณ TPC TFC และ TAC สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อน นอกจากนี้ยังพบว่า BPT มี TFC และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใกล้เคียงกับ BE50 ส่วนฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ พบว่า PE50 มีค่าสูงที่สุด ถึงแม้ว่าเครื่องดื่มอ้อยดำผสมใบเตยที่ได้จากการต้มในน้ำร้อนหรือในรูปแบบชาซองอาจจะให้สารสำคัญน้อยกว่าการสกัดด้วยเอทานอลแต่ก็ยังมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อยอดและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากอ้อยดำต่อไป

คำสำคัญ: อ้อยดำ, ใบเตย, เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ

Preliminary phytochemical investigation, antioxidation and nitric oxide inhibition of Sugarcane and Toe-hom extracts for healthy drink applications

Arisa Rittiron¹, Nattawadee Kanpipit² and Suthasinee Thapphasaraphong^{3*}

¹Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, Graduate School, Khon Kaen University,

²Biomedical Sciences, Graduate School, Khon Kaen University

³Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Khon Kaen University

*Corresponding Author E-mail: sutpit1@kku.ac.th

Abstract

Now a day, black sugar cane is popular as a healthy drink combined with pandan leaves to provide a good taste drink. Therefore, black sugarcane combined with pandan leaf tea should be studied for phytochemical composition and biological activity compared with ethanolic extracts. Therefore, the extraction by hot water as an herbal tea of black sugarcane mixed pandan leaf tea (BPT), black sugarcane tea (BT) and pandan leaf tea (PT), and the 50% ethanol extraction of black sugarcane extract (BE50) and pandan leaf extract (PE50) were investigated for phytochemicals, total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFC), total anthocyanin (TAC) content, antioxidant activities and nitric oxide (NO) inhibition. The results showed that the different TLC fingerprints were from different chemical compositions in each extract. The ethanolic extracts provided higher TPC TFC and TAC than the herbal tea extracts. Moreover, BPT has TFC and antioxidant activities similar to BE50. For nitric oxide inhibition, the highest %NO inhibition was from PE50. However, the black sugarcane drink mixed with pandan leaves tea (BPT) provided fewer active compounds than ethanolic extracts, but it could show antioxidant activity and NO inhibition that was beneficial to human body. This information was a scientific basis for further study and development of black sugarcane products.

Keywords: Black sugarcane, pandan leaves, healthy drink

บทนำ

อ้อยเป็นพืชล้มลุกขนาดใหญ่ อยู่ในเขตร้อนและกึ่งร้อนที่มีแสงแดดมาก อ้อยมีหลายสายพันธุ์ ส่วนอ้อยที่ใช้ผลิตน้ำตาล คือ ชนิด *Saccharum officinarum* L. พบว่าส่วนต่าง ๆ ของอ้อย มีสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ Flavonoid, Phenolic compound, Saponin, Tannin, Alkaloid, Higher terpenoid, Steroid และ Cyanogenic glycoside⁽¹⁾ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าที่ผิวของลำต้นและใบอ้อยทั่วไปจะมีสารที่เรียกว่า sugar cane wax ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ Long chain saturated fatty alcohols และ Long chain saturated fatty acids ได้แก่ Policosanol ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ⁽²⁾ ส่วนอ้อยที่มีการใช้ในตำรายาแผนไทยคืออ้อยดำ ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Saccharum sinense* Roxb. ชื่ออื่นๆ ที่ใช้เรียกในแต่ละท้องถิ่น คือ อ้อย อ้อยขม อ้อยดำ อ้อยแดง อ้อยตาแดง (ภาคกลาง), กะที้ เกอที้ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), อำโป (เขมร), โกงจั่ว (ม้ง), มี (ลั้วะ), กำเขี้ย (เมี่ยน) และกำเจี้ย ช่งเจี้ย (จีน)⁽³⁾ พบว่า อ้อยดำพบว่ามีสารที่สำคัญอย่างเช่น Flavonoid และ Anthocyanin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม Polyphenol ซึ่งพบในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบ ลำต้น ผิวเปลือก เป็นต้น ในตำรายาไทย มีการนำส่วนของลำต้นอ้อยดำ มาต้มรับประทาน โดยกล่าวว่ามีสรรพคุณหลายประการ ได้แก่ รักษาโรคนี้้อ อาการไอ แก้ไข้คอบแห้ง กระจายน้ำ ส่วนของลำต้น และน้ำอ้อย รสหวานขมชุ่ม แก้ร้อนใน ขับปัสสาวะ ขับเสมหะ แก้หืด ไอ แก้คลื่นไส้อาเจียน แก้ไข้สามประชน แก้ปัสสาวะพิการ แก้ไตพิการ แก้หนองใน ขับนิ่ว แก้ไข้ร้ว แก้ท้องผูก บำรุงกระเพาะอาหาร แก้ขัดเบา บำรุงธาตุ แก้สะอึก แก้เมาค้าง ท้องผูก รักษาฝี บำรุงกำลัง ทำให้เจริญอาหาร รักษาตามีดฟาง กำเดา อาการอ่อนเพลีย แก้วร้อน แก้วพิษตานซาง บำรุงธาตุน้ำ บำรุงกำลัง ขับปัสสาวะ เป็นต้น⁽³⁾

อ้อยดำ สามารถพบปริมาณฟลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานิน โดยพบว่าอ้อยดำนั้นจะมีปริมาณของแอนโทไซยานินมากกว่าอ้อยสายพันธุ์อื่น ๆ เนื่องจากแอนโทไซยานิน นั้นเป็นสารสำคัญที่ให้สีในพืช เช่น สีแดง สีม่วง สีน้ำเงิน โดย มีลำต้นสีม่วงแดงเข้มแสดงให้เห็นถึงปริมาณแอนโทไซยานินที่มีมาก โดยทั่วไปแล้วแอนโทไซยานินพบได้บริเวณลำต้นและผิวเปลือกของลำต้น โดยที่ผิวเปลือกของลำต้นนั้นยังมีรายงานพบสารสำคัญของกลุ่มแอนโทไซยานิน ได้แก่ Petunidin 3-O-6"-succinyl-(rhamnoside และ Cyanidin-3-O-glucoside⁽⁴⁾ ดังนั้นอ้อยดำจึงน่าจะมีสารทางพฤกษเคมีที่มีอยู่มากมายที่สามารถนำไปใช้ในทางด้นยาได้

ในบางพื้นที่ของประเทศไทย ได้นิยมรับประทานน้ำอ้อยดำ ที่มีการเตรียมในรูปแบบเครื่องดื่มโดยมีการผสมกับใบเตย เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอมรับประทาน โดยมีความเชื่อว่าช่วยล้างพิษ ฟอกเลือดบำรุงสุขภาพ บำรุงกำลังหรือช่วยป้องกันโรคต่าง ๆ โดยมีข้อมูลวิธีการเตรียมน้ำอ้อยดำผสมใบเตยเผยแพร่ในแหล่งข้อมูลออนไลน์ต่างๆ มากมายซึ่งยังขาดข้อมูลสนับสนุนทางด้านการวิจัยที่เกี่ยวข้องเช่น การศึกษาองค์ประกอบสารสำคัญในอ้อยดำ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงน่าจะได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อจะได้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับผู้บริโภคต่อไป

ใบเตย หรือ เตยหอม มีชื่อสามัญคือ Pandanus Palm , Fragrant Pandan , Pandanus wangi ชื่ออื่น เตยหอมใหญ่ (Toei-hom-yai) (ภาคกลาง) เตยหอมเล็ก (Toei-hom-lek) ปาแนะวอจิง (Pa-nae-wo-ninging) (มลายู) หวานข้าวไหม้ (เหนือ) ปาแนะออริ่ง (ใต้) ปาแนก้อจี (ไทยมุสลิม) ปานหนัน (นราธิวาส-ปัตตานี) พังลั้ง (จีน) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pandanus amaryllifolius* Roxb. ใบเตยมีสรรพคุณในการขับปัสสาวะ แก้ไข้ร้อนในกระจายน้ำ บำรุงหัวใจ อ่อนเพลีย รักษาโรคผิวหนัง โรคอีสุกใสและหัด ใบเตยมีส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญ ได้แก่ Flavonoids, Glycosides, Alkaloids, Steroids, Terpenoids, Saponins, Tannin, Stigmasterols, Carbohydrate และ Protein รวมถึงวิตามินหลายชนิด ได้แก่ Vitamin C, Vitamin B1, B2 และ B3 จึงทำให้มีฤทธิ์

ต้านออกซิเดชันที่ดี⁽⁵⁾ นอกจากนี้มีการศึกษาสารสกัดด้วยน้ำของใบเตยที่มีผลช่วยลดการเกิดโรคทาง metabolic syndrome เช่น โรคอ้วน ความดันโลหิตสูง น้ำตาลในเลือดสูง โรคหัวใจ เบาหวาน เป็นต้น^(6, 7)

ดังนั้นการนำใบเตยมาผสมในเครื่องดื่มน้ำอ้อยดำนอกจากวัตถุประสงค์เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอมรับประทานได้ง่ายขึ้นแล้วจึงน่าจะเป็นการเสริมฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นอีกด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดนี้และสารสกัดที่จากการผสมของอ้อยดำและใบเตยในรูปแบบที่เป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ โดยมีการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี ของสารสกัดแต่ละประเภท และทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและ ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ที่เป็นกลไกหนึ่งของฤทธิ์ด้านการอักเสบ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาอ้อยดำร่วมกับใบเตยสำหรับเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อตรวจคัดกรององค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่สำคัญของน้ำต้มอ้อยดำผสมใบเตย สารสกัดอ้อยดำ และสารสกัดใบเตย
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำต้มอ้อยดำผสมใบเตย สารสกัดสารสกัดอ้อยดำ และ สารสกัดใบเตย

ระเบียบวิธีศึกษา

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยการตรวจสอบสารทางพฤกษเคมีเบื้องต้น การศึกษาปริมาณสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ น้ำต้มอ้อยดำผสมใบเตย สารสกัดอ้อยดำ และสารสกัดใบเตย โดยมีขั้นตอนการวิจัยและดำเนินงาน ดังนี้

1. เตรียมตัวอย่างพืช

พืชที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ อ้อยดำชนิด *Saccharum sinense* Roxb. จากตำบลบ้านเรือน อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูนและเตยหอมชนิด *Pandanus amaryllifolius* Roxb. จากตำบลศรีโคตร อำเภอจตุรพักตรพิมาน จังหวัดร้อยเอ็ด โดยเลือกเก็บจากส่วนของลำต้นอ้อยดำอย่างเดียวที่มีอายุ 1 ปี ขึ้นไปไม่เกิน 2 ปี ที่มีลักษณะแก่สีลำต้นสีม่วงดำเหมือนกัน และมีขนาดเส้นรอบวงของลำต้นประมาณ 7 - 8 เซนติเมตร ทำการเก็บในช่วงเช้าจากสวนของนายจันทร์ เขียวพันธุ์ และนางพรพรรณ เขียวพันธุ์ ตำบลบ้านเรือน อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2562 ส่วนใบเตยเลือกเก็บจากส่วนของใบที่มีอายุ 1 ปี ขึ้นไปที่มีลักษณะแก่สีเขียวเข้มเหมือนกัน ทำการเก็บในช่วงเช้าจากสวนของนายอร่าม เจริญผิว ตำบลศรีโคตร อำเภอจตุรพักตรพิมาน จังหวัดร้อยเอ็ด ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2562

2. การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง

การเตรียมสารสกัดโดยการต้มในน้ำร้อน จากอ้อยดำ ใบเตยและอ้อยดำผสมใบเตย โดยเตรียมตามวิธีของ นายจันทร์ เขียวพันธุ์ และนางพรพรรณ เขียวพันธุ์ ตำบลบ้านเรือน อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน สำหรับการเตรียมน้ำต้มอ้อยดำ (BT) ใช้อ้อยดำ 7 ข่อ สำหรับน้ำต้มใบเตย (PT) ใช้ ใบเตย 3 ใบ ส่วนน้ำต้มอ้อยดำผสมใบเตย (BPT) ใช้อ้อยดำ 7 ข่อ และใบเตย 3 ใบ ทั้งสามตัวอย่างต้มในน้ำ 2 ลิตร สำหรับน้ำต้มอ้อยดำ ให้ต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในหม้อหุงข้าวไฟฟ้า ส่วนน้ำต้มใบเตย ต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที และ น้ำต้มอ้อยดำผสมใบเตย เตรียม

โดยการต้มอ้อยดำ นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงใส่ใบเตย 3 ใบ จากนั้นต้มต่ออีก 15 นาที ถอดปลั๊กหม้อหุงข้าวออก แล้วทิ้งไว้อีก 15 นาที จนตัวอย่างเย็นลง นำน้ำต้มทั้งสามชนิดกรองด้วยเครื่อง Buchner funnel โดยใช้กระดาษกรอง Whatman No .1 เพื่อให้ได้สารละลายใส นำสารละลายที่กรองได้ไปทำให้แห้งโดยการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งด้วยเครื่อง Freeze dryer เก็บตัวอย่างใส่ภาชนะบรรจุปิดสนิทในตู้เย็น -20°C เพื่อรอทำการทดสอบต่อไป

การเตรียมสารสกัดพืชด้วยตัวทำละลายอินทรีย์⁽⁸⁾ โดยนำลำต้นอ้อยดำ หรือใบเตย มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปตากแดดให้แห้ง ในช่วงเวลา 10:00 – 15:00 น. เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาผึ่งต่ออีก 1 วัน รวมทั้งหมดเป็นเวลา 3 วัน ชั่งตัวอย่างพืชมาอย่างละ 100 กรัม หมักด้วยตัวทำละลาย 50%เอทานอล ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ทำการเขย่าเป็นบางครั้งและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน แล้วแยกส่วนที่เป็นสารละลาย เก็บไว้ นำกากที่เหลือมาสกัดซ้ำด้วยวิธีเดิมรวมทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้ง มารวมกันแล้วกรองด้วยเครื่อง Buchner funnel ผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 เพื่อให้ได้สารละลายใส นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้วสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer เก็บตัวอย่างใส่ภาชนะบรรจุปิดสนิทในตู้เย็น -20°C เพื่อรอทำการทดสอบต่อไป

3. การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น⁽⁹⁾

3.1 สารกลุ่มอัลคาลอยด์ (Alkaloids)

ชั่งสารสกัดมา 20 mg เติม HCl เจือจาง 2 mL แล้วกรอง เตรียมไว้ทั้งหมด 2 หลอด หลอดที่หนึ่งหยดด้วย Mayer's reagent 2 หยด ให้หยดด้านข้างหลอดแก้ว ผลบวก แสดงตะกอนสีขาวหรือสีครีม อีกหลอดหยดด้วย Dragendorff's reagent 1 mL ผลบวก แสดงตะกอนสีเหลืองหรือส้ม

3.2 สารกลุ่มซาโปนิน (Saponins)

ชั่งสารสกัดมา 10 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 mL จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 10 นาที ผลบวก แสดงฟองคงตัวนาน 30 นาที

3.3 สารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates)

Fehling's test : ชั่งสารสกัดมา 5 mg ละลายใน 50%เอทานอล 2 mL ต้มในน้ำเดือดใส่ร่วมกับ Fehling solution A และ Fehling solution B ผลบวก แสดงตะกอนสีแดง

3.4 สารกลุ่มโปรตีน (Proteins)

Ninhydrin test : ชั่งสารสกัดมา 5 mg ละลายในน้ำกลั่น 5 mL กรองสารละลายที่ได้ ตวงสารสกัดมา 2 mL หยด Ninhydrin solution (Ninhydrin 10 mg ในสารละลาย Acetone 200 mL) ผลบวก แสดงสีม่วง

3.5 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

Shinoda's test : ชั่งสารสกัดมา 5 mg ละลายใน 50%เอทานอล 2 mL ใส่ Magnesium ribbon 1 ชิ้น เติม Conc. HCl 2 หยด จะเกิดฟองฟู สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นภายใน 2 - 5 นาที ผลบวก แสดงสีชมพู-แดง, เหลือง, ส้ม

3.6 สารกลุ่มแอนโทไซยานิน (Anthocyanins)

ชั่งสารสกัดมา 5 mg ละลายใน 50%เอทานอล 2 mL เติม 2N HCl และ NH₃ 1 mL ลงไป ผลบวก แสดงสีชมพู-แดงเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน-ม่วง

3.7 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

Ferric chloride test : ชั่งสารสกัดมา 5 mg ละลายใน 50%เอทานอล 2 mL หยด 5%FeCl₃ 2 หยด ผลบวก แสดงสีเขียวมีด

3.8 สารกลุ่มแทนนิน (Tannins)

ชั่งสารสกัดมา 10 mg ละลายในน้ำกลั่น 2 mL กรองสารละลายที่ได้เติม 10%Lead acetate 3 mL ผลบวก แสดงการตกตะกอน

3.9 สารกลุ่มสเตียรอยด์ (Steroids)

Liebermann_Burchard test : ชั่งสารสกัดมา 5 mg ละลายด้วย Chloroform 1 mL เติม acetic anhydride จำนวน 3 หยด จากนั้นเติม Conc.Sulphuric acid 1 หยด ผลบวก แสดงสีน้ำเงิน หรือน้ำเงินเขียว

3.10 สารกลุ่มคาร์ดิอิกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides)

ชั่งสารสกัดมา 5 mg ละลายด้วย Chloroform 1 mL ทำทั้งหมด 3 หลอด แบ่งหลอดทดลองออกเป็น 3 ส่วน เพื่อทดสอบดังต่อไปนี้

Unsaturated lactone ring : ด้วย Kedde' reagent ผลบวก แสดงสีม่วง

Deoxy sugar: ด้วย Keller-Kiliani test โดยเติม Glacial acetic acid ที่มี Ferric chloride ผสมเล็กน้อย จำนวน 1 mL ค่อยๆหยด Conc.Sulphuric acid 1 mL ผลบวก แสดงวงแหวน สีน้ำตาลรอยต่อระหว่างสารสกัดกับ Sulphuric acid

Steroid nucleus: ด้วย Liebermann Burchard test เติม acetic anhydride จำนวน 3 หยด จากนั้นเติม Conc.Sulphuric acid 1 หยด ผลบวก แสดงสีน้ำเงิน หรือน้ำเงินเขียว

4. การตรวจสอบสารสกัดหยาบโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)⁽¹⁰⁾

เตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 50 mg/mL ละลายใน 50%เอทานอล นำสารสกัดตัวอย่างที่เตรียมหยดลงบนแผ่น TLC ชนิด Reverse phase โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่มีส่วนประกอบของ น้ำ : เอทานอล : กรดอะซิติก ในสัดส่วน 4 : 6 : 0.1 โดยปริมาตร จากนั้นนำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 365 nm และ ฟ่นด้วย 10% H₂SO₄ ตรวจสอบค่า R_f ของแถบสารที่ถูกแยกออกมาจากสารตัวอย่าง เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ต่าง ๆ ได้แก่ Rutin Catechin Quercetin Apigenin Chlorogenic acid Coumaric acid และ Ferulic acid ทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีในรูปลายพิมพ์โครมาโตกราฟี (TLC Fingerprint)

5. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method⁽¹¹⁾

เตรียมสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL และสารมาตรฐานGallic acid (5, 10, 20, 50 และ 100 µg/mL) จากนั้นปิเปต 20 µL ใน 96 well plate เติม Folin-Ciocalteu reagent 100 µL จากนั้นเติม Na₂CO₃ 80 µL เขย่าด้วย Vortex ให้เข้ากัน บ่มอุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ด้วย Microplate reader ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ยสร้างกราฟมาตรฐาน Gallic acid และคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากกราฟมาตรฐาน แสดงค่าเป็น mg GAE/g ของสารสกัด

6. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content) โดยวิธี Aluminium trichloride colorimetric method ⁽¹²⁾

เตรียมสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL และสารมาตรฐาน Quercetin (5, 10, 20, 50 และ 100 µg/mL) จากนั้นปิเปต 100 µL ใน 96 well plate เติม 2%w/v AlCl₃ 100 µL เขย่าด้วย Vortex ให้เข้ากัน บ่มอุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วย Microplate reader ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ยแล้วสร้างกราฟมาตรฐาน Quercetin และคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวม แสดงค่าเป็น mg QE/g ของสารสกัด

7. การหาปริมาณแอนโทไซยานิน (Total anthocyanin content) โดยวิธี pH – differential method ⁽¹³⁾

ปิเปตสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL มา 50 µL ผสมกับ 0.025 M KCL buffer, pH 1.0 ปริมาตร 50 µL และปิเปตสารสกัดตัวอย่างมา 50 µL ผสมกับ 0.4 M CH₃COONa buffer, pH 4.5 ปริมาตร 50 µL ลงใน 96-well plate นำสารละลายที่เตรียมไว้ไปเขย่าด้วย Vortex และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm และ 700 nm ภายในเวลา 20 – 50 นาที ด้วย Microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินดังสมการ แล้วคำนวณปริมาณในรูปของ Cyanidin-3-glucoside equivalent (mg C3GE/g ของสารสกัด)

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

กำหนดให้ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเจือจาง

$$Mw = 449.2 \text{ (ใช้ค่ามวลโมเลกุลของ Cyanidin 3-glucoside) g/mol}$$

$$\epsilon = 26,900 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

DF = dilution factor ของสารละลายเจือจาง

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานิน (mg/L)} = \frac{A \times Mw \times \text{dilution factor} \times 10^3}{\epsilon}$$

8. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

8.1 DPPH free Radical Scavenging Activity ⁽¹⁴⁾

เตรียมสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 50, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 µg/mL และ Vitamin C ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 µg/mL จากนั้นปิเปต 50 µL ลงใน 96 well plate แล้วเติม DPPH 150 µL เขย่าด้วย Vortex ให้เข้ากัน บ่มอุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วย Microplate reader ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำไปหาค่าเฉลี่ยสร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่า % DPPH inhibition ดังสมการและ 50% Inhibitory Concentration (IC₅₀)

$$\% \text{DPPH inhibition} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

8.2 ABTS free Radical Scavenging ⁽¹⁵⁾

เตรียมสารละลาย ABTS โดยผสมสารละลาย ABTS 5 mL และ Potassium persulfate (K₂S₂O₈) 5 mL ตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลาย ABTS สีเขียวเข้ม ก่อนใช้นำสารละลาย ABTS

มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:25 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ให้อยู่ในช่วง 0.7 ± 0.02 โดยวันที่ความยาวคลื่น 734 nm

ปิเปตสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 50, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 $\mu\text{g/mL}$ และสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 15, 20 และ 25 $\mu\text{g/mL}$ อย่างละ 50 μL ใส่ใน 96 well plate เติม ABTS 150 μL บ่มอุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วย Microplate reader นำไปหาค่าเฉลี่ยสร้างกราฟมาตรฐานคำนวณหาค่า %ABTS inhibition ดังสมการ และหา IC_{50}

$$\% \text{ABTS inhibition} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

8.3 FRAP assay ⁽¹⁶⁾

เตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสมสารละลาย Acetate buffer (PH 3.6), 10 mM TPTZ และ 20 mM Ferric chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 นาที ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการทดสอบและเก็บในที่มืด ปิเปตสารสกัดตัวอย่าง และสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/mL}$ และ FeSO_4 ที่ความเข้มข้น 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 $\mu\text{M/mL}$ อย่างละ 50 μL ใส่ใน 96 well plate เติม FRAP reagent 150 μL บ่มอุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ด้วย Microplate reader ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ยสร้างกราฟมาตรฐาน FeSO_4 และคำนวณหาค่า FRAP value แสดงค่าเป็น mmole Fe(II) equivalent ต่อกรัมของสารสกัด

9. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ⁽¹⁷⁾

ปิเปตสารสกัดตัวอย่าง และ Trolox ที่ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/mL}$ อย่างละ 50 μL ใส่ใน 96 well plate เติม 10 mM Sodium nitroprusside ที่ละลายใน Phosphate buffer saline, pH 7.4 จำนวน 50 μL ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 150 นาที หลังจากนั้นเติม Griess reagent (ผสม 1% Sulphanilamide ใน 5% Phosphoric acid ปริมาตร 50 μL กับ 0.1%N-(1-naphthyl) ethylenediamine ปริมาตร 50 μL (อัตราส่วน 1:1) จำนวน 100 μL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm ด้วย Microplate reader ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำไปหาค่าเฉลี่ย และคำนวณหาค่า % NO inhibition ดังสมการ

$$\% \text{NO inhibition} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

10.การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาแต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแตกต่าง ของค่าเฉลี่ยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณแอนโทไซยานิน และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ที่ด้วย One - way ANOVA ระดับความเชื่อมั่น 95% หรือ P - value < 0.05 โดยเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Turkey' post hoc test ส่วนการหาความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละกลุ่มโดยใช้ Pearson's correlation

ผลการศึกษา

1. การตรวจสอบคุณภาพลักษณะทางกายภาพและเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัด

จากการทดลองพบว่าสารสกัดตัวอย่างทั้ง 5 ชนิด เมื่อผ่านกระบวนการสกัดและทำให้แห้งโดยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งมีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกัน โดยน้ำต้มอ้อยดำใบเตย (BPT) มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลปนเขียวหม่นให้กลิ่นหอมทั้งอ้อยดำและใบเตย น้ำต้มอ้อยดำ (BT) มีลักษณะเป็นผงสีม่วงปนเทาหม่นให้กลิ่นหอมอ้อยดำ อีกทั้งน้ำต้มใบเตย (PT) มีลักษณะเป็นผงสีเขียวอ่อนอมเหลืองให้กลิ่นหอม สารสกัดอ้อยดำใน 50%เอทานอล (BE50) มีลักษณะของแข็งกึ่งเหนียวสีน้ำตาลเข้มให้กลิ่นอ้อยดำไม่มีกลิ่นหอม และสารสกัดใบเตยใน 50%เอทานอล (PE50) มีลักษณะของแข็งกึ่งเหนียวสีเขียวเข้มออกดำให้กลิ่นใบเตยไม่มีกลิ่นหอม ส่วนค่า pH ที่วัดได้ในสารสกัดทั้ง 5 ตัวอย่าง มีค่า pH ที่ใกล้เคียงกันโดย pH เรียงตามลำดับจากสูงไปต่ำ ของ น้ำต้มใบเตย (PT) สารสกัดอ้อยดำ (BE50) สารสกัดใบเตย (PE50) น้ำต้มอ้อยดำผสมใบเตย (BPT) และ น้ำต้มอ้อยดำ (BT) คือ 6.79, 6.61, 6.51, 6.03 และ 5.89 ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 1 และ ตารางที่ 1

2. ร้อยละผลผลิต (%Yield)

สารสกัดตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่าง เมื่อนำมาคำนวณหาร้อยละผลผลิต (% Yield) พบว่า สารสกัดใบเตยใน 50% เอทานอล , สารสกัดอ้อยดำใน 50% เอทานอล, น้ำต้มอ้อยดำใบเตย, น้ำต้มอ้อยดำ, และน้ำต้มใบเตย ให้ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 18.79, 10.92 5.12, 4.82 และ 2.89 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยสารสกัดที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์จะให้ร้อยละผลผลิตที่มากกว่าสารสกัดที่ได้จากการใช้น้ำร้อน

3. การตรวจสอบสารทางพิษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบสารทางพิษเคมีเบื้องต้น อาศัยการเกิดตะกอนและการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้น โดยทำการตรวจสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ทั้งหมด 10 กลุ่ม ได้แก่ Alkaloids, Saponins, Carbohydrates, Proteins, Flavonoids, Anthocyanins, Phenolic compounds, Tannins, Steroids และ Cardiac glycosides จากการทดลองพบว่า Carbohydrates Flavonoids และTannins พบในทุกสารสกัดตัวอย่าง ขณะที่ Proteins Steroids และCardiac glycosides ไม่พบในทุกสารสกัดตัวอย่าง นอกจากนี้ Saponins และ Anthocyanins พบเฉพาะในน้ำต้มอ้อยดำใบเตย และ น้ำต้มอ้อยดำ ส่วน Phenolic compounds พบได้เกือบทุกตัวอย่างยกเว้น สารสกัดใบเตย โดยมีปริมาณแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 2

4. การตรวจสอบองค์ประกอบสารสกัดโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (TLC)

การตรวจสอบโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (TLC) ของสารสกัดตัวอย่าง ทั้ง 5 ชนิด เมื่อส่องแผ่น TLC ภายใต้รังสียูวีที่ความยาวคลื่น 254 nm, 366 nm และ ฟันทด้วย 10% H_2SO_4 ลักษณะ TLC fingerprint ของสารสกัดตัวอย่างปรากฏแถบของสารหลายชนิดบนแผ่น TLC เมื่อนำมาเทียบกับสารมาตรฐาน สารมาตรฐาน ได้แก่ Rutin (R) , Catechin (C), Quercetin(Q), Apigenin (A) Chlorogenic acid (Ch), Coumaric acid (Co) และ Ferulic acid (F) พบว่าน้ำต้มอ้อยดำใบเตย น้ำต้มอ้อยดำ น้ำต้มใบเตย และสารสกัดอ้อยดำใน 50%เอทานอล มีแถบของสารซึ่งตรงกับสารมาตรฐาน Rutin (มีค่า R_f = 0.50) ซึ่งเห็นได้ชัดในภาพที่ 2 (ก) และ 2 (ค) นอกจากนี้ยังพบแถบของสาร Apigenin (มีค่า R_f = 0.17) ในสารสกัดอ้อยดำใน 50%เอทานอล ซึ่งเห็นได้ชัดในภาพที่ 2 (ก) พบว่าใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน นอกจากนี้ยังพบแถบของสารมาตรฐาน Coumaric acid (มีค่า R_f = 0.56) และ Ferulic acid (มีค่า R_f = 0.54) ปรากฏใน น้ำต้มอ้อยดำใบเตย น้ำต้มใบเตย (R_f = 0.56, 0.54) และสารสกัดอ้อยดำใน 50%เอทานอล (R_f = 0.55, 0.54) ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ชัดในภาพที่ 2 (ก) และ 2 (ค)

5. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content, TPC)

นำสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL มาทดสอบโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric โดยใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากกราฟมาตรฐานของ Gallic acid คือ $Y = 0.0044X + 0.0474$, $R^2 = 0.9983$ และคำนวณปริมาณ TPC ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ Gallic acid ต่อกรัมของสารสกัด (Gallic acid equivalent, mg GAE/g DE) พบว่าสกัดใบเตยใน 50% เอทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุดเท่ากับ 46.29 ± 0.35 mg GAE/g DE รองลงมา คือ สารสกัดอ้อยดำใน 50%เอทานอล (39.72 ± 0.48 mg GAE/g DE) น้ำต้มอ้อยดำใบเตย (33.68 ± 0.81 mg GAE/g DE) น้ำต้มอ้อยดำ (31.92 ± 0.58 mg GAE/g DE) และน้ำต้มใบเตย (26.80 ± 0.48 mg GAE/g DE) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยสารสกัดทุกตัวอย่างมีปริมาณ TPC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

6. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content, TFC)

นำสารสกัดตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL ทำการตรวจสอบโดยวิธี Aluminium trichloride colorimetric method โดยใช้ Quercetin เป็นสารมาตรฐาน และคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากกราฟมาตรฐาน Quercetin คือ $Y = 0.0131X - 0.0077$, $R^2 = 0.9990$ คำนวณปริมาณ TFC ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ Quercetin ต่อกรัมของสารสกัดหยาบ (Quercetin equivalent, mg QE/g DE) พบว่าสารสกัดอ้อยดำใน 50%เอทานอล มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดเท่ากับ 5.83 ± 0.12 mg QE/g DE รองลงมา คือ สารสกัดใบเตยใน 50%เอทานอล (5.73 ± 0.16 mg QE/g DE) โดยน้ำต้มอ้อยดำใบเตย มีปริมาณฟลาโวนอยด์ (5.52 ± 0.04 mg QE/g DE) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ สารสกัดด้วย 50% เอทานอลของอ้อยดำและใบเตย ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า น้ำต้มอ้อยดำใบเตย สารสกัดอ้อยดำใน 50% เอทานอล และ สารสกัดใบเตยใน 50% เอทานอล มีปริมาณ TFC ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสูงกว่าน้ำต้มอ้อยดำและน้ำต้มใบเตย อย่างมีนัยสำคัญ

7. การหาปริมาณแอนโทไซยานิน (Total anthocyanin content, TAC)

การหาปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดตัวอย่าง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL เมื่อใช้วิธี pH – differential method โดยคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินแสดงในรูปของ มิลลิกรัม Cyanidin-3-glucoside equivalent, ของสารสกัด (C3GE/ g DE) พบว่าสารสกัดอ้อยดำใน 50% เอทานอล แสดงปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุดเท่ากับ 0.215 ± 0.02 mg C3GE/ g DE รองลงมา คือ น้ำต้มอ้อยดำใบเตย (0.134 ± 0.03 mg C3GE /g DE) และน้ำต้มอ้อยดำ (0.126 ± 0.03 mg C3GE/ g DE) ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยพบว่า น้ำต้มอ้อยดำใบเตย และ น้ำต้มอ้อยดำ มีปริมาณ TAC ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนน้ำต้มใบเตย สารสกัดใบเตยใน 50%เอทานอล ไม่สามารถตรวจพบปริมาณแอนโทไซยานินได้

8. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH assay โดยใช้ Vitamin C เป็นสารควบคุมเชิงบวก โดยมีสารสกัดตัวอย่าง ทั้ง 5 ชนิด จากการทดลองพบว่า สารสกัดตัวอย่างแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้น 50 - 1,000 µg/mL เมื่อพิจารณาจากค่า IC_{50} พบว่า Vitamin C มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูงกว่าสารสกัดตัวอย่าง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.66 ± 0.27 µg/mL ส่วนตัวอย่างที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ สารสกัดใบเตยใน 50% เอทานอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 709.39 ± 5.68 µg/mL รองลงมา คือ สารสกัดอ้อยดำใน 50%เอทานอล (719.64 ± 6.91 µg/mL) น้ำต้มอ้อยดำใบเตย (914.34 ± 5.59 µg/mL) น้ำต้มอ้อยดำ (1290.73 ± 13.89 µg/mL) น้ำต้มใบเตย (1305.43 ± 16.24 µg/mL) ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยพบว่าสารสกัดใน 50%เอ

ทานอลของอ้อยดำ และใบเตย มีค่า IC_{50} ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และการสกัดด้วยน้ำร้อนของอ้อยดำ และใบเตย มีค่า IC_{50} ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี ABTS โดยใช้ Trolox เป็นสารควบคุมเชิงบวก โดยมีสารสกัดตัวอย่าง ทั้ง 5 ชนิด พบว่า สารสกัดตัวอย่างแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้น 50 – 1,000 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อพิจารณาจากค่า IC_{50} พบว่าสารมาตรฐาน Trolox แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูงกว่าสารสกัดตัวอย่างโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $11.74 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$ ส่วนตัวอย่างที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือสารสกัดอ้อยดำใน 50% เอทานอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ $227.31 \pm 4.36 \mu\text{g/mL}$ รองลงมา คือ น้ำต้มอ้อยดำใบเตย ($287.73 \pm 2.49 \mu\text{g/mL}$) สารสกัดใบเตยใน 50% เอทานอล ($310.65 \pm 1.00 \mu\text{g/mL}$) น้ำต้มอ้อยดำ ($326.11 \pm 2.44 \mu\text{g/mL}$) น้ำต้มใบเตย ($579.52 \pm 12.05 \mu\text{g/mL}$) ดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อทดสอบด้วย ABTS assay สารสกัดทุกตัวอย่างมีค่า IC_{50} แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี FRAP เพื่อหาหาปริมาณเหล็กที่ถูกรีดิวซ์เป็นเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ในสารสกัดตัวอย่าง โดยใช้ Trolox เป็นสารควบคุมเชิงบวก แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในรูปของ FRAP value คำนวณจากกราฟมาตรฐาน FeSO_4 คือ $Y = 0.0027X + 0.1252$, $R^2 = 0.9993$ พบว่าสารสกัดตัวอย่างมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยารีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้น 20 – 400 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าที่ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/mL}$ สารสกัดอ้อยดำใน 50% เอทานอล แสดงค่า FRAP value สูงที่สุด เท่ากับ $0.85 \pm 0.01 \text{ mmole Fe(II)/g DE}$ รองลงมา คือ น้ำต้มอ้อยดำใบเตย ($0.75 \pm 0.04 \text{ mmole Fe(II)/g DE}$), น้ำต้มอ้อยดำ ($0.60 \pm 0.02 \text{ mmole Fe(II)/g DE}$), สารสกัดใบเตยใน 50%เอทานอล ($0.51 \pm 0.11 \text{ mmole Fe(II)/g DE}$) และน้ำต้มใบเตย ($0.12 \pm 0.02 \text{ mmole Fe(II)/g DE}$) ส่วนสารมาตรฐาน Trolox ซึ่งแสดงค่า FRAP value $2.40 \pm 0.01 \text{ mmole Fe(II)/g DE}$ ดังแสดงในตารางที่ 3 โดย น้ำต้มอ้อยดำใบเตย มี FRAP value ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสารสกัดอ้อยดำใน 50% เอทานอล และ น้ำต้มอ้อยดำ มีค่า FRAP value ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับสารสกัดใบเตยใน 50% เอทานอล

9. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ พบว่าสารสกัดตัวอย่างแสดงฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้น 50 – 1,000 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/mL}$ สารสกัดใบเตยใน 50% เอทานอล แสดงค่าการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์สูงที่สุด เท่ากับ $81.39 \pm 0.37\%$ รองลงมา คือ น้ำต้มใบเตย ($64.51 \pm 0.20 \%$) น้ำต้มอ้อยดำใบเตย ($57.32 \pm 0.32\%$), สารสกัดอ้อยดำใน 50%เอทานอล ($51.38 \pm 0.92 \%$) และน้ำต้มอ้อยดำ ($50.64 \pm 0.56 \%$) ดังแสดงในตารางที่ 3 ทุกตัวอย่างมีการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์สูงกว่า 50% โดย น้ำต้มใบเตยและสารสกัดใบเตยใน 50% เอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์สูงกว่าสารมาตรฐาน Trolox ($61.43 \pm 0.44\%$) ส่วนน้ำต้มอ้อยดำใบเตย น้ำต้มอ้อยดำ สารสกัดอ้อยดำใน 50%เอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ต่ำกว่าสารมาตรฐาน Trolox โดยตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ต่ำที่สุดคือ น้ำต้มอ้อยดำใบเตยและน้ำต้มอ้อยดำ ซึ่งทั้งสองตัวอย่างมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

การตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า TPC มีความสัมพันธ์เชิงบวกมากกับ TFC ($r = 0.77$) และมีความสัมพันธ์เชิงลบมากกับ DPPH ($r = -0.88$) และ ABTS มีความสัมพันธ์เชิงลบมากกับ FRAP ($r = -0.95$) ส่วน TFC มีความสัมพันธ์เชิงลบมากกับ DPPH ($r = -0.78$) ABTS ($r = -0.97$) และ ความสัมพันธ์

เชิงบวกมากกับ FRAP ($r = 0.87$) ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ จึงมีผลกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ส่วน TPC มีความสัมพันธ์เชิงบวกปานกลางกับฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

อภิปรายผล

จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมี ฤทธิ์ของน้ำต้มอ้อยดำหรือผสมกับใบเตยจากเครื่องต้มสมุนไพร และ TLC fingerprint ทำให้ทราบถึง ม้องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัด ส่วน TLC fingerprint จะเห็นความแตกต่างกันระหว่างสารสกัดของอ้อยดำและใบเตย อย่างชัดเจน โดยตัวอย่างที่มีองค์ประกอบของอ้อยดำ (BT และ BE50) จะมีรูปแบบของ TLC fingerprint คล้ายกันซึ่งจะแตกต่างชัดเจนจาก TLC fingerprint ของตัวอย่างที่มีองค์ประกอบของใบเตย (PT และ PE50) ตัวอย่างสารสกัดด้วย 50 % เอทานอล จะเห็นแถบสารที่ชัดหรือมีความเข้มมากกว่า เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์จะสกัดสารออกมาได้มากกว่าหรือหลายชนิดมากกว่า โดยสอดคล้องกับผลการหาปริมาณ TPC TFC และ TAC ของสารสกัดเอทานอลจะมีปริมาณมากกว่าและแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูงกว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำร้อน โดยสอดคล้องกับผลการสกัดของ ผล *Garcinia atrovirens* ด้วย 50% เอทานอลทำให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายหรือวิธีอื่น⁽¹⁸⁾ โดยปริมาณสารดังกล่าวจะมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันอีกด้วย⁽¹⁴⁾ ดังผลการวิจัยพบว่า การใช้ความร้อนในการเตรียมสารสกัดเพื่อใช้เป็นเครื่องต้มสมุนไพร สามารถสกัดสารสำคัญบางชนิดออกจากพืชได้ น้ำต้มอ้อยดำใบเตยก็สามารถพบสารประกอบฟีนอลิกหรือสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ได้ และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อทดสอบด้วย DPPH ABTS และ FRAP assay แต่พบว่าต้มอ้อยดำใบเตยมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่ผ่านกลไกการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+} ที่เด่นกว่ากลไกอื่นจึงทำให้ต้มอ้อยดำใบเตยมีค่า FRAP value ที่สูงและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสารสกัดอ้อยดำใน 50%เอทานอล นอกจากนี้ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยผ่านการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ พบว่า ตัวอย่างที่มีส่วนประกอบของใบเตยจะให้ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์สูงกว่าตัวอย่างที่ไม่มีใบเตย ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์นี้น่าจะมาจากสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในใบเตย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทานอลจากใบเตยมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์สูงใกล้เคียงกับ aminoguanidine ที่เป็นสารควบคุมผลบวก⁽¹⁹⁾ อย่างไรก็ตามน้ำต้มอ้อยดำใบเตยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์สูงกว่าสารสกัดอ้อยดำใน 50%เอทานอลอย่างมีนัยสำคัญ ถึงแม้ว่าจะปริมาณ TPC และ TFC น้อยกว่า เนื่องจากการสกัดด้วยน้ำต้มมีการใช้ความร้อนอาจทำให้สารสำคัญบางตัว เช่น แอนโทไซยานิน สารฟีนอลิก หรือ ฟลาโวนอยด์บางตัว ไม่คงตัวและมีปริมาณลดลงในตัวอย่างสกัดด้วยน้ำร้อน ซึ่งอาจจะมีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย โดยมีงานวิจัยที่ศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ในเตรียมชาสมุนไพร พบว่าอุณหภูมิที่สูงเกินไปมีผลต่อปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ลดลง โดยพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมชาสมุนไพรชนิดนี้ คือ 89.3 °C เป็นเวลา 2.50 นาที⁽²⁰⁾

ข้อสรุป

ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดแต่ละชนิดมีสารทางพฤกษเคมีที่สำคัญแตกต่างกัน และการทดสอบเอกลักษณ์ด้วย โครมาโทกราฟีผิวบางทำให้ทราบลักษณะลายพิมพ์โครมาโตกราฟี ของสารตัวอย่างแต่ละชนิดที่ต่างกัน สารตัวอย่างที่สกัดด้วย 50% เอทานอล เช่น PE50 และ BE50 ให้ปริมาณของสารสำคัญ เช่น สารกลุ่มฟีนอลิก สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่สูงกว่า และแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในแบบจำลองต่าง ๆ ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อน (BPT

BT และ PT) จากการวิจัยนี้พบว่าตัวอย่างที่มากจากการเตรียมในรูปแบบเครื่องต้มสมุนไพรที่มีส่วนผสมของอ้อยดำและใบเตย โดยการต้ม (BPT) มี TFC และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใกล้เคียงกับสารสกัด BE50 ถึงแม้ว่าจะให้ปริมาณสารสำคัญต่าง ๆ ที่น้อยกว่าการสกัดด้วยเอทานอลแต่ก็ยังสามารถแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ที่อาจจะเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ด้านการอักเสบ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์เบื้องต้นที่ทำให้ทราบองค์ประกอบของสารในอ้อยดำหรือใบเตย เพื่อใช้ในการศึกษาต่อยอด หรือหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอ้อยดำในรูปแบบชาสมุนไพร และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากอ้อยดำต่อไป นอกจากนี้ การทดลองนี้เป็นการทดสอบเพื่อคัดกรองเบื้องต้นในหลอดทดลอง จึงน่าจะมีการศึกษาฤทธิ์ด้านอื่น ๆ ของอ้อยดำในระดับเซลล์หรือในสัตว์ทดลองต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้จากงบประมาณ แผนบูรณาการพัฒนาศักยภาพ วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัยและนวัตกรรม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยขอนแก่น โครงการวิจัยเลขที่ 6200049 ขอขอบคุณนายจันทร์ เขียวพันธ์ และนางพรพรรณ เขียวพันธ์ ตำบลบ้านเรือน อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างอ้อยดำ ขอขอบคุณ นางสาวสิริวิภา สุภาพ ในการเก็บและจัดเตรียมตัวอย่างพืช และขอขอบพระคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับทุนสนับสนุนและส่งเสริมงานวิจัยเพื่อสร้างความเข้มแข็งในการก้าวสู่ตำแหน่งทางวิชาการของอาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (Startup Research Pharm KKU) ปีงบประมาณ 2561 และทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาของนางสาว อริสา ฤทธิ์ธิด และความอนุเคราะห์ด้านเครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ และสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย

ตาราง ภาพ และแผนภาพ

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดตัวอย่าง

ตัวอย่างพืช	สี	กลิ่น	pH	ลักษณะสารสกัด	Yield (%)
1. น้ำต้มอ้อยดำใบเตย (BPT)	น้ำตาล ปนเขียวหม่น	กลิ่นหอมอ้อยดำ ผสมใบเตย	6.03	ผง	5.12
2. น้ำต้มอ้อยดำ (BT)	ม่วงหม่นปนเทาอ่อน	กลิ่นหอมอ้อยดำ	5.89	ผง	4.82
3. น้ำต้มใบเตย (PT)	เขียวอ่อน	กลิ่นหอมใบเตย	6.79	ผง	2.89
4. สารสกัดอ้อยดำใน 50 %เอทานอล (BE50)	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นอ้อยดำไม่หอม มีกลิ่นฉุนของ แอลกอฮอล์	6.61	ของแข็งกึ่งเหนียว	10.92
5. สารสกัดใบเตยใน 50% เอทานอล (PE50)	เขียวเข้มออกดำ	กลิ่นใบเตยไม่หอม มีกลิ่นฉุนของ แอลกอฮอล์	6.51	ของแข็งกึ่งเหนียว	18.79

ตารางที่ 2 การตรวจสอบสารทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดตัวอย่าง

Phytochemical test		BPT	BT	PT	BE50	TE50
Alkaloids	Mayer	++	+	-	++++	-
	Dragendorff	+++	+	-	++++	-
Saponins	Froth test	+++++	+++	-	-	-
Carbohydrates	Fehling test	+++	+++	+++++	+	+++++
Proteins	Ninhydrin test	-	-	-	-	-
Flavonoids	Shinoda test	++++	++++	++	+++	+
Anthocyanins	HCL+NH ₃ test	+++	+++	-	-	-
Phenolics compound	Ferric chloride test	+++++	+++	+	++++	-
Tannins	Lead acetate test	+++	+++	++	+++	+
Steroids	Libermann_Burchard test	-	-	-	-	-
Cardiac glycosides	Kedde/Kellar-killani/ Libermann_Burchard test	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : +++++ = พบมากที่สุด, ++++ = พบมาก, +++ = พบปานกลาง, ++ = พบน้อย, + = พบน้อยที่สุด, - = ไม่พบ
BPT = น้ำต้มย้อยดำผสมโบเตย; BT = น้ำต้มย้อยดำ; PT = น้ำต้มโบเตย; BE50 = สารสกัดย้อยดำใน 50%เอทานอล; PE50 = สารสกัดโบเตยใน 50%เอทานอล

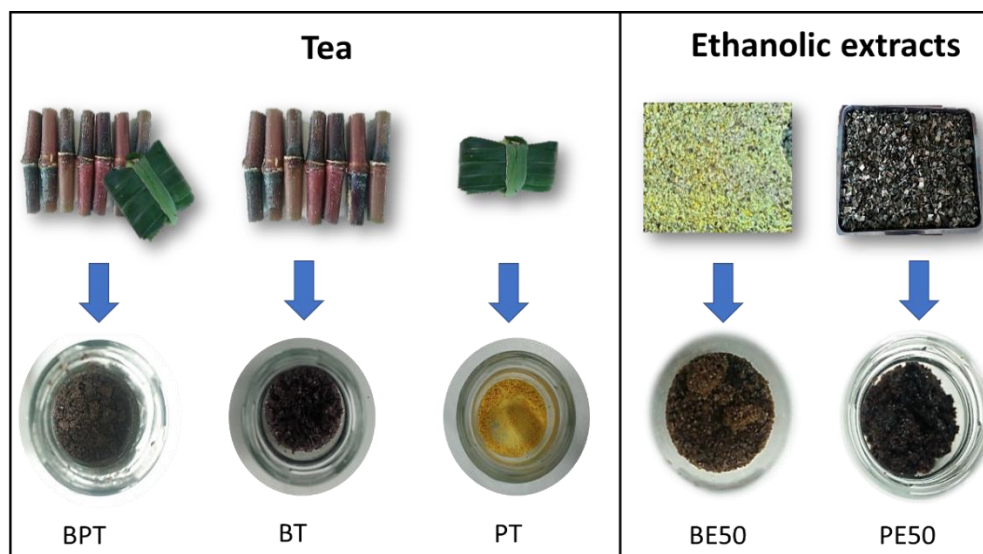
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณ สารฟีนอลิก (TPC) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (TFC) สารกลุ่มแอนโทไซยานิน (TAC)ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (DPPH, ABTS, FRAP) และฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ (NO inhibition) ของสารสกัด ได้แก่ น้ำต้มอ้อยดำใบเตย (BPT) น้ำต้มอ้อยดำ (BT) น้ำต้มใบเตย (PT) สารสกัดอ้อยดำใน 50% เอทานอล (BE50) และ สารสกัดใบเตยใน 50% เอทานอล (PE50) และ Vitamin C (Vit C)

Sample	TPC (mg GAE/g DE)	TFC (mg QE/g DE)	TAC (mg C3GE/g DE)	DPPH IC ₅₀)μg/mL(	ABTS IC ₅₀)μg/mL(	FRAP Value (mole Fe(II)/g DE)	%NO inhibition
BPT	33.68±0.81 ^c	5.52±0.04 ^c	0.134±0.03 ^a	914.34±5.59 ^c	287.73±2.49 ^c	0.75±0.04 ^c	57.32±0.32 ^b
BT	31.92±0.58 ^b	5.02±0.15 ^b	0.126±0.03 ^a	129.73±13.89 ^d	326.11±2.44 ^e	0.60±0.02 ^b	50.64±0.56 ^a
PT	26.80±0.48 ^a	2.85±0.27 ^a	-	1305.43±16.24 ^d	579.52±12.05 ^f	0.12±0.02 ^a	64.51±0.20 ^d
BE50	39.72±0.48 ^d	5.83±0.12 ^c	0.215±0.02 ^b	719.64±6.91 ^b	227.31±4.36 ^b	0.85±0.01 ^c	51.38±0.92 ^a
PE50	46.29±0.35 ^e	5.73±0.16 ^c	-	709.39±5.68 ^b	310.65±1.00 ^d	0.51±0.11 ^b	81.39±0.37 ^e
Vit C	-	-	-	23.66±0.27 ^a	-	-	-
Trolox	-	-	-	-	11.74±0.09 ^a	2.40±0.01 ^d	61.43±0.44 ^c

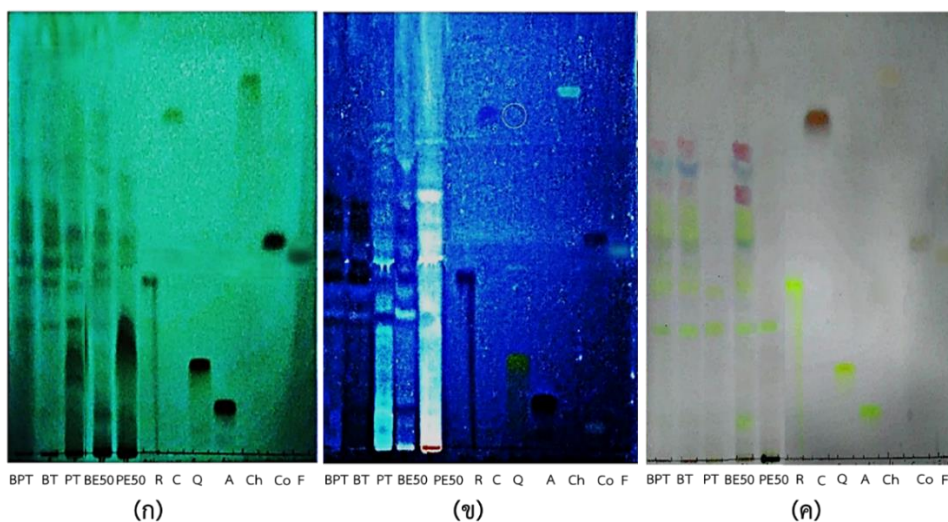
ผลการทดลองแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± SD (n = 3) และ ^{a, b, c, d, e, f} แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม (p < 0.05)

ตารางที่ 4 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient , r) ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม กับปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ของสารสกัดต่าง ๆ

Assay	TPC	TFC	DPPH	ABTS	FRAP	NO
TPC	1	-	-	-	-	-
TFC	0.77	1	-	-	-	-
DPPH	-0.88	-0.78	1	-	-	-
ABTS	-0.67	-0.97	0.71	1	-	-
FRAP	0.47	0.87	-0.60	-0.95	1	-
NO	0.50	-0.04	-0.32	0.24	-0.450	1



ภาพที่ 1 ลักษณะของสารสกัด น้ำต้มอ้อยดำผสมใบเตย (BPT) , น้ำต้มอ้อยดำ (BT), น้ำต้มใบเตย (PT), สารสกัดอ้อยดำใน 50% เอทานอล (BE50) และ สารสกัดใบเตยใน 50% เอทานอล (PE50)



ภาพที่ 2 ของ TLC fingerprint เมื่อส่องภายใต้แสง UV ที่ 254 nm (ก) 366 nm (ข) และ ฟ่นด้วย 10% H_2SO_4 (ค) ของสารสกัดตัวอย่าง น้ำต้มอ้อยดำใบเตย (BPT), น้ำต้มอ้อยดำ (BT), น้ำต้มใบเตย (PT), สารสกัดอ้อยดำใน 50%เอทานอล (BE50), สารสกัดใบเตยใน 50% เอทานอล (PE50) และ สารมาตรฐาน: Rutin (R), Catechin (C), Quercetin (Q), Apigenin (A), Chlorogenic acid (Ch), Coumaric acid (Co) และFerulic acid (F)

เอกสารอ้างอิง

1. Singh A, et al. (2015). Phytochemical profile of sugarcane and its potential health aspects. **Pharmacognosy Reviews**. 9(17), 45–54
2. Ledón N, et al. (2003). Anti-inflammatory and analgesic effects of a mixture of fatty acids isolated and purified from sugar cane wax oil. **Planta Medica**. 69(4), 367–369.
3. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. (2010). อ้อยดำ - ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี : phargarden.com. สืบค้นเมื่อ 12 พฤศจิกายน 2565 จาก <https://apps.phar.ubu.ac.th/phargarden/main.php?action=viewpage&pid=140>
4. Li X, et al. (2010). Determination and comparison of flavonoids and anthocyanins in Chinese sugarcane tips, stems, roots and leaves. **Journal of Separation Science**. 33(9), 1216–1223.
5. Ghasemzadeh A, and Jaafar HZ. (2013). Profiling of phenolic compounds and their antioxidant and anticancer activities in pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) extracts from different locations of Malaysia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 13(1), 341.
6. Chiabchalard A, and Nooron, N. (2015). Antihyperglycemic effects of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. leaf extract. **Pharmacognosy Magazine**. 11(41), 117–122.
7. Reshidan NH, et al. (2019). The effects of *Pandanus amaryllifolius* (Roxb.) leaf water extracts on fructose-induced metabolic syndrome rat model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 19(1), 232.
8. Uchenna E, et al. (2015). Phytochemical and Antimicrobial Properties of the Aqueous Ethanol Extract of *Saccharum officinarum* (Sugarcane) Bark. **Journal of Agricultural Science**. 7(10), 291.
9. Raaman N. (2006). **Phytochemical Techniques**. New Delhi: New India Publishing.
10. Sharma V, and Paliwal R. (2013). Preliminary phytochemical investigation and thin layer chromatography profiling of sequential extracts of *Moringa oleifera* pods. **International Journal of Green Pharmacy (IJGP)**. 7(1), 41-45.
11. เรณู คำหอม. (2559). การทดสอบสารฟลักซ์เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของปืบ วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยบูรพา.
12. Stankovic MS, et al. (2011). Total Phenolic Content, Flavonoid Concentrations and Antioxidant Activity, of The Whole Plant and Plant Parts Extracts from *Teucrium Montanum* L. Var. *Montanum*, F. *Supinum* (L.) Reichenb. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**. 25(1), 2222–2227.
13. Lee J, et al. (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**. 88(5), 1269–1278.

14. สุธีรา มณีฉาย และ ประสพอร รินทอง. (2559). ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอล จากดอกถั่วแระและดอกส้มป่อย. **วารสารวิทยาศาสตร์ มข.** 44(1), 142–152.
15. Kong F, et al. (2015). Preparation of Antioxidant and Evaluation of the Antioxidant Activities of Antioxidants Extracted From Sugarcane Products. **Journal of Food and Nutrition Research.** 3(7), 458–463.
16. Benzie IFF, and Strain JJ. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry.** 239(1), 70–76.
17. Alam, Md. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, Md. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal.** 21(2), 143–152.
18. Chailap B, and Nuanyai T. (2022). Effect of ethanol polarity and temperature on antioxidant activity, Tyrosinase inhibition, and total phenol content of *Garcinia atroviridis* fruits extract. **Huachiew Chalermprakiet Science Journal.** 8(1), 70–80.
19. กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม. (2563). การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านปฏิกิริยาไทโรซิเนส และ ด้านการอักเสบของสมุนไพรไทยสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน. **วารสารเทคนิคการแพทย์.** 48(3), 7504–18.
20. Ueda Y, et al. (2019). Optimization of Hot-water Extraction of Dried Yacon Herbal Tea Leaves: Enhanced Antioxidant Activities and Total Phenolic Content by Response Surface Methodology. **Food Science and Technology Research.** 25(1), 131–139.