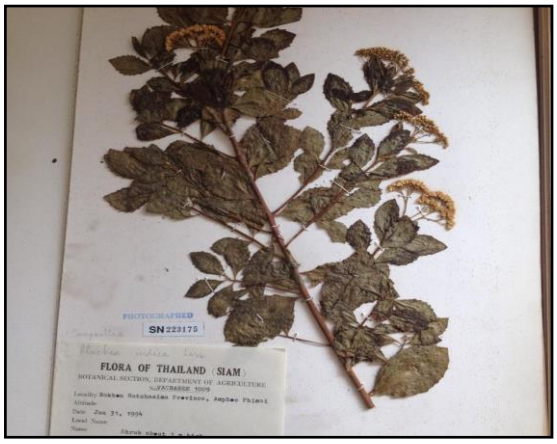
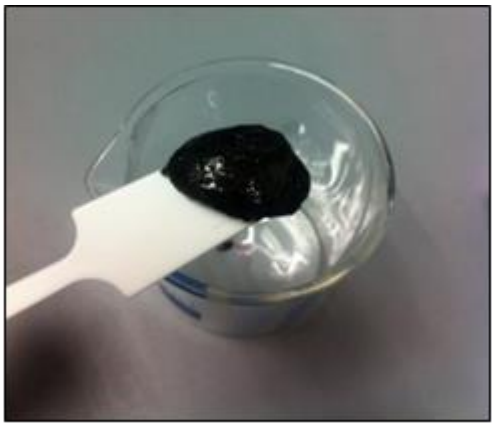
# บทที่ 4
# ผลการวิจัย

**การเตรียม และการสกัดใบขลู่ (Extraction)**

ใบขลู่นำมาจากจังหวัดจันทบุรี อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อแห้งแล้วนำใบขลู่ไปพิสูจน์เอกลักษณ์พืชที่พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าใบขลู่ที่นำมาใช้ในงานวิจัย มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Pluchea indica (L.)* Less. และอยู่ในวงศ์ Compositae (ภาพที่ 4.1) เมื่อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะสีเขียวเข้ม และหนืด (ภาพที่ 4.2) และคิดเป็นร้อยละของสารสกัดหยาบ (%yield) เท่ากับ 67.08 %




**ภาพที่ 4.1** การตรวจสอบเอกลักษณ์พืชที่พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



**ภาพที่ 4.2** แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบใบขลู่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ethanol)

**การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ของสารสกัดจากใบขลู่ด้วยวิธี DPPH assay**

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ของสารสกัดใบขลู่ (*P.indica* extract) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

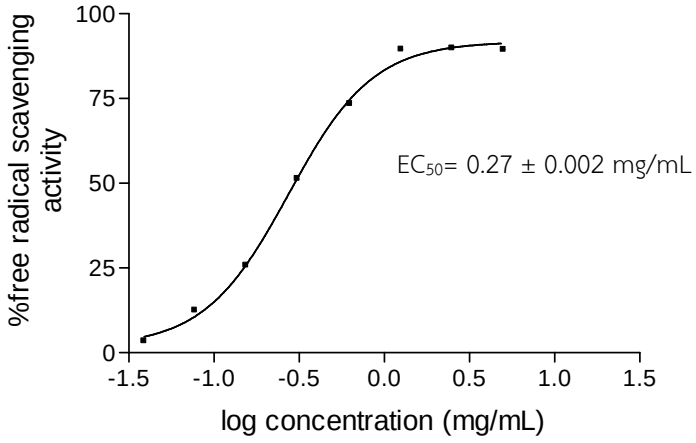
**ตารางที่ 4.1** แสดงร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity) ของสารสกัดใบขลู่

| ความเข้มข้นของสารสกัดใบขลู่ (mg/mL) | ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity) | $EC_{50}$± SD (mg/mL) |
|---|---|---|
| 0.039 | 3.41±0.28 | 0.27±0.002 |
| 0.078 | 12.47±0.10 | |
| 0.156 | 25.74±0.02 | |
| 0.312 | 51.32±0.32 | |
| 0.625 | 73.36±0.18 | |
| 1.25 | 89.48±0.02 | |
| 2.5 | 89.82±0.64 | |
| 5.0 | 89.35±0.03 | |

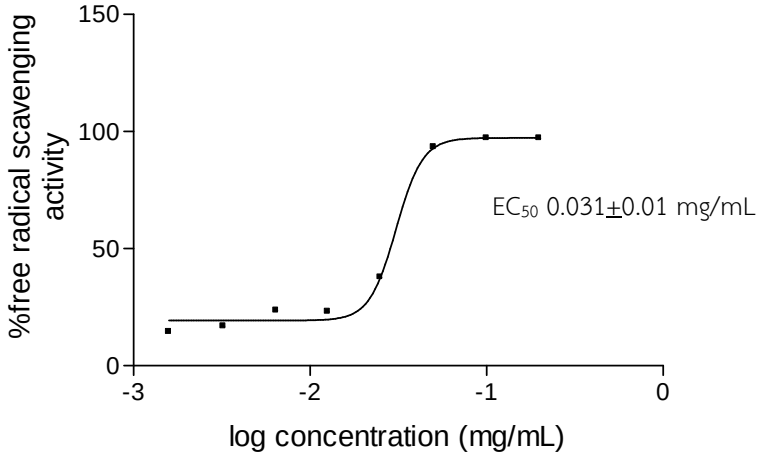
**ตารางที่ 4.2** แสดงร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity) ของวิตามินซี (L-ascorbic acid)

| ความเข้มข้นของวิตามินซี (mg/mL) | ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity) | $EC_{50}$± SD (mg/mL) |
|---|---|---|
| 0.0016 | 9.59±0.05 | 0.031 ± 0.01 |
| 0.0032 | 14.48±0.07 | |
| 0.0064 | 23.52±0.16 | |
| 0.0125 | 23.00±0.18 | |
| 0.025 | 37.69±0.09 | |
| 0.05 | 93.31±0.05 | |
| 0.10 | 97.01±0.02 | |
| 0.20 | 97.16±1.31 | |

จากข้อมูลในตารางที่ 4.1 และ 4.2 แสดงให้เห็นว่า ทั้งสารสกัดและวิตามินซี มีแนวโน้มให้ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity) เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารตัวอย่างสูงขึ้น (dose-dependent curve) เมื่อนำข้อมูลจากตารางพล๊อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (log concentration) และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity) เพื่อหาค่าการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% (half maximal effective concentration, $EC_{50}$) โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism พบว่าสารสกัดใบขลู่ และวิตามินซี (L-ascorbic acid) มีค่า $EC_{50}$ เท่ากับ 0.27±0.002 และ 0.031 ± 0.01 mg/mL ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ




**ภาพที่ 4.3** กราฟแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบขลู่ (*P.indica* extract)

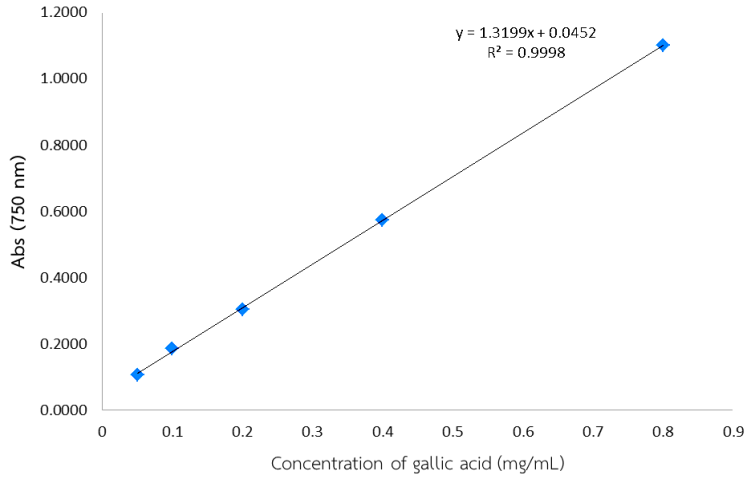



**ภาพที่ 4.4** กราฟแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซี (L-ascorbic acid)

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ของสารสกัดใบขลู่ (*P.indica* extract) ด้วยวิธี DPPH scavenging assay ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารที่มาจากธรรมชาติ ในการทดสอบนี้ ทดสอบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้ผลเชิงบวก (positive control) คือวิตามินซี (L-ascorbic acid) พบว่า สารสกัดใบขลู่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าวิตามินซีประมาณ 10 เท่า อาจเนื่องมาจากวิตามินซี เป็นสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยตรง ส่วนสารสกัดใบขลู่ที่นำมาทดสอบเป็นสารสกัดหยาบที่มีองค์ประกอบทางเคมีหลากหลาย จึงทำให้เมื่อทดสอบด้วยวิธีนี้สารสกัดจึงมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าวิตามินซี

**การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic content) ในสารสกัดใบขลู่ ด้วยวิธี Folin–Ciocalteu assay**

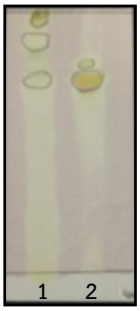
การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total Phenolic content) ในสารสกัดใบขลู่ ด้วยวิธี Folin–Ciocalteu assay เมื่อนำมาเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน (calibration curve) ของกรดแกลลิก (gallic acid) (ภาพที่ 4.5) ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดใบขลู่มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 280.30±10.0 mgGAE/g extract




**ภาพที่ 4.5** กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของกรดแกลลิก (gallic acid)

**การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบใบขลู่ ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)**

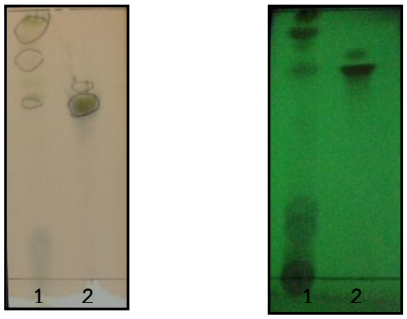
การตรวจสอบสารสำคัญที่ออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบใบขลู่ชั้นเอทานอล ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) โดยอาศัยการแยกของสารสกัด ระบบที่ใช้คือ $CHCl_3$: ethyl acetate (EtOAc): formic acid ในอัตราส่วน 1:1:0.1 และการสเปรย์ด้วย DPPH spray reagent (ภาพที่ 4.6) และ10% ferric chloride ($FeCl_3$) spray reagent และสารมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบคือ quercetin (Traithip, 2005)




**ภาพที่ 4.6** แสดงผลการตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH free radical ของสารสกัดหยาบจากใบขลู่ ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) หลังจากสเปรย์ด้วย DPPH reagent

Track: 1 = leaf ethanol extract, Retention factor ($R_f$) 1 = 0.68

2 = quercetin, Retention factor ($R_f$) 2 = 0.67




A B

**ภาพที่ 4.7** แสดงผลการตรวจสอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบจากใบขลู่ ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) หลังจากสเปรย์ด้วย 10% ferric chloride reagent (A), ส่องการดูดกลืนแสงภายใต้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm (B)

Track: 1 = leaf ethanol extract, Retention factor $(R_f)_1$ = 0.67

2 = quercetin, Retention factor $(R_f)_2$ = 0.65

จากภาพที่ 4.6 แสดงผลการตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH free radical ของสารสกัดหยาบจากใบขลู่ ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) หลังจากสเปรย์ด้วย DPPH reagent พบว่า สารสกัดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH free radical เปรียบเทียบกับสาร quercetin การติดสีบนแผ่น TLC ของสารสกัดใบขลู่ (จุด 1) เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง เมื่อเปรียบเทียบกับ สาร quercetin (จุด 2) พบว่าให้สีเหลืองอ่อนกว่า จากผลการทดสอบนี้อาจสรุปได้ว่า สารสกัดให้ผลการต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าสารมาตรฐาน quercetin

ภาพที่ 4.7 แสดงผลการตรวจสอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบจากใบขลู่ ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) หลังจากสเปรย์ด้วย 10% ferric chloride reagent พบว่าการติดสีบนแผ่น TLC ของสารสกัดใบขลู่ (จุด 1) เปลี่ยนจากสีส้ม สีของ ferric chloride เป็นสีเขียว เมื่อเปรียบเทียบกับสาร quercetin พบว่าสาร quercetin (จุด 2) ให้สีเขียวชัดเจนกว่า ซึ่งจากผลการทดสอบนี้สรุปได้ว่าในสารสกัดใบขลู่มีองค์ประกอบเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิก

เมื่อดูจากค่า $R_f$ พบว่า สารสกัดใบขลู่ชั้นเอทานอลมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสาร quercetin ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิก กลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ประเภทฟลาโวนอล (flavonol) จากผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Traithip (2005)