Published online: 18 July 2018

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของสารสกัดว่านสากเหล็ก

ANTIVITIES AND TYROSINASE INHIBITION ACTIVITIES OF *MOLINERIA LATIFOLIA* EXTRACT

ศักดิ์ชัย ธีรธรรมเสถียร

อีเมล์: sakchait07@gmail.com

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชา วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร. ณัตฐาวุฒิ ฐิติปราโมทย์ อาจารย์ที่ปรึกษา

อีเมล์: natthawut.thi@mfu.ac.th

สำนักวิชา วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

Mae Fah Luang University

บทคัดย่อ

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณสารประกอบรวมฟีนอล (Total Phenolic Content,TPC) สารประกอบรวมฟลาโวนอยด์ (Total Flavonoid Content,TFC) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(DPPH radical scavenging activity และ reducing antioxidant power, FRAP) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดที่ได้จากส่วนเหนือดิน(ลำต้นและใบ) และส่วนใต้ดิน(ราก)ของต้นว่านสากเหล็ก โดยการหมักแช่ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำ, เอทอนอล, เอทิลอะซิเตต และ เฮก-เซน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระเหยแห้งสารสกัดด้วยเครื่องทำแห้งสูญญากาศ ผลการศึกษาพบว่าปริมาณผลผลิตของสารสกัดจากทั้งส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของว่านสากเหล็กจากตัวทำละลายน้ำมีปริมาณมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติร้อยละเท่ากับ 8.09±1.78 และ 8.54±0.44 ตามลำดับ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์(TPC และ TFC) ด้วยตัวทำละลายต่างกัน พบว่าสารสกัดส่วนเหนือดินที่สกัดด้วยน้ำมี TPC สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งเท่ากับ 0.64±0.02 mg GAE/ g extract และสารสกัดจากส่วนใต้ดินที่สกัดด้วยเอทานอลมี TPC สูงที่สุด 1.48±0.04 mg GAE/ g extract ในขณะที่ปริมาณ TFC พบว่าจากส่วนเหนือดินที่สกัดด้วย ethyl acetate มีค่า TFC มากที่สุดเท่ากับ 0.64±0.02 mg QE/g extract และส่วนใต้ดินที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า TFC มากที่สุดเท่ากับ 0.74±0.07 mg QE/ g extract ($p<0.05$)

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดว่านสากเหล็กพบว่าปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุดในสารสกัดจากส่วนเหนือดินที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่ามากที่สุด เท่ากับ 28.35±0.23 μg AAC/ g extract และส่วนใต้ดินที่สกัดด้วยน้ำมีค่าเท่ากับ 35.43±0.02 μg AAC/g extract ($p<0.05$) นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจาก FRAP assay ของสารสกัดจากส่วนเหนือดิน

และส่วนใต้ดินของว่านสารกเหล็กที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่าเท่ากับ 14.73±0.60 และ 47.58±1.60 μg AAC/g extract ตามลำดับ($p<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินที่สกัดด้วยตัวทำละลายเดียวกัน พบว่าสารสกัดจากส่วนใต้ดินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH และ FRAP assay) มากกว่าส่วนเหนือดินที่สกัดตัวทำละลายเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดว่านสากเหล็ก พบว่าสารสกัดจากส่วนเหนือดินที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด (11.62±5.64 μg.Kojic acid/ g extract) ส่วนสารสกัดจากส่วนใต้ดินที่สกัดด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสมากที่สุดเท่ากับ 7.78±0.43 μg Kojic acid/ g extract ($p<0.05$)

จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์และฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง TPC ของสารสกัดว่านสากเหล็กมีความสัมพันธ์กับ DPPH และ FRAP assay ในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$) โดยมีทิศทางความสัมพันธ์ระดับปานกลาง ($r = 0.633$) และ ระดับสูง ($r = 0.896$) ตามลำดับ นอกจากนี้ความสัมพันธ์ระหว่าง TFC ของสารสกัดว่านสากเหล็ก และ FRAP activity มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทิศทางระดับต่ำ ($r=0.338$) แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิกอาจเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดว่านสากเหล็กโดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนใต้ดินของว่านสากเหล็กมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางอาหารและอื่นๆต่อไป

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ/ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส/ ว่านสากเหล็ก/ สารประกอบฟลาโวนอยด์/ สารประกอบฟีนอลิก

Mae Fah Luang University

ABSTRACT

This study examined the bioactive compound total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), antioxidant activity (DPPH, FRAP activities) and tyrosinase inhibitory activity of the *Molineria latifolia* from 2 different parts: Aerials parts (Stem and Leaf) and Underground parts (root) are extracted using maceration method with 4 solvents (DI water, ethanol, ethyl acetate and hexanes) for 24 hours. The extracts were filtrated by whatman no.1 filter paper and evaporated using rotary evaporator until dry. The results showed that the highest extractable yield were found in DI water extract from both aerials and underground parts of *M.latifolia* (8.09±1.78% and 8.54±0.44% respectively). In results of their bioactive compounds, aerials parts with DI water extraction showed significantly highest TPC (0.64±0.02 mg GAE/ g extract) when comparing with other solvents extraction ($p<0.05$). Underground parts with ethanol extract had higher TPC (1.48±0.04 mg GAE/g extract) than other extract at same sample ($p<0.05$). Moreover, the total of flavonoid content (TFC) was greatest on ethyl acetate extract of aerials parts (0.64±0.02 mg QE/ g extract) and ethanol extract from underground parts (0.74±0.07 mg QE/ g extract) ($p<0.05$)

In bioactivities of *M.latifolia*, DPPH was highest in aerials parts extracted by ethanol (28.35±0.23 µg AAC/g extract) and DI water extract of underground parts (33.43±0.02 µg AAC/g extract)($p<0.05$). Furthermore, the highest inhibitory activity in FRAP assay was found in both aerials and underground parts extracted by ethanol (14.73±0.60 and 47.58±1.60 µg AAC/g extract respectively). When comparing between parts of *M.latifolia*, the extracts from underground parts possessed higher antioxidant activities than that of aerials parts at the same condition. Moreover, the tyrosinase inhibitory activity was highest in the ethyl acetate extract of aerials plant (11.62± 5.64 µg of kojic acid/ g extract) whereas hexane extract of underground parts showed higher tyrosinase inhibitory activity (7.78±0.43 µg kojic acid / g extract).

For the relationship between bioactive compound and its bioactivity, TPC has positive correlation with antioxidant determined by DPPH and FRAP assay that had correlation coefficient (r) as medium level (r =0.633) and high level (r = 0.896) respectively. Moreover, TFC had also showed positive correlation with FRAP assay but with low level of correlation (r = 0.338). The results showed that bioactive compound (especially TPC) might be the main compound responsible for anti-oxidant activity. The results suggested that the *M.latifolia* (especially its root) may be used as natural active ingredient in cosmetic, food and other industry.

Mae Fah Luang University

Keywords : Antioxidant/ Flavonoid/Phenolic/ *Molineria latifolia*; aerial and underground/ tyrosinase inhibitory activity

บทนำ

สารสำคัญปัจจุบันได้จากการสังเคราะห์จากธรรมชาติ (Natural product) เช่น พืช สัตว์ แร่ธาตุอื่นๆ เป็นต้น การใช้สาระสำคัญที่ได้จากธรรมชาติเป็นที่นิยมและปลอดภัย โดยส่วนใหญ่ที่ได้มาจากพืชเนื่องจากประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ของพืชพรรณธรรมชาติและมีพื้นที่ปลูกพืชทางการเกษตรที่หลากหลาย เช่นพืชผัก ผลไม้ และพืชสมุนไพร และมีการสะสมประสบการณ์การใช้พืชสมุนไพรจนได้ภูมิปัญญาด้านการแพทย์แผนไทย แต่อย่างไรก็ตามบางภูมิปัญญาไทยแม้ว่าจะได้ผลการรักษาได้ดีแต่ยังคงขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เพื่อสนับสนุนความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับต่อสากล

ว่านสากเหล็ก (*M.latifolia*) ถือว่าเป็นวัชพืชที่ขึ้นตามสวนยางเป็นพืชสมุนไพรสำคัญที่มีการใช้ในตำรับยา มีสรรพคุณที่น่าสนใจเช่น ดับพิษร้อน ถอนพิษไข้ ช่วยกระจายโลหิตทำให้ไหลเวียนสะดวก บำรุงกำลัง แก้อาการไอ เจ็บคอ เป็นต้น ส่วนฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบมีงานวิจัยที่น่าสนใจ เช่น มีฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบชนิดบี (Haruyuki Yamashita,1990) ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี (Reza Farzinebrahimi,2015) และอาร์บูติน (arbutin) ที่สกัดได้จากสมุนไพรอื่นๆ และพืชวงศ์เดียวกัน (*C.latifolia*) เทียบกับผลิตภัณฑ์ Skin whitening cream ในท้องตลาด (Wisau Thongchai,2007) และยังมีงานวิจัยหาสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic) จากรากต้นว่านสากเหล็ก

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาวิจัยสารสกัดจากส่วนเหนือดิน (ใบและลำต้น) และส่วนใต้ดิน (ราก) ของว่านสากเหล็กด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันพร้อมทั้งศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดว่านสากเหล็ก ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าพืชชนิดนี้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.เพื่อทดสอบหาปริมาณสารรวมประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากสารสกัดว่านสากเหล็กที่สกัดจากตัวทำละลายต่างชนิดกันทั้งในส่วนเหนือดินและใต้ดินของต้นว่านสากเหล็ก

2.เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดว่านสากเหล็ก

Mae Fah Luang University

ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2. เตรียมสารสกัดว่านสากเหล็กส่วนของส่วนเหนือดิน และใต้ดินในตัวทำละลายที่ต่างกัน 4 ชนิด เฮกเซน, เอทิล อะซิเตท, เอทานอล และน้ำ
3. ทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดว่านสากเหล็ก
4. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยสถิติ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดว่านสากเหล็ก

ต้นว่านสากเหล็กเก็บจากอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เวลาเก็บระหว่างเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ ต้นที่มีอายุตั้งแต่ 6 เดือนขึ้นไปหรือที่มีความสูงอย่างน้อย 40 cm โดยแบ่งว่านสากเหล็กเป็น 2 ส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน อบในตู้อบแห้งที่ 60 C° บดให้เป็นผงละเอียด สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ(DI water), เอทานอล(ethanol), เอทิล อะซิเตท (ethyl acetate) และ เฮกเซน(hexane) อย่างละ 300 ml ชั่งผงว่านสากเหล็ก 50 g ทำการหมัก(Maceration) และกวน 24ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้ง (Rotary evaporation) จากนั้นคำนวณหาปริมาณร้อยละของสารที่สกัด (%Yield)

2. การวิเคราะห์คุณภาพสารสกัด

2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม

เตรียมสารมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นต่างๆ โดยทดสอบเริ่มจากปิเปตสารละลายมาตรฐานปริมาตร125 µl เติมสารละลาย Folin Cioculteu's reagent ปริมาตร 125µl เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6นาที จากนั้นเติม 7% sodium carbonate ปริมาตร 1.25ml และเติมน้ำกลั่น 1.5ml ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 765nm เขียนกราฟมาตรฐานของ gallic acid และ เตรียมสารสกัดจากว่านสากเหล็กความเข้มข้น 1.0 mg/ml หาปริมาณสารฟีนอลิกรวมเฉลี่ยในรูปมิลลิกรัมของ gallic acid ต่อกรัมสารสกัด

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์

เตรียมสารมาตรฐาน Quercetin ที่ความเข้มข้นต่าง โดยการทดสอบเริ่มจากปิเปตสารละลายมาตรฐาน Quercetin ปริมาตร 0.5ml นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 3ml เติม $NaNO_2$ ความเข้มข้น 5%

Mae Fah Luang University

ปริมาตร 0.3ml เขย่าให้เข้ากัน และเติม $AlCl_3$i ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 0.6ml เติม NaOH ความเข้มข้น 1M ปริมาตร 2ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงได้ดีที่ ความยาวคลื่น 510nm เขียนกราฟมาตรฐานสร้างความสัมพันธ์ระหว่างค่าความดูดกลืนแสงกับปริมาณของสารมาตรฐาน Quercetin ทำการทดสอบหาสารสกัดว่านสากเหล็กคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมต่อกรัมสารสกัด

2.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

เตรียมสารละลาย 0.2mM DPPH radical ในเอทานอลความ และเตรียมสารมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบในอัตราส่วน 1.5ml : 1.5ml ระหว่างสารมาตรฐานกับ 0.2mM DPPH เขย่าเข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517nm หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณของสารมาตรฐาน คำนวณ % radical scavenging และคำนวณหาค่า IC_{50}จากผลการทดลองที่ได้โดยคำนวณหา % radical scavenging จากสมการ

$$\% \text{ radical scavenging} = [1 - (A_{sample} / A_{control})] \times 100$$

เมื่อ A_{sample}คือ ค่าดูดกลืนแสงของหลอดที่มีสารตัวอย่าง หรือสารมาตรฐาน

และ$A_{control}$ คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH•

ให้นำค่า % radical scavenging เขียนกราฟความสัมพันธ์ คำนวนและวิเคราะห์หาผลเป็น µg ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AAC)/g sample extract

2.4 การวิเคราะห์ FRAP assay

เตรียมสารละลาย FRAP reagent (300mM sodium acetate buffer pH 3.6 : 20mM $FeCl_36H_2O$: 1 mM 4,6-tripryridyls-triazine (TPTZ)ใน 40mM HCl ด้วยอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ) สารมาตรฐาน Ascorbic acid ความเข้มข้นต่างๆ ปิเปต 100µl ผสมกับ FRAP ปริมาตร 3ml ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 4 นาทีจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสดงที่ 593nm เขียนกราฟมาตรฐานแล้วทำการทดสอบสารสกัดตัวอย่าง 1mg/ml เทียบกับกราฟมาตรฐาน กราฟความสัมพันธ์เพื่อแสดงค่าในรูป mg Fe^{2+} equivalent /g sample extract

2.5 การวิเคราะห์ทดสอบการยับยั้งไทโรซิเนส

ทดสอบสารมาตรฐาน Kojic acid โดยเตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยตัวทำละลายเอทานอล หาความสัมพันธ์ % inhibition กับ ความเข้มข้นต่างๆ และทดสอบสารสกัดว่านสากเหล็ก 3 mg/ml ปิเปต เติม 0.85mM สารL-dopa และไทโรซิเนสในตัวทำละลายให้ได้ 245unit/ml เริ่มปิเปตสารละลาย buffer pH 6.8 ปริมาตร 240µl และปริมาตร 360µl หลอดสารสกัดว่านสากเหล็ก

Mae Fah Luang University

และ blank sample ตามลำดับ L-Dopa 120µl ในหลอด sample แล้วบ่มเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10นาที เติมเอนไซม์ไทโรซิเนส 120 µl ทั้ง 2 หลอดผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 20นาที แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490nm

คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสมการ

$$\% \text{ Tyrosinase inhibition} = \frac{[(A-B)+(D-C)]}{(A-B)} \times 100$$

โดย A = absorbance ของ control B = absorbance ของ blank control

C = absorbance ของ sample D = absorbance ของ blank sample

โดย A, B, C และ D ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm จากนั้นคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดว่านสากเหล็กที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

2.6 การวิเคราะห์ผลการศึกษาทางสถิติ

นำผลการศึกษามาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรมการวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูปที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (IBM SPSS version 21)

3.ผลการวิจัย

3.1 ปริมาณสารสกัด การสกัดสารออกฤทธิ์จากว่านสากเหล็กจากส่วนเหนือดิน(ก้านและใบ)เปรียบเทียบกับส่วนใต้ดิน(ราก) สกัดด้วยตัวทำละลาย 4ชนิด คือ น้ำ, ethanol, ethyl acetate และ hexanes สารสกัดส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน ที่สกัดด้วยน้ำได้ปริมาณผลิตผลร้อยละมากที่สุดเท่ากับ 8.09±1.78 และ 8.54±0.44 ($p<0.05$)

3.2 ปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิก (TPC) และปริมาณรวมสารประกอบฟลาโวนอยด์ (TFC)

การวิเคราะห์เพื่อหา TPC ของสารสกัดว่านสากเหล็กส่วนต่างๆ ตามตารางที่ 1 จากแต่ละตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดส่วนเหนือดินด้วยทำละลายน้ำจะได้ TPC มากที่สุดเท่ากับ 0.64±0.2 mg GAE /g extract และสารสกัดส่วนใต้ดินด้วยตัวทำละลาย ethanol มากที่สุดเท่ากับ 1.485±0.40 mg GAE/g extract($P<0.05$) และค่าTPC พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลาย ethanol, ethyl acetate และ hexane ส่วนใต้ดินได้ค่า TPC มากกว่าส่วนเหนือดิน 2-3 เท่า($P<0.05$)

การวิเคราะห์หา TFC พบว่าในส่วนเหนือดินด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate มีค่า TFC มากที่สุดเท่ากับ 0.64±0.02 mg QE /g extract ($P<0.05$) ขณะที่ส่วนใต้ดินของต้นว่านสากเหล็กด้วยตัวทำละลาย ethanol มี TFC สูงสุดเท่ากับ 0.74±0.07 mg QE /g extract ($P<0.05$) ตามตารางที่ 1

Mae Fah Luang University

ตารางที่ 1 ปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิก และ ปริมาณรวมสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดส่วนต่างๆของว่านสากเหล็กจากแต่ละตัวทำละลายชนิดต่างๆ

สารสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณฟีนอลิก (mg GAE /g crude extract)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg QE /g crude extract)
ส่วนเหนือดิน	DI Water	$0.64\pm0.02^{a, A}$	$0.25\pm0.01^{c, A}$
	Ethanol	$0.41\pm0.02^{b, B}$	$0.43\pm0.00^{b,B}$
	Ethyl Acetate	$0.38\pm0.02^{c, B}$	$0.64\pm0.02^{a, A}$
	Hexane	$0.11\pm0.01^{d, B}$	$0.63\pm0.02^{a, A}$
ส่วนใต้ดิน	DI Water	$0.44\pm0.01^{c, B}$	$0.20\pm0.00^{c, B}$
	Ethanol	$1.48\pm0.04^{a, A}$	$0.74\pm0.07^{a, A}$
	Ethyl Acetate	$0.95\pm0.03^{b, A}$	$0.51\pm0.01^{b,B}$
	Hexane	$0.36\pm0.02^{d, A}$	$0.24\pm0.01^{c, B}$

หมายเหตุ. Mean+S.D. (n=24) ตัวยกอักษรพิมพ์เล็ก (a, b, c, d) แสดงความแตกต่างกันของสารสกัดแต่ละชนิด ในส่วนของพืชเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (Parametric analysis : ANOVA: Duncan test หรือ Non parametric analysis; Kruskal-Wallis test)

ตัวยกอักษรพิมพ์ใหญ่ (A, B) แสดงความแตกต่างกันของสารสกัดส่วนเหนือดิน และใต้ดินที่ตัวทำละลายเดียวกัน $p<0.05$ (Parametric analysis : ANOVA: Duncan test หรือ Non parametric analysis; Mann whiney U test)

3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดว่านสากเหล็กที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH activity และ FRAP assay และฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitory activity)

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH activity ตามตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดจากส่วนใต้ดินด้วยตัวทำละลายด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด เท่ากับ 35.43±0.02 μg AAC /g extract ส่วนสารสกัดจากส่วนเหนือดินจากตัวทำละลาย ethanol มีค่าเท่ากับ 28.35±0.22 μg AAC /g extract ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดส่วนต้นว่านสากเหล็กของตัวทำละลายทุกตัวพบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH activity ของสารสกัดจากส่วนใต้ดินมีค่ามากกว่าส่วนเหนือดิน($p<0.05$)

การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP assay ตามตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดส่วนกส่วนเหนือดินและใต้ดินของต้นว่านสากเหล็กจากตัวทำละลาย ethanol แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุด เท่ากับ 14.78±0.60 และ 47.58±1.60 μg AAC /g extract ตามลำดับ($p<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP assay ส่วนเหนือดินกับส่วนใต้ดินของต้นว่านสากเหล็กด้วยทุกตัวทำละลายได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัดส่วนใต้ดินมีค่ามากกว่าสารสกัดส่วนเหนือดิน

Mae Fah Luang University

การทดสอบทางค่าปริมาณเฉลี่ยต่อฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitory activity) ตามตารางที่ 2 จากสารสกัดจากส่วนเหนือดินของว่านสากเหล็กที่สกัดด้วย ethyl acetate พบว่ามีประสิทธิภาพยับยั้งไทโรซิเนสสูงสุดเท่ากับ 11.62±5.64μg Kojic acid/ g extract และสารสกัดจากส่วนใต้ดินของต้นว่านสากเหล็กมีค่า tyrosinase inhibition ของทำละลาย hexane พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสมากที่สุดเท่ากับ7.78±0.43 μg Kojic acid/ g extract ($p<0.05$) ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, FRAP assay และ Tyrosinase inhibition ของสารสกัดว่านสากเหล็กจากแต่ละตัวทำละลาย

สารสกัด	ตัวทำละลาย	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (μg AAC/g extract)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP assay (μg AAC /g extract)	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (μg Kojic acid /g crude extract)
ส่วนเหนือดิน	DI Water	$20.91\pm0.10^{b, B}$	$9.08\pm1.62^{b, B}$	$0.02\pm0.00^{b, B}$
	Ethanol	$28.35\pm0.23^{a, B}$	$14.78\pm0.60^{a, B}$	$0.20\pm0.04^{b, A}$
	Ethyl Acetate	$14.06\pm0.30^{c, B}$	$8.68\pm0.88^{b, B}$	$11.62\pm5.64^{a, A}$
	Hexane	$2.91\pm0.65^{d, B}$	$5.24\pm0.97^{c, B}$	$3.42\pm1.49^{b, B}$
ส่วนใต้ดิน	DI Water	$35.43\pm0.02^{a, A}$	$14.78\pm3.41^{d, A}$	$0.07\pm0.06^{c, A}$
	Ethanol	$35.10\pm0.18^{b, A}$	$47.58\pm1.60^{a, A}$	$0.26\pm0.07^{c, A}$
	Ethyl Acetate	$32.72\pm0.18^{c, A}$	$28.78\pm1.63^{b, A}$	$3.03\pm2.38^{b, B}$
	Hexane	$26.99\pm0.35^{d, A}$	$21.63\pm4.52^{c, A}$	$7.78\pm0.43^{a, A}$

หมายเหตุ. Mean+S.D. (n=24) ด้วยอักษรพิมพ์เล็ก (a, b, c, d) แสดงความแตกต่างกันของสารสกัดแต่ละชนิด ในส่วนของพืชเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (Parametric analysis : ANOVA: Duncan test หรือ Non parametric analysis; Kruskal-Wallis test)

ด้วยอักษรพิมพ์ใหญ่ (A, B) แสดงความแตกต่างกันของสารสกัดส่วนเหนือดิน และใต้ดินที่ตัวทำละลายเดียวกัน $p<0.05$ (Parametric analysis : ANOVA: Duncan test หรือ Non parametric analysis; Mann whiney U test)

3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH วิธี FRAP และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ความสัมพันธ์ระหว่าง TPC ของสารสกัดว่านสากเหล็กมีความสัมพันธ์กับ DPPH และ FRAP assay เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$) โดยทิศทางความสัมพันธ์ระดับปานกลาง ($r=0.633$) และ ระดับสูง ($r = 0.896$) ตามลำดับ นอกจากนี้ความสัมพันธ์ระหว่าง TFC ของสารสกัดว่านสากเหล็ก และฤทธิ์ FRAP activity มีความสัมพันธ์เส้นตรงเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทิศทาง

Mae Fah Luang University

ระดับต่ำ (r = 0.338) ผลแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิกอาจเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดจากทั้งส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของว่านสากเหล็กที่สกัดด้วยน้ำได้ปริมาณมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับร้อยละ 8.09±1.78 และ 8.54±0.44 ตามลำดับ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์(TPC และ TFC) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกันพบว่าสารสกัดส่วนเหนือดินที่สกัดด้วยน้ำมีค่า TPC เท่ากับ 0.64±0.02 mg.GAE/ g extract และสารสกัดจากส่วนใต้ดินที่สกัดด้วย ethanol มีค่า TPC สูงที่สุด 1.48±0.04 mg.GAE/ g extract ในขณะTFC จากส่วนเหนือดินที่สกัดด้วย ethyl acetate มีค่า TFC มากที่สุดเท่ากับ 0.64±0.02 mg QE/ g extract และส่วนใต้ดินที่สกัดด้วย ethanol มีค่า TFC มากที่สุดเท่ากับ 0.74±0.07 mg QE/ g extract ($p<0.05$)

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดว่านสากเหล็กพบว่าปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH activity จากสกัดจากส่วนเหนือดินที่สกัดด้วย ethanol มีค่ามากที่สุด เท่ากับ 28.35±0.23 μg AAC/ g extract และส่วนใต้ดินที่สกัดด้วยน้ำมีค่าเท่ากับ 35.43±0.02 μg AAC/ g extract ($p<0.05$) นอกจากนี้ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP assay ของสารสกัดจากส่วนเหนือดิน และส่วนใต้ดินที่สกัดด้วย ethanol มีค่าเท่ากับ14.73±0.60 และ 47.58±1.60 μg AAC/ g extract ตามลำดับ($p<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินที่สกัดด้วยตัวทำละลายเดียวกัน พบว่าสารสกัดจากส่วนใต้ดินมีฤทธิ์อนุมูลอิสระ (DPPH และ FRAP assay) มากกว่าส่วนเหนือดินที่สกัดด้วยตัวทำละลายเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดว่านสากเหล็ก พบว่าสารสกัดจากส่วนเหนือดินที่สกัดด้วย ethyl acetate มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด (11.62±5.64 μg.Kojic acid/ g extract) ส่วนสารสกัดจากส่วนใต้ดินที่สกัดด้วย hexane มีปริมาณฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสมากที่สุดเท่ากับ 7.78±0.43 μg.Kojic acid/ g extract ($p<0.05$)

การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์และฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง TPC ของสารสกัดว่านสากเหล็กมีความสัมพันธ์กับ DPPH และ FRAP assay เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$) โดยทิศทางความสัมพันธ์ระดับปานกลาง (r = 0.633) และ ระดับสูง (r = 0.896) ตามลำดับ นอกจากนี้ความสัมพันธ์ระหว่าง TFC ของสารสกัดว่านสากเหล็ก และฤทธิ์ FRAP activity มีความสัมพันธ์เส้นตรงเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทิศทางระดับต่ำ

Mae Fah Luang University

(r=0.338) ผลแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิกอาจเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสจากว่านสากเหล็กด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และ hexane จากสารสกัดจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน เป็นสารสำคัญที่น่าสนใจควรมีการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมและความเป็นพิษเพื่อสามารถนำไปใช้ในเครื่องสำอางประเภทผิวขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

รายการอ้างอิง

เนตรนภา เมยกลาง และ ดร.เฉลิม เรื่องวิริยะชัย. (2557). การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มน้ำผลไม้. *วารสารวิจัย มข.(บศ.)*, 73-74.

พอใจ รัตนปนัดดา. (2553).การประยุกต์ใช้ไคโตซานในการเตรียมอาร์บูตินไมโครพาร์ติเคิลเพื่อทำให้ผิวขาว.คณะวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม.มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.เชียงใหม่.

มนสิชา ขวัญเอกพันธุ์. 2555. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเของสารสกัดจากส่วนเถาชะเอมไทย. สำนักวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.เชียงราย

มนัสดา ขวัญดำ. (2555). *ศึกษาแคริโอไทป์พืชวงศ์มะพร้าวนกคุ่มบางชนิดในประเทศไทย*. *Thesis* (16-18). Thailand: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Yamashita H., Theerasilp S., Aiuchi T., Nakaya K., Nakamura Y., & Kurihara Y.(1990). Purification and Complete Aimno Acid Sequence of a New Type Sweet Protein with Taste-modifying Activity, *Curculin. Biological Chemistry*, 15770-1577

Huang J., Wang Z.H., Ma X.C., Li G.Y., Niu C, Ma Y.P., & Kasimu R. (2014). Four new phenolic glucosides from Curculigo orchioides Geartn. *Phytochemistry Letters*, 153-157.

Wang K.J., Li N., Di L., & Zhu C.C.(2010). Chemical Constituents from Rhizoes of Curculigo capitulata. *Korean Chem*, 2999-3002.

Ismail M., Ooi D.J., Chan K.W., Sarega N., Alitheen N.B., & Ithnin H. (2016). Bioprospecting the Curculigoside-Cinnamic Acid-Rich Fraction from *Molineria latifolia* Rhizome as a Potential Antioxidant Therapeutic agent. *Molecules*, 1-20.

Mae Fah Luang University

Wisau Thongchai, Boonsom Liawruangrath, & Saisunee Liawruangrath. (2007). High-performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin-whitening creams and medicinal plant exracts. *Journal of Cosmetic Science*, 35-44.

Mae Fah Luang University