5ST-P04: การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของซาโปนินรวมในใบหูกวางสดและใบหูกวางแห้งด้วยเทคนิคฟูเรียทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีและยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี

Qualitative and quantitative analysis of total saponins in fresh and dried leaves of *Terminalia catappa* L. by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and UV-visible spectrophotometry

สุนทรา เฟื่องฟุ้ง[1*] อัญนรา ธรรมขันธ์[1] กาญจนา พิศาภาค[1] และ วรนันธ์ เหล็กเพชร[1]

Suntara Fueangfung[1*], Annara Tummakan[1], Kanjana Pisapak[1] and Woranan Lekphet[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณซาโปนินรวมจากตัวอย่างใบหูกวางแบบสดและใบหูกวางแบบแห้ง ใบหูกวางทั้งสองชนิดเตรียมได้จากการสกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเอทานอลต่อน้ำ (25:75 50:50 และ 75:25 v/v) ด้วยวิธีการแช่ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สารสกัดทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยวิธีลีเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด และเทคนิคฟูเรียทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี จากนั้นวิเคราะห์เชิงปริมาณใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี เพื่อหาตัวทำละลายเหมาะสมที่สุดในการสกัดซาโปนินรวม จากนั้นนำตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดนี้มาศึกษาระยะเวลาที่ดีที่สุดในการสกัด โดยการเพิ่มเวลาการสกัดเป็น 2 3 4 และ 5 ชั่วโมงตามลำดับ ผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพจากการเปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของสารสกัดหยาบตัวอย่างกับสารมาตรฐาน และวิธีลีเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด พบซาโปนินในสารสกัดหยาบจากน้ำ เอทานอล และเอทานอลต่อน้ำ การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างใบหูกวาง พบว่าเอทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 75:25 ที่สกัดในเวลา 1 ชั่วโมง เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดซาโปนินรวมทั้งในใบหูกวางแบบสดและใบหูกวางแบบแห้ง โดยมีปริมาณซาโปนินรวมจากใบหูกวางสดเท่ากับ 3.825±0.011 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด และปริมาณซาโปนินรวมจากใบหูกวางแห้งเท่ากับ 3.972±0.013 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง จากการศึกษาเวลาที่ใช้ในการสกัดโดยใช้เอทานอลต่อน้ำที่ 75:25 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณซาโปนินรวมจากการสกัดตัวอย่างใบหูกวางสดเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ที่เวลา 4 ชั่วโมง ปริมาณที่ได้เท่ากับ 3.901 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ส่วนปริมาณซาโปนินรวมจากการสกัดตัวอย่างใบหูกวางแห้งเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ที่เวลา 2 ชั่วโมง ปริมาณที่ได้อยู่ในช่วง 4.001 -4.002 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

คำสำคัญ: ซาโปนิน หูกวาง ฟูเรียทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ยูวี-วิซิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี

Abstract

The aim of research was to determine the total saponins from fresh leaves samples and dried leaves samples of *Terminalia catappa* L. Both leaves samples were extracted using water, ethanol, and ethanol: water mixture in different proportions (25:75, 50:50, and 75:25, v/v) with maceration technique at 55°C for 1 hour. The extracts were qualitatively analyzed using Liebermann-Burchard test and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). The extracts were quantitatively analyzed using UV-Visible Spectrophotometry to attain the most suitable solvent that could extract the highest amount of the total saponins. Then, the most suitable solvent was used to determine the most suitable extraction time (2, 3, 4, and 5 hours) to obtain the highest amount of the total saponins. The qualitative results by comparing the FT-IR

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

[1] Faculty of Science and Technology Faculty, Rajamangala University of Technology

[*] Corresponding author. Email : suntara.f@rmutsb.ac.th

spectra to the standard saponin and Liebermann-Burchard test showed that all different types of solvents were able to extract the total saponins. The quantitative results indicated that ethanol: water (75:25) was the most suitable solvent for the extraction in 1 hour. The extract of fresh leaves obtained 3.825 ± 0.011 mg of total saponins per 100 g of fresh weight while the extract of the dried leaves gave 3.972 ± 0.013 mg of total saponins per 100 g of dried weight. When the time of the extraction using ethanol: water (75:25) as a solvent was studied, it was found that the most suitable time for the extraction of the fresh samples was 4 hours. The condition yielded 3.901 ± 0.012 mg of total saponins per 100 g of fresh weight. Meanwhile, the most suitable time for the extraction of the dried samples was 3 hour which gave 4.002 ± 0.017 mg of total saponins per 100 g of dried weight.

Keywords: Saponin, *Terminalia catappa* L., Fourier transform infrared spectroscopy, UV-visible spectrophotometry

บทนำ

หูกวาง มีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า *Terminalia catappa* Linn. อยู่ในวงศ์ Combretaceae พบได้ทั่วไปในบริเวณเขตร้อนทวีปเอเชีย ทวีปแอฟริกา และทวีปออสเตรเลีย มีชื่อสามัญอื่น เช่น Tropical Almond, Singapore Almond, Bengal Almond, Umbrella Tree เป็นต้น หูกวางเป็นไม้ยืนต้นผลัดใบสูงประมาณ 30-45 ฟุต ใบเดี่ยวเป็นรูปเรียวไข่สีเขียวสดขนาด 6 × 12 นิ้ว ซึ่งจะกลายเป็นสีแดง สีเหลือง หรือสีม่วงเมื่อเกิดการผลัดใบ ดอกมีลักษณะเป็นช่อเรียวยาวสีขาวยาวประมาณ 6 นิ้ว ผลของหูกวางมีลักษณะคล้ายกับอัลมอนด์ เป็นทรงกลมรี กว้าง 1-2 นิ้ว ยาว 2-3 นิ้ว ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่จะกลายเป็นสีแดงจนถึงสีน้ำตาลคล้ำ (Gilman, & Watson, 1994) หูกวางมีคุณประโยชน์มากมาย ทั้งทางด้านกายภาพในเรื่องการให้ร่มเงา อีกทั้งทุกส่วนของหูกวางมีประโยชน์ทางด้านสมุนไพร อาทิเช่น เปลือกต้นหูกวางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง สามารถยับยั้งการอักเสบ (Lin และ คณะ, 1999) ป้องกันตับจากสารพิษ ยับยั้งไวรัสตับอักเสบ (Chen และคณะ, 2000) ยับยั้งเซลล์มะเร็งและไวรัส HIV (Tan และคณะ, 1991) สารสกัดจากใบหูกวางสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในแหล่งน้ำ (สมจินตนา และ วรวัฒ, 2550) สารสกัดจากผลหูกวางออกฤทธิ์ต้านโรคอ้วน (Nagappa และคณะ, 2003) และสารสกัดจากเมล็ดของผลหูกวางมีฤทธิ์กระตุ้นสมรรถภาพทางเพศในหนู (Ratnasooriya, & Dharmasiri, 2000) เป็นต้น ในปัจจุบันเกษตรกรหรือผู้เลี้ยงปลากัดได้นำใบหูกวางแห้งมาแช่น้ำเพื่อใช้ในการรักษาโรคและแผลในปลากัด (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2560)

ใบหูกวางมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด นอกจากแทนนินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักแล้ว องค์ประกอบที่สำคัญเช่นเดียวกัน คือ ซาโปนิน (Saponins) ซึ่งเป็นสารประเภทไกลโคไซด์ (glycoside) สามารถละลายได้ในน้ำแอลกอฮอล์ร้อน โครงสร้างทั่วไปประกอบด้วยสองส่วน คือ ไกลโคน (Glycone) ซึ่งละลายน้ำได้ดี มีโครงสร้างหลักเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือหลายโมเลกุลต่อกัน ส่วนใหญ่เป็นโมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharides) ได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส แรมโนส อะราบิโนส ไซโลส และฟรุกโตส เป็นต้น (Oleszek และ Hamed, 2010) ส่วนอะไกลโคน (Aglycone) ซึ่งละลายน้ำได้ไม่ดี มีโครงสร้างเป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์ปีนส์ (triterpenes) หรือสเตอรอยด์ (steroids) (Sparg และคณะ, 2004) ซาโปนินมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับสบู่ มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว ทำให้เกิดฟองได้ง่าย นิยมใช้เป็นสารชำระล้างตามธรรมชาติ (Do และคณะ, 2019) มีประโยชน์ในด้านชะลอความแก่ก่อนวัย ทำให้ผิวอ่อนเยาว์ (Anand และคณะ, 2015) เสริมสร้างผิวหนังจากภายใน และลดปัญหาริ้วรอยเหี่ยวย่นที่เกิดขึ้นได้ (Huang และคณะ, 2018) เหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อุปโภคและเครื่องสำอาง จากประโยชน์ของใบหูกวางและซาโปนิน คณะผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาการสกัดซาโปนินรวมจากใบหูกวาง โดยทำการวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณของสารซาโปนินรวมในใบหูกวางสดและใบหูกวางแห้งด้วยเทคนิคฟูเรียทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีและยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี รวมถึงปัจจัยในการสกัดได้แก่ การเลือกใช้ตัวทำละลาย อัตราส่วนของตัวทำละลาย และ

เวลาในการสกัดที่เหมาะสม ซึ่งในงานวิจัยนี้ คณะผู้ทำวิจัยหวังว่าจะสามารถเพิ่มมูลค่าใบหูกวาง และสามารถนำไปต่อยอดในการสกัดและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ได้ต่อไป

วิธีการศึกษา

สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณซาโปนินรวมในตัวอย่างใบหูกวางประกอบด้วยเอทานอล (Ethanol, C_2H_5OH, 95%, AR, RCI Labscan) วานิลลิน (Vanillin, $C_8H_8O_3$, 99%, Sigma-Aldrich) กรดเปอร์คลอริก (Perchloric acid, $HClO_4$, 70-72%, Merck) และสารมาตรฐานซาโปนิน (Saponin, composition 8-25%, Sigma-Aldrich) อุปกรณ์ที่ใช้ได้แก่ เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ยี่ห้อ Bruker รุ่น Tensor 27 เครื่อง spectrophotometer ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น GENESYS 10S UV-Vis เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) ยี่ห้อ Buchi รุ่น R-205 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) ไมโครปิเปต (micropipette) ตู้อบลมร้อน เครื่องชั่ง อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

การเตรียมตัวอย่างใบหูกวางแบบสดและแบบแห้ง

นำใบหูกวางที่เก็บจากอำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา มาล้างทำความสะอาดและเช็ดให้แห้ง การเตรียมตัวอย่างใบหูกวางแบบสด นำใบหูกวางแบบสดมาหั่นให้เป็นชิ้นละเอียด ควรใส่ถุงมือขณะเตรียมตัวอย่าง และรักษาความสะอาดเพื่อป้องกันการปนเปื้อน และเก็บใส่ถุงซิปล็อคเพื่อรอนำไปสกัดต่อไป สำหรับการเตรียมตัวอย่างใบหูกวางแบบแห้ง นำใบหูกวางแบบสดที่ทำความสะอาดแล้ว ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำออกจากตู้อบตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง บดให้ละเอียด และเก็บใส่ถุงซิปล็อคเพื่อรอนำไปสกัดในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดซาโปนินรวม

ตัวอย่างของใบหูกวางแบบสดและแบบแห้งที่นำมาสกัด ได้ถูกดัดแปลงมาจากวิธีของ Deore และคณะ (2015) และวิธีของ Sasikala และคณะ (2019) โดยชั่งตัวอย่างใบหูกวาง 5.0 กรัม ผสมกับตัวทำละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปสกัดโดยการแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ เอทานอล น้ำ และเอทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 75:25, 50:50 และ 25:75 ตามลำดับ กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยสกัดตัวทำละลายละ 3 ซ้ำ จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) จนได้สารสกัดหยาบ

การวิเคราะห์ซาโปนินรวมเชิงคุณภาพด้วยวิธีลีเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพดำเนินการทดสอบได้ด้วยวิธีลีเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด (Liebermann-Burchard test) ซึ่งดัดแปลงมาจากอภิรดี และคณะ (2560) โดยปิเปตต์สารสกัดหยาบ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายวานิลลินในเอทานอล เข้มข้นร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร แล้วทำปฏิกิริยากับกรดเปอร์คลอริก 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สังเกตสีที่ได้

การวิเคราะห์ซาโปนินรวมเชิงคุณภาพด้วยเทคนิคฟูเรียทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

นำสารสกัดหยาบมาวิเคราะห์ซาโปนินรวมเชิงคุณภาพด้วยเครื่อง FT-IR โดยใช้เลขคลื่นที่อยู่ในช่วง 4000-400 cm^{-1} จากนั้นแปลผลหมู่ฟังก์ชันในสเปกตรัมที่ได้ เปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารมาตรฐานซาโปนิน

การวิเคราะห์ซาโปนินรวมเชิงปริมาณด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี

ปิเปตต์สารสกัดหยาบ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร แล้วเจือจางและปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตรเป็น 10.0 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตต์สารละลายข้างต้นมา 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมสารละลายวานิลลินในเอทานอล เข้มข้นร้อยละ 8 โดยมวลต่อปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร แล้วทำปฏิกิริยากับกรดเปอร์คลอริก 1.0 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายข้างต้นมาแช่น้ำเย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร แล้ววิเคราะห์หาปริมาณซาโปนินรวมเทียบกับกราฟมาตรฐานซาโปนิน

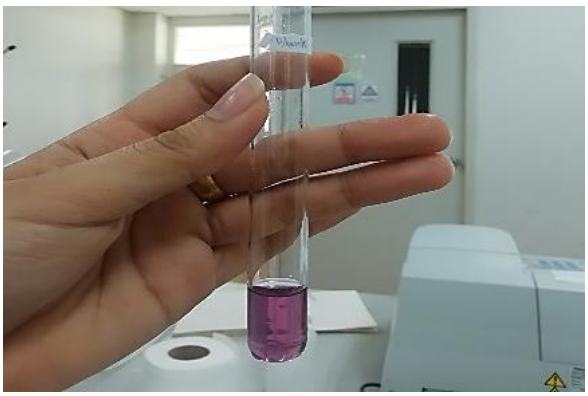
การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดซาโปนินรวม

จากผลการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดซาโปนินรวม จะนำมาศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดซาโปนินรวมด้วยวิธีการเดียวกันกับการศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยการเพิ่มเวลาเป็น 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ ทำการสกัด 3 ซ้ำ แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณซาโปนินรวมเทียบกับกราฟมาตรฐานซาโปนินต่อไป

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

การวิเคราะห์ซาโปนินรวมเชิงคุณภาพด้วยวิธีลีเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด

เมื่อนำสารมาตรฐานซาโปนินมาวิเคราะห์ซาโปนินรวมเชิงคุณภาพด้วยวิธีลีเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด พบว่าเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีม่วงแดง ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงแดงของสารมาตรฐานซาโปนินด้วยวิธีลีเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด

เมื่อนำสารสกัดหยาบใบหูกวางสดและใบหูกวางแห้งมาวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยวิธีเดียวกัน พบว่าสารสกัดหยาบทั้งจากใบหูกวางสดและใบหูกวางแห้งทั้งหมดเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงแดง ดังตารางที่ 1 จากผลการทดสอบ

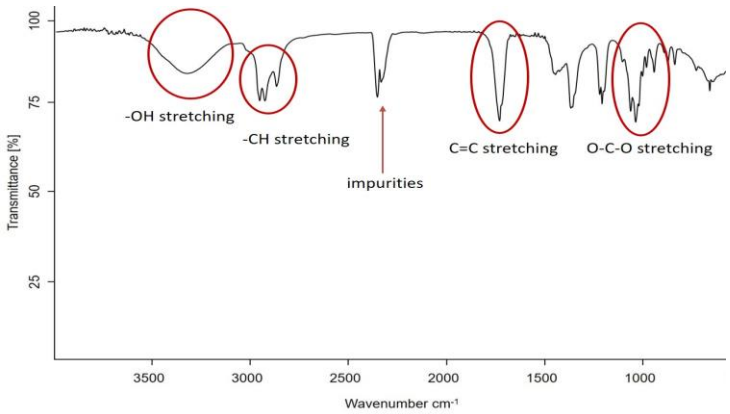
สามารถบอกได้ว่าในสารสกัดหยาบทั้งหมดมีซาโปนินเป็นองค์ประกอบ โดยอยู่ในประเภทของไตรเทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน (Triterpenoid saponins) (Pooja และคณะ, 2016)

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ซาโปนินรวมเชิงคุณภาพด้วยวิธีลีเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ดในสารสกัดใบหูกวางในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ตัวอย่าง	ชนิดตัวทำละลาย	ผลการวิเคราะห์ซาโปนินรวมเชิงคุณภาพด้วยวิธีลีเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด
ใบหูกวางสด	เอทานอล	+
	เอทานอล : น้ำ 75:25	+
	เอทานอล : น้ำ 50:50	+
	เอทานอล : น้ำ 25:75	+
	น้ำ	+
ใบหูกวางแห้ง	เอทานอล	+
	เอทานอล : น้ำ 75:25	+
	เอทานอล : น้ำ 50:50	+
	เอทานอล : น้ำ 25:75	+
	น้ำ	+

หมายเหตุ: + คือ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงแดง

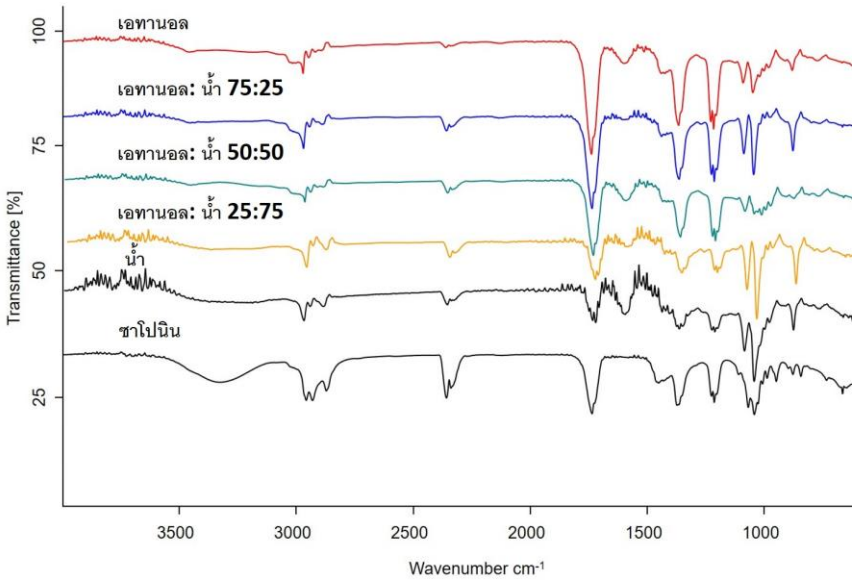
การวิเคราะห์ซาโปนินรวมเชิงคุณภาพด้วยเทคนิคฟูเรียทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี



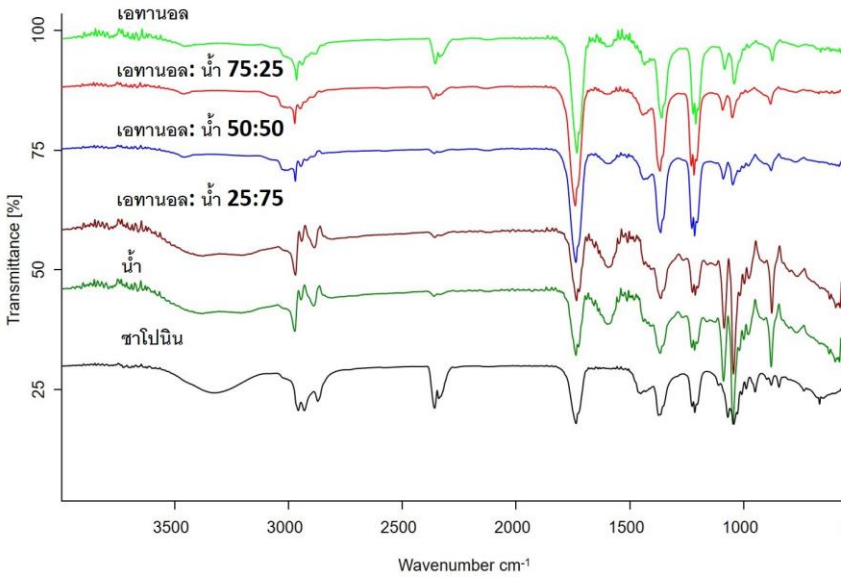
ภาพที่ 2 FT-IR สเปกตรัมของสารมาตรฐานซาโปนินที่เลขคลื่นที่อยู่ในช่วง 4000-400 cm^{-1}

เมื่อนำสารมาตรฐานซาโปนินมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟูเรียทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ได้สเปกตรัมปรากฏดังภาพที่ 2 ซึ่งพบตำแหน่งที่สำคัญที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bajad และคณะ (2019) และเป็นลักษณะเฉพาะของสารซาโปนิน ได้แก่ O-H stretching ในช่วง 3500-3100 cm^{-1} C-H stretching ในช่วง 3000-2800 cm^{-1} C=C stretching ที่ 1600 cm^{-1} และ O-C-O stretching ระหว่าง 1020-1000 cm^{-1} ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดหยาบใบหู

กวางสดและสารสกัดหยาบใบหูกวางแห้งมาทำการวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิคฟูเรียทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ได้สเปกตรัมของสารสกัดหยาบใบหูกวางสดและสารสกัดหยาบใบหูกวางแห้ง ดังแสดงในภาพที่ 3 และ ภาพที่ 4 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานซาโปนิน พบว่าทั้งสารสกัดหยาบใบหูกวางสดและสารสกัดใบหูกวางแห้งมีโอกาสพบซาโปนิน เนื่องจากตำแหน่งที่สำคัญในสเปกตรัมปรากฏในลักษณะที่ใกล้เคียงกันกับสารมาตรฐาน



ภาพที่ 3 FT-IR สเปกตรัมของของสารสกัดหยาบใบหูกวางสดในตัวทำละลายชนิดต่างๆ เทียบกับสารมาตรฐาน



ภาพที่ 4 FT-IR สเปกตรัมของของสารสกัดหยาบใบหูกวางแห้งในตัวทำละลายชนิดต่างๆ เทียบกับสารมาตรฐาน

การศึกษาอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดซาโปนินรวม

ตารางที่ 2 ปริมาณซาโปนินรวมของสารสกัดใบหูกวางในอัตราส่วนตัวทำละลายต่าง ๆ

ตัวอย่าง	ชนิดตัวทำละลาย	ปริมาณซาโปนินรวม (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักตัวอย่าง)
ใบหูกวางสด	เอทานอล	3.812 ± 0.013
	เอทานอล:น้ำ 75:25	**3.825 ± 0.011**
	เอทานอล:น้ำ 50:50	3.672 ± 0.013
	เอทานอล:น้ำ 25:75	3.372 ± 0.017
	น้ำ	3.218 ± 0.012
ใบหูกวางแห้ง	เอทานอล	3.956 ± 0.014
	เอทานอล:น้ำ 75:25	**3.972 ± 0.013**
	เอทานอล:น้ำ 50:50	3.675 ± 0.011
	เอทานอล:น้ำ 25:75	3.504 ± 0.015
	น้ำ	3.463 ± 0.019

จากการวิเคราะห์ซาโปนินรวมเชิงปริมาณเพื่ออัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดใบหูกวางสดและใบหูกวางแห้ง โดยใช้ตัวทำละลายในอัตราส่วนต่าง ๆ ผลแสดงดังตารางที่ 2 พบว่าตัวทำละลายต่างๆ ที่ใช้ในการสกัดซาโปนินรวมจากตัวอย่างใบหูกวางสดและตัวอย่างใบหูกวางแห้งได้ผลที่ใกล้เคียงกัน โดยเอทานอล:น้ำ 75:25 สามารถสกัดซาโปนินรวมจากตัวอย่างใบหูกวางสดได้สูงสุดเท่ากับ 3.825 ± 0.011 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด และสามารถสกัดซาโปนินรวมจากตัวอย่างใบหูกวางแบบแห้งได้มากที่สุดเท่ากับ 3.972 ± 0.013 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งการใช้ตัวทำละลายดังกล่าวมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Sasikala และคณะ (2019) ในการสกัดซาโปนินจาก *Tribulus terristris* โดยใช้เอทานอล:น้ำ 70:30 ซึ่งให้ประสิทธิภาพสูงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายผสมเอทานอลกับน้ำในอัตราส่วนอื่น อันเนื่องมาจากน้ำในปริมาณที่เหมาะสม นอกจากจะช่วยในการละลายของซาโปนินแล้ว ยังช่วยให้ตัวทำละลายสามารถซึมลึกเข้าไปในเมทริกซ์ของพืชได้ง่าย และทำให้ซาโปนินเข้าสู่ตัวทำละลายสกัดได้มากขึ้น

การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดซาโปนินรวม

การวิเคราะห์ปริมาณซาโปนินรวมโดยใช้เอทานอล:น้ำ 75:25 เป็นตัวทำละลายในการสกัดใบหูกวางทั้งแบบสดและแบบแห้งที่ระยะเวลาในการสกัดต่างกันได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3 พบว่าปริมาณซาโปนินรวมที่ได้จากการสกัดตัวอย่างใบหูกวางสดและใบหูกวางแห้งได้ผลที่ไม่ต่างกัน ปริมาณซาโปนินรวมจากการสกัดตัวอย่างใบหูกวางแบบสดเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ที่เวลา 4 ชั่วโมง ปริมาณที่ได้เท่ากับ 3.901 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ส่วนปริมาณซาโปนินรวมจากการสกัดตัวอย่างใบหูกวางแบบแห้งเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ที่เวลา 2 ชั่วโมง ปริมาณที่ได้อยู่ในช่วง 4.001-4.002 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ดังนั้นตัวอย่างใบหูกวางแบบแห้งใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่า

ตัวอย่างใบหูกวางสด อันเนื่องมาจากตัวอย่างใบหูกวางสดยังคงมีน้ำ คลอโรฟิลล์ และองค์ประกอบอื่น ทำให้ตัวทำละลายเข้าไปสกัดได้ช้ากว่าการสกัดตัวอย่างแบบแห้ง

ตารางที่ 3 ปริมาณซาโปนินรวมของสารสกัดใบหูกวางโดยใช้ เอทานอล:น้ำ 75:25 เป็นตัวทำละลายในเวลาแตกต่างกัน

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณซาโปนินรวม (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักตัวอย่าง)
ใบหูกวางสด	เอทานอล:น้ำ 75:25	1	3.825 ± 0.011
		2	3.850 ± 0.010
		3	3.891 ± 0.012
		4	3.901 ± 0.012
		5	3.901 ± 0.011
ใบหูกวางแห้ง	เอทานอล:น้ำ 75:25	1	3.972 ± 0.013
		2	4.001 ± 0.011
		3	4.002 ± 0.017
		4	4.002 ± 0.014
		5	4.002 ± 0.013

สรุป

จากการสกัดตัวอย่างใบหูกวางสดและใบหูกวางแห้งด้วย น้ำ เอทานอล และน้ำผสมเอทานอลในอัตราส่วนต่างๆ เมื่อนำมาวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพด้วยวิธีลีเบอร์แมนน์-เบอร์ชาร์ด และเทคนิค FT-IR เทียบกับสารมาตรฐาน พบว่าสามารถสกัดมีซาโปนินรวมเป็นองค์ประกอบ เมื่อทำศึกษาตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัด พบว่าการสกัดโดยใช้เอทานอลและน้ำ 75:25 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สามารถสกัดซาโปนินรวมจากตัวอย่างใบหูกวางสดและตัวอย่างใบหูกวางแห้งได้มากที่สุดเท่ากับ 3.825 ± 0.011 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด และ 3.972 ± 0.013 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากนั้นนำเอทานอลและน้ำ 75:25 มาศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดซาโปนินรวมจากตัวอย่างใบหูกวางสดและตัวอย่างใบหูกวางแห้ง ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณซาโปนินรวมจากการสกัดตัวอย่างใบหูกวางสดเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ที่เวลา 4 ชั่วโมง ปริมาณที่ได้เท่ากับ 3.901 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ส่วนปริมาณซาโปนินรวมจากการสกัดตัวอย่างใบหูกวางแห้งเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ที่เวลา 2 ชั่วโมง ปริมาณที่ได้อยู่ในช่วง 4.001-4.002 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งงานวิจัยนี้มีส่วนช่วยเพิ่มมูลค่าใบหูกวางให้มากยิ่งขึ้น อีกทั้งสามารถนำไปพัฒนาและแปรรูปให้เป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ต่อไปได้ในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และ หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

สมจินตนา พุทธมาตย์ และ วรวัฒ สุวรรณสาร. (2550). การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบหูกวาง (*Terminalia catappa* L.) และผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำและการยับยั้งแบคทีเรียในน้ำ. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45: สาขาพืช*, 579-585.

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (2560). *ใบหูกวางกับการรักษาโรคในปลากัด*. สืบค้น 3 กุมภาพันธ์ 2564 , จาก https://www3.rdi.ku.ac.th/?p=38122.

อภิรดี กอร์ปไพบูลย์, อรวินทินี ชูศรี และศิริพร เต็งรัง. (2560). การพัฒนาวิธีการสกัดสารซาโปนินจากเปลือกเงาะและการทดสอบประสิทธิภาพของสารซาโปนิน. *วารสารวิชาการเกษตร*, *35*(1), 60-73.

Anand, A. V.; Divya, N.; Kotti, P. P. (2015). An updated review of *Terminalia catappa*. *Pharmacognosy Reviews*, *9*(18), 93-98.

Bajad, P. N.; Pardeshi, A.B.; Pagore, V. P. Anand, A. V.(2019). Extraction, isolation and quantification of saponin from *Dodonaea viscosa* JACQ. *The Pharma Innovation Journal*, *8*(5), 41-44.

Chen, P. S.; Li, J. H.; Liu, T. Y.; Lin, T. C. (2000). Folk Medicine *Terminalia catappa* and Its Major Tannin Component, Punicalagin, are Effective Against Bleomycin-induced Genotoxicity in Chinese Hamster Ovary Cells. *Cancer Letters*, *52*, 115-122.

Do, D. N.; Dang, T. T.; Le, Q. T.; Lam, T. D.; Bach, L. G.; Nguyen, D. C.; Toan, T. Q. (2019). Extraction of saponin from gleditsia peel and applications on natural dishwashing liquid detergent. *Materialstoday: Proceeding*, *18*(7), 5219-5230.

Deore, S. L.; Baviskar, S. A.; Rangari, A. S. (2015). Rapid and high yield Extraction method for Saponins from *Safed musli*. *Pharmacognosy Journal*, *7*(4), 210-214.

Gilman, E. F.; Watson, D. G. (1994). *Terminalia catappa* Tropical-Almond. Fact Sheet ST-626. Retrieved 1 Febuary 2021, from http://hort.ufl.edu/trees/tercata.pdf

Huang, Y-. H.; Wu, P-. Y.; Wen, K-. C.; Lin, C. Y.; Chiang, H. M. (2018). Protective effects and mechanisms of *Terminalia catappa* L. methenolic extract on hydrogen-peroxide-induced oxidative stress in human skin fibroblasts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *18*(266), 1-9.

Nagappa, A. N.; Thakurdesai, P. A.; Venkat, R., N.; Singh, J. (2003). Antidiabetic Activity of *Terminalia catappa* Linn Fruits. *Journal of Ethnopharmarcology* ,*88*,45-50.

Lin, C. C.; Hsu, Y. F.; Lin, T. C. (1999) Effects of Punicaligin and Punicalin Oncarrageenan–induced Inflammation in Rats. *The American Journal of Chinese Medicine*. *27*(3-4), 371-376.

Oleszek, W.; Hamed, A. (2010). Saponin-based Surfactants. In: Kjellin, M. & Johansson, I. (Eds.), *Surfactants from Renewable Sources Resources*. (pp. 239-249). Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.

Pooja, S.; Vidyasagar G. M. (2016). Phytochemical screening for secondary metabolites of *Opuntia dillenii* Haw. *Journal of Medicinal Plants Studies*. *4*(5), 39-43.

Ratnasooriya, W., D.; Dharmasiri, M. G. (2000). Effects of *Terminalia catappa* Seeds on Sexual Behavior and Fertility of Male Rats. *Asian Journal of Andrology*. *2*, 213-226.

Sasikala, W.; Manasa, P.; Mohan, R. S. V. B.; Vangalapati, M. (2018). Extraction of Effective Phytochemical-Saponin From Herbal Plant *Tribulus Terristris*. *International Journal of Engineering Research & Technology*. *7*(12), 232-237.

Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. *94*, 219-243.

Tan, G. T.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D.; Hughes, S. H. (1991). Evaluation of Natural Products as Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Reverse Transcriptase. *Journal of Natural Products*. *54*(1), 143-154.