มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนวิจัยหมวดเงินอุดหนุน (ว.1)

ประจำปีงบประมาณ.....2561.....

เรื่อง

การพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางธรรมชาติจากทรัพยากรพืชในป่าเต็งรังพื้นที่ มจธ. ราชบุรี

Development of Natural Cosmeceutical Products from Plant Resources in Dry Dipterocarp Forest at KMUTT, Ratchaburi Campus

คณะผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล ผศ.ดร. พรพรรณ สิระมนต์ หัวหน้าโครงการ
สังกัด ศูนย์บริการทางการศึกษาราชบุรี มจธ. ราชบุรี

ชื่อ-สกุล ผศ.ดร. วิชาญ เอียดทอง ผู้ร่วมโครงการ
สังกัด ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ชื่อ-สกุล ผศ.ดร. ธิติมา วงษ์ชีรี ผู้ร่วมโครงการ
สังกัด สำนักวิจัยและบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มจธ. บางมด

ชื่อ-สกุล ผศ.ดร. รัตติยา แววนุกูล ผู้ร่วมโครงการ
สังกัด คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มจธ. บางขุนเทียน

เดือน....มิถุนายน.....พ.ศ....2563.....

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการสำรวจ และรวบรวมตัวอย่างพืชสมุนไพรจำนวน 9 ชนิด จากป่าเต็งรังภายในรัศมี 50 กิโลเมตร รอบ มจธ. ราชบุรี เพื่อคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพจำนวน 5 ชนิด สำหรับสกัดใช้เป็นสารสำคัญในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผลิตภัณฑ์ดูแลผิวพรรณ และกลุ่มผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผม ในการศึกษาเพื่อคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพนั้น จะเริ่มจากการสกัดตัวอย่างโดยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดตัวอย่างพืชแต่ละชนิด โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของเอทานอลที่ 3 ระดับ คือ 50% 70% และ 95% (v/v) และทำการสกัดตัวอย่างที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ที่สกัดได้จากสภาวะต่างๆ จากนั้นจึงทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบที่ได้โดยวิธี DPPH และ ABTS และเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระกับสารมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT) และ Alpha-tocopherol (Vitamin E) จากผลการศึกษาพบว่า การสกัดตัวอย่างพืชจำนวน 7 ตัวอย่าง ได้แก่ กระทือ (เหง้า) ต้นสามสิบ (ราก) เปราะหอม (เหง้า) ว่านนางคำ (เหง้า) ขมิ้นอ้อย (เหง้า) ปอเต่าไห้ (ใบ, เปลือกลำต้น) และน้อยหน่า (ใบ) โดยใช้ตัวทำละลาย 50% (v/v) เอทานอล สามารถให้ผลผลิตสารสกัด และปริมาณฟีนอลิกที่สกัดได้สูงสุด ส่วน 70% (v/v) เอทานอล เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด หญ้าพังโหม (ใบ) และหมีเหม็น (ใบ) เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากตัวทำละลายที่เหมาะสมของพืชแต่ละชนิด พบว่าสารสกัดตัวอย่างทั้งหมดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารมาตรฐาน BHT และ Vitamin E จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากพืชแต่ละชนิด สามารถคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพสำหรับนำมาผลิตสารออกฤทธิ์ทางเวชสำอางได้จำนวน 5 ชนิด คือ ว่านนางคำ (เหง้า) หญ้าพังโหม (ใบ) หมีเหม็น (ใบ) ปอเต่าไห้ (ใบ) และน้อยหน่า (ใบ) จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของสารสกัดหยาบที่ได้จากพืชแต่ละชนิดด้วยเครื่อง Liquid Chromatography - Mass Spectrometer (LC-MS)

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เวชสำอาง ป่าเต็งรัง องค์ประกอบหลัก สารประกอบฟีนอลิก ราชบุรี

ABSTRACT

On this research, 9 plant samples were collected from dry dipterocarp forest, 50 km radiant area around KMUTT Ratchaburi campus**.** Focus on searching for the effective plants and method to extract better potential plant to use as active ingredients for skin care and hair products**.** The preliminary research is screening and selecting the effective plant samples based on the extracts that give high of both phenolic contents and antioxidant activities which are considered to be attributes of potential cosmetic efficacy plants. In the extraction study, the plant samples were soaked with 3 different concentrations of ethanol [50% (v/v), 70% (v/v) and 95% (v/v)] at 30 °C for 72 hours for determine the most effective solvent concentration for extraction of each plant sample. Total phenolic contents of crude extracts from each extraction condition were evaluated by folin-ciocalteu colorimetric method. Furthermore, the antioxidant activities of crude extracts from the optimal extraction condition were further investigated by comparing the two most common radical scavenging assays namely, the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). The results found that the crude extracts exhibited a medium to low antioxidant activities comparing to the commercial chemical, Butylated hydroxytoluene (BHT) and Alpha-tocopherol (Vitamin E). From the results of total phenolic contents and antioxidant activity tests, It was concluded that 5 potential samples which gave both high phenolic contents and antioxidant activity were: *Curcuma aromatica* (rhizome), *Paederia pilifera Hook. f.* (leaves), *Litsea glutinosa* (leaves), *Enkleia siamensis* (leaves) and *Annona squamosa* (leaves). The major constituents of crude extracts from each plant samples were further determined by Liquid Chromatography Mass - Spectrometer (LC-MS).

Keywords: Antioxidant activity, Cosmeceuticals, Dry Dipterocarp Forest, Major constituents, Phenolic compounds, Ratchaburi

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีที่ได้สนับสนุนงบประมาณสำหรับการดำเนินงานวิจัย ซึ่งเป็นทุนวิจัยหมวดเงินอุดหนุนที่ได้รับการจัดสรรจากรัฐ และขอขอบคุณศูนย์บริการทางการศึกษาราชบุรี (มจธ. ราชบุรี) ที่ได้อำนวยความสะดวกในการใช้พื้นที่ และเครื่องมือต่างๆ สำหรับการศึกษาวิจัย

คณะผู้วิจัย

8 มิถุนายน 2563

สารบัญ

หน้า

บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ทฤษฎี / แนวความคิดที่ในการทำวิจัย	3
วิธีดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัย	7
สรุปและเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง	26

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สรุปรายชื่อพืชที่ได้ทำการรวบรวมเพื่อศึกษา 9

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณผลผลิตสารสกัด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) โดยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบที่ได้โดยวิธีการแช่ตัวอย่างในตัวทำละลาย 11

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณผลผลิตสารสกัด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) โดยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบที่ได้โดยวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค 12

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณผลผลิตสารสกัด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) โดยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบโดยวิธี Soxhlet 14

ตารางที่ 5 แสดงผลการสกัดตัวอย่างพืชที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมจากการสกัด 3 วิธี 15

ตารางที่ 6 แสดงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างพืชแต่ละชนิด 16

ตารางที่ 7 สรุปองค์ประกอบหลักที่พบในสารสกัดหยาบของพืชแต่ละชนิด 25

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 การลงพื้นที่สำรวจ และประเมินศักยภาพพืชในป่าเต็งรังร่วมกับผู้เชี่ยวชาญ 7

ภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพืช 8

ภาพที่ 3 แสดง HPLC chromatograms และ Mass spectra ของ peaks ในช่วงเวลาต่างๆ ของสารสกัดหยาบว่านนางคำ (เหง้า) 18

ภาพที่ 4 แสดง HPLC chromatograms และ Mass spectra ของ peaks ในช่วงเวลาต่างๆ ของสารสกัดหยาบหญ้าพังโหม (ใบ) 20

ภาพที่ 5 แสดง HPLC chromatograms และ Mass spectra ของ peaks ในช่วงเวลาต่างๆ ของสารสกัดหยาบหมีเหม็น (ใบ) 21

ภาพที่ 6 แสดง HPLC chromatograms และ Mass spectra ของ peaks ในช่วงเวลาต่างๆ ของสารสกัดหยาบปอเต่าไห้ (ใบ) 23

ภาพที่ 7 แสดง HPLC chromatograms และ Mass spectra ของ peaks ในช่วงเวลาต่างๆ ของสารสกัดหยาบน้อยหน่า (ใบ) 24

บทนำ

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เวชสำอาง (cosmeceuticals) ได้รับความสนใจจากผู้บริโภคในวงกว้าง เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่รวมคุณสมบัติของเครื่องสำอาง (cosmetics) และยา (phamaceuticals) ไว้ด้วยกัน ซึ่งผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนี้จัดเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทใหม่ของวงการอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และมีความต้องการสูงในตลาดโลก โดยเวชสำอางเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถออกฤทธิ์หรือทำให้มีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดกว่าเครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ที่จัดเป็นเวชสำอางจะไม่เน้นเรื่องการเสริมความงาม แต่จะให้ความสำคัญในเรื่องของประสิทธิภาพในการรักษาปัญหาเฉพาะจุด (ธนภร, 2552) ซึ่งในปัจจุบันผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศให้ความสนใจในการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์เวชสำอางกันมากขึ้น ทำให้กลุ่มผลิตภัณฑ์นี้มีแนวโน้มการเติบโตอย่างรวดเร็ว ศูนย์วิจัยกสิกรไทย (2547) รายงานว่า ผลิตภัณฑ์เวชสำอางมีการเติบโตถึง 30% และมีมูลค่ากว่า 2,000 ล้านบาท โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เวชสำอางธรรมชาติ (natural cosmeceuticals) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีส่วนผสมของสารสังเคราะห์ ไม่มีการใช้วัตถุดิบที่ปนเปื้อนหรือตัดแต่งพันธุกรรม รวมทั้งไม่มีการใช้สัตว์ทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพและอาการแพ้ที่เกิดจากการใช้ผลิตภัณฑ์ สำหรับประเทศไทยอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เวชสำอางนั้นมีความน่าสนใจและมีทิศทางอนาคตที่สดใสเนื่องจากประเทศไทยมีความได้เปรียบในแง่ของความหลากหลาย และความอุดมสมบูรณ์ของวัตถุดิบประเภทพืชสมุนไพรที่สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางชนิดต่างๆ ได้ ซึ่งการวิจัยและพัฒนาเพื่อยกระดับมาตรฐานการผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์เวชสำอางนั้นมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้นั้นได้รับการยอมรับในระดับสากล (อัศวชัย และคณะ, 2553)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (มจธ.) พื้นที่การศึกษาราชบุรี ตั้งอยู่ในตำบลรางบัว อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี นั้นอยู่บนพื้นที่สวนป่าเต็งรังเดิมครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 21 ไร่ และบริเวณโดยรอบมหาวิทยาลัยก็แวดล้อมไปด้วยระบบนิเวศของป่าเต็งรัง ซึ่ง มจธ. ร่วมกับสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (2551) ได้ทำการสำรวจทรัพยากรพืชในป่าเต็งรังบริเวณพื้นที่โดยรอบ มจธ. ราชบุรี พบว่ามีพืชหลายชนิดที่กลุ่มชนพื้นบ้านได้มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านการสมานแผล การรักษา และบำรุงผิวพรรณหรือเส้นผม ดังเช่น กระพังโหม ต้นสามสิบ ขมิ้นต้น เปราะหอม ว่านนางคำ หมีเหม็น มะหาด เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติของพืชสมุนไพรเหล่านี้เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอาง รวมทั้งจะเป็นการสร้างประโยชน์ได้อย่างมากเมื่อมีการถ่ายทอดองค์ความรู้ และเทคโนโลยีจากงานวิจัยนี้แก่ชุมชนในพื้นที่โดยรอบ

สำหรับงานวิจัยนี้ทางคณะผู้วิจัยจะทำการสำรวจ และรวบรวมตัวอย่างพืชสมุนไพรจากป่าเต็งรังภายในรัศมี 50 กิโลเมตร รอบ มจธ. ราชบุรี และคัดเลือกตัวอย่างพืชที่มีศักยภาพจำนวน 5 ชนิด เพื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชตัวอย่าง รวมทั้งการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักในสารสกัดที่ได้ และทำการแยกสารออกฤทธิ์จากพืชตัวอย่างเพื่อใช้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผลิตภัณฑ์ดูแลผิวพรรณ และกลุ่มผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผม จำนวน 3 ผลิตภัณฑ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสนองพระราชดำริ อพ.สธ.
2. เพื่อพัฒนาพืชสมุนไพรเฉพาะถิ่นในป่าเต็งรังพื้นที่ มจธ. ราชบุรี ที่มีศักยภาพจำนวน 5 ชนิด ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางเวชสำอาง และการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใน 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มดูแลผิวพรรณ และกลุ่มดูแลเส้นผม จำนวน 3 ผลิตภัณฑ์ ที่ผ่านตามมาตรฐาน มอก. เอส
3. เพื่อทราบองค์ประกอบหลักในสารสกัดที่ได้จากพืชแต่ละชนิด
4. เพื่อทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้สำหรับการใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์ทั้งสองกลุ่ม
5. เพื่อให้ได้องค์ความรู้ และเทคโนโลยีการผลิตสารออกฤทธิ์ รวมถึงกระบวนการพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางจากพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพ

ทฤษฎี / แนวความคิดที่ในการทำวิจัย

ป่าเต็งรัง (dry dipterocarp forest) พบมากในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมทั้งทางภาคตะวันตกของประเทศบริเวณจังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ป่าชนิดนี้จะพบได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับพื้นที่ป่าชนิดอื่นๆ (สำนักงานหอพรรณไม้ฯ, 2552) และพบว่ากลุ่มชนพื้นบ้านมีความผูกพันกับป่าในการดำรงชีวิตอย่างมาก ก่อเกิดภูมิปัญญาต่างๆ ที่สืบทอดจากบรรพบุรุษในการใช้ประโยชน์จากป่าในการดำรงชีวิตประจำวัน จิตรวนาและคณะ (2555) ทำการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชุมชนบ้านบ่อหวี อำเภอสวนผึ้ง จ.ราชบุรี พบว่ามีการใช้ประโยชน์จากพืชจำนวน 221 ชนิด โดยใช้ประโยชน์ในแง่ของพืชสมุนไพรมากที่สุดจำนวน 136 ชนิด รองลงมาคือ พืชอาหาร 90 ชนิด และเครื่องสำอางจำนวน 6 ชนิด ใน 4 วงศ์ ได้แก่ Mimosaceae Rutaceae Annonaceae และ Cucubitaceae

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (มจธ.) พื้นที่การศึกษาราชบุรี ตั้งอยู่ในตำบลรางบัว อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี นั้นอยู่บนพื้นที่สวนป่าเต็งรังเดิมครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 21 ไร่ และบริเวณโดยรอบมหาวิทยาลัยก็แวดล้อมไปด้วยระบบนิเวศของป่าเต็งรัง ซึ่ง มจธ. ร่วมกับสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (2551) ได้ทำการสำรวจทรัพยากรพืชในป่าเต็งรังบริเวณพื้นที่โดยรอบ มจธ. ราชบุรี ซึ่งมีรายงานการใช้ประโยชน์จากภูมิปัญญาชาวบ้านของพืชที่น่าสนใจในการใช้เพื่อสมานแผล การรักษา และบำรุงผิวพรรณ หรือเส้นผม ซึ่งแบ่งเป็นได้ดังนี้

(1) กลุ่มพืชสมุนไพรเพื่อการใช้ประโยชน์ทางด้านการรักษา และบำรุงผิวพรรณ ได้แก่
- เปราะป่า [*Kaempferia roscoeana* Wall.] : เป็นพืชไม้ล้มลุกในวงศ์ Zingiberaceae (วงศ์เดียวกับ ขิง ข่า กระทือ และไพล แต่ต่างสกุลกัน) มีรายงานการใช้ประโยชน์ของเหง้าจากพืชชนิดนี้ในการรักษา และบำรุงผิวพรรณ
- กระพังโหม [*Paederia foetida* Linn.] : เป็นพืชไม้เถาเลื้อยในวงศ์ Rubiaceae มีรายงานการใช้ประโยชน์จากทุกส่วนของพืชชนิดนี้ในการรักษา และบำรุงผิวพรรณ
- เครือหมาน้อย [*Cissampelos pareira*] : เป็นพืชไม้เถาเลื้อยในวงศ์ Menispermaceae มีรายงานการใช้ประโยชน์จากราก และใบของพืชชนิดนี้ในการรักษา และบำรุงผิวพรรณ
- ต้นสามสิบ [*Asparagus racemosus* Willd.] : เป็นพืชไม้เถาเลื้อยในวงศ์ Asparagaceae มีรายงานการใช้ประโยชน์จากรากของพืชชนิดนี้ในการรักษา และบำรุงผิวพรรณ
- กระแจะ [*Naringi crenulata* (Roxb.) Nicolson] : เป็นไม้พุ่มกึ่งยืนต้นในวงศ์ Rutaceae มีรายงานการใช้ประโยชน์จากทุกส่วนของพืชชนิดนี้ในการรักษา และบำรุงผิวพรรณ
- ขมิ้นต้น [*Metadina trichotoma (*Zoll. ex Merr.) Bakh. F.] : เป็นไม้ยืนต้นในวงศ์ Rubiaceae มีรายงานการใช้ประโยชน์จากแก่นไม้ของพืชชนิดนี้ในการรักษา และบำรุงผิวพรรณ
- มะหาด [*Artocarpus lakoocha*] : เป็นไม้ยืนต้นในวงศ์ Moraceae มีรายงานการใช้ประโยชน์จากแก่นไม้ของพืชชนิดนี้ในการรักษา และบำรุงผิวพรรณ

(2) กลุ่มพืชสมุนไพรเพื่อการใช้ประโยชน์ทางด้านการรักษา และบำรุงเส้นผม ได้แก่
- เคด [*Catunaregum spathulifolia* Tirveng.] : เป็นไม้พุ่มในวงศ์ Rubiaceae มีรายงานการใช้ประโยชน์จากผลของพืชชนิดนี้ในการรักษา และบำรุงเส้นผม

- มะเค็ด [*Catunaregam tomentosa* (Blume ex DC.) Tirveng.] : เป็นไม้พุ่มในวงศ์ Rubiaceae มีรายงานการใช้ประโยชน์จากผลของพืชชนิดนี้ในการรักษา และบำรุงเส้นผม
- ยอดิน [*Morinda angustifolia*] : เป็นไม้พุ่มในวงศ์ Rubiaceae มีรายงานการใช้ประโยชน์จากใบของพืชชนิดนี้ในการรักษา และบำรุงเส้นผม
- ยอป่า [*Morinda coreia* Ham.] : เป็นไม้ยืนต้นในวงศ์ Rubiaceae มีรายงานการใช้ประโยชน์จากใบของพืชชนิดนี้ในการรักษา และบำรุงเส้นผม
- หมีเหม็น [*Litsea glutinosa* (Lour.) C.B.Rob.] : เป็นไม้ยืนต้นในวงศ์ Lauraceae มีรายงานการใช้ประโยชน์จากใบของพืชชนิดนี้ในการรักษา และบำรุงเส้นผม

งานวิจัยนี้ทางคณะผู้วิจัยจะทำการสำรวจ และคัดเลือกตัวอย่างพืชสมุนไพรจากกลุ่มพืชที่ระบุข้างต้นจากป่าเต็งรังในรัศมี 50 กิโลเมตร รอบ มจธ. ราชบุรี โดยทำการศึกษา และประเมินศักยภาพของพืชเหล่านี้ร่วมกับผู้เชี่ยวชาญด้านพืชในป่าเต็งรัง และทำการคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพจำนวน 5 ชนิด สำหรับนำมาสกัดผลิตสารออกฤทธิ์เพื่อใช้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผลิตภัณฑ์ดูแลผิวพรรณ และกลุ่มผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผม จำนวน 3 ผลิตภัณฑ์ แล้วทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ตามมาตรฐาน มอก. เอส

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสำรวจ และรวบรวมตัวอย่างพืชสมุนไพร

ทำการสำรวจ และรวบรวมตัวอย่างพืชสมุนไพรจากป่าเต็งรังภายในรัศมี 50 กิโลเมตร รอบ มจธ. ราชบุรี และทำการประเมินศักยภาพของพืช โดยการลงพื้นที่สำรวจร่วมกับผู้เชี่ยวชาญด้านพืชในป่าเต็งรัง และทำการคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพจำนวนอย่างน้อย 5 ชนิด สำหรับนำมาสกัดเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางเวชสำอาง ซึ่งพืชที่จะทำการสำรวจเพื่อประเมินศักยภาพในงานวิจัยนี้จะทำการคัดเลือกเบื้องต้นจากพืชที่มีรายงานการใช้ประโยชน์จากภูมิปัญญาชาวบ้านในการนำมาบำรุงผิวพรรณ และเส้นผม (มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และ สสวท., 2551)

2. การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

นำตัวอย่างพืชแต่ละชนิดที่รวบรวมได้ มาทำการล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ปอกเปลือกและนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำมาอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่ 40 °C จนตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่ (ความชื้นน้อยกว่า 10 %) แล้วจึงนำมาบดให้เป็นผงสำหรับใช้ในการสกัดต่อไป

3. การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างพืชโดยวิธีการแช่ตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย

ในการทดลองเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์เพื่อประเมินศักยภาพของพืช ทำโดยการแช่ตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย การทดลองนี้ได้เลือกใช้ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลที่ 3 ระดับ คือ 50% 70% และ 95% (v/v) ในการสกัด ใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:100 (w/v) ทำการสกัดที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นหาปริมาณผลผลิตสารสกัด และตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ในสารสกัดที่ได้โดยใช้วิธี Folin-ciocalteu reagent (Singleton and Rossi, 1965) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid, Sigma-Aldrich)

4. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

ทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบที่ได้จากสภาวะการสกัดที่เหมาะสมจากข้อ 3 โดยวิธี DPPH (Siramon and Ohtani, 2007) และวิธี ABTS (Re *et al.*, 1999) รวมทั้งเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระกับสารมาตรฐาน Butylated hydroxtoluene (BHT) และ Alpha-Tocopherol (Vitamin E)

5. การสกัดตัวอย่างด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิคเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัด

ทำการสกัดตัวอย่างพืชจำนวน 5 ชนิด (ที่คัดเลือกว่ามีศักยภาพจากข้อ 3) โดยวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดกับวิธีการแช่ตัวอย่างด้วยตัวทำละลายที่ได้จากข้อ 3 โดยทำการสกัดตัวอย่างพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 ใช้อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:100 (w/v) ทำการสกัดด้วยเครื่อง sonicator (Bandelin sonorex digitec, รุ่น DT 510H, 35 kHz, 16 W) ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 60 และ 120 นาที แล้วจึงหาปริมาณผลผลิตสารสกัด ตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้จาก

สภาวะต่างๆ ตามวิธีการเดียวกับข้อ 3 และตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content) ตามวิธีการของ Wolfe *et al.*, 2003 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของคาเทชิน (Catechin, Sigma-Aldrich) รวมทั้งวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้ตามวิธีการในข้อ 4

6. การสกัดตัวอย่างด้วยวิธี Soxhlet เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัด

ทำการสกัดตัวอย่างพืชจำนวน 5 ชนิด (ที่คัดเลือกว่ามีศักยภาพจากข้อ 3) ด้วยวิธี Soxhlet โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 จากนั้นจึงทำการหาปริมาณผลผลิตสารสกัด ตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่สกัดได้ และวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้ตามวิธีการในข้อ 5

7. การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของตัวอย่างสารสกัดที่ได้จากพืชแต่ละชนิด

ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้ด้วยเครื่อง Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometer (LC-ESI-MS) (Agilent Technologies 6420 Triple Quad) โดยใช้ ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100 mm, 3.5µm; Agilent) เป็นคอลัมน์ในการวิเคราะห์ ควบคุมอุณหภูมิในการวิเคราะห์ที่ 40 ºC โดยมี photodiode-array เป็นดีเทคเตอร์ (ตั้งค่าที่ 254 nm และ 280 nm) ทำการวิเคราะห์ด้วย negative/positive ionization mode เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบไปด้วย (A) 0.1% acetic acid ในน้ำปราศจากไอออน (DI water) และ (B) 0.1% acetic acid ใน acetonitrile โดยใช้สภาวะเกรเดียนเป็นดังนี้ คือ 0 นาที B 8%, 0.1-2 นาที B 10%, 2.1-27 นาที B 30%, 27.1-50 นาที B 90%, 50.1-60 นาที B 100% ตามลำดับ โดยใช้อัตราการไหลเท่ากับ 0.50 ml/min, Injection volume 20 µl

ผลการวิจัย

1. ผลการสำรวจ และรวบรวมตัวอย่างพืชสมุนไพร

จากการสำรวจ และประเมินศักยภาพของพืชโดยการลงพื้นที่สำรวจร่วมกับผู้เชี่ยวชาญด้านพืชในป่าเต็งรัง ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าพืชที่คาดว่าจะมีศักยภาพสำหรับนำมาสกัดเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางมีจำนวน 9 ชนิด ดังแสดงในตารางภาพที่ 1 ซึ่งได้แก่ ต้นสามสิบ กระทือ เปราะหอม ว่านนางคำ ขมิ้นอ้อย หญ้าพังโหม หมีเหม็น ปอเต่าไห้ และน้อยหน่า สำหรับกระบวนการเตรียมตัวอย่างพืชที่ได้เพื่อใช้สำหรับการสกัดแสดงในภาพที่ 2

ภาพที่ 1 การลงพื้นที่สำรวจและประเมินศักยภาพพืชในป่าเต็งรังร่วมกับผู้เชี่ยวชาญ

ล้างทำความสะอาด และปอกเปลือก

อบในตู้อบลมร้อนที่ 40 °C

บด

ภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพืช

ตารางที่ 1 สรุปรายชื่อพืชที่ได้ทำการรวบรวมเพื่อทำการศึกษา

ลำดับ	ชื่อพืช	ส่วนของพืช	ภาพตัวอย่างพืช
1	กระทือ (*Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.)	เหง้า	
2	ต้นสามสิบ (*Asparagus racemosus* Willd.)	ราก	
3	เปราะหอม (*Kaempferia galangal*)	เหง้า	
4	ว่านนางคำ (*Curcuma aromatic* Salisb.)	เหง้า	
5	ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*)	เหง้า	
6	หญ้าพังโหม (*Paederia pilifera Hook. f.*)	ใบ	

7	หมีเหม็น (*Litseaglutinosa* (Lour.) C.B.Rob.)	ใบ	
8	ปอเต่าไห้ (*Enkleia siamensis* Nevling)	ใบ / เปลือกลำต้น	
9	น้อยหน่า (*Annona squamosa* L.)	ใบ	

2. ผลการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดเพื่อประเมินศักยภาพของพืชโดยวิธีการแช่ตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย

การศึกษาเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดพืชตัวอย่างเพื่อประเมินศักยภาพของพืช โดยได้ทำการสกัดโดยการแช่ตัวอย่างในตัวทำละลายเอทานอลที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 50% 70% และ 95% (v/v) ที่ 30 °C เป็นเวลา 72 ชม. และตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้จากสภาวะต่างๆ และทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Duncan จากนั้นจึงทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม (ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่ให้ค่า % สารสกัด และปริมาณฟีนอลิกสูงสุด) โดยวิธี DPPH และ ABTS และเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระกับสารมาตรฐาน BHT และ Alpha-Tocopherol แสดงผลการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณผลผลิตสารสกัด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) โดยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบที่ได้โดยวิธีการแช่ตัวอย่างในตัวทำละลาย

ลำดับที่	ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	สารสกัด (%)[*, **]	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (µg GAE/g)[*, **]	IC_{50} (µg/ml) โดยวิธี DPPH[***]	IC_{50} (µg/ml) โดยวิธี ABTS[***]
1	กระทือ (เหง้า)	50% เอทานอล	22.01±0.13a	16.26 ±0.77a	136,997.62	4,052.44
		70% เอทานอล	15.78±0.11b	14.50±1.32a		
		95% เอทานอล	5.56±0.03c	8.71±0.33b		
2	ต้นสามสิบ (ราก)	50% เอทานอล	70.31±0.39a	7.54±0.10b	147,384.51	48,281.85
		70% เอทานอล	68.10±0.42a	6.84±0.48b		
		95% เอทานอล	19.03±0.20b	16.99±0.51a		
3	เปราะหอม (เหง้า)	50% เอทานอล	36.57 ±0.20a	25.29±0.99a	-	5,035.14
		70% เอทานอล	28.13 ±0.17b	13.00±0.33a		
		95% เอทานอล	8.78 ±0.06c	18.82±11.58a		
4	ว่านนางคำ (เหง้า)	50% เอทานอล	18.60±0.11a	42.56±0.33a	9,662.75	944.39
		70% เอทานอล	10.05±0.05b	36.94±1.86b		
		95% เอทานอล	5.53±0.03c	33.90±2.76b		
5	ขมิ้นอ้อย (เหง้า)	50% เอทานอล	22.28±0.13a	47.29±1.27a	12,478.31	4,620.06
		70% เอทานอล	19.34±0.10b	47.51±1.35a		
		95% เอทานอล	14.51±0.08c	49.95±1.00a		
6	หญ้าพังโหม (ใบ)	50% เอทานอล	21.10±0.13a	26.99±0.75b		
		70% เอทานอล	20.69±0.11a	29.66±0.41a	1,887.96	2,944.97
		95% เอทานอล	12.24±0.06b	15.57±1.13c		
7	หมีเหม็น (ใบ)	50% เอทานอล	12.01±0.06c	31.54±1.50b		
		70% เอทานอล	16.44±0.09a	48.94±2.83a	1,276.44	981.13
		95% เอทานอล	14.50±0.08b	64.59±14.43a		
8	ปอเต่าไห้ (ใบ)	50% เอทานอล	19.61±0.11a	87.43±4.92a	1,602.27	604.22
		70% เอทานอล	18.45±0.10b	85.25±6.75a		
		95% เอทานอล	12.69±0.07c	55.57±0.77b		
9	ปอเต่าไห้ (เปลือกลำต้น)	50% เอทานอล	13.17±0.07b	79.00±5.81a	1,356.71	747.96
		70% เอทานอล	14.45±0.06a	45.80±1.42b		
		95% เอทานอล	10.29±0.05c	23.02±1.39c		
10	น้อยหน่า (ใบ)	50% เอทานอล	28.85±0.87a	78.44±2.29a	1,631.88	869.01
		70% เอทานอล	26.81±0.53b	73.33±1.81b		
		95% เอทานอล	22.22±0.01c	74.31±0.94b		
สารมาตรฐาน BHT					180.32	215.45
สารมาตรฐาน Alpha-Tocopherol					383.14	375.01

[*] เทียบกับน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้นแห้ง

[**] เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ±SD, ตัวอักษร a – c (ตัวอย่างเดียวกัน) หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

[***] เทียบกับน้ำหนักของสารสกัดหยาบ

จากผลการวิเคราะห์พบว่า การสกัดตัวอย่างจำนวน 8 ตัวอย่างโดยใช้ตัวทำลาย 50% (v/v) เอทานอล สามารถให้ผลผลิตสารสกัด และปริมาณฟีนอลิกที่สกัดได้สูงสุด ยกเว้นพืช 2 ชนิด คือ กระพังโหม และหมีเหม็น ซึ่งตัวทำละลาย 70% (v/v) เอทานอลเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้สกัดตัวอย่างพืชทั้งสอง จากผลการศึกษานี้จะได้ว่าตัวทำละลายดังกล่าวเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดตัวอย่างพืชนั้นๆ ต่อไป และเมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายที่เหมาะสมของพืชแต่ละชนิด โดยวิธี DPPH และ ABTS และเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระกับสารมาตรฐาน BHT และ Alpha-Tocopherol พบว่าสารสกัดตัวอย่างทั้งหมดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐานทั้ง 2 ตัวในทั้ง 2 วิธีการ และจากผลการศึกษาในตารางที่ 2 สามารถสรุปได้ว่าพืชที่มีศักยภาพ (ปริมาณฟีนอลิก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง) จำนวน 5 ชนิด สำหรับนำมาสกัดเพื่อใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางต่อไป คือ (1) ว่านนางคำ (2) หญ้าพังโหม (3) หมีเหม็น (4) ปอเต่าไห้ (ใบ) และ(5) ใบน้อยหน่า

3. ผลการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค

ทำการสกัดตัวอย่างพืชจำนวน 5 ชนิด (ที่คัดเลือกว่ามีศักยภาพ) โดยวิธีการใช้ตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมของพืชแต่ละชนิด และทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Duncan แสดงผลการวิเคราะห์ และสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างแต่ละชนิด ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณผลผลิตสารสกัด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) โดยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบที่ได้โดยวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค

ตัวอย่าง	สภาวะการสกัด (อุณหภูมิ/ เวลา)		สารสกัด (%)[*, **]	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (µg GAE/g)[*,**]	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (µg CE/g)[*,**]	IC_{50} (µg/ml) โดยวิธี DPPH[**, ***]	IC_{50} (µg/ml) โดยวิธี ABTS[**, ***]
ว่านนางคำ (เหง้า)	30 ^{0}C	30 min	20.08±0.33d	118.21±1.21b	9,839.24±1.24f	37,832.39±1.59f	8,910.80±1.43a
		60 min	20.31±0.24d	121.07±1.68a	12,016.18±1.18e	9,690.08±1.25c	9,020.49±1.51b
		120 min	23.50±0.35b	120.83±1.83ab	13,789.78±1.67a	7,945.32±1.68a	10,678.15±1.18f
	50 ^{0}C	30 min	24.64±0.21a	120.59±1.41ab	13,067.96±1.15b	8,608.47±1.36b	10,332.73±1.27d
		60 min	22.03±0.30c	118.21±1.19b	12,342.42±1.41d	9,957.58±1.25e	10,563.14±1.55e
		120 min	21.62±0.40c	120.11±1.11ab	12,924.20±1.17c	9,733.87±1.65d	10,237.97±1.33c
หญ้าพังโหม (ใบ)	30 ^{0}C	30 min	21.39±0.36a	120.59±1.18d	9,885.70±1.37f	4,382.30±1.19f	2,566.19±1.36f
		60 min	20.99±0.40ab	124.17±1.50bc	10,535.19±1.19b	2,878.65±1.53e	2,513.19±1.06e
		120 min	20.44±0.31bc	122.02±1.02cd	10,618.07±1.14a	2,545.91±1.39c	1,175.97±1.25a
	50 ^{0}C	30 min	19.09±0.41d	125.36±1.13b	10,187.46±1.35e	2,133.62±1.55a	1,914.63±1.37b
		60 min	19.87±0.36c	129.89±1.42a	10,380.12±1.21c	2,155.62±1.32b	2,139.90±1.13c
		120 min	20.03±0.35c	121.31±1.47d	10,323.64±1.53d	2,692.60±1.38d	2,234.66±1.56d
หมีเหม็น (ใบ)	30 ^{0}C	30 min	17.14±0.39ab	253.34±1.34b	10,478.60±1.05b	1,751.49±1.62d	802.37±1.37e
		60 min	17.80±0.40a	244.76±1.39c	9,845.96±1.37d	1,611.23±1.34b	744.74±1.14c
		120 min	17.53±0.35a	242.37±1.31c	9,606.08±1.50f	1,885.20±1.20e	729.13±1.25a
	50 ^{0}C	30 min	16.71±0.41bc	239.99±1.22d	10,036.82±1.05c	1,949.64±1.64f	819.06±1.39f
		60 min	16.30±0.35c	256.67±1.33a	12,071.97±1.40a	1,702.33±1.45c	799.68±1.21d
		120 min	16.21±0.34c	242.85±1.16c	9,718.37±1.37e	1,450.67±1.50a	742.06±1.42b

ปอเต่าไห้ (ใบ)	30 ^{0}C	30 min	20.09±0.21c	868.20±1.20c	12,342.30±1.19e	2,635.71±1.53e	397.42±1.30b
		60 min	22.41±0.34a	925.94±1.07b	14,852.12±1.23b	2,227.41±1.40c	718.90±1.10d
		120 min	22.82±0.32a	962.03±1.16a	16,408.53±1.47a	2616.36±1.37d	764.14±1.14e
	50 ^{0}C	30 min	20.92±0.18b	838.15±1.15d	12,136.18±1.18f	3,359.67±1.21f	597.20±1.80c
		60 min	19.65±0.20c	701.55±1.32e	14,081.38±1.39c	1,990.80±1.68b	302.10±1.34a
		120 min	19.64±0.33c	693.33±1.26f	12,577.57±1.46d	1,941.22±1.33a	395.80±1.60b
น้อยหน่า (ใบ)	30 ^{0}C	30 min	28.03±0.37c	315.30±1.47ab	17,795.31±1.24b	1,172.31±1.31e	713.12±1.54c
		60 min	28.59±0.39c	312.68±1.31c	15,697.88±1.44e	1,022.87±1.21c	696.28±1.17b
		120 min	29.49±0.29b	302.43±1.57e	15,557.63±1.38f	977.08±1.03b	822.29±1.29e
	50 ^{0}C	30 min	29.62±0.22b	314.82±1.15bc	18,260.18±1.18a	1,026.68±1.57c	826.60±1.13f
		60 min	30.50±0.35a	307.67±1.27d	16,893.92±1.37d	947.99±1.44a	620.89±1.56a
		120 min	30.79±0.29a	317.45±1.23a	17,351.02±1.56c	1,072.13±1.42d	780.30±1.30d

* เทียบกับน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้นแห้ง

** เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ±SD, ตัวอักษร a – f (ตัวอย่างเดียวกัน) หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

*** เทียบกับน้ำหนักของสารสกัดหยาบ

จากผลการสกัดในตารางที่ 3 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างพืชแต่ละชนิด โดยวิธีการใช้ตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค เป็นดังนี้คือ

(1) ว่านนางคำ (เหง้า):
สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร ทำการสกัดที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 120 นาที

(2) หญ้าพังโหม (ใบ):
สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร ทำการสกัดที่สภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที

(3) หมีเหม็น (ใบ):
สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร ทำการสกัดที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที

(4) ปอเต่าไห้ (ใบ):
สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร ทำการสกัดที่สภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 120 นาที

(5) น้อยหน่า (ใบ):
สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร ทำการสกัดที่สภาวะอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที

4. ผล**การสกัดตัวอย่างด้วยวิธี Soxhlet**

ทำการสกัดตัวอย่างพืชจำนวน 5 ชนิด (ที่คัดเลือกว่ามีศักยภาพ) โดยวิธีการใช้ตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมของพืชแต่ละชนิด และทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Duncan แสดงผลการวิเคราะห์ และสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างแต่ละชนิด ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณผลผลิตสารสกัด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) โดยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบโดยวิธี Soxhlet

ชื่อพืช	ตัวทำละลาย	เวลาสกัด (ชั่วโมง)	สารสกัด (%)[*, **]	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (µg GAE/g)[*,**]	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (µg CE/g)[*,**]	IC_{50} (µg/ml) โดยวิธี DPPH[***]	IC_{50} (µg/ml) โดยวิธี ABTS[***]
ว่านนางคำ (เหง้า)	50% เอทานอล	7	7.12±1.02	342.63±9.23	10,455.27±6.84	1,709.33	6,724.97
หญ้าพังโหม (ใบ)	70% เอทานอล	7	19.69±0.07	337.15±6.94	11,132.87±5.33	2,031.66	2,110.93
หมีเหม็น (ใบ)	70% เอทานอล	5	22.21±0.73	862.75±18.40	23,677.06±7.23	833.47	1,602.4
ปอเต่าไห้ (ใบ)	50% เอทานอล	5	21.67±0.22	651.57±12.70	23,443.38±4.47	767.21	10,492.06
น้อยหน่า (ใบ)	50% เอทานอล	7	26.25±0.58	647.22±20.48	27,428.45±7.12	488.51	42,164.45

[*] เทียบกับน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้นแห้ง

[**] เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ±SD

[***] เทียบกับน้ำหนักของสารสกัดหยาบ

จากการศึกษาการสกัดสารสกัดหยาบจากตัวอย่างพืชจำนวน 5 ชนิด โดยใช้วิธีการสกัด 3 วิธี คือ (1) การแช่ตัวอย่างในตัวทำละลาย (2) การใช้ตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค และ (3) การใช้วิธี Soxhlet เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างนั้น สามารถสรุปเปรียบเทียบผลการสกัดที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมจากแต่ละวิธีการได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการสกัดตัวอย่างพืชที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมจากการสกัด 3 วิธี

ชื่อพืช	วิธีสกัด	สารสกัด (%)*,**	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (µg GAE/g)*,**	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (µg CE/g)*,**	IC_{50} (µg/ml) โดยวิธี DPPH***	IC_{50} (µg/ml) โดยวิธี ABTS***
ว่านนางคำ (เหง้า)	แช่ในตัวทำละลาย 3 วัน	18.60±0.11	42.56±0.33	8,750.35	9,662.75	944.39
	คลื่นอัลตร้าโซนิค 30 ^{0}C, 120 min	23.50±0.35	120.83±1.83	13,789.78	7,945.32	10,678.15
	Soxhlet 7 ชม.	7.12±1.02	342.63±9.23	10,455.27	1,709.33	6,724.97
หญ้าพังโหม (ใบ)	แช่ในตัวทำละลาย 3 วัน	20.69±0.11	29.66±0.41	9,483.48	1,887.96	2,944.97
	คลื่นอัลตร้าโซนิค 50 ^{0}C, 60 min	19.87±0.36	129.89±1.42	10,380.12	2,155.62	2,139.90
	Soxhlet 7 ชม.	19.69±0.07	337.15±6.94	11,132.87	2,031.66	2,110.93
หมีเหม็น (ใบ)	แช่ในตัวทำละลาย 3 วัน	16.44±0.09	48.94±2.83	7,660.27	1,276.44	981.13
	คลื่นอัลตร้าโซนิค 30 ^{0}C, 60 min	17.80±0.40	244.76±1.39	9,845.96	1,611.23	744.74
	Soxhlet 5 ชม.	22.21±0.73	862.75±18.40	23,677.06	833.47	1,602.4
ปอเต่าไห้ (ใบ)	แช่ในตัวทำละลาย 3 วัน	19.61±0.11	87.43±4.92	13,791.15	1,602.27	604.22
	คลื่นอัลตร้าโซนิค 50 ^{0}C, 120 min	19.64±0.33	693.33±1.26	12,577.57	1,941.22	395.80
	Soxhlet 5 ชม.	21.67±0.22	651.57±12.70	23,443.38	767.21	10,492.06
น้อยหน่า (ใบ)	แช่ในตัวทำละลาย 3 วัน	28.85±0.87	78.44±2.29	15,010.28	1,631.88	869.01
	คลื่นอัลตร้าโซนิค 50 ^{0}C, 60 min	30.50±0.35	307.67±1.27	16,893.92	947.99	620.89
	Soxhlet 7 ชม.	26.25±0.58	647.22±20.48	27,428.45	488.51	42,164.45
สารมาตรฐาน BHT					180.32	215.45
สารมาตรฐาน Alpha-Tocopherol					383.14	375.01

* เทียบกับน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้นแห้ง

** เป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ±SD

*** เทียบกับน้ำหนักของสารสกัดหยาบ

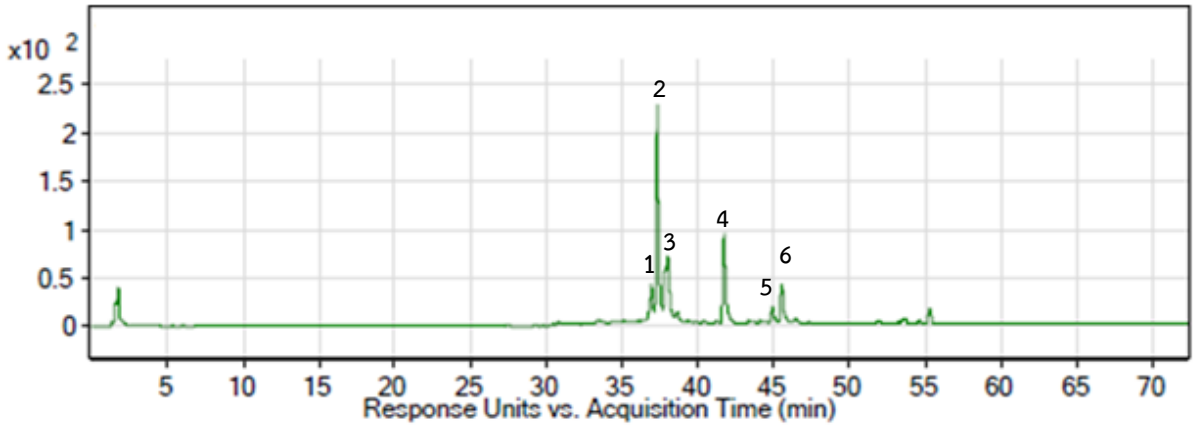
จากผลเปรียบเทียบการสกัดพืชจากสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละวิธีในตารางที่ 4 พบว่าผลการสกัดด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลายร่วมกับคลื่น ultrasonic นั้น ให้ผลไม่แตกต่างจากวิธีอื่นมาก และวิธีนี้มีข้อได้เปรียบจากวิธีอื่น คือ ใช้พลังงานต่ำ เวลาสั้น ดำเนินการง่าย ต้นทุนในการดำเนินการต่ำ เมื่อพิจารณาข้อได้เปรียบดังกล่าวร่วมกับผลการสกัด สามารถสรุปได้ว่าวิธีการสกัดนี้เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดพืชตัวอย่าง และสามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างพืชทั้ง 5 ชนิด ได้ดังตารางที่ 6

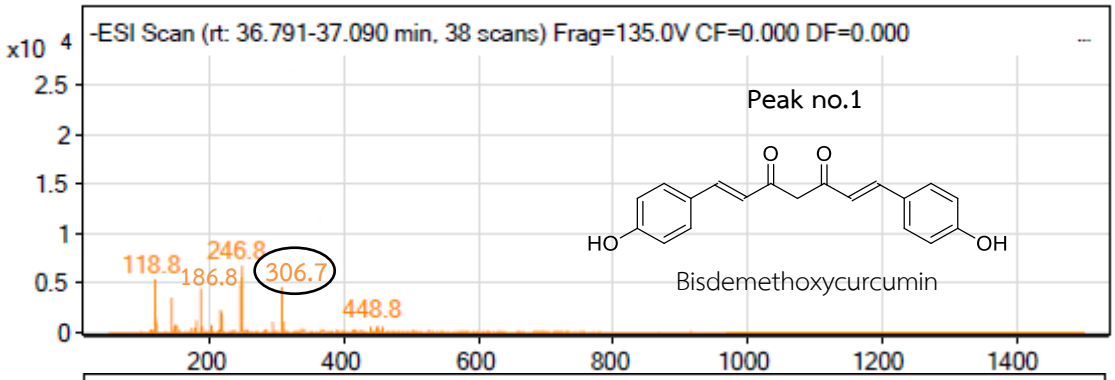
ตารางที่ 6 แสดงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างพืชแต่ละชนิด

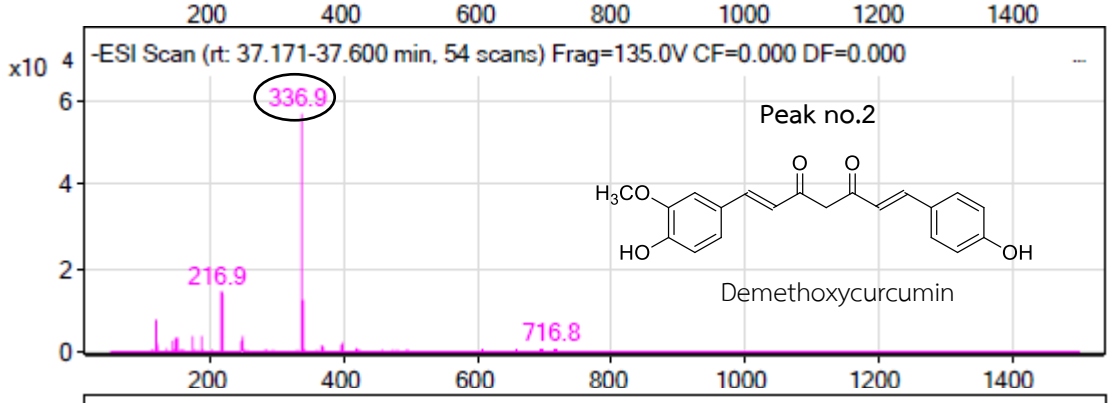
ชื่อพืช	ตัวทำละลาย	วิธีการสกัด
ว่านนางคำ (เหง้า)	50% เอทานอล	ตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค 30 ^{0}C, 120 min
หญ้าพังโหม (ใบ)	70% เอทานอล	ตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค 50 ^{0}C, 60 min
หมีเหม็น (ใบ)	70% เอทานอล	ตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค 30 ^{0}C, 60 min
ปอเต่าไห้ (ใบ)	50% เอทานอล	ตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค 50 ^{0}C, 120 min
น้อยหน่า (ใบ)	50% เอทานอล	ตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค 50 ^{0}C, 60 min

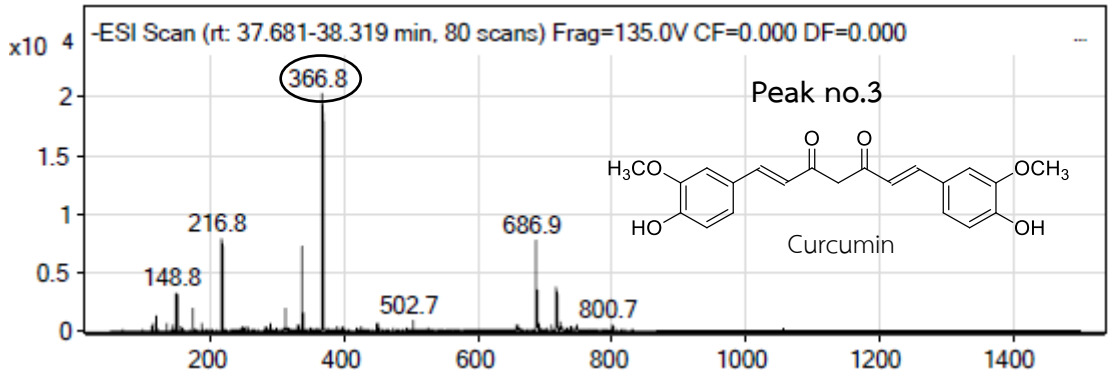
5. **ผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของสารสกัดตัวอย่างจากพืชแต่ละชนิด**

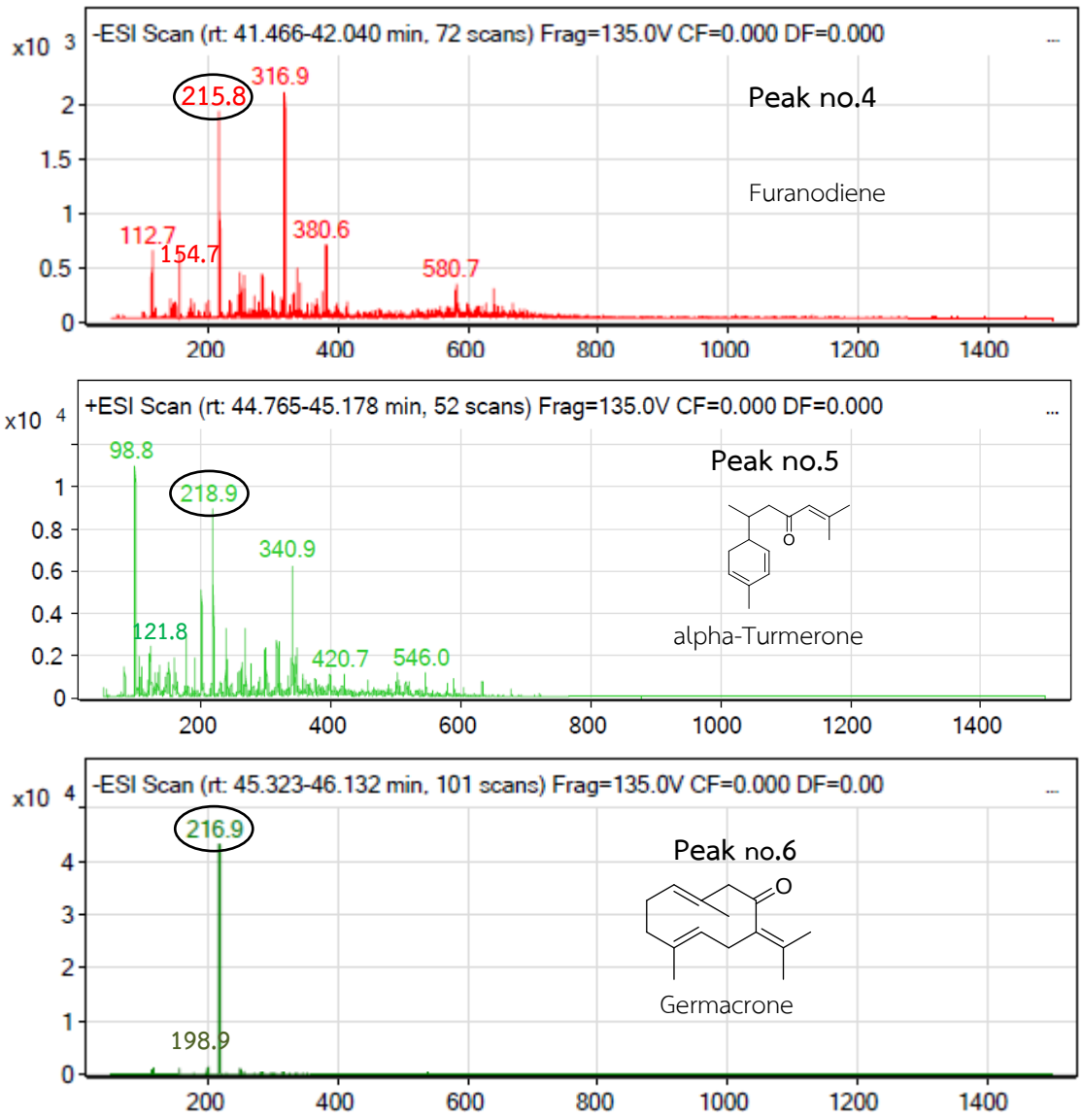
จากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของสารสกัดหยาบจากพืชด้วย LC-ESI-MS องค์ประกอบหลักที่พบในพืชตัวอย่างแต่ละชนิด แสดงในตารางที่ 7 และแสดง HPLC chromatograms และ mass spectra ของ peaks ในช่วงเวลาต่างๆ ในภาพที่ 3-7


x10 2
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1
2
3
4
5
6
5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
Response Units vs. Acquisition Time (min)

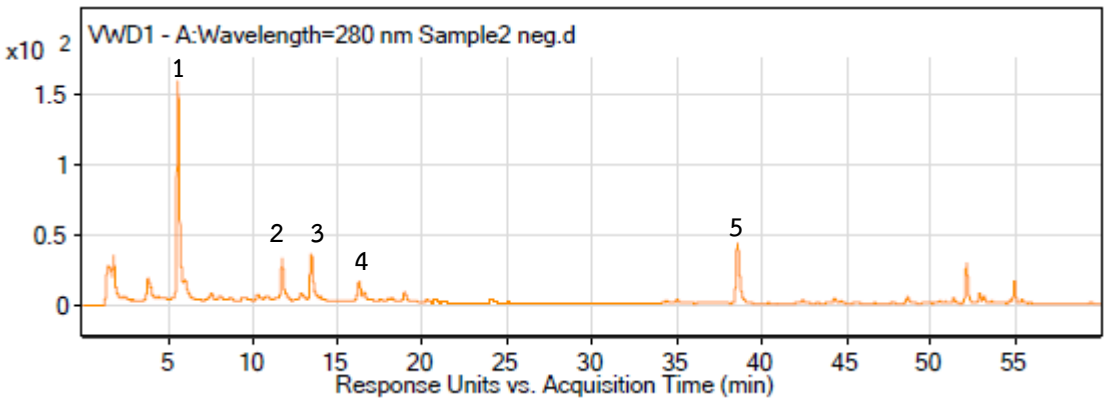

-ESI Scan (rt: 36.791-37.090 min, 38 scans) Frag=135.0V CF=0.000 DF=0.000
x10 4
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Peak no.1
HO
O
O
OH
Bisdemethoxycurcumin
118.8
186.8
246.8
306.7
448.8
200 400 600 800 1000 1200 1400

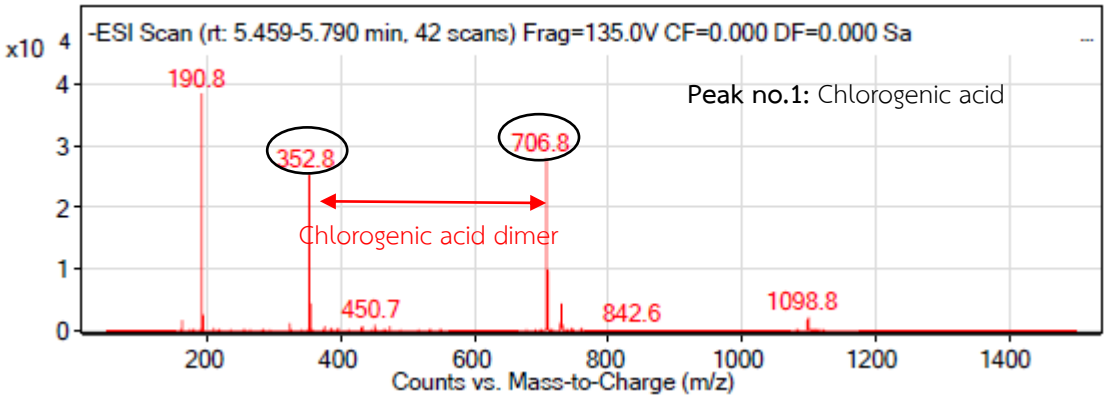

-ESI Scan (rt: 37.171-37.600 min, 54 scans) Frag=135.0V CF=0.000 DF=0.000
x10 4
6
4
2
0
Peak no.2
H3CO
HO
O
O
OH
Demethoxycurcumin
336.9
216.9
716.8
200 400 600 800 1000 1200 1400

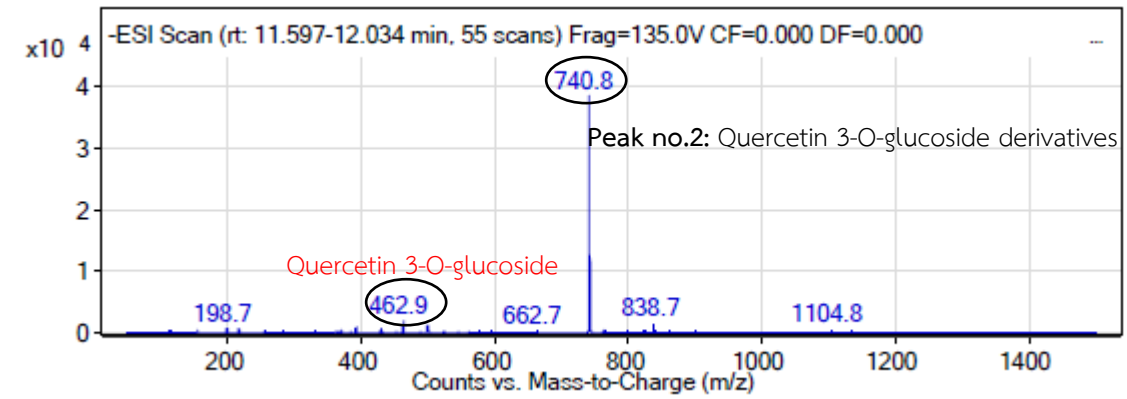

-ESI Scan (rt: 37.681-38.319 min, 80 scans) Frag=135.0V CF=0.000 DF=0.000
x10 4
2
1.5
1
0.5
0
Peak no.3
H3CO
HO
O
O
OCH3
OH
Curcumin
366.8
216.8
148.8
502.7
686.9
800.7
200 400 600 800 1000 1200 1400

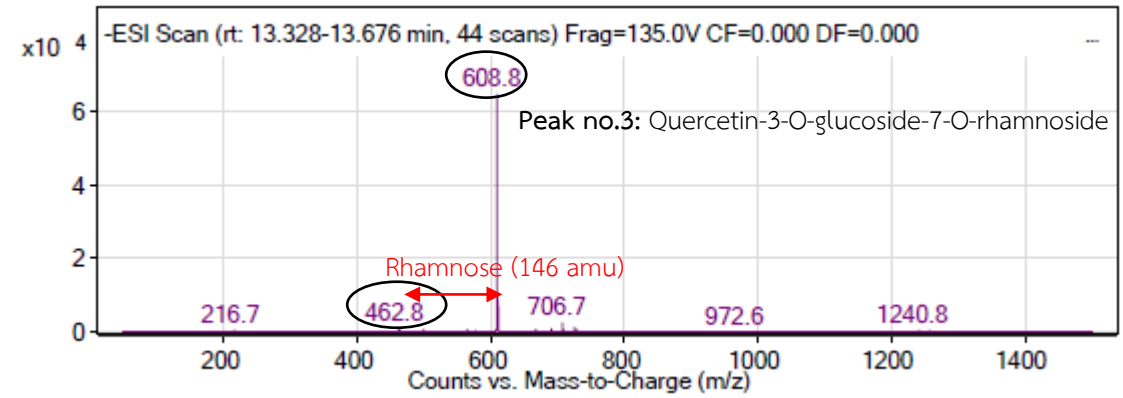


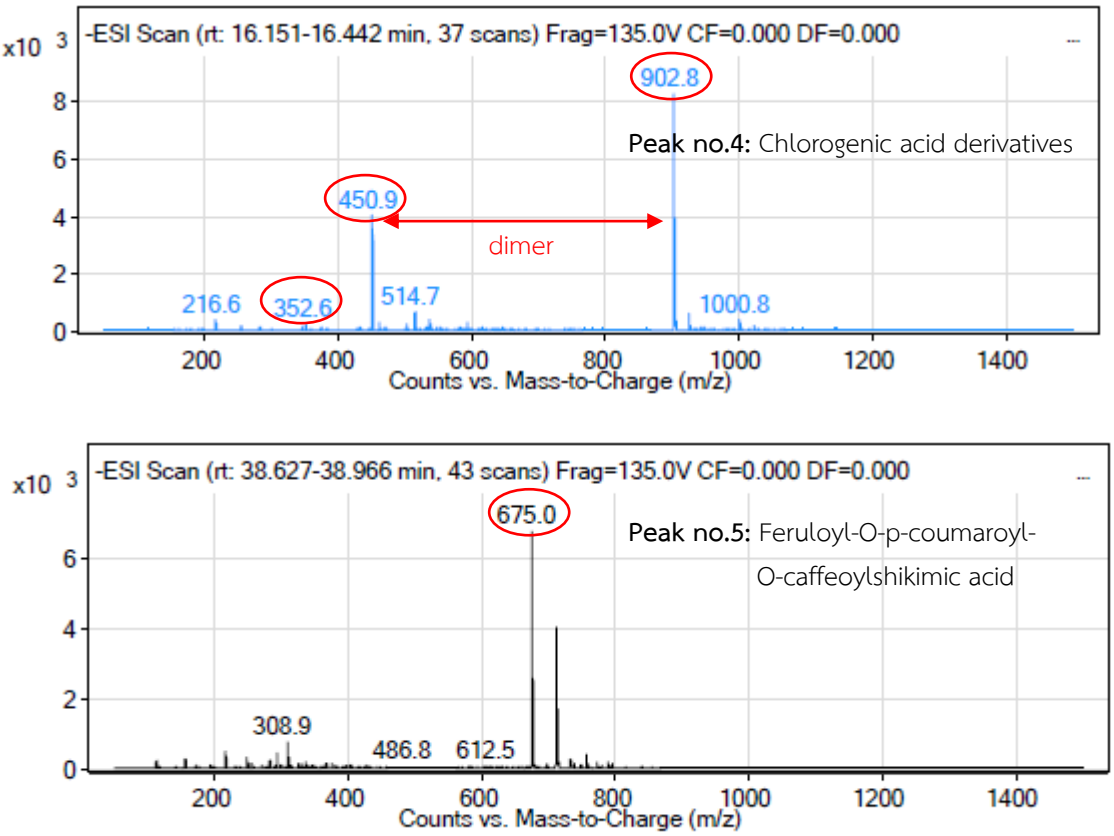
ภาพที่ 3 แสดง HPLC chromatograms และ Mass spectra ของ peaks ในช่วงเวลาต่างๆ ของสารสกัดหยาบว่านนางคำ (เหง้า)


VWD1 - A:Wavelength=280 nm Sample2 neg.d
x10 2
1.5
1
0.5
0
1
2
3
4
5
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Response Units vs. Acquisition Time (min)

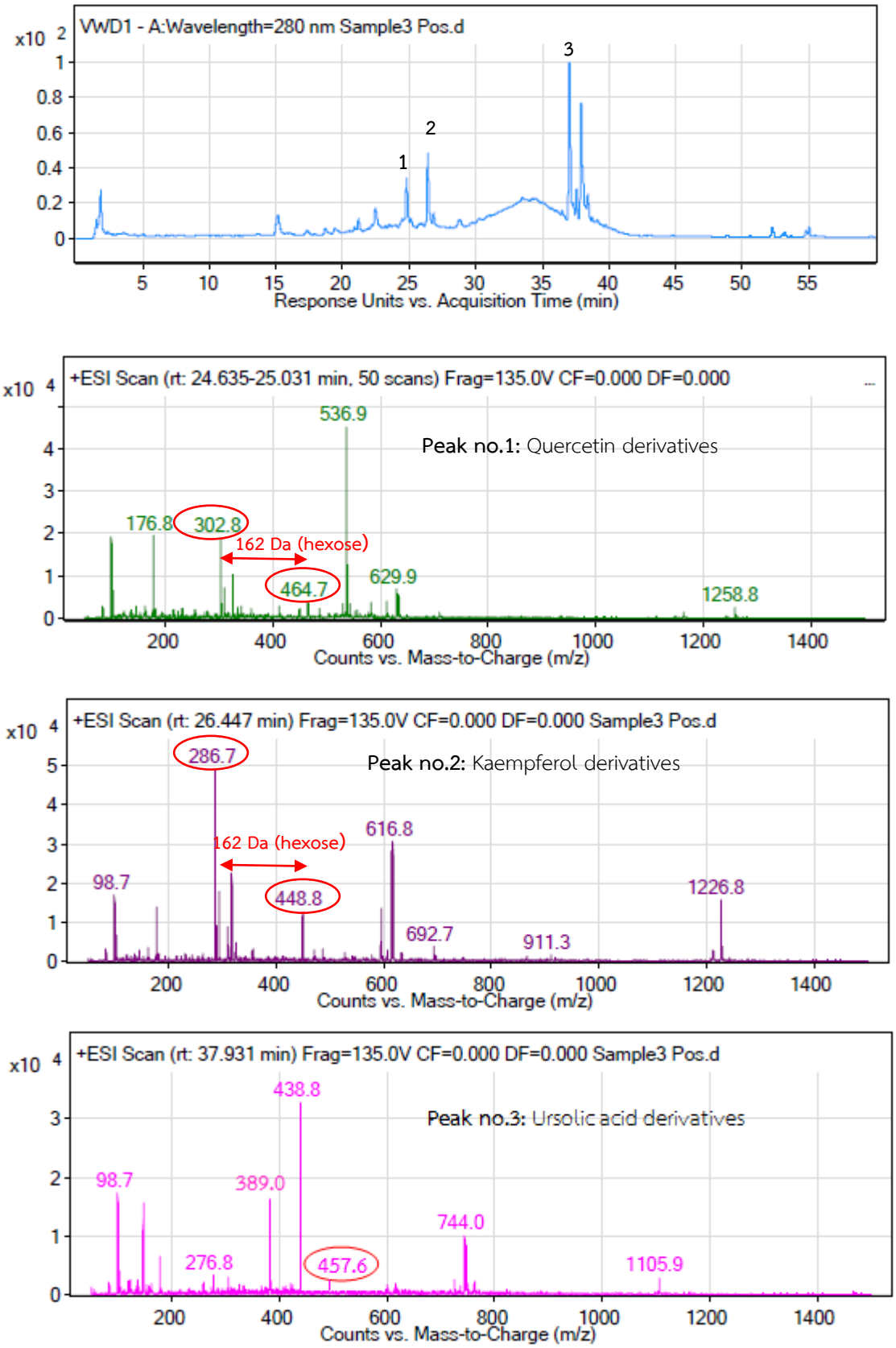

-ESI Scan (rt: 5.459-5.790 min, 42 scans) Frag=135.0V CF=0.000 DF=0.000 Sa
x10 4
4
3
2
1
0
190.8
352.8
706.8
Chlorogenic acid dimer
450.7
842.6
1098.8
Peak no.1: Chlorogenic acid
200
400
600
800
1000
1200
1400
Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)


-ESI Scan (rt: 11.597-12.034 min, 55 scans) Frag=135.0V CF=0.000 DF=0.000
x10 4
4
3
2
1
0
740.8
Peak no.2: Quercetin 3-O-glucoside derivatives
Quercetin 3-O-glucoside
198.7
462.9
662.7
838.7
1104.8
200
400
600
800
1000
1200
1400
Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)

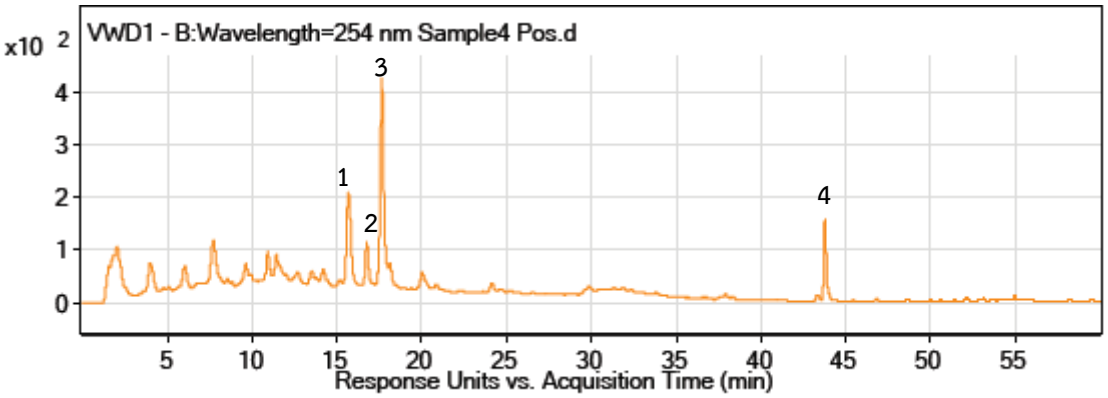

-ESI Scan (rt: 13.328-13.676 min, 44 scans) Frag=135.0V CF=0.000 DF=0.000
x10 4
6
4
2
0
608.8
Peak no.3: Quercetin-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside
Rhamnose (146 amu)
216.7
462.8
706.7
972.6
1240.8
200
400
600
800
1000
1200
1400
Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)

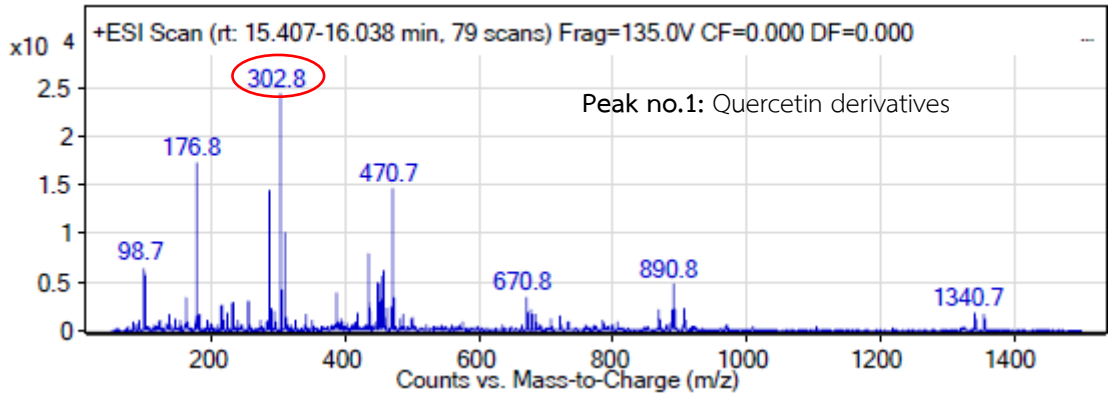


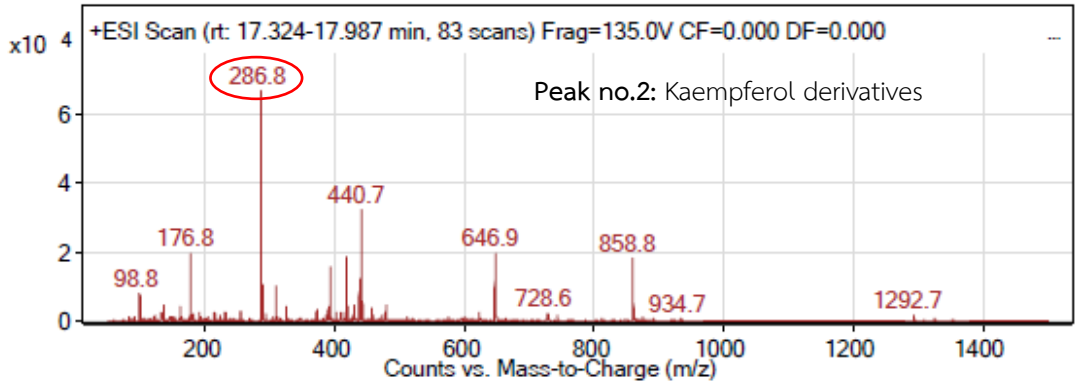
ภาพที่ 4 แสดง HPLC chromatograms และ Mass spectra ของ peaks ในช่วงเวลาต่างๆ ของสารสกัดหยาบหญ้าพังโหม (ใบ)

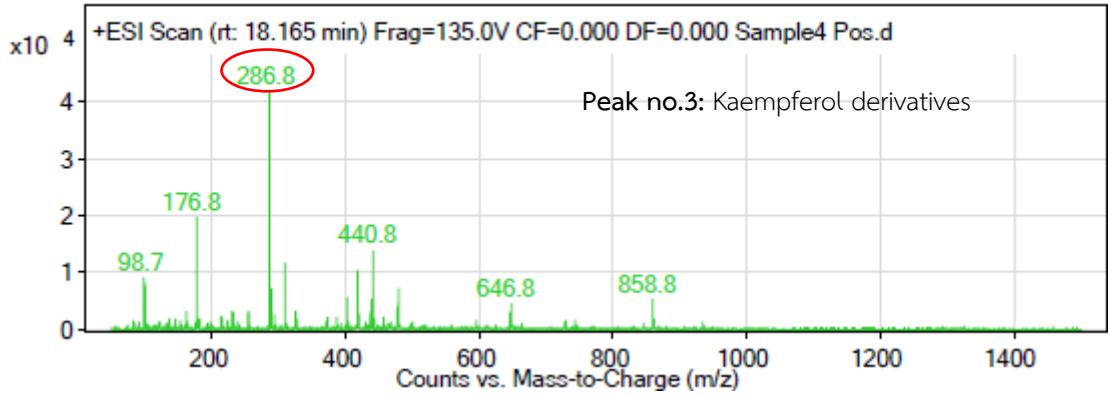


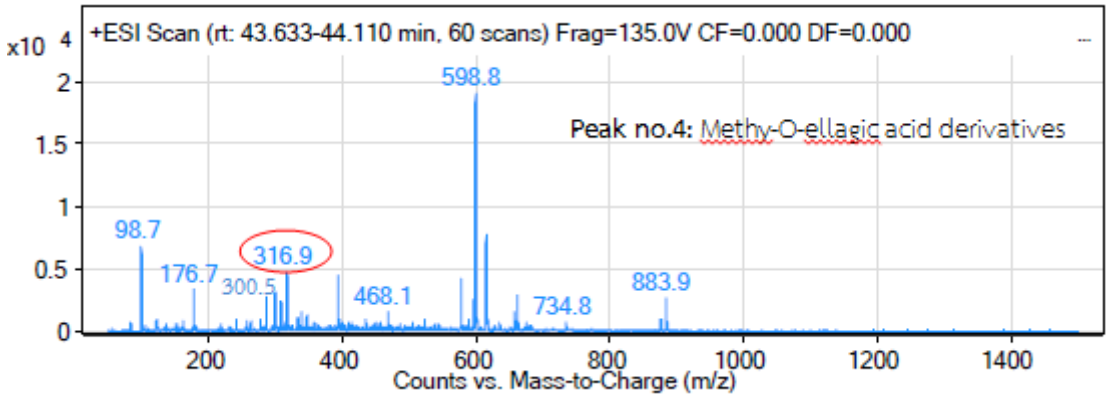
ภาพที่ 5 แสดง HPLC chromatograms และ Mass spectra ของ peaks ในช่วงเวลาต่างๆ ของสารสกัดหยาบหมีเหม็น (ใบ)


VWD1 - B:Wavelength=254 nm Sample4 Pos.d
x10 2
1
2
3
4
Response Units vs. Acquisition Time (min)

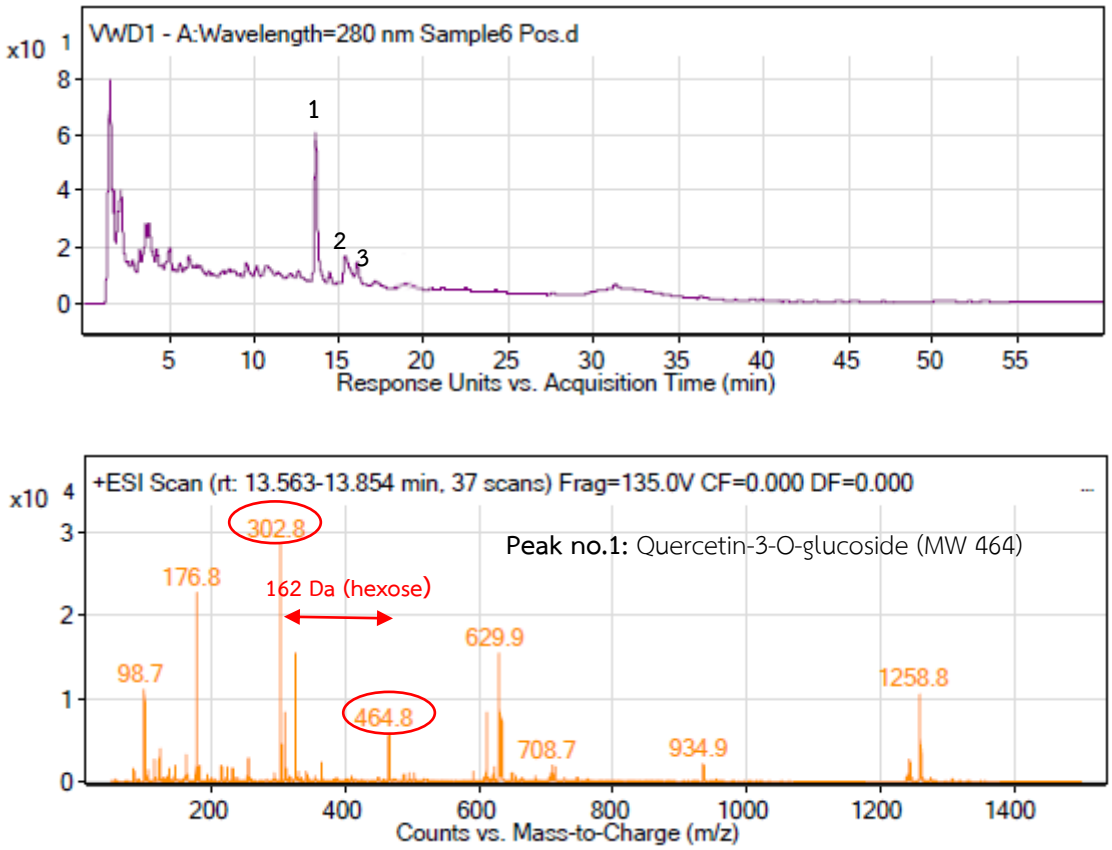

+ESI Scan (rt: 15.407-16.038 min, 79 scans) Frag=135.0V CF=0.000 DF=0.000
x10 4
302.8
176.8
470.7
98.7
670.8
890.8
1340.7
Peak no.1: Quercetin derivatives
Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)


+ESI Scan (rt: 17.324-17.987 min, 83 scans) Frag=135.0V CF=0.000 DF=0.000
x10 4
286.8
440.7
176.8
646.9
858.8
98.8
728.6
934.7
1292.7
Peak no.2: Kaempferol derivatives
Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)


+ESI Scan (rt: 18.165 min) Frag=135.0V CF=0.000 DF=0.000 Sample4 Pos.d
x10 4
286.8
176.8
440.8
98.7
646.8
858.8
Peak no.3: Kaempferol derivatives
Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)



ภาพที่ 6 แสดง HPLC chromatograms และ Mass spectra ของ peaks ในช่วงเวลาต่างๆ ของสารสกัดหยาบปอเต่าไห้ (ใบ)



ภาพที่ 7 แสดง HPLC chromatograms และ Mass spectra ของ peaks ในช่วงเวลาต่างๆ ของสารสกัดหยาบน้อยหน่า (ใบ)

ตารางที่ 7 สรุปองค์ประกอบหลักที่พบในสารสกัดหยาบของพืชแต่ละชนิด

ตัวอย่าง	องค์ประกอบ	อ้างอิง
ว่านนางคำ (เหง้า)	- Bisdemethoxycurcumin (mw 307.7) - Demethoxycurcumin (mw 337.9) - Curcumin (mw 367.8) - Furanodiene (mw 216.8) - alpha-Tumerone (mw 217.9) - Germacrone (mw 217.9)	- Bamba *et al.*, 2011 - Hao *et al.*, 2019
หญ้าพังโหม (ใบ)	- Chlorogenic acid (mw 354) - Quercetin 3-O-glucoside derivatives (mw 741) - Quercetin-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside (mw 610) - Chlorogenic acid derivatives (mw 451) - Feruloyl-O-p-coumaroyl-O-caffeoylshikimic acid (mw 676)	- Sun *et al.*, 2016 - Ibrahim *et al.*, 2015 - Simirgiotis *et al.*, 2015 - Said *et al.*, 2017
หมีเหม็น (ใบ)	- Quercetin derivatives - Kaempferol derivatives - Ursolic acid derivatives	- Chen *et al.*, 2016 - Novotny *et al.*, 2003
ปอเต่าไห้ (ใบ)	- Quercetin derivatives - Kaempferol derivatives - Methy-O-ellagic acid derivatives	- Kumar *et al.*, 2017
น้อยหน่า (ใบ)	- Quercetin-3-O-glucoside (mw 464) - Norisocorydine ($C_{19}H_{21}NO_4$) (mw 327) - Reticuline ($C_{19}H_{23}NO_4$) (mw 329)	- Pawar and Nasreen, 2018 - Dholvitayakhun *et al.*, 2013 - Kotake *et al.*, 2004 - Panda and Kar, 2007 - Pandey and Barve, 2011

สรุปและเสนอแนะ

1. จากผลการศึกษาการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม และทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบที่ได้เพื่อหาพืชที่มีศักยภาพสำหรับนำมาผลิตสารออกฤทธิ์ทางเวชสำอาง พบว่า ว่านนางคำ (เหง้า) หญ้าพังโหม (ใบ) หมีเหม็น (ใบ) ปอเต่าไห้ (ใบ) น้อยหน่า (ใบ) เป็นพืชที่มีศักยภาพสำหรับนำมาสกัดเพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2. จากผลการวิเคราะห์เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างพืชที่มีศักยภาพทั้ง 5 ชนิด พบว่า การสกัดด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลายร่วมกับคลื่น ultrasonic นั้น เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดพืชทั้ง 5 ตัวอย่าง และสภาวะที่ได้จากการศึกษานี้จะใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์ต่อไป

3. จากผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของสารสกัดตัวอย่างโดย LC-MS พบสารในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ เทอร์พีน เทอร์พีนอยด์ และอัลคาลอยด์

เอกสารอ้างอิง

จิตรวนา จันทร์ขอนแก่น จิตราภรณ์ ธวัชพันธุ์ และ พิชัย สนแจ้ง. 2555. พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชุมชนบ้านบ่อหวี อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50 สาขาส่งเสริมการเกษตร และคหกรรมศาสตร์, สาขาพืช. หน้า 225-265.

ธนภร อำนวยกิจ. 2552. เวชสำอาง. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal. 4(1): 94-110.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตราชบุรี และสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.). 2551. คู่มือพรรณไม้ป่าเต็งรัง. 154 หน้า.

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. 2547. เวชสำอาง : อิงกระแสผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ...แนวโน้มที่น่าสนใจ (ออนไลน์ อ้างถึงวันที่ 15 มิถุนายน 2558)
แหล่งที่มา:http://www.manager.co.th/iBizchannel/ViewNews.aspx?NewsID=9470000055596

สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 2552. ป่าเต็งรังแม่น้ำภาชี. กรุงเทพฯ: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 216 หน้า.

อัศวชัย ช่วยพรหม ณสพล โพธิ์วิจิตร มาลี บรรจบ ธิดารัตน์ บุญรอด ปิยะวรรณ บูชา และ บุญญาณี ศุภผล. 2553. การพัฒนาตำรับเวชสำอางบำรุงผิวผสม embelin วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. 2(2): 69-77.

Bamba, Y., Y.S. Yun, A. Kunugi and H. Inoue. 2011. Compounds isolated from *Curcuma aromatica* Salisb. Inhibit human P450 enzymes. J. Nat. Med. 65: 583-587.

Chen, G., X. Li, F. Saleri and M. Guo. 2016. Analysis of flavonoids in *Rhamnus davurica* and its antiproliferative activities. Molecules. 21: 1-14.

Dholvitayakhun, A., N. Trachoo, U. Sakee and T.P.T. Cushnie. 2013. Potential applications for *Annona squamosa* leaf extract in the treatment and prevention of foodborne bacterial disease. Nat. Prod. Commun. 8(3): 385-388.

Hao, M., D. Ji, L. Li, L. Su, J. Zhang, Q. Wang, W. Gu, C. Jiang, T. Lu and C. Mao. 2019. Metabolic profiling analysis of three processed rhizomes of *Curcuma wenyujin Y.H. Chen et C. Ling* by ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. Pharmacogn. Mag. 15: 164-171.

Ibrahim, R.M., A.M. El-Halawany, D.O. Saleh, E.M.B.E. Naggar, A.E.R.O. El-Shabrawy and S.S. El-Hawary. 2015. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *Securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. Revista Brasileira de Farmacognosia. 25(2): 134-141.

Kotake, Y., K. Okuda, M. Kamizono, N. Matsumoto, T. Tanahashi, H. Hara, C.P. Dominique and S. Ohta. 2004. Detection and determination of reticuline and *N*-methylcoculaurine in the *Annonaceae* family using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B. 806: 75-78.

Kumar, S., A. Singh and B. Kumar. 2017. Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of Phyllanthus species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. J. Pharm. Anal. 7(4): 214–222.

Novotny, L., M.E. Abdel-Hamida, H. Hamza, I. Masterova and D. Grancai. 2003. Development of LC-MS method for determination of ursolic acid: application to the analysis of ursolic acid in *Staphylea holocarpa* Hemsl. J. Pharm. Biomed. Anal. 31: 961-968.

Panda, S. and A. Kar. 2007. Antidiabetic and antioxidative effects of *Annona squamosa* leaves are possibly mediated through quecetin-3-O-glucoside. BioFactor. 31: 201-210.

Pandey, N. and D. Barve. 2011. Phytochemical and pharmacological review on *Annona squamosa* Linn. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 2(4): 1404-1412.

Pawar, D.S. and S. Nasreen. 2018. HR-LCMS of phytoconstituents and antifungal activity of medicinal plant. J. Med. Plants Stud. 6(1): 173-176.

Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine. 26: 1231-1237.

Said, R.B., A.I. Hamed, U.A. Mahalel, A.S. Al-Ayed, M. Kowalczyk, J. Moldoch, W. Oleszek and A. Stochmal. 2017. Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry and DFT. Int. J. Mol. Sci. 18: 1-18.

Simirgiotis, M.J., J. Benites, C. Areche and B. Sepúlveda. 2015. Antioxidant capacities and analysis of phenolic compounds in three endemic *Nolana* species by HPLC-PDA-ESI-MS. Molecules. 20: 11490-11507.

Singleton, V.L. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics and phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 6:144-158.

Siramon, P. and Y. Ohtani. 2007. Antioxidative and antiradical activities of *Eucalyptus camaldulensis* leaf oils from Thailand. J. Wood Sci. 53(6): 498-504.

Sun J., F. Liang, Y. Bin, P. Li and C. Duan. 2007. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. Molecules. 12: 679-693.

Wolfe, K., X. Wu and R.H. Liu. 2003. Antioxidant activity of apple peels. J. Agric. Food Chem. 51: 609-614.