

การทดสอบเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ของหอมแดงที่สกัดด้วยเทคนิควิธีการที่แตกต่างกัน

COMPARISON OF THE PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN DIFFERENT EXTRACTION TECHNIQUES OF *Allium ascalonicum* L.

ปภาภัสสร ชีระพัฒน์วงศ์^{1,*} และ กฤษฎา พันธุ์เดช²

Paphaphat Thiraphatthanavong^{1,*} and Krissada Phandeche²

¹ สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

² หน่วยงานกายภาพบำบัด ภาควิชาเวชศาสตร์ฟื้นฟู คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

¹ Department of Thai Traditional medicine, Faculty of Science, Udon Thani Rajabhat University

² Physical therapy unit, Department of Rehabilitation, Faculty of medicine, Khon Kaen University

Received: 19 December 2022

Revised: 17 February 2023

Accepted: 20 March 2023

บทคัดย่อ

กลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (NCDs) เป็นปัญหาด้านสุขภาพที่สำคัญในปัจจุบัน สาเหตุหลักเกิดจากพฤติกรรมเสี่ยงในการดำเนินชีวิต เช่น การรับประทานอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ขาดการออกกำลังกาย มีความเครียดสูงจากสภาพสังคมและสิ่งแวดล้อม ปัจจัยเหล่านี้ทำให้เซลล์ในร่างกายมีการสร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้จะไปกระตุ้นกระบวนการออกซิเดชันส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ในร่างกายและนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ ได้ งานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า สารสกัดจากผักและผลไม้มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ หอมแดง (*Allium ascalonicum* L.) เป็นพืชที่ปลูกมากในเขตภาคอีสาน และเป็นหนึ่งในพืชที่มีการรายงานถึงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังดังกล่าว โดยมีวิธีการในการสกัดสารสำคัญที่หลากหลายและแตกต่างกันออกไป ดังนั้น งานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของหอมแดงที่สกัดด้วยเทคนิควิธีการที่แตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ 1) สกัดด้วยน้ำกลั่น (DW) 2) สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10

* Corresponding author: ปภาภัสสร ชีระพัฒน์วงศ์

E-mail: paphaphat.th@udru.ac.th

นาที่ (DW+B60°C) และ 3) สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (A50) จากนั้นนำไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Flavonoid Assay ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ Nitric oxide (NO) radical scavenging assay ผลการวิจัยพบว่า หอมแดงที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (DW+B60°C) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงกว่าหอมแดงที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (DW) และสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (A50) มีค่าเท่ากับ 9.07 ± 0.32 mg/L GAE/mg extract และ 1.226 ± 0.017 mg/L quercetin/mg extract และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP ที่ดีที่สุด โดยมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) มีค่าเท่ากับ 8.65 ± 0.01 และ 20.86 ± 0.43 mg/mL ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้ง NO สูงที่สุด มีค่าเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 27.22 ± 0.30 การวิจัยในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าหอมแดงที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (DW+B60°C) เป็นวิธีการสกัดสารที่มีประสิทธิภาพดีกว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่น (DW) และสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (A50) ที่อุณหภูมิห้อง โดยผลของความร้อนที่เหมาะสมอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่สามารถช่วยให้การสกัดสารสำคัญในหอมแดงมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

คำสำคัญ: หอมแดง, สารประกอบฟีนอลิก, สารต้านอนุมูลอิสระ, วิธีการสกัดสาร

Abstract

Nowadays, chronic non-communicable diseases (NCDs) are a major health problem. The main cause is due to behaviors in daily life such as unhealthy food eating, lack of exercise and high stress due to social and environmental conditions. These factors can stimulate cells in the body to produce more free radicals. These substances will provoke the oxidative stress process that affect the function of cells in the body and lead to various diseases. Previous study found that the fruits and vegetables including shallot (*Allium ascalonicum* L.) have the ability to be antioxidants with various extraction methods. Therefore, this study aims to compare the phenolic

compound contents and the antioxidant activity of *Allium ascalonicum* L. extracted by 3 different techniques including 1) aqueous extract (DW) 2) boiling at 60 °C for 10 minutes extract (DW+B60°C) and 3) 50 percent of ethanol extract (A50). The phenolic compound contents and the antioxidant activity were investigated by using Folin-Ciocalteu, Flavonoid Assay, DPPH, FRAP and Nitric oxide (NO) radical scavenging assay. The results shown that the shallot (*Allium ascalonicum* L.) with boiling at 60 °C for 10 minutes extract have the most total phenolic compound and flavanoid at 9.07 ± 0.32 mg/L GAE/mg extract and 1.226 ± 0.017 mg/L quercetin/mg extract. Moreover, the antioxidant activity by DPPH and FRAP assay show the best of the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) at 8.65 ± 0.01 and 20.86 ± 0.43 mg/ml, respectively. In addition, The highest percentage of NO inhibition is at 27.22 ± 0.30 . This research showed that, Shallots (*Allium ascalonicum* L.) extracted by boiling at 60 °C for 10 minutes (DW+B60°C extraction) is a more efficient method than aqueous and 50 percent of ethanol extraction. The effect of optimum heat may be one of the factors that can enhance the efficient extraction of essential substances in shallot.

Keywords: Shallot, Phenolic compounds, Antioxidant, Extraction techniques

บทนำ

หอมแดง (Shallot) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Allium ascalonicum* L. อยู่ในตระกูล *Amaryllidaceae* เป็นพืชสมุนไพรที่คนไทยนิยมนำส่วนหัวมาใช้ในการประกอบอาหาร จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ นิยมปลูกในเขตภาคอีสานของประเทศไทย งานวิจัยก่อนหน้านี้ มีการรายงานถึงคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของหอมแดง โดยพบว่า มีสารในกลุ่มเคอควิทิน (Quercetin) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) แคมพ์เฟอรอล (Kaempferol) และอัลลิซิน (Allicin) และเมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของพืชตระกูลหอม (Onion) พบว่า หอมแดงมีฤทธิ์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับหอมอีก 10 ชนิด (Jun et al., 2004) นอกจากนั้น ยังมีรายงานถึงคุณสมบัติในการต้านอาการแพ้และระคายเคือง

(Alexander Victor et al., 2016; Jiri et al., 2016; Warangkana et al., 2019) ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Razieh et al., 2007) ลดเปอร์เซ็นต์ของระดับไขมันในร่างกาย (Total fat percentage) (Ji-Sook et al., 2016; Mariangela et al., 2019) ช่วยลดระดับ Cholesterol และ Triglyceride ที่เป็นปัจจัยในการกระตุ้นให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (Atherosclerosis) ช่วยเพิ่มการไหลเวียนเลือดและลดระดับความดันเลือด (Yin et al., 2012; Ehécatl et al., 2016; Sanaz et al., 2017)

ในปัจจุบัน การสกัดสารสำคัญจากพืชทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ เช่น คุณสมบัติของการมีขี้มีขี้ หรือไม่มีขี้ ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน การหมัก (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชที่มีขั้นตอนวิธีการโดยนำตัวอย่างพืชที่บดละเอียดมาเติมน้ำหรือตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพดีในการสกัดพืชตามอัตราส่วนที่ต้องการ ในภาชนะปิดทิ้งไว้ 12-24 ชั่วโมง หรือมากกว่านั้น โดยประมาณ 2-7 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำไปกรอง วิธีนี้มีข้อดี คือ สารไม่ถูกความร้อนแต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายและใช้เวลาค่อนข้างนาน จึงมีการคิดค้นวิธีการเพื่อประหยัดเวลาในการสกัดสารสำคัญ โดยการเพิ่มความเร็วในการสกัดจากการเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนของการสกัด แต่วิธีการนี้ต้องพึงระวังในเรื่องของการสลายตัวของสารสำคัญจากอุณหภูมิที่สูงขึ้น ผลของการวิจัยก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดพืชมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสำคัญที่ได้ โดยพบว่า ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดสารสำคัญในพืชและเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเกินกว่า 80 องศาเซลเซียส มีผลทำให้สารสำคัญลดลง (Maja et al., 2013; Intan Soraya et al., 2017) นอกจากนั้น ยังนิยมนำตัวทำละลายแอลกอฮอล์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารละลายกึ่งมีขี้ เช่น เอทานอลและเมทานอลมาใช้สกัดสารสำคัญในพืชสมุนไพรซึ่งให้ปริมาณสารสำคัญที่มากขึ้นในการสกัดพืชบางชนิด ดังนั้น งานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของหอมแดงที่สกัดด้วยเทคนิควิธีการที่ต่างกันเพื่อนำข้อมูลการวิจัยที่ได้ไปใช้ในการต่อยอดพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางสุขภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างพืช (Plant material preparation)

นำหัวหอมแดงสด (*Allium ascalonicum* L.) ที่เก็บเกี่ยวจากพื้นที่จังหวัดศรีสะเกษ ประเทศไทย ในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2565 มาปอกเปลือกล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ หลังจากนั้นนำไปอบแห้งในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหัวหอมแดงแห้งที่ได้ไปปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่น ลักษณะของหอมแดงก่อนปอกเปลือก หลังปอกเปลือกและแห้งปั่นละเอียด ดังแสดงในรูปที่ 1 จากนั้นนำไปสกัดด้วย 3 วิธี ได้แก่ 1) สกัดด้วยน้ำกลั่น (DW) ที่อุณหภูมิห้อง หมักนาน 24 ชั่วโมง 2) สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (DW+B60°C) และ 3) สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (A50) ที่อุณหภูมิห้อง หมักนาน 24 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วน 1:5 (weight: volume) เมื่อครบเวลากรองแยกส่วนของของเหลวโดยใช้ผ้าขาวบางและกระดาษกรองเบอร์ 4 นำเฉพาะส่วนของเหลวไปทำให้แห้งด้วยความร้อน (Hot air drying) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้จะเก็บใส่ภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิดและป้องกันไม่ให้โดนแสง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic content)

ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน (Quettier-Deleu et al., 2000) เริ่มจากหยอดสารสกัดปริมาณ 20 μ L ตามด้วย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาณ 0.2 mL และ น้ำกลั่น ปริมาณ 2 mL บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที หลังจากนั้น เติม 20% sodium carbonate ปริมาณ 1 mL และบ่มต่ออีก 2 ชั่วโมง โดยแต่ละตัวอย่างสารสกัดจะทำแบบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) หลังจากบ่มครบเวลาจะนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยรายงานผลเป็นหน่วย mg/L GAE/mg extract

การคำนวณสารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic compounds)

สร้างกราฟมาตรฐาน ของ Gallic acid และคำนวณปริมาณ total phenolic ในสารละลายตัวอย่างด้วยการแทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐาน

$$(y = ax + b)$$

โดยที่ x = ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดตัวอย่าง

y = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารสกัดตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content)

ด้วยวิธี Aluminum chloride method โดยใช้เคอควิซิทิน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน เริ่มจากหยอดสารสกัดปริมาณ 100 μL ผสมกับ 2% AlCl_3 ปริมาณ 100 μL บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที โดยแต่ละตัวอย่างสารสกัดจะทำแบบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) หลังจากบ่มครบเวลาจะนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยรายงานผลเป็นหน่วย mg/L quercetin/ mg extract

การคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ (Flavonoids content)

สร้างกราฟมาตรฐาน ของ Quercetin และคำนวณปริมาณ flavonoids content ในสารละลายตัวอย่างด้วยการแทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐาน

$$(y = ax + b)$$

โดยที่ x = ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดตัวอย่าง

y = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารสกัดตัวอย่าง

การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธีคือ

วิธีที่ 1 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging capacity (DPPH) โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน (Tai et al., 2011) เตรียมสารมาตรฐานและสารสกัดในตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 และ 50 mg/mL จากนั้นหยอดสาร 1 mM DPPH บ่มในที่มืดและที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที โดยแต่ละตัวอย่างสารสกัดจะทำแบบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) หลังจากบ่มครบเวลาจะนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้แต่ละความเข้มข้นของสารสกัดไปสร้างกราฟเปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐานโดยรายงานผลเป็นค่า IC_{50} หน่วย mg/mL

การคำนวณ % DPPH scavenging นำค่าที่ได้มาคำนวณ ตามสูตร ดังต่อไปนี้

$$\% \text{ DPPH scavenging} = [(A_c - A_t)/A_c] \times 100$$

เมื่อ A_c = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของ DPPH ในตัวทำละลายเมทานอล

A_t = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารสกัดตัวอย่าง

นำค่าที่ได้มา Plot graph เพื่อหาสมการเส้นตรง $y = ax + b$

คำนวณหาค่า IC_{50} โดยแทนค่า 50 ที่ y ในสมการเส้นตรง จะได้ค่า IC_{50} ของสารตัวอย่าง

วิธีที่ 2 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน (Benzie & Strain, 1996) เริ่มจากการเตรียมสาร FRAP reagent โดยผสม acetate buffer ปริมาณ 25 mL และ TPTZ ปริมาณ 2.5 mL ลงใน $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ปริมาณ 2.5 mL หลังจากนั้น นำ FRAP reagent ที่ผสมแล้ว มาหยอดสารสกัดปริมาณ 50 μ L ผสมลงไปและใช้เครื่องปั่นผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรที่นาที่ 0 และนำไปบ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งโดยใช้เครื่อง spectrophotometer โดยแต่ละตัวอย่างสารสกัดจะทำแบบซ้ำ 3 ครั้ง(triplicate) นำค่าที่ได้แต่ละความเข้มข้นของสารสกัดไปสร้างกราฟเปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐานโดยรายงานผลเป็นค่า IC_{50} หน่วย mg/mL

การคำนวณ FRAP activity นำค่าที่ได้มาคำนวณ ตามสูตร ดังต่อไปนี้

$$FRAP \text{ activity} = [(A_c - A_t)/A_c] \times 100$$

เมื่อ A_c = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของตัวทำละลายเอทานอล

A_t = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารสกัดตัวอย่าง

นำค่าที่ได้มา Plot graph เพื่อหาสมการเส้นตรง $y = ax + b$

คำนวณหาค่า IC_{50} โดยแทนค่า 50 ที่ y ในสมการเส้นตรง จะได้ค่า IC_{50} ของสาร

วิธีที่ 3 Nitric oxide (NO) radical scavenging assay ดัดแปลงตามวิธีของ (Aktas et al., 2013) โดยใช้เคอควิทีน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน เริ่มจากนำสารละลาย Sodium nitroprusside (SNP) 10 mM ที่ละลายใน Phosphate buffer saline (pH 7.4) ปริมาณ 40 μ L มาหยอดสารสกัดปริมาณ 20 μ L ผสมลงไป วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 150 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Griess (1% Sulfanilamide: 0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) ในอัตราส่วน 1:1) ปริมาณ 100 μ L ผสมสารให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดย

ใช้เครื่อง spectrophotometer โดยแต่ละตัวอย่างสารสกัดจะทำแบบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) รายงานผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% Inhibition)

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Nitric oxide (% Inhibition of NO) นำค่าที่ได้มาคำนวณ ตามสูตร ดังต่อไปนี้

$$\% \text{ NO inhibition} = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

เมื่อ A_c = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารละลาย SNP

A_t = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารสกัดตัวอย่าง

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการนำหอมแดงสดมาทำให้แห้ง พบว่ามีค่า %Yield (Dried sample) เท่ากับ 14.55 จากนั้นนำมาสกัดสารสำคัญด้วย 3 วิธี ได้แก่ 1) สกัดด้วยน้ำกลั่น (DW) 2) สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (DW+B60°C) และ 3) สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (A50) โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์ที่ได้หลังจากการทำแห้ง (%Yield) ของวิธีการสกัดแบบ DW+B60°C มีค่า %Yield crude extract เท่ากับ 5.00 รองลงมาคือ การสกัดแบบ DW และการสกัดแบบ A50 มีค่าเท่ากับ 4.25 และ 4.00 ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดที่ได้จากทั้ง 3 วิธี มีลักษณะของสารสกัดหยาบที่ได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงค่า %Yield สารสกัดหยาบ (Crude extract)

วิธีการสกัดสารสำคัญ	ค่า %Yield สารสกัดหยาบ (Crude extract)
DW	4.25
DW+B60°C	5.00
A50	4.00



รูปที่ 1 แสดงลักษณะภายนอกของหอมแดง (A) แบบสดปอกเปลือก (B) และแบบแห้งป่นละเอียด (C) ที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพืช



รูปที่ 2 แสดงลักษณะสารสกัดหยาบ (Crude extract) ที่ได้รับการสกัดทั้ง 3 วิธี

นอกจากนั้น ผลการวิจัยยังพบว่าหอมแดงที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (DW+B60°C) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 9.07 ± 0.32 mg/L GAE/mg extract และ 1.226 ± 0.017 mg/L quercetin/mg extract ตามลำดับ วิธีการสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดรองลงมา คือ หอมแดงที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (DW) และสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (A50) โดยมีค่าเท่ากับ 5.03 ± 0.05 และ 3.79 ± 0.01 mg/L GAE/mg extract ตามลำดับ แต่พบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในการหมักแบบ A50 มีค่าสูงกว่าการหมักแบบ DW เล็กน้อยโดยมีค่าเท่ากับ 0.492 ± 0.007 และ 0.433 ± 0.007 mg/L quercetin/mg extract ตามลำดับ นอกจากนี้ การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และ FRAP พบว่าหอมแดงที่สกัดด้วยวิธี DW+B60°C มีฤทธิ์ดีที่สุด โดยมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) มีค่าเท่ากับ 8.65 ± 0.01 และ 20.86 ± 0.43 mg/mL ส่วนหอมแดงที่สกัดด้วยวิธี DW มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 12.89 ± 0.14 และ 29.75 ± 0.03 mg/mL ส่วนวิธีการสกัด

A50 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.97 ± 0.36 และ 38.63 ± 0.07 mg/mL โดยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของกรดแอสคอร์บิกซึ่งเป็นสารมาตรฐาน (STD) ของการทดสอบ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.014 ± 0.37 และ 2.007 ± 0.11 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant activity) ด้วยวิธี DPPH และ FRAP และสมการเส้นตรง (Linear equation) เปรียบเทียบกับค่าสารมาตรฐาน (STD) ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น หอมแดงที่สกัดด้วยวิธี DW+B60°C มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ NO โดยแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 27.22 ± 0.30 รองลงมาคือ หอมแดงที่สกัด A50 และ DW มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 26.52 ± 0.15 และ 18.26 ± 0.30 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3

ตารางที่ 2 แสดงค่าสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP ของหอมแดงที่สกัดด้วยเทคนิควิธีการที่แตกต่างกัน ค่าที่ได้แสดงในรูปแบบ Mean $\pm$ SEM

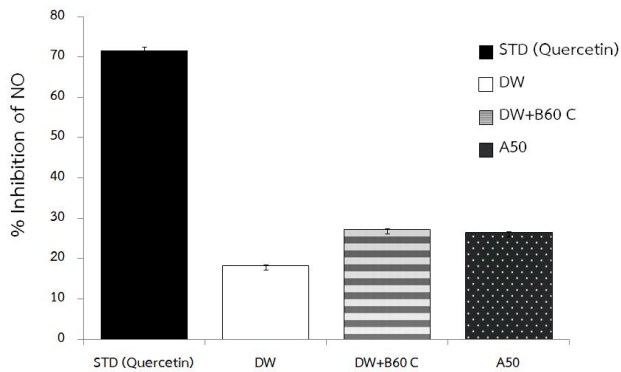
การทดสอบ	STD	วิธีการสกัดสารสำคัญ		
		DW	DW+B60°C	A50
TPC (mg/L GAE/mg extract)	-	5.03 ± 0.05	9.07 ± 0.32	3.79 ± 0.01
Flavonoid (mg/L quercetin/mg extract)	-	0.433 ± 0.007	1.226 ± 0.017	0.492 ± 0.007
DPPH (IC_{50} : mg/mL)	0.014 ± 0.37	12.89 ± 0.14	8.65 ± 0.01	8.97 ± 0.36
FRAP (IC_{50} : mg/mL)	2.007 ± 0.11	29.75 ± 0.03	20.86 ± 0.43	38.63 ± 0.07

ตารางที่ 3 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจด้วยวิธี DPPH ของหอมแดงที่สกัดด้วยวิธีที่ต่างกันเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (STD) ค่าที่ได้แสดงในรูปแบบ Mean±SEM

วิธีการสกัด ตัวอย่าง (n=3)	ความเข้มข้น (mg/mL)	% DPPH Scavenging	Linear equation
STD (Ascorbic acid)	0.001	17.30±0.48	$y = 3.0818x + 6.2893$ $R^2 = 0.9895$
	0.005	24.21±3.21	
	0.010	34.59±0.65	
	0.020	65.41±2.36	
	0.025	85.85±0.83	
	0.050	105.97±0.18	
DW	0.5	1.49±0.89	$y = 2.965x + 11.792$ $R^2 = 0.9781$
	1	6.47±1.11	
	2	9.43±1.33	
	5	24.06±0.67	
	10	45.28±0.44	
	20	69.81±1.33	
	50	80.66±1.11	
DW+B60°C	0.5	3.76±1.27	$y = 5.8445x - 0.5695$ $R^2 = 0.9776$
	1	12.90±0.01	
	2	23.12±2.28	
	5	60.22±1.01	
	10	72.17±0.86	
	20	91.94±0.76	
	50	93.55±3.04	
A50	0.5	23.11±1.00	$y = 2.1024x + 31.132$ $R^2 = 0.9922$
	1	31.13±0.67	
	2	40.57±1.33	
	5	53.77±2.00	
	10	72.64±1.33	
	20	82.08±0.67	
	50	91.98±0.33	

ตารางที่ 4 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่ตรวจด้วยวิธี FRAP ของหอมแดงที่สกัดด้วยวิธีที่ต่างกันเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (STD) ค่าที่ได้แสดงในรูปแบบ Mean±SEM

วิธีการสกัด ตัวอย่าง (n=3)	ความเข้มข้น (mg/mL)	FRAP activity	Linear equation
STD (Ascorbic acid)	0.010	0.48±0.10	$y = 0.0106x + 0.5912$ $R^2 = 0.9961$
	0.020	0.71±0.33	
	0.025	0.90±0.05	
	0.050	1.19±0.62	
	0.100	1.62±1.43	
	0.250	3.24±2.29	
DW	0.5	2.43±0.33	$y = 1.5939x + 2.5742$ $R^2 = 0.9919$
	1	4.33±0.62	
	2	5.67±0.14	
	5	10.33±0.05	
	10	20.52±0.33	
	20	33.52±0.19	
DW+B60°C	0.5	2.33±0.33	$y = 2.2877x + 2.277$ $R^2 = 0.9977$
	1	4.57±0.19	
	2	7.05±0.01	
	5	12.81±0.24	
	10	24.14±1.29	
	20	33.90±2.48	
A50	0.5	1.33±0.48	$y = 1.2702x + 0.9289$ $R^2 = 0.9831$
	1	1.62±0.19	
	2	2.90±0.62	
	5	7.38±0.52	
	10	16.05±0.43	
	20	25.19±0.05	



รูปที่ 3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Nitric oxide (% Inhibition of NO) ของการสกัดสารทั้ง 3 วิธีที่ความเข้มข้น 10 mg/mL เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (STD) ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mL

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยพบว่า หอมแดง (Shallot) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Allium ascalonicum* L. เป็นพืชที่มีสารที่มีคุณสมบัติเป็นฟลักเคมิ (Phytochemical) ในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้งในส่วนของคุณสมบัติสารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic content) ปริมาณฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) ด้วยวิธี DPPH และ FRAP และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ NO วิธีการสกัดที่ดีที่สุดในการทดลองครั้งนี้ คือ การสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (DW+B60°C) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารสำคัญในหอมแดงกลุ่มหลักน่าจะเป็นสารกลุ่มที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วและละลายได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิห้องปกติแต่ไม่ถึงจุดเดือด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Maja Dent และคณะ (Maja, D et al., 2013) นอกจากนั้น วิธีการสกัดสารที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ของหอมแดงที่ต่างกัน โดยผลของความร้อนอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถช่วยให้การสกัดสารสำคัญในหอมแดงมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

การวิจัยในครั้งนี้ เป็นการเปรียบเทียบวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 วิธี โดยมีความแตกต่างกันของคุณสมบัติการมีขั้วและอุณหภูมิ ซึ่งวิธีการของการสกัดสารเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการได้มาซึ่งสารสำคัญ ดังนั้น ควรเพิ่มเติมตัวทำละลายที่

แตกต่างกันในด้านคุณสมบัติการละลายทั้งมีขี้ว กิ่งมีขี้ว และไม่มีขี้ว เช่น เฮกเซน (Hexan) อีเทอร์ (Ether) และ อะซิโตน (Acetone) เป็นต้น อีกทั้ง ควรศึกษาเพิ่มเติมผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด รวมทั้งอุณหภูมิในการระเหยตัวทำละลาย โดยการวิจัยครั้งนี้ใช้ความร้อนในการระเหยตัวทำละลายที่มีส่วนประกอบของน้ำทั้ง 3 วิธี ซึ่งการใช้ความร้อนที่มากเกินไปสารจะสลายตัว หรือ ถ้าความร้อนต่ำเกินไปน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายจะระเหยออกไม่หมด ดังนั้น ควรเพิ่มเติมเทคนิควิธีการอื่น เช่น การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) เพื่อคงปัจจัยเรื่องอุณหภูมิซึ่งมีผลต่อสารสำคัญที่สกัดได้โดยคำนึงถึงคุณค่าเป็นพื้นฐาน อีกทั้งควรมีการทดสอบหาปริมาณสารสำคัญในกลุ่มเคอซีทิน (Quercetin) และแคมป์เฟอร์อล (Kaempferol) ที่พบได้มากในหอมแดงร่วมด้วย เพื่อนำข้อมูลไปต่อยอดสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพและการวิจัยที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในสัตว์ทดลองและทางคลินิกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ที่เอื้ออำนวยความสะดวกงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Aktas, N., Genc, Y., Gozcelioglu, B., Konuklugil, B., & Harput, U. S. (2013). Radical scavenging effect of different marine sponges from Mediterranean coasts. *Records of Natural Product*, 7(2), 96-104.
- Alexander Victor, A. D., Radhakrishnan, A., & Subramani, P. (2016). Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*, 10(20), 84-89.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

- García-Trejo, E. M., Arellano-Buendía, A. S., Argüello-García, R., Loredó-Mendoza, M. L., García-Arroyo, F. E., Arellano-Mendoza, M. G., Castillo-Hernández, M. C., Guevara-Balcázar, G., Tapia, E., Sánchez-Lozada, L. G., & Osorio-Alonso, H. (2016). Effects of Allicin on Hypertension and Cardiac Function in Chronic Kidney Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-13. doi: 10.1155/2016/3850402.
- Che Sulaiman, I. S., Basri, M., Fard Masoumi, H. R., Jian Chee, W., Efliza Ashari S., & Ismail, M. (2017). Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chemistry Central Journal*, 11, 1-11. doi: 10.1186/s13065-017-0285-1.
- Jiri, M., Tunde, J., Sona, S., & Jiri, S. (2016). Quercetin and Its Anti-Allergic Immune Response. *Molecules*, 21(5), 623-637.
- Ji-Sook, L., Yong-Jun, C., Kyung-Hea, L., & Jung-Eun, Y. (2016). Onion peel extract reduces the percentage of body fat in overweight and obese subjects: a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrition Research and Practice*, 10(2), 175-181.
- Jun, Y., Katherine, J. M., Jan van, D. H., & Rui, H. L. (2004). Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), 6787-6793.
- Maja, D., Verica, D. U., Marija, P., Mladen, B., Tomislav, B., & Branka, L. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 84-91.
- Mariangela, M., Valentina, A., Giancarlo, S., & Filomena, C. (2019). Biological Properties and Bioactive Components of *Allium cepa* L.: Focus on Potential Benefits in the Treatment of Obesity and Related Comorbidities. *Molecules*, 19-36.

- Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J. C., Bailleul, F., Trotin, F. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 35-42.
- Razieh, J., Sayyed, M. B., Ali, M., & Morteza, B. R. (2007). Hypoglycemic Effect of Aqueous Shallot and Garlic Extracts in Rats with Fructose-Induced Insulin Resistance. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 41(3), 218-223.
- Sanaz, M., Behnod, A., Leila, D., Mehdi, A., Esfahani, Zahra, M., Hossein, K. B., & Reza, G. (2017). Effects of yogurt and yogurt plus shallot consumption on lipid profiles in type 2 diabetic women. *International Journal of Preventive Medicine*, 8(54), 1-4.
- Tai, A., Sawano, T., Yazama, F., & Ito, H. (2011). Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810, 170-177.
- Warangkana, A., Soraya, K., Sunee, C., Nutthiya, H., Saisawat, C., Masaaki, T., & Hirotooshi, T. (2019) Antiallergic activities of shallot (*Allium ascalonicum* L.) and its therapeutic effects in allergic rhinitis. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 40(4), 393-400.
- Yin, L., Zhuojin, H., Xiuying, S., Xiaolu, X., Jie, F., Shaohua, W., & Deyong, Z. (2012). Cholesterol-Lowering Effect of Allicin on Hypercholesterolemic ICR Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-6.