วันที่รับบทความ : 04/03/2567
วันแก้ไขบทความ : 22/04/2567
วันตอบรับบทความ : 26/04/2567

วารสารสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
Journal of Allied Health Sciences Suan Sunandha Rajabhat University

พฤกษเคมีวิเคราะห์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากใบส่องฟ้า

รัชยาพร อโนราช[1], ปัญญดา ปัญญาทิพย์[2], สุธิดา ดาถ่ำ[3], พิมลวรรณ ศิริปรุ[3], เบญจมาศ บั้งทอง[3], จุฑามาศ รถา[3], เพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง[1,3], ชวลิต โยงรัมย์[4*]

สาขาวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น[1]
สาขาวิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ[2]
กลุ่มวิจัยเมลาโทนิน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น[3]
สาขาวิชากัญชาเวชศาสตร์ วิทยาลัยสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา[4]
E-mail: chawalit.yo@ssru.ac.th*

บทคัดย่อ

ส่องฟ้า (*Clausena harmandiana*) เป็นพืชที่พบกระจายในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงประเทศไทย สรรพคุณทางแพทย์แผนไทยนำมาใช้ในการรักษาโรคทางเดินอาหาร อาการปวดตา อาการปวดศีรษะ และบำรุงสุขภาพ ฤทธิ์ดังกล่าวเกี่ยวเนื่องกับชนิดและปริมาณของสารพฤกษเคมีที่พบในต้นส่องฟ้า ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารพฤกษเคมีด้วยเทคนิค HPLC และ GC-MS รวมถึงวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) และฟลาโวนอยด์รวม (TFC) ต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้อนุมูลอิสระชนิด DPPH และ ABTS ร่วมกับการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ Ferric ion ด้วยวิธี FRAP จากผลการวิเคราะห์เป็นที่น่าสนใจว่าใบส่องฟ้าพบปริมาณของ TPC (196.29±3.64 mg GAE/g extract) และ TFC (129.93±1.92 mg QE/g extract) ในปริมาณสูง เมื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ จำนวน 12 ชนิดด้วยเทคนิค HPLC พบปริมาณสารตั้งแต่ 62.49 ถึง 1202.99 µg/g extract โดยมีปริมาณของสาร Protocatechuic acid สูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบสารที่สามารถระบุชนิดได้ทั้งหมด 31 สาร และไม่สามารถระบุได้ 5 สาร โดยมีร้อยละของพื้นที่พีค (% peak area) รวมเท่ากับ 96.17 เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 490.52±2.62 และ 162.00±1.40 µg/mL ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับ Trolox พบว่าสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า Trolox อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) เช่นเดียวกับผลการรีดิวซ์ Ferric ion โดยค่า FRAP เท่ากับ 88.36±4.30 mmole Fe^{2+}/100 g extract ซึ่งต่ำกว่า Trolox (3005.16±211.88 Fe^{2+}/100 g extract) อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) แต่อย่างไรก็ตามผลจากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีด้วยวิธี HPLC และ GC-MS พบสารหลายชนิดที่มีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้าน่าจะเป็นอีกทางเลือกจากธรรมชาติที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ

คำสำคัญ : ส่องฟ้า, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, พฤกษเคมี, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง, แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์

*** ผู้ประพันธ์บรรณกิจ**

วารสารสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
Journal of Allied Health Sciences Suan Sunandha Rajabhat University

Phytochemical analysis and antioxidant activities from the methanolic leaves extract of *Clausena harmandiana* (Pierre) Guillaumin

Rutchayaporn Anorach[1], Panyada Panyatip[2], Suthida Datham[3], Pimolwan Siripru[3], Benjamat Bangthong[3], Juthamat Ratha[3], Ploenthip Puthongking[1,3], Chawalit Yongram[4*]

Division of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University[1]
Division of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University[2]
Melatonin Research Group, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University[3]
Division of Cannabis Health Sciences, College of Allied Health Sciences, Suan Sunandha Rajabhat University[4]
E-mail: chawalit.yo@ssru.ac.th*

ABSTRACT

Clausena harmandiana is mainly found in Southeast Asian, including Thailand. *C. harmandiana* has been used in Thai traditional medical to treat gastrointestinal tract disease, eye pain, headaches and invigorate health. These activities related to the content of bioactive compounds that obtain in *C. harmandiana*. Thus, this study aims to evaluate the qualitative and quantitative of phytochemical content using HPLC and GC-MS techniques as well as the total phenolic contents (TPC) and total flavonoid contents (TFC). Antioxidant capacity with DPPH, ABTS and FRAP assays were also studied. The results showed the *C. harmandiana* leaves methanolic extract found a high level of TPC and TFC with the values are 196.29±3.64 and 129.93±1.92 mg QE/g extract, respectively. The qualitative and quantitative analysis of 12 compounds using HPLC found in the range of 62.49 to 1202.99 µg/g extract and protocatechuic acid was found in the highest content. GC-MS analysis reported a total peak area as 96.17% which is 31 known compounds and 5 unknown compounds. Antioxidant activities of methanol leaves extract showed IC_{50} values of 490.52±2.62 and 162.00±1.40 µg/mL in DPPH and ABTS assays, which is significantly (P<0.05) lower antioxidant activity than the standard Trolox. In addition, the result of ferric ion reduction by FRAP assay of *C. harmandiana* methanol leaves extract had a FRAP value of 88.36±4.30 mmole Fe^{2+}/100 g extract which is also lower than Trolox (3005.16±211.88 Fe^{2+}/100 g extract). However, the finding phytochemical contents by HPLC and GC-MS analysis in this study revealed several bioactive compounds that have been

reported as an antioxidant agent. Therefore, the methanol leaves extract of *C. harmandiana* might be a potential source of antioxidant activity and other biological activities.

Keywords: *Clausena harmandiana*, Antioxidant activity, Phytochemical, HPLC, GC-MS

*** Corresponding Author**

บทนำ

ส่องฟ้า (*Clausena harmandiana* (Pierre) ex Guillaumin) เป็นพืชไม้ล้มลุกจัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae (ตระกูลส้ม) โดยส่องฟ้ามีชื่อเรียกอื่น ๆ เช่น หวดหม่อนต้น หัศคุณดง ลอดฟ้า ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของส่องฟ้า เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 20-50 เซนติเมตร ใบประกอบแบบขนนก เรียงสลับ ใบย่อย มีรูปคล้ายไข่แกมวงรี แผ่นใบมีจุดน้ำมันกระจายทั่วใบ และมีกลิ่นเฉพาะของพืชวงศ์นี้[1] พืชวงศ์ Rutaceae ในประเทศไทยพบ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. Micromelum C. Marillia C. Glycosmis C. Murraya* และ *C. harmandiana*[2] สามารถพบได้ทั่วไปในเขตร้อนชื้น แพร่กระจายอย่างกว้างขวางในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในทางการแพทย์แผนไทยนิยมนำส่วนของใบอ่อน เปลือกต้น ราก และดอก มาใช้ร่วมกับสมุนไพรอื่น ๆ ในการปรุงเป็นยาเพื่อใช้ในการรักษาโรคทางระบบย่อยอาหาร เช่น การขับลมในลำไส้ และรักษาโรคอาหารเป็นพิษ[1] รักษาอาการปวดตา ปวดศีรษะ ตลอดส่งเสริมให้ใช้ในการบำรุงสุขภาพ[3] อีกทั้งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมนำใบสดอ่อนของส่องฟ้ามารับประทานเป็นเครื่องเคียงร่วมกับอาหารมาอย่างยาวนาน เนื่องจากรสชาติที่เปรี้ยวและกลิ่นหอมที่มีต่อมน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบร่วมด้วย[4] และมีรางานการศึกษาพบว่าสารสกัดส่องฟ้ามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านออกซิเดชั่น[5] และยังสามารถปกป้องเซลล์ประสาท[6] รวมถึงต้านเซลล์มะเร็ง[7] และยังรายงานการศึกษาพบว่าแต่ละส่วนของส่องฟ้า ช่วยต้านอนุมูลอิสระและป้องกันภาวะความเสื่อมของร่างกาย[8]

จากการศึกษากลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของพืชสกุล *Clausena* ที่วิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่ามีสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ กลุ่มเซสควิเทอร์พีน และกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ ซึ่งมีสารที่พบเช่น (E)-Anethole, β-Pinene, Sabinene, Germacrene-D, Linalool และPulegone[9] และสารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบสำคัญกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ สารกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอลคาลอยด์ และคูมาลิน ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ช่วยในการป้องกันความเสื่อมของร่างกายเช่นกัน โดยความเสื่อมของร่างกายเกิดจากความไม่สมดุลกันระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ ส่งผลเสียต่อโปรตีนและดีเอ็นเอของมนุษย์นำไปสู่ปัญหาสุขภาพและโรคเรื้อรังหลายอย่าง เช่น โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง รวมถึงโรคหลอดเลือด หัวใจ และระบบประสาท[10] การแสดงออกของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลายมีผลมาจากสารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบภายในพืช ดังนั้นข้อมูลสารองค์ประกอบทางเคมีของพืชจึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในทางเภสัชกรรมที่จะพัฒนาส่งเสริมการนำส่องฟ้ามาใช้ประโยชน์ในการแพทย์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบของสารพฤกษเคมีของใบส่องฟ้าที่สกัดด้วยเมทานอลด้วยเทคนิค HPLC และ GC-MS

2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบส่องฟ้าที่สกัดด้วยเมทานอล

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างและการสกัด

ใบส่องฟ้า (*C. harmandiana*) เก็บมาจากจังหวัดขอนแก่น ในช่วงเดือนกุมภาพันธุ์ พ.ศ.2565 โดยตัวอย่างส่องฟ้า (Voucher specimen number KKU 21145) ถูกนำมาตรวจสอบลักษณะทางพฤกษศาสตร์และเก็บตัวอย่างที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในการสกัดเริ่มโดยนำใบส่องฟ้ามาทำความสะอาด แล้วนำมาอบให้แห้ง และมาสกัดด้วยเมทานอลในอัตราส่วนของผงใบส่องฟ้าต่อเมทานอล (2:8) ด้วยเทคนิค Sonication ด้วยเครื่อง Ultrasonic cleaners (TRU-SWEEPTM, NY, USA) ด้วยความถี่ 50/60 Hz และมีกำลังไฟ 100 watt (สกัดซ้ำ 3 ครั้ง) หลังจากนั้นนำมากรองและระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศซึ่งจะได้สารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้า โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วย HPLC (High-performance liquid chromatography) (Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D; Kyoto, Japan) ด้วย Column Unisol C18, 5 µm Particle Size, 4.6 × 250 mm (Torrance, Ca, USA) โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นส่วนผสมระหว่าง 1% Acetic acid (v/v) ในน้ำปราศจากไอออน (Solvent A) และ Acetonitrile (Solvent B) ซึ่งใช้ระบบ Gradient Program เริ่มจาก 0-5 นาที, 5% Solvent B; จาก 5-15 นาที, 9% Solvent B; จาก 15-22 นาที, 11% Solvent B; จาก 22-38 นาที, 18% Solvent B; จาก 38-43 นาที, 23% Solvent B; จาก 43-44 นาที, 90% Solvent B; จาก 44-45 นาที, 80% Solvent B; จาก 45-55 นาที, Isocratic program ที่ 80% Solvent B; จาก 55-65 นาที, Re-equilibration ที่ 5% Solvent B; Linear gradient จาก 65-70 นาที, 5% Solvent B ที่อัตราการไหล 0.8 mL/min อุณหภูมิคอลัมน์ 40°C และฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 20 µL โดยใช้ UV-diode array detector ที่ความยาวคลื่น 280 nm สำหรับสารกลุ่ม Hydroxybenzoic acids และ 320 nm สำหรับสารกลุ่ม Hydroxycinnamic acids รวมไปถึง 370 nm สำหรับสารกลุ่ม Flavonols ซึ่ง HPLC Chromatogram ของสารตัวอย่างจะถูกเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานฟีนอลิกที่เวลาเดียวกัน[11] (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้าโดยใช้เครื่อง GC-MS SHIMADZU QP-2010 instrument (Kyoto, Japan) ด้วยคอลัมน์ Agilent J&W DB-5MS column (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm, Santa Clara, CA, USA) ตั้งอัตราการไหลของก๊าซฮีเลียมเข้าคอลัมน์เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีอุณหภูมิของคอลัมน์ดังนี้ อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 40°C เป็นเวลา 2 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 40-100°C (5.0°C /min, hold 5 min), จาก 100-150°C (5.0°C/min, hold 10 min), จาก

150-200°C (5.0°C/min, hold 10 min), จาก 200-250°C (5.0°C/min, hold 5 min), จาก 250-320°C (5.0°C/min, hold 15 min และฉีดตัวอย่าง 1 µL ที่มี split ratio ที่ 1:20 ที่มีก๊าซฮีเลียม เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งพีคของสารสำคัญจะถูกวิเคราะห์เทียบกับแมสสเปกตรัมโดยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NIST17.LIB[12]

2.3 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจะใช้วิธี Folin-Ciocalteu (ทำการเจือจาง Folin-Ciocalteu ในน้ำกลั่น 10 เท่าก่อนการทดสอบ) ในการทดสอบจะผสมสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้า 20 µL กับ 10%Folin-Ciocalteu 100 µL ในถาดหลุดชนิด 96 หลุม (96 Well plate) บ่มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 7% Sodium carbonate 80 µL บ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm ของ Blue chromophore ด้วยเครื่อง Microplate reader (Sunrise Tecan, Grödig, Austria) และใช้เมทานอลเป็น Blank ซึ่งปริมาณฟีนอลิกรวมจะแสดงในรูปของน้ำหนักเทียบเท่ากรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/g extract)[13] (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

2.4 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้าจะใช้ปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้าผสมกับ 2% $AlCl_3$ ในอัตราส่วน 1:1 ในถาดหลุดชนิด 96 หลุม (96 Well plate) บ่มเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm และใช้เมทานอลเป็น Blank ซึ่งปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจะแสดงในรูปของน้ำหนักเทียบเท่าเควอซิตินในหน่วยมิลลิกรัมต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (mg QE/g extract)[14] (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.1 วิธี DPPH radical-scavenging

ผสมสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้าความเข้มข้นต่าง ๆ (ความเข้มข้นสุดท้าย 10-500 µg/mL) กับสารละลาย 200 µM DPPH ในอัตราส่วนที่เท่ากัน โดยบ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงไปเป็นไม่มีสี แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ที่ 517 nm โดยใช้ Trolox เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก และใช้เมทานอลเป็น Blank แล้วคำนวณค่า %DPPH Inhibition และสร้างกราฟระหว่าง %DPPH Inhibition กับความเข้มข้นเพื่อหาค่า Median inhibitory concentration; IC_{50}[1] (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

$$\%DPPH\ Inhibition = [(A_{control}-A_{sample})/ A_{control}] \times 100$$

3.2 วิธี ABTS radical-scavenging

ABTS จะถูกทำให้เป็นอนุมูลอิสระด้วยตัวออกซิไดซ์ Potassium persulfate (2.45 mM) ในน้ำกลั่น บ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนการใช้งาน ผสมสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับสารละลาย 7 mM ABTS ในอัตราส่วนที่เท่ากัน โดยบ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินไปเป็นไม่มีสี แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS ที่ 415 nm โดยใช้ Trolox เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก

และใช้เมทานอลเป็น Blank แล้วคำนวณค่า %ABTS Inhibition และสร้างกราฟระหว่าง %ABTS Inhibition กับความเข้มข้นเพื่อหาค่า IC_{50}[16] (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

$$\%ABTS\ Inhibition = [(A_{control}-A_{sample})/ A_{control}] \times 100$$

3.3 วิธี Ferric reducing/antioxidant power (FRAP)

สารละลาย FRAP จะถูกเตรียมโดยการผสมของ 300 mM Acetate buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl และ 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ในอัตราส่วน 10:1:1 สำหรับการทดสอบเริ่มโดยนำสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้ามาผสมกับสารละลาย FRAP ใน 96 well plate และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 min ในที่มืดแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 595 nm โดยใช้ Trolox เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก และใช้เมทานอลเป็น Blank ผลที่ได้จะแสดงผลในหน่วย mmole Fe^{2+}/100 g extract[17] (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลต่าง ๆ จะถูกแสดงในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยจะใช้ one-way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี Tukey's test และวิธี t-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) ด้วยโปรแกรม SPSS 26.0

ผลการวิจัย

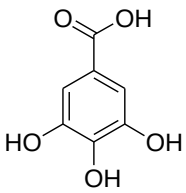
1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค HPLC

สารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีบทบาทสำคัญในการช่วยรักษาโรคต่างๆ ได้หลายชนิด และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้[18] ซึ่งการศึกษานี้ได้วิเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Rutin และ Quercetin) และสารในกลุ่มฟีนอลิกกลุ่มย่อย Hydroxybenzoic acids (Gallic, Syringic, Protocatechuic acid, *p*-Hydroxybenzoic และ Vanillic acid) และกลุ่มย่อย Hydroxycinnamic acids (Caffeic, Ferulic, Sinapic, *p*-Coumaric และ Chlorogenic acid) ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าในสารสกัดมีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์อยู่ในช่วง 62.49 ถึง 1202.99 µg/g extract ดังตารางที่ 1 ซึ่งมี Protocatechuic acid สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (1202.99±13.13 µg/g extract) รองลงมาได้แก่ *p*-Coumaric acid, Quercetin, *p*-Hydroxybenzoic acid, Gallic acid, Ferulic acid, Vanillic acid และ Syringic acid ตามลำดับ (ภาพที่ 1) นอกจากนี้พบว่ามีปริมาณของ Chlorogenic acid และ Rutin มีค่าน้อยกว่า 10 µg/g extract ซึ่งเป็นค่า LOQ ที่เครื่อง HPLC สามารถตรวจวัดปริมาณได้ และไม่พบ Caffeic acid ในสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้า

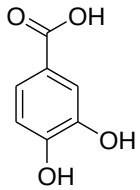
ตารางที่ 1 ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้าด้วยเทคนิค HPLC

สารสำคัญ	ปริมาณสารสำคัญ (µg/g extract)
Gallic acid	354.82±3.22[e]
Protocatechuic acid	1202.99±13.13[a]
p-Hydroxybenzoic acid	392.96±4.68[d]
Vanillic acid	113.24±3.45[g]
Syringic acid	73.05±3.45[h]
Chlorogenic acid	<10[i]
Caffeic acid	ND[i]
p-Coumaric acid	768.77±4.20[b]
Ferulic acid	266.38±0.98[f]
Sinapic acid	62.49±0.12[h]
Rutin	<10[i]
Quercetin	560.03±2.06[c]

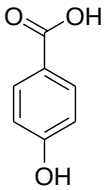
หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษหมายถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



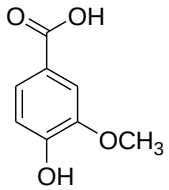
Gallic acid



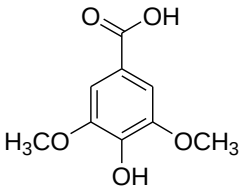
Protocatechuic acid



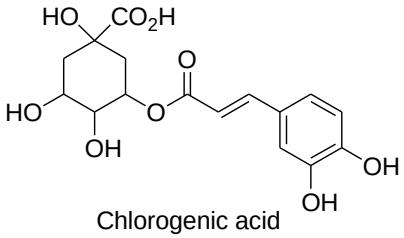
p-Hydroxybenzoic acid



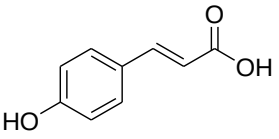
Vanillic acid



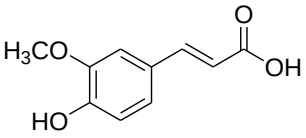
Syringic acid



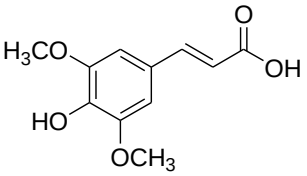
Chlorogenic acid



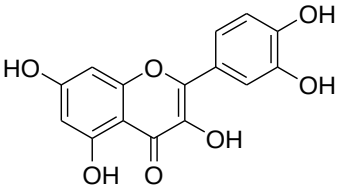
p-Coumaric acid



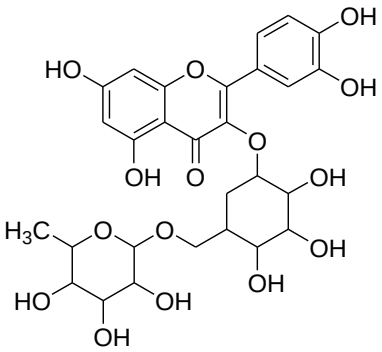
Ferulic acid



Sinapic acid



Quercetin

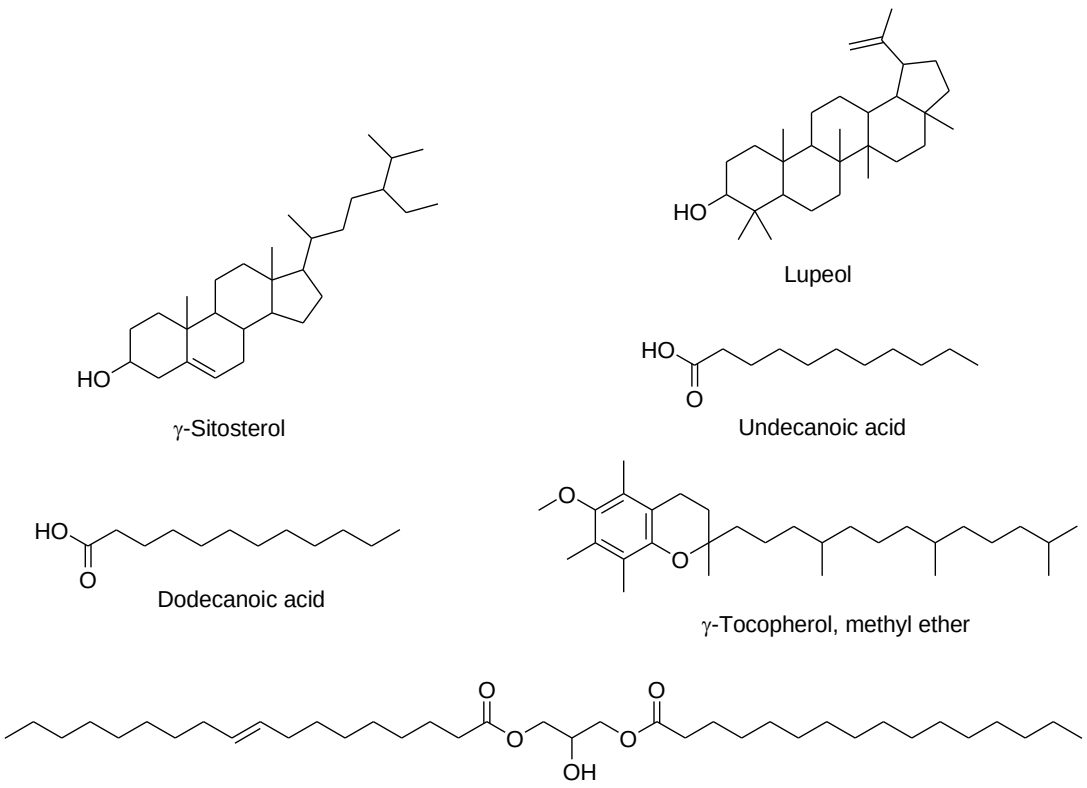


Rutin

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่พบในสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้าเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS

ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS ของสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้า สามารถระบุสารสำคัญได้ทั้งหมด 31 ชนิดและไม่สามารถระบุได้ (Unknown) 5 ชนิด (ตารางที่ 1) ซึ่งสารสำคัญที่ระบุได้ที่มี %Peak area มากกว่า 2% ได้แก่ 9-Octadecenoic acid (Z)-,2-hydroxy-3-[(1-oxohexadecyl)oxy] propyl ester (21.26%) ซึ่งเป็นสารที่มี %Peak area มากที่สุดและรองลงมาได้แก่ Dodecanoic acid (11.61%), **γ**-Tocopherol, methyl ether (4.74%), **γ**-Sitosterol (3.42%), Undecanoic acid (2.95%) และ Lupeol (2.78%) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS ที่พบในสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้าเฉพาะที่มี %Peak area มากกว่า 2%

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS ของสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้า

ลำดับที่	ชื่อสารสำคัญ	CAS Registry	KI	%Peak area	Fragmentation Pattern m/z
1	Isoamyl acetate	123-92-2	820	0.38	133, 121, 88, 74, 70, 61, 55, 43(100)
2	n-Decanoic acid	334-48-5	1372	1.39	172, 143, 129, 115, 101, 87, 73, 60(100), 57, 41
3	Methyl undecanoate	1731-86-8	1381	0.07	169, 157, 143, 129, 115, 101, 87, 74(100), 69, 55, 41
4	Undecanoic acid	112-37-8	1471	2.95	207, 186, 169, 157, 143, 129, 115, 73(100), 60, 43, 55
5	Methyl dodecanoate	111-82-0	1481	0.61	214, 183, 171, 157, 143, 129, 101, 87, 74(100), 55, 43, 69
6	Dodecanoic acid	143-07-7	1570	11.61	207, 200, 171, 157, 143, 129, 115, 101, 85, 73(100), 60, 43
7	3-Oxo-alpha-ionol	34318-21-3	1627	0.24	152, 123, 108(100), 95, 91 77, 67, 53, 43
8	3-Buten-2-ol, 2-methyl-4-(1,3,3-trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-2-yl)-	72294-84-9	1497	0.30	179, 138, 119, 110, 96, 81(100), 69, 55, 41
9	3,7,11,15-Tetramethylhexadec-2-ene	2437-93-6	1802	0.09	140, 125, 111, 97, 83, 70(100), 57, 41
10	Neophytadiene	504-96-1	1774	0.9	249, 193, 151, 137, 123, 109, 95, 82, 68(100), 57, 43
11	Phytol	102608-53-7	2045	0.32	278, 179, 123, 109, 95, 82(100), 68, 57, 43
12	Methyl palmitate	112-39-0	1878	0.28	270, 239, 227, 213, 199, 185, 171, 157, 143, 129, 115, 101, 87, 74(100), 69, 55, 43
13	Palmitic Acid	57-10-3	1968	0.36	256, 227, 213, 199, 185, 171, 157, 143, 129, 115, 97, 87, 73(100), 60, 43
14	Phytol	150-86-7	2045	0.88	196, 137, 123, 111, 95, 81, 71(100), 57, 41
15	Nonacosanal	72934-04-4	3092	0.17	281, 208, 157, 138, 124, 110, 96, 82(100), 69, 57, 43

ลำดับที่	ชื่อสารสำคัญ	CAS Registry	KI	%Peak area	Fragmentation Pattern m/z
16	Squalene	111-02-4	2914	0.78	281, 257, 203, 149, 136, 121, 107, 95, 81, 69(100), 41
17	α-Tocospiro B	601490-41-9	3195	0.54	419(100), 402, 237, 219, 205, 191, 177, 153, 137, 125, 109, 95, 83, 57, 43
18	Glycerol tricaprylate	538-23-8	3143	0.17	127, 281, 265, 251, 221, 201, 185, 171, 158, 145, 127(100), 109, 81, 57
19	Einecs 306-416-1	54159-46-5	3058	0.1	415, 355, 295, 281, 267, 251, 221, 207, 147, 121, 107, 93, 81, 69(100), 41
20	β-Tocopherol	148-03-8	3036	0.1	416, 355, 325, 191, 151(100), 135, 123, 107, 57
21	γ-Tocopherol	7616-22-0	3036	0.41	416, 355, 325, 191, 151(100), 135, 123, 107, 57,41
22	Cholesta-4,6-dien-3-ol, (3β)-	14214-69-8	2579	0.25	394, 356, 341, 275, 211, 199, 171, 159, 143, 135, 119, 105, 95, 81(100), 69, 43
23	Stigmasta-3,5-diene	4970-37-0	2525	0.4	396, 381, 288, 275, 255, 237, 213, 195, 147(100), 133, 105, 95, 81, 57, 43
24	γ-Tocopherol, methyl ether	79306-82-4	3004	4.74	430, 205, 145(100), 121, 91, 71, 57
25	Campesterol	474-62-4	2632	0.67	400, 382, 367, 315, 289, 273, 255, 231, 213, 199, 173, 161, 145, 133, 107(100), 95(100), 81, 69, 43
26	Stigmasterol	83-48-7	2739	0.53	412, 394, 379, 351, 300, 271, 255, 213, 173, 159, 145, 133, 105, 83(100), 69, 55(100)
27	γ-Sitosterol	83-47-6	2731	3.42	414, 396, 381, 329, 303, 273, 255, 231, 213, 199, 173, 145, 133, 119, 107(100), 95(100), 81, 43
28	Lup-20(29)-en-3-one	1617-70-5	2831	0.39	475, 424, 409, 396, 381, 313, 245, 232, 205, 189, 175, 161, 147, 135, 121, 109, 95(100), 81, 67, 55, 41
29	Lupeol	545-47-1	2848	2.78	426, 411, 315, 257, 229, 218, 207, 189, 175, 161, 147, 135, 121,109, 95(100), 81, 69, 55, 41

ลำดับที่	ชื่อสารสำคัญ	CAS Registry	KI	%Peak area	Fragmentation Pattern m/z
30	Phytyl stearate	62172-54-7	3759	0.33	401, 278, 183, 152, 137, 123, 109, 95(100), 82, 57, 43
31	9-Octadecenoic acid (Z)-, 2-hydroxy-3-[(1-oxohexadecyl)oxy] propyl ester	3343-30-4	4204	21.26	480, 423, 367, 339, 313, 264, 239, 227, 185, 137, 123, 109, 95, 71, 57(100)
32	Unknown	-	-	33.57	
33	Unknown	-	-	1.27	-
34	Unknown	-	-	1.91	-
35	Unknown	-	-	0.58	-
36	Unknown	-	-	1.42	-
รวมทั้งหมด				96.17	

หมายเหตุ KI คือ ค่า retention index, homologous of n-alkane ที่วิเคราะห์จากคอลัมน์ใช้ในการแยกสาร (คอลัมน์ Agilent J&W DB-5MS)
CAS Registry คือ Chemical Abstracts Service

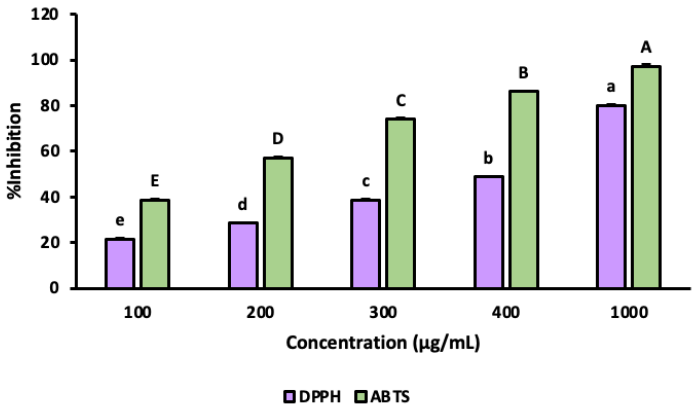
3. ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม

ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ซึ่งมีสมการเส้นตรงเท่ากับ $y = 0.049x + 0.006$ ($R^2 = 0.9997$) พบว่าในสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้ามีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 196.29±3.64 mg GAE/g extract และการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (TFC) เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ซึ่งมีสมการเส้นตรงเท่ากับ $y = 0.0297x - 0.0022$ ($R^2 = 0.9999$) พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 129.93±1.92 mg QE/g extract

4. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้า

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้าด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้ามีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ซึ่งมีฤทธิ์เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้น (Dose-dependent manner) ดังภาพที่ 3 ซึ่งสามารถหาค่า IC_{50} ด้วยวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 490.52±2.62 และ 162.00±1.40 µg/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 3) นอกจากนี้เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เทียบกับกราฟมาตรฐานของ $FeSO_4$ ซึ่งมีสมการเส้นตรงเท่ากับ

y = 0.0051x - 0.0411 (R^2 = 1.0000) พบว่าสารสกัดมีค่า FRAP เท่ากับ 88.36±4.30 mmole Fe^{2+}/100 g extract แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับ Trolox ซึ่งเป็นสารมาตรฐานพบว่าสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้ายังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า Trolox อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)



ภาพที่ 3 ร้อยละการยับยั้งของสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้าเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH (■) และ ABTS (■) radical-scavenging และตัวอักษรภาษาอังกฤษหมายถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบ %Inhibition ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยที่ตัวอักษรพิมพ์เล็กเป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างในวิธี DPPH และตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ในวิธี ABTS ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้า

ตัวอย่าง	**ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ**		
	DPPH; IC_{50} (µg/mL)	**ABTS; IC_{50} (µg/mL)**	**FRAP (mmole Fe^{2+}/100 g extract)**
สารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้า	490.52±2.62[b]	162.00±1.40[b]	88.36±4.30[b]
Trolox	6.02±0.05[a]	4.21±0.08[a]	3005.16±211.88[a]

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษหมายถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้ากับ Trolox ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี t-Test

สรุปและอภิปรายผล

ในการศึกษานี้เลือกใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายเนื่องจากเมทานอลสามารถสกัดสารสำคัญได้หลายกลุ่ม[19] ซึ่งการศึกษาสารพฤกษเคมีของสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้าพบว่ามีปริมาณ TPC และ TFC สูง เมื่อเทียบกับปริมาณ TPC และ TFC ที่พบในพืชทั่วไป[20] จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารพฤกษเคมีด้วยเทคนิค HPLC ยังพบว่าใบส่องฟ้ามีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่สำคัญจำนวน 10 ชนิด ซึ่งเป็นสาระสำคัญที่มีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดพืช [20,21] และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS พบว่ามีสารสำคัญที่มี Peak area มากกว่า 2% และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้แก่ Dodecanoic acid มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี ฤทธิ์ต้านเบาหวาน[21] และฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli*[23] ส่วนสาร γ-Tocopherol, methyl ether ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของ Tocopherol ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายได้ในไขมัน[24] และ γ-Sitosterol เป็นสารในกลุ่มสเตียรอยด์ที่พบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้หลายชนิด[25] ส่วนสาร Undecanoic acid ที่พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อย[26] และ Lupeol เป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์พีนที่พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็งและต้านแบคทีเรีย[27]

โดยในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้าด้วยวิธี DPPH ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวัดสารในกลุ่ม Hydrophobic[28] ซึ่งเป็นวิธีในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยกลไกการให้อิเล็กตรอน ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการคัดกรองพืชที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และใช้เวลาน้อยในการวิเคราะห์ ซึ่งในการทดสอบด้วยวิธี DPPH ซึ่งอนุมูลอิสระ DPPH จะถูกรีดิวซ์ให้เป็น Diphenylpicryl hydrazine ที่มีสีเหลือง โดยการทำปฏิกิริยากับสารสกัดของพืชตามความเข้มข้น[29] โดยพบว่าสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้ามี %Inhibition เพิ่มขึ้นความความเข้มข้นของสารสกัด (Dose-dependent manner) ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้ามีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยการถ่ายโอนอิเล็กตรอนหรือความสามารถในการให้ไฮโดรเจนจากการจัดกลุ่มค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มได้แก่ กลุ่มฤทธิ์ดีมาก (IC_{50} <10 µg/mL) กลุ่มฤทธิ์ดี (IC_{50} 10-50 µg/mL) กลุ่มฤทธิ์ปานกลาง (IC_{50} 50-100 µg/mL) กลุ่มฤทธิ์น้อย (IC_{50} 100-250 µg/mL) และกลุ่มไม่มีฤทธิ์ (IC_{50} >250 µg/mL)[30] พบว่าสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 490.52±2.62 µg/mL ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีฤทธิ์เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH แต่อย่างไรก็สารสกัดใบสองฟ้ามีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดหวดหม่อน (*C. excavate*) (IC_{50} = 904.53±3.23 µg/mL) และสารสกัดส่องฟ้า (*C. harmandiana*) (IC_{50} = 2037.66±39.23 µg/mL) ที่เก็บตัวอย่างจากภาคเหนือของไทย[31] ในส่วนของวิธี ABTS เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารในกลุ่ม Hydrophilic และ Lipophilic เนื่องจากสารดังกว่าสามารถละลายในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ได้ และไม่มีผลต่อ

ความแรงของไอออน ซึ่งวิธี ABTS มีกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยการให้ไฮโดรเจนกับ $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีสีเขียวแกมน้ำเงินซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไม่มีสีโดยการทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ[32] เมื่อจัดกลุ่มค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบส่องฟ้าพบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 162.00±1.40 µg/mL ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มฤทธิ์น้อยเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS และเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP เป็นวิธีที่วัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการรีดิวซ์ Ferric ion (Fe^{3+}) ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระไปเป็น Ferrous ion (Fe^{2+}) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว[33] ซึ่งสอดคล้องกับสารสกัดใบสองฟ้าเมทานอลที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อย แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมมากกว่าการศึกษาของ Tanruean และคณะในปี 2021[31]

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าสารสกัดเมทานอลใบส่องฟ้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยซึ่งมีกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระผ่านกลไกการการถ่ายโอนอิเล็กตรอนหรือความสามารถในการให้ไฮโดรเจนและรีดิวซ์ Ferric ion รวมไปถึงยังพบปริมาณสารสำคัญสูง ได้แก่ สารกลุ่มฟีนอลิก (Protocatechuic acid, *p*-Coumaric acid และ Quercetin) กลุ่มกรดไขมัน และสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ที่มีศักยภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีและสามารถนำไปพัฒนาเป็นเภสัชภัณฑ์ได้

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเลือกวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพียงฤทธิ์เดียว ซึ่งในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี HPLC และ GC-MS พบสารองค์ประกอบเคมีหลายชนิด ดังนั้นในการศึกษาต่อไปผู้วิจัยจะนำสารสกัดส่องฟ้าไปทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านเบาหวาน และความสามารถในการปกป้องประสาท รวมถึงการศึกษาความสัมพันธ์ของสารพฤกษเคมีที่ตรวจพบและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่น และวิทยาลัยสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทาที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Arbab I, Abdul A, Aspollah M, et al. A review of traditional uses, phytochemical and pharmacological aspects of selected members of *Clausena genus* (Rutaceae). J. Med. Plants Res. 2012; 6(38):5107-18.
2. Adebajo A, Iwalewa E, Obuotor E, et al. Pharmacological properties of the extract and some isolated compounds of *Clausena lansium* stem bark: anti-trichomonal, antidiabetic, anti-inflammatory, hepatoprotective and antioxidant effects. J. Ethnopharmacol. 2009; 122(1):10-9.
3. Thongthoom T, Songsiang U, Phaosiri C, Yenjai C. Biological activity of chemical constituents from *Clausena harmandiana*. Arch. Pharm. Res. 2010; 33:675-80.

4. Wongthet N, Sanevas N, Schinnerl J, Valant-Vetschera K, Bacher M, Vajrodaya S. Chemodiversity of *Clausena excavata* (Rutaceae) and related species: coumarins and carbazoles. Biochem. Syst. Ecol. 2018; 80:84-90.
5. Wangboonskul J, Prawan A, Takthaisong P, et al. Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic activities and acute toxicity of the ethanolic extract of *Clausena harmandiana* Pierre in animals. JAASP 2012; 1(3):159-69.
6. Boonyarat C, Yenjai C, Monthakantirat O, et al. Multifunctionality of *Clausena harmandiana* extract and its active constituents against Alzheimer's disease. Curr. Issues. Mol. Biol. 2022; 44(8):3681-94.
7. Jantamat P, Weerapreeyakul N, Puthongking P. Cytotoxicity and apoptosis induction of coumarins and carbazole alkaloids from *Clausena harmandiana*. Molecules 2019; 24(18):3385.
8. Songsiang U, Thongthoom T, Boonyarat C, Yenjai C. Claurailas A-D, cytotoxic carbazole alkaloids from the roots of *Clausena harmandiana*. J. Nat. Prod. 2011; 74(2):208-12.
9. Usman L, Hamid A, Olawore N, Fakunle C, Oladosu I, Zubair M. Chemical composition of leaf essential oil of *Clausena anisata* growing in North-Central Nigeria. J. Appl. Sci. Res. 2010; 6:891-4.
10. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. Oxid. Med. Cell Longev. 2017; 2017:8416763.
11. Panyatip P, Padumanonda T, Yongram C, Kasikorn T, Sungthong B, Puthongking P. Impact of tea processing on tryptophan, melatonin, phenolic and flavonoid contents in mulberry (*Morus alba* L.) leaves: quantitative analysis by LC-MS/MS. Molecules 2022; 27(15):4979.
12. Burana-osot J, phattanawasin P, luangthuwapanit P, khamwut P, sotanaphun U. Determination of volatile constituents from crude drugs of phikud navakot by gas chromatography-mass spectrometry. Thai Bull. Pharm. Sci. 2016; 11(2):45-60.
13. Siriparu P, Panyatip P, Pota T, et al. Effect of germination and illumination on melatonin and its metabolites, phenolic content, and antioxidant activity in mung bean sprouts. Plants 2022; 11:2990.

14. Yongram C, Panyatip P, Siriparu P, et al. Influence of maturity stage on tryptophan, phenolic, flavonoid, and anthocyanin content, and antioxidant activity of *Morus alba* L. fruit. Rasayan J. Chem. 2022; 15(3):1693-701.
15. ภาณุพันธ์ ศรีพันธุ์, ชวลิต โยงรัมย์, สุวดี โชคชัยสิริ และคณะ. การวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ การทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับยากัญชาแผนไทยอายุวัฒนะ. วารสารสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา, 2566; 8(2):18-34.
16. Islam M, Huang Y, Islam S, Fan B, Tong L, Wang F. Influence of the degree of hydrolysis on functional properties and antioxidant activity of enzymatic soybean protein hydrolysates. Molecules 2022; 27(18):6110.
17. Rumpf J, Burger R, Schulze M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. Int. J. Biol. Macromol. 2023; 233:123470.
18. Stoenescu AM, Trandafir I, Cosmulescu S. Determination of phenolic compounds using HPLC-UV method in wild fruit species. Horticulturae 2022; 8(2):84.
19. Borges A, José H, Homem V, Simões M. Comparison of techniques and solvents on the antimicrobial and antioxidant potential of extracts from *Acacia dealbata* and *Olea europaea*. Antibiotics. 2020; 9(2):48.
20. Puthongking P, Ratha J, Panyatip P, Datham S, Siriparu P, Yongram C. The effect of extraction solvent on the phytochemical contents and antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of extracts from the leaves, bark and twig of *Dipterocarpus alatus*. Trop. J. Nat. Prod. Res. 2023; 7(12):5595-600.
21. Ratha J, Yongram C, Panyatip P, et al. Polyphenol and tryptophan contents of purple corn (*Zea mays* L.) variety knd and butterfly pea (*Clitoria ternatea*) aqueous extracts: insights into phytochemical profiles with antioxidant activities and PCA analysis. Plants 2023; 12(3):603.

22. Anuar N, Shafie S, Maznan M, et al. Lauric acid improves hormonal profiles, antioxidant properties, sperm quality and histomorphometric changes in testis and epididymis of streptozotocin-induced diabetic infertility rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2023; 470:116558.
23. Renugadevi K, Nachiyar V, Zaveri M. Bioactivity of dodecanoic acid extracted from *Geitlerinema* sp. TRV57. IJPER 2021; 55(1):224-31.
24. Pirsa S, Banafshechin E, Amiri S, Rahimirad A, Ghafarzadeh J. Detection of fraud of palm, sunflower, and corn oil in butter using HPLC profile of tocopherols and tocotrienols by response surface method. J. IRAN. CHEM. SOC. 2021; 18:1167–77.
25. Sundarraj S, Thangam R, Sreevani V, et al. γ-Sitosterol from *Acacia nilotica* L. induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc suppression in MCF-7 and A549 cells. J. Ethnopharmacol. 2012; 141(3):803-9.
26. Henry G, Momin R, Nair M, Dewitt D. Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. J. Agric. Food Chem. 2002; 50(8):2231-4.
27. Park J, Rehman I, Choe K, Ahmad R, Lee H, Kim M. A triterpenoid lupeol as an antioxidant and anti-neuroinflammatory agent: impacts on oxidative stress in Alzheimer's disease. Nutrients 2023; 15(13):3059.
28. Floegel A, Kim D, Chung S, Koo S, Chun O. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. J. Food Compost. Anal. 2011; 24:1043-8.
29. Rahman M, Islam M, Biswas M, Khurshid Alam A. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of different parts of *Tabebuia pallida* growing in Bangladesh. BMC Res. Notes. 2015; 8:621.
30. Phongpaichit S, Nikom J, Rungjindamai N, et al. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from Garcinia plants. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2007; 51:517-25.
31. Tanruean K, Poolprasert P, Suwannarach N, Kumla J, Lumyong S. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant and biological activities of extracts from three *Clauseneae* plants in Northern Thailand. Plants 2021; 10(1):117.

32. Echegaray N, Pateiro M, Munekata P, et al. Measurement of antioxidant capacity of meat and meat products: methods and applications. Molecules 2021; 26(13):3880.

33. Akhtar N, Mirza B. Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. Arab. J. Chem. 2018; 11(8):1223-35.