



## ปัญหาพิเศษ

การใช้ประโยชน์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปลือกหอมแดง  
(*Allium ascalonicum* L.)

UTILIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM SHALLOTS  
PEEL (*ALLIUM ASCALONICUM* L.)

โดย

นางสาวกนกวรรณ นนทวงศ์

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2561



ใบรับรองปัญหาพิเศษ  
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

วิทยาศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การใช้ประโยชน์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปลือกหอมแดง (*Allium ascalonicum* L.)  
UTILIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM SHALLOTS PEEL (*ALLIUM*  
*ASCALONICUM* L.)

นามผู้วิจัย ..... นางสาวกนกวรรณ นนทวงศ์ .....

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(..... อาจารย์พุทธพร ส่องศรี, D.Eng. ....)

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์แดงอ่อน พรหมมิ, ปร.ค. ....)

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. 2561

# การใช้ประโยชน์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปลือกหอมแดง

(*Allium ascalonicum* L.)

กนกวรรณ นนทวงศ์ และ พุทธพร ส่องศรี

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปลือกหอมแดงด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด คือ  $142.46 \pm 2.84$  mg GAE/g DW และสารสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด (1:1000) เท่ากับร้อยละ  $71.86 \pm 4.54$  ด้วยวิธี DPPH การตรวจสอบสารเคอควิโนไฮเดรต (QH) และเคอควิโนไกลโคไซด์ (QG) ในสารสกัดด้วยวิธี thin layer chromatography พบว่าสารสกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอลมีทั้ง QH และ QG การแยกสารในเปลือกหอมแดงด้วยวิธี column chromatography พบว่า fraction 1 ของสารสกัดด้วยเอทานอลและเมทานอลมีทั้งสาร QH และ QG ในขณะที่ fraction 2 ไม่มีสาร QH และ QG แต่เป็นสารกลุ่มแอนโทไซยานิน ซึ่งสารสกัดด้วยเอทานอลและเมทานอลมีปริมาณเคอควิโนเทียบเท่า คือ  $47.33$  และ  $35.34$  mg QH/g DW ตามลำดับ สารสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด ( $IC_{50} = 1:247$ ) ส่วน fraction 1 และ fraction 2 สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ แต่ fraction 2 ยับยั้งได้ดีกว่า fraction 1 ผลการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของสารสกัดเปลือกหอมแดงด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งได้ดีที่สุด (100%) ทำให้ไม่เกิดการสร้างกรดยูริก ในขณะที่ fraction 1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสดีกว่า fraction 2

คำสำคัญ: เปลือกหอมแดง เคอควิโน แอนโทไซยานิน ไทโรซิเนส แซนทีนออกซิเดส

## UTILIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM SHALLOTS PEEL

(*ALLIUM ASCALONICUM* L.)

Kanokwan Nonthawong and Puttaporn Songsri

---

### ABSTRACT

This research was performed to study the extraction of bioactive compounds from *Allium ascalonicum* L. (shallot) waste with ethanol, methanol and water. The ethanol extracts showed the highest total phenolic content ( $142.46 \pm 2.84$  mg GAE/g DW). The ethanol extracts (1:1000) also exhibited the highest antioxidant activity as  $71.86 \% \pm 4.54$  by DPPH method. Quercetin hydrate (QH) and quercetin 3- $\beta$ -D-glucoside (QG) assay in extracts by thin layer chromatography showed that water, ethanol and methanol extracts contain QH and QG. Separation of compounds in shallots peel using column chromatography showed that fraction 1 from ethanol and methanol extracts contained both QG and QH, while fraction 2 did not contain QG and QH but anthocyanin group compound. Ethanol and methanol extracts consisted the amount of 47.33 and 35.34 mg QH/g DW quercetin equivalent respectively. Ethanol extracts showed highest tyrosinase inhibitory activity ( $IC_{50} = 1:247$ ). However the fraction 1 and fraction 2 could inhibit tyrosinase but the fraction 2 inhibited better than fraction 1. Xanthine oxidase inhibition by ethanol extracts showed highest activity (100%), no uric acid formed. However the fraction 1 has better efficiency for inhibition of xanthine oxidase than fraction 2.

Keywords: shallots peel; quercetin; anthocyanin; tyrosinase; xanthine oxidase

---

Student's signature

---

Advisor's signature

---

/ /



## บทนำ

หอมแดง (*Allium ascalonicum* L.) อยู่ในวงศ์ Alliaceae เป็นพืชที่ใช้ในการประกอบอาหาร ส่วนมากในประเทศไทย ส่วนเปลือกหอมแดงจะไม่ได้ใช้ในการประกอบอาหาร โดย Khiari and Makris (2012) ได้ศึกษาส่วนที่กินไม่ได้ของหัวหอมพบว่ามีส่วนประกอบฟีนอลิกที่มีโครงสร้างเฉพาะที่ไม่พบในส่วนที่กินได้ซึ่งมีส่วนสำคัญคือ เควอซิติน โดยสารออกฤทธิ์ชนิดเควอซิตินอะไกลคอนจากผิวแห้งหอมแดงสูงกว่าเควอซิตินไกลโคไซด์จากเนื้อเยื่อหอมแดงสด (Spencer and Crozier, 2012) และ Viera *et al.* (2017) ได้ศึกษาการสกัดสารของผิวหอมแดง (*Allium cepa* L.) พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และ แอนโทไซยานินทั้งหมด รวมทั้งสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีค่าสูง เควอซิตินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติที่จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ สารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งเป็นสาเหตุของโรคชรา และ โรคมะเร็ง Prior and Wu (2006) ได้รายงานว่ายานโทไซยานินเป็นรงควัตถุธรรมชาติมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมสุขภาพในแง่ของการป้องกัน โรคอ้วน สุขภาพหัวใจและหลอดเลือด ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และการป้องกันมะเร็ง

Arung *et al.* 2011 ได้รายงานว่ายาน quercetin 4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside ที่แยกจากเปลือกแห้งของหอมหัวใหญ่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส Aramwit *et al.* (2010) รายงานว่าสารสกัดเมล็ดเบอร์รี่สีม่วงที่ไม่เจือจางซึ่งมีแอนโทไซยานินประมาณ 0.17 mmol CGE/g DW สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่ากรดโคจิกเข้มข้น (1–4% w/v) อย่างน้อย 15 เท่า ที่ใช้เป็นสารปรับผิวขาว โดยที่ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตเมลานินโดยมีทั่วไปในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พืช แบคทีเรีย และเชื้อรา โดยจะเร่งปฏิกิริยา hydroxylation ของ monophenols ไปเป็น *o*-diphenols (monophenolase activity) และไปเป็น *o*-quinone (diphenolase activity) และสุดท้ายเป็นเมลานิน (melanin) การสะสมของเมลานินที่มากเกินไปอาจทำให้เกิดความผิดปกติของเม็ดสี เช่น จุดด่างดำ ผื่น และกระ (Fan *et al.* 2017) เศษเหลือใช้หอมหัวใหญ่และฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์มีศักยภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ยับยั้งโรคเกาต์ (Nile *et al.*, 2017) เอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเพื่อเปลี่ยนสารไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) ไปเป็นแซนทีน (xanthine) และกรดยูริก (uric acid) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคเกาต์

การศึกษารุ่นนี้เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดสารจากเปลือกหอมแดง การตรวจสอบและแยกเควอซิติน เควอซิตินไกลโคไซด์จากสารสกัดเปลือกหอมแดงด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) และ วิธี column chromatography (CC) และการทดสอบสารแอนโทไซยานินด้วยวิธี acid-base indicator ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโร

ซินีส และเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสจากสารสกัดเปลือกหอมแดง และเพื่อประยุกต์ใช้ประโยชน์จากเปลือกหอมแดงโดยการนำไปสู่การสร้างผลิตภัณฑ์

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การสกัดสารจากเปลือกหอมแดง (Shallot)

นำตัวอย่างเปลือกหอมแดงที่ปั่นละเอียด 10 กรัม พร้อมกับตัวทำละลาย (เอทานอล 95% เมทานอล 99.8% และน้ำ) อย่างละ 100 มิลลิลิตร (ของแข็ง : ตัวทำละลาย = 1:10) ใส่ในบีกเกอร์ นำตัวอย่างกวนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยการต้มโดยใช้เครื่องทำความร้อน (hot plate) ที่จุดเดือดของตัวทำละลายแต่ละชนิด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำมาปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 มิลลิลิตร

### 2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Analysis of Total Phenolic Content: TPC)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในเปลือกหอมแดงใช้วิธี Folin-Ciocalteu (FC) โดยมีการดัดแปลงบางส่วน วัดการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ทำการทดลองตัวอย่างละสามซ้ำ ความเข้มข้นสุดท้ายของฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจะเทียบกับกราฟมาตรฐาน ( $y = 0.005x + 0.0163$ ,  $R^2 = 0.9929$ ) ของกรดแกลลิก

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity โดยวิธีของ Andrica *et al.* (2016) การวัดทั้งหมดทำสามซ้ำ วัดการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยเทียบกับเคอเวอซิตินไฮเดรต (quercetin hydrate, QH) และสารเคอเวอซิตินไกลโคไซด์ (quercetin 3- $\beta$ -D-glucoside, QG) และใช้สารบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (butylated hydroxy toluene, BHT) เป็นสารมาตรฐาน

### 4. การตรวจสอบและแยกสารเคอเวอซิติน เคอเวอซิตินไกลโคไซด์ และแอนโทไซยานินจากสารสกัดเปลือกหอมแดง

#### 4.1 วิธี Thin layer chromatography (TLC)

ใช้ระบบตัวชะ 2 แบบ โดยระบบตัวชะที่ 1 ใช้ n-butanol:acetic acid:water, BAW (4:1:5) สำหรับเคอเวอซิติน และระบบตัวชะที่ 2 ใช้ ethyl acetate:formic acid:water (8:1:1), EAW โดยวิธี Sherma J. (2000) โดยมีการดัดแปลงบางส่วน ซึ่งใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ การคำนวณระยะทางที่

สารเคลื่อนที่ในรูปค่า  $R_f$  (Rate of flow) โดยเทียบกับสารมาตรฐานรูตินไฮเดรต เควอซิตินไฮเดรต และเควอซิตินไกลโคไซด์

#### 4.2 วิธี acid-base titration

โดยใช้วิธีของ Saptarini *et al.* (2015) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย นำตัวอย่างของสารสกัดมาไทเทรตด้วยกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl) เข้มข้น 0.1 M และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) เข้มข้น 0.1 M ใช้เป็นตัวบ่งชี้แอนโทไซยานิน

#### 4.3 วิธี Column Chromatography (CC)

โดยใช้วิธีของ Rodney (2000) ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับใช้ตัวทำละลาย chloroform : methanol (7:3) เป็นตัวชะ นำสารสกัดที่แยกได้แต่ละส่วน (fraction) มาตรวจสอบด้วยการทำ TLC ด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate:formic acid:water (8:1:1) โดยเทียบกับสารมาตรฐานเควอซิตินไฮเดรตและเควอซิตินไกลโคไซด์

### 5. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเควอซิตินจากสารสกัดเปลือกหอมแดง

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเควอซิตินจากสารสกัดเปลือกหอมแดงใช้วิธีของ Lombard *et al.* (2002) โดยมีการดัดแปลงบางส่วน นำสารสกัด Fraction 1 ของสารสกัดด้วยเอทานอล 95% และเมทานอล 99.8% เจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 350 นาโนเมตร ซึ่งเป็น  $\lambda_{max}$  ของสารเควอซิติน โดยเทียบกับสารมาตรฐานเควอซิตินไฮเดรต ( $Y = 131.89x - 0.4561$ ,  $R^2 = 0.9595$ )

### 6. การวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase)

การวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสใช้วิธีของ Neagu *et al.* (2016) โดยมีการดัดแปลงบางส่วน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ณ เวลา 0 5 10 และ 15 นาที หลังเกิดปฏิกิริยา ซึ่งทำสามซ้ำ โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) กรดโคจิก (kojic acid) เควอซิตินไฮเดรตและเควอซิตินไกลโคไซด์เป็นสารมาตรฐาน

### 7. การวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase)

การวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสใช้วิธีของ Nile *et al.* (2017) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโนเมตร โดยใช้ อัลโลพูรินอล (allopurinol) และเควอซิตินไฮเดรตเป็นสารมาตรฐาน

## ผลการศึกษา

ผลการสกัดสารจากเปลือกหอมแดงด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล 95% เมทานอล 99.8% และน้ำ มีปริมาตรสุทธิดังนี้ 2.2 1.7 และ 3.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อสกัดสารจนได้



ปริมาตรสุทธิจะนำมาปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 มิลลิลิตร โดยที่หอมแดง 1 กิโลกรัม จะได้เปลือก 60 กรัม ดังนั้นถ้าใช้เปลือก 10 กรัมในการสกัด จะต้องใช้หอมแดงสดเป็น  $10 \times 1000 / 60 = 167$  กรัม

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเปลือกหอมแดงที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล 95% และเมทานอล 99.8% ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (FC) พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยเอทานอล 95% สูงที่สุด ( $142.46 \pm 2.84$  mg GAE/10 g DW) และตามด้วยเมทานอล 99.8% ( $106.59 \pm 1.99$  mg GAE/10 g DW) และน้ำ ( $25.23 \pm 1.46$  mg GAE/10 g DW) ตามลำดับดังตารางผนวกที่ 3 กำหนดค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานด้วยโปรแกรม Excel 2016

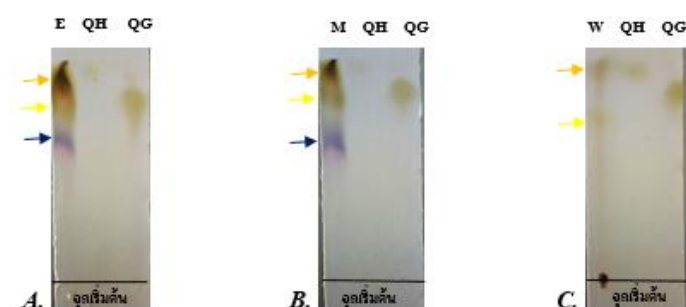
ผลการวิเคราะห์ปริมาณการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกหอมด้วยวิธี DPPH scavenging activity โดยสารสกัดเปลือกหอมแดงด้วยเอทานอล 95% (1:1000) มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดร้อยละ  $71.86 \pm 4.54$  รองลงมาเป็นเมทานอล 99.8% (1:1000) ร้อยละ  $64.42 \pm 1.11$  และน้ำ (1:500) ร้อยละ  $38.57 \pm 1.76$  เมื่อเทียบกับเคอซิทินไฮดรตเข้มข้น 5 mM มีค่าร้อยละ 88.54 และ เคอซิทินไกลโคไซด์เข้มข้น 1 mM ร้อยละ 74.45 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 โดยคำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานด้วยโปรแกรม Excel 2016

ตารางที่ 1 ปริมาณร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH scavenging activity

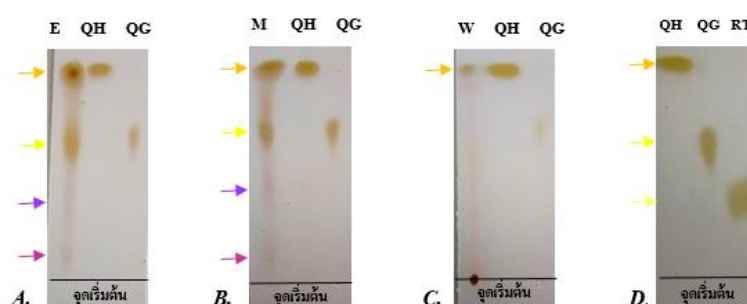
ชนิดตัวทำละลาย ของสารสกัด	% การต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ยของ % การ ต้านอนุมูลอิสระ $\pm$ SD
	1	2	3	
น้ำ 1: 500	38.47	36.86	40.38	38.57 $\pm$ 1.76
เอทานอล 1:1000	77.09	69.46	69.02	71.86 $\pm$ 4.54
เมทานอล 1: 1000	65.19	63.14	64.90	64.42 $\pm$ 1.11
เคอซิทินไฮดรต	88.54	-	-	88.54
เคอซิทินไกลโคไซด์	74.45	-	-	74.45

ผลของการตรวจสอบสารเคอซิทินและเคอซิทินไกลโคไซด์จากสารสกัดเปลือกหอมแดงด้วยวิธี TLC พบว่าสารสกัดด้วยน้ำชะด้วยระบบที่ 1 BAW (ภาพที่ 1) มี 2 แถบ มีค่า  $R_f$  คือ 0.79 และ 0.92 เมื่อเทียบกับ QG และ QH มีค่า  $R_f$  คือ 0.82 และ 0.90 ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอล 95% มี 3 แถบ โดยมีค่า  $R_f$  คือ 0.71, 0.83, 0.91 เทียบกับ QG และ QH มีค่า  $R_f$  คือ 0.8 และ 0.95 ตามลำดับ และสารสกัดด้วยเมทานอล 99.8% มีค่า  $R_f$  คือ 0.71, 0.86, 0 เทียบกับ QG และ QH

มีค่า  $R_f$  คือ 0.86 และ 0.94 ตามลำดับ และในที่ชะด้วยระบบที่ 2 EFW (ภาพที่ 2) ของสารสกัดด้วยน้ำมีเพียงแถบเดียว มีค่า  $R_f$  คือ 0.85 มีลักษณะเป็นทาง QG และ QH มีค่า  $R_f$  คือ 0.67 และ 0.85 ตามลำดับ และสารสกัดด้วยเอทานอล มี 4 แถบ มีค่า  $R_f$  คือ 0.07, 0.30, 0.60, 0.86 และ QG และ QH มีค่า  $R_f$  คือ 0.61 และ 0.88 ตามลำดับ และสารสกัดด้วยเมทานอล มี 4 แถบ มีค่า  $R_f$  คือ 0.09, 0.38, 0.65, 0.84 และ QG และ QH มีค่า  $R_f$  คือ 0.67 และ 0.85 ตามลำดับ และสารอ้างอิงระหว่าง QH QG และ rutin trihydrate มีลักษณะสีน้ำตาลเหลือง มีค่า  $R_f$  ที่ต่างกัน คือ 0.94 0.70 และ 0.5 ตามลำดับ



**ภาพที่ 1** ผลการตรวจสอบควอซีตินและควอซีตินไกลโคไซด์จากสารสกัดเปลือกหอมแดงโดยวิธี TLC ระบบที่ 1 BAW (4:1:5) ; (A คือ สารสกัดด้วยเอทานอล 95%, B คือ สารสกัดด้วยเมทานอล 99.8%, C คือ สารสกัดด้วยน้ำ , QH คือ quercetin hydrate และ QG; quercetin 3- $\beta$ -D-glucoside)



**ภาพที่ 2** ผลการตรวจสอบควอซีตินและควอซีตินไกลโคไซด์จากสารสกัดเปลือกหอมแดงโดยวิธี TLC แบบที่ 2 EFW (8:1:1) (A) สารสกัดด้วยเอทานอล 95% (B) สารสกัดด้วยเมทานอล 99.8% (C) สารสกัดด้วยน้ำ และ (D) สารมาตรฐาน โดย ethanol (E), methanol (M), water (W), quercetin hydrate (QH), quercetin 3- $\beta$ -D-glucoside (QG) และ rutin trihydrate (RT)

การตรวจสอบสารแอนโทไซยานินจากสารสกัดเปลือกหอมแดงด้วยวิธี acid-base titration พบว่าเมื่อหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M 1-2 หยด สารสกัดเริ่มมีการเปลี่ยนเป็นสีแดง และเมื่อหยดโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 M 1-2 หยด สารสกัดเริ่มมีการเปลี่ยนเป็นสีส้มน้ำตาลและสีน้ำตาลเหลือง



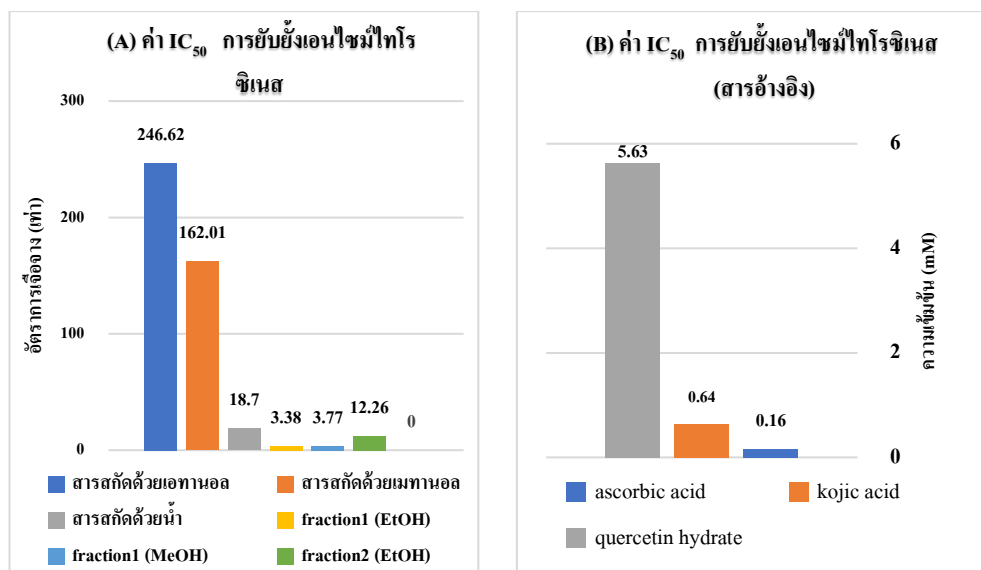
**ภาพที่ 3** การตรวจสอบสารแอนโทไซยานินจากสารสกัดเปลือกหอมแดง โดยวิธี acid-base titration

โดยที่ 1 = สารสกัดหอมแดง, 2 = สารสกัด + HCl 1 หยด, 3 = สารสกัด + HCl 2 หยด, 4 = สารสกัด + HCl 3 หยด, 5 = สารสกัด + NaOH 1 หยด และ 6 = สารสกัด + NaOH 2 หยด ตามลำดับ

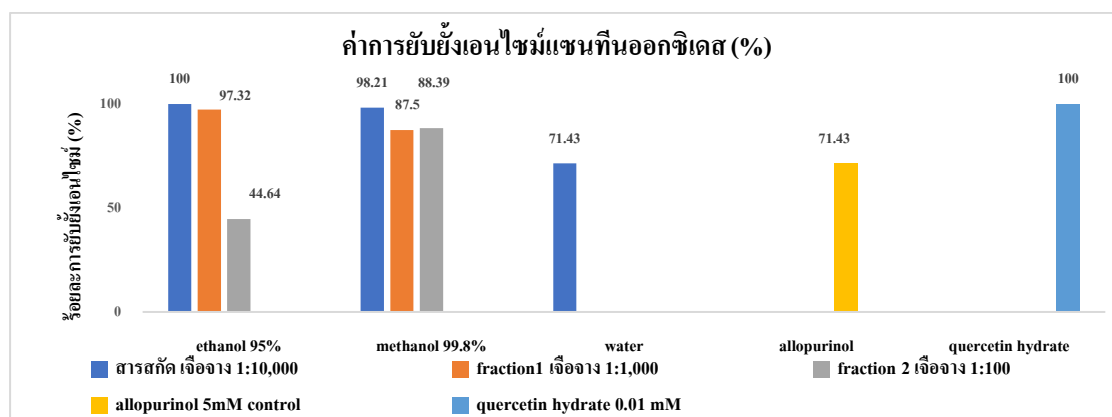
ผลของการแยกสารเคออร์ซินและเคออร์ซินไกลโคไซด์จากสารสกัดเปลือกหอมแดงด้วยวิธี CC โดยแยกเป็น 2 fraction พบว่า fraction 1 มีสีเหลือง เมื่อนำไปทดสอบด้วย TLC แล้วพบ 2 แถบมีแถบใกล้เคียงกับ QH และ QG ส่วน fraction 2 ของสารสกัดมีเพียงแถบสีม่วงแดงที่จาง และนำไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นเคออร์ซินในเปลือกหอมแดง พบว่าการสกัดด้วยเอทานอล 95% ทำให้ได้ปริมาณเคออร์ซินเทียบเท่า คือ 47.33 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้งของเปลือกหอมแดง ส่วนการสกัดด้วยเมทานอล 99.8% ทำให้ได้ปริมาณเคออร์ซินเทียบเท่า คือ 35.34 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้งของเปลือกหอมแดง

ผลการวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่าสารสกัดจากเปลือกหอมแดงที่สกัดด้วยเอทานอล 95% เมทานอล 99.8% และน้ำ มีค่า  $IC_{50}$  ที่อัตราเจือจาง 1:246.62 1:162.01 และ 1:18.7 ตามลำดับ และ fraction 1 ของสารสกัดด้วยเอทานอล 95% และสารสกัดด้วยเมทานอล 99.8% มีค่า  $IC_{50}$  คือ ที่อัตราเจือจาง 1:3.38 และ 1:3.77 ตามลำดับ และ fraction 2 ของสารสกัดด้วยเอทานอล 95% และสารสกัดด้วยเมทานอล 99.8% มีค่า  $IC_{50}$  คือ อัตราเจือจาง 1:12.26 และ ที่ไม่เจือจาง ตามลำดับ โดยที่ ascorbic acid kojic acid QH และ QG มีค่า  $IC_{50}$  คือ 0.16 0.64 5.63 และ 0.126 mM ตามลำดับ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และ fraction ของสารสกัดด้วยเอทานอล 95% และเมทานอล 99.8% (A) และ สารอ้างอิง (B) ต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ผลการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของสารสกัดด้วยเอทานอล 95% เมทานอล 99.8% และน้ำ ที่อัตราเจือจาง 1:10,000 สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 100 98.21 และ 71.43 ตามลำดับ



ภาพที่ 4 ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสของสารสกัดเปลือกหอมแดงด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

## วิจารณ์ผลการศึกษา

การสกัดเปลือกหอมแดงด้วยเอทานอล 95% พบว่าให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Do *et al.* (2014) ได้รายงานว่ามีสารสกัดจากผักแขยง (*Limnophila aromatica*) ในส่วนที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด ( $40.50 \pm 0.88$  mg GAE/g DFLA) ต่างจากสารที่สกัดจากน้ำมีปริมาณฟีนอลิกต่ำที่สุด ( $6.25 \pm 0.24$  mg GAE/g DFLA) เพราะสารสกัดจากน้ำอาจประกอบด้วยสารประกอบที่ไม่ใช่ฟีนอลิกจำนวนมากหรือมีสารประกอบ ฟีนอลที่มีหมู่ที่ทำงาน (active groups) จำนวนน้อยมาก

สารสกัดจากเปลือกหอมแดงด้วยเอทานอล 95% มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่มีฟีนอลนั้นมีความสามารถในการให้ไฮโดรเจน ทำให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ด้วยการไปแทนที่ในตำแหน่งออโธ (ortho) ด้วยหมู่ที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ง่าย (สุวรรณิ และคณะ, 2555) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Do *et al.* (2014) รายงานว่าการสกัดด้วยเอทานอลแสดงให้เห็นกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ( $IC_{50} = 70.06 \pm 1.0$   $\mu$ g/mL) และ Nile *et al.* (2017) ได้รายงานว่ามีผลต่อกลิ่นหอมหัวใหญ่ที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทานอลมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่แรง

การตรวจสอบสารสกัดจากเปลือกหอมแดงที่สกัดด้วยเอทานอล 95% เมทานอล 99.8% และน้ำพบว่ามีการเคลื่อนที่ของสารเคออร์ซินไฮเดรตและเคออร์ซินไกลโคไซด์ ซึ่งสารสกัดด้วยเอทานอล 95% และเมทานอล 99.8% แยกสารได้ดีด้วยระบบตัวชะที่ 2 EFW (8:1:1) เพราะแยกสารได้ 4 แถบซึ่งมีความละเอียดกว่า และมีความเป็นขั้วที่ใกล้เคียงกับระบบตัวชะละลายจึงแยกได้ดี ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำแยกสารได้ดีด้วยระบบตัวชะที่ 1 BAW (4:1:5) เนื่องจากระบบตัวชะมีส่วนที่เป็นขั้วสูงและสกัดด้วยน้ำมีความเป็นขั้วสูงทำให้เคลื่อนที่ได้ดี ซึ่งสัมพันธ์กับ Nandani *et al.* (2013) ได้รายงานว่าการแยกและการระบุ เคออร์ซินจากชุมเห็ดไทย (*Cassia tora* L.) ด้วยระบบตัวชะด้วย n-butanol:acetic acid:water (4:1:5) พบว่ามีสีเหลืองสำหรับสารเคออร์ซิน และ Sherma J. (2000) ได้ใช้ระบบตัวชะ ethyl acetate: formic acid:water (8:1:1) ในการระบุฟลาโวนอยด์จากอาร์ติโชก (Artichoke) และใช้ระบบตัวชะ butanol-acetic acid-water (4:1:5) สำหรับบักวีต

การทดสอบแอนโทไซยานินจากสารสกัดจากเปลือกหอมแดงเมื่อหยดกรดไฮโดรคลอริก แล้วเปลี่ยนเป็นสีแดงและหยดโซเดียมไฮดรอกไซด์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเหลือง เนื่องจากสีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเป็นกรด-ด่าง สัมพันธ์กับงานวิจัยของ Saptarini *et al.* (2015) รายงานว่าสารสกัดจากอัญชันมีการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีฟ้าที่ pH 4 สีฟ้าเป็นสีเขียวที่ pH 9 และสีเขียวเป็นสีเหลืองที่ pH 12 การเปลี่ยน pH อาจทำให้โครงสร้างของแอนโทไซยานินเปลี่ยนแปลงไปซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนสี ซึ่งแอนโทไซยานินในสภาพที่เป็นกรดเป็นสีแดง

การแยกสารด้วยวิธี CC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย chloroform : methanol (7:3) สามารถแยกสารเคอซิทินออกจากสารอื่น ๆ ให้มีความบริสุทธิ์ได้มากขึ้นเห็นได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิด พบว่า fraction 1 เป็นสารเคอซิทินไฮเครตและเคอซิทินไกลโคไซด์ แต่ส่วน fraction 2 ไม่มีส่วนของสารเคอซิทินไฮเครตและเคอซิทินไกลโคไซด์ แต่มีสีม่วงแดงที่อาจเกิดจากตัวทำละลายที่ชะมีความเป็นกรดที่ pH 4-5 ในการชะนั้นคลอโรฟอร์มเป็นเฟสเคลื่อนที่ที่มีขั้วน้อยและเมทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ที่มีขั้วมาก ซึ่งสารเคอซิทินจะออกมาในลำดับแรก เนื่องจากเคอซิทินมีความเป็นขั้วต่ำจึงออกมาก่อน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chauhan *et al.* (2004) ที่ชะคอดัมน์ด้วย chloroform : methanol (95:5) สำหรับการแยกเคอซิทินจากการสกัดใบแห้งของก้อเชียงดาว (*Quercus semecarpifolia*) ด้วยเมทานอล

การวิเคราะห์ปริมาณเคอซิทินโดยอาศัยการดูดกลืนแสงของเคอซิทินไฮเครตซึ่งมี  $\lambda_{\max}$  คือ 350 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 95% มีปริมาณเคอซิทินเทียบเท่าเคอซิทินไฮเครต (47.33 mg/1g DW) มากกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล 99.8% (35.34 mg/1g DW) สำหรับสารสกัดด้วยน้ำไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากมีปริมาณฟีนอลิกที่น้อยมาก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Do *et al.* (2014) ได้รายงานว่าการสกัดปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของผักแขยง (*L. aromatic*) ด้วยตัวทำละลายที่ต่าง กัน พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 100% มีปริมาณสูงที่สุด (31.11 mg quercetin/g) รองลงมาเป็นสารสกัดด้วยอะซิโตน 100% (30.86 mg quercetin/g) และสารสกัดด้วยเมทานอล 75% (22.51 mg quercetin/g) และน้อยที่สุดคือสารสกัดด้วยน้ำ (4.04 mg quercetin/g) และ Nile *et al.* (2017) ได้รายงานว่าสารสกัดจากเศษเหลือใช้หอมหัวใหญ่มีสารเคอซิทินปริมาณ 60.44 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเปลือกหอมแดงด้วยเอทานอล 95% ดีที่สุดตามด้วยเมทานอล 99.8% และสารสกัดด้วยน้ำ เนื่องจากสารสกัดด้วยเอทานอล 95% มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดส่งผลให้ยับยั้งได้ดี และส่วนของ fraction 1 ของสารสกัดด้วยเมทานอล 99.8% ยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล เนื่องจาก fraction 1 มีสารเคอซิทินไฮเครตและเคอซิทินไกลโคไซด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Arung *et al.* (2011) ได้รายงานว่าการแยก quercetin-3'-O- $\beta$  D-glucoside จากผิวแห้งของหอมหัวใหญ่ที่สกัดด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งการสร้างเมลานินใน B16 melanoma cells ซึ่งมี  $IC_{50} = 38.8 \mu M$  ที่ใช้ L-tyrosine เป็นซับสเตรท และ  $IC_{50} = 48.5 \mu M$  ที่ใช้ L-dihydroxyphenyl alanine เป็นซับสเตรท และ fraction 2 ของสารสกัดด้วยเอทานอล 95% ยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล 99.8% เนื่องจาก fraction 2 เป็นสารกลุ่มแอนโทไซยานิน จากการทดสอบหยดกรดและเบสมีการเปลี่ยนสีตามช่วงพีเอชซึ่งสารนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยพบว่า fraction 2 ยับยั้งได้ดีกว่า fraction

1 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tsuda and Osawa (1997) ได้รายงานเกี่ยวกับแอนโทไซยานินที่แยกได้ 3 ชนิดจากถั่วแดงและถั่วดำพบว่า cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside และ cyanidin เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่คี่ที่สุด แสดงให้เห็นการยับยั้งกิจกรรมอย่างมีนัยสำคัญโดยโครงสร้างที่มีหมู่ไฮดรอกซิลสองหมู่ในวงแหวนบี

สารสกัดเปลือกหอมแดงด้วยตัวทำละลายที่อัตราเจือจาง 1:10,000 พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 95% ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้สูงที่สุด (100%) ตามด้วยเมทานอล 99.8% (98.21%) และน้ำ (71.43%) ตามลำดับ และส่วนของ fraction 1 ของสารสกัดด้วยเอทานอล 95% ที่อัตราเจือจาง 1:1,000 ยับยั้งได้ดีกว่า fraction 1 ของสารสกัดด้วยเมทานอล 99.8% เนื่องจากส่วนของ fraction 1 เป็นสาร QH และ QG ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสทำให้ลดการสร้างกรดยูริก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nile *et al.* (2017) ได้รายงานที่สารสกัดของเศษเหลือใช้หอมหัวใหญ่ได้แก่สารเคอซิดิน ( $IC_{50} = 10.5 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ ) และเคอซิดินไกลโคไซด์ ( $IC_{50} = 15.3 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ ) สามารถยับยั้งแซนทีนออกซิเดสได้ 90% และ 86% ตามลำดับ ในขณะที่ fraction 2 ของสารสกัดด้วยเมทานอล 99.8% ยับยั้งได้ดีกว่า fraction 2 ของสารสกัดด้วยเอทานอล 95% ที่อัตราเจือจาง 1:100 มีค่าร้อยละ 88.39 และ 44.64 ตามลำดับ เนื่องจากมีสารกลุ่มแอนโทไซยานิน ซึ่ง fraction 2 ยับยั้งได้น้อยกว่า fraction 1 เป็น 10 เท่า ซึ่งสัมพันธ์กับ Zhang *et al.* (2017) ได้รายงานที่สารแอนโทไซยานินที่มีปริมาณ acyl สูงของมันเทศเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสในการทดสอบทางคลินิก

### สรุปผลการศึกษา

ตัวทำละลายเอทานอล 95% เหมาะต่อการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปลือกหอมแดง สารสกัดจากเปลือกหอมแดงมีสารประกอบฟีนอลิก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส ทั้งนี้เป็นผลมาจากในสารสกัดมีทั้งเคอซิดิน เคอซิดินไกลโคไซด์ และมีสารกลุ่มแอนโทไซยานิน ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกหอมแดงจึงมีศักยภาพในการใช้ประโยชน์ทางด้านเครื่องสำอาง และในการรักษาโรคเกาต์ได้

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ทุนอุดหนุนและสนับสนุนการทำวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีวเคมี และห้องปฏิบัติการเคมีที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

- สุวรรณณี แสตนทวิสุข, ดวงใจ จงตามกลาง, ทศน์วรรณ สมจันทร์ และ ปิติพงษ์ โดบัณฑิตถอกพ. 2555. ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพรบางชนิด. **แก่นเกษตร** 40(2):480-483.
- Andrica, F.M., G.A. Draghici, C. Soica, I. Pinzaru, D. Coricovac, C. Citu and C. Dehelean. 2016. Antioxidant Activity Assessment of Ethanolic Spirulina Extracts. **Revista de Chimie - Bucharest** 67(2):289-290.
- Aramwit, P., N. Bang, and T. Srichana. 2010. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. **Food Research International** 43(4):1093-1097.
- Arung, E.T., I. W. Kusuma, K. Shimizu and R. Kondo. 2011. Tyrosinase inhibitory effect of quercetin 4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from dried skin of red onion (*Allium cepa*). **Natural Product Research** 25(3):256-263.
- Chauhan, S.M.S., M. Singh and A. Kumar. 2004. Isolation and characterization of selected secondary metabolites from dry leaves of *Quercus semicarpifolia*. **Indian Journal of Chemistry Sec A** 43B:223-226.
- Do, Q.D., A.E. Angkawijaya, P.L. Tran-Nguyen, L.H. Huynh, F.E. Soetaredjo, S. Ismadji and Y. Ju. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal of Food and Drug Analysis** 22(3):296-302.
- Fan, M., G. Zhang, X. Hu, X. Xu and D. Gong. 2017. Quercetin as a tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity, conformational change and mechanism. **Food Research International** 100:226-233.
- Khiari Z. and D. P. Makris. 2012. Stability and transformation of major flavonols in onion (*Allium cepa*) solid wastes. **Journal of Food Science and Technology** 49(4):489-494.
- Lombard, K.A., E. Geoffriau. and E. Peffey. 2002. Flavonoid Quantification in Onion by Spectrophotometric and High Performance Liquid Chromatography Analysis. **HortScience** 37(4):682-685.
- Nandani, D., R. N. Verma and A. Batra. 2013. Isolation and identification of quercetin and emodin from *Cassia tora* L. **Annals of Phytomedicine** 2(2):96-104.



- Neagu, E., G.L. Radu., C. Albu and G. Paun. 2016. Antioxidant activity, acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of *Pulmonaria officinalis* and *Centarium umbellatum* extracts. **Saudi Journal of Biological Sciences** 25(3):578-585.
- Nile, S.H., A.S. Nile, Y.S. Keum and K. Sharma. 2017. Utilization of quercetin and quercetin glycosides from onion (*Allium cepa* L.) solid waste as an antioxidant, urease and xanthine oxidase inhibitors. **Food Chemistry** 235:119–126.
- Prior, R.L. and Wu X. 2006. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. **Free Radical Research** 40(10): 1014-1028.
- Rodney, B. 2000. **Modern Experimental Biochemistry (3rd Edition)**. benjamin/cummings, an imprint of addison wesley longman, San Francisco.
- Saptarini, N.M., D. Suryasaputra and H. Nurmalia. 2015. Application of Butterfly Pea (*Clitoria ternatea* Linn) extract as an indicator of acid-base titration. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research** 7(2):275-280.
- Sherma, J. 2000. Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. **Journal of Chromatography A** 880 (1-2):129-147.
- Spencer, J.P.E. and A. Crozier, 2012. **Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function**. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York.
- Tsuda, T. and T. Osawa. 1997. Inhibition of Tyrosinase Activity by the Anthocyanin Pigments Isolated from *Phaseolus vulgaris* L. **Food Science and Technology International, Tokyo** 3(1):82-83.
- Viera, V.B., N. Piovesan, J.B. Rodrigues, R. de O. Mello, R.C. Prestes, R.C. V dos Santos, R. de A. Vaucher, T.P. Hautrive. And E.H. Kubota. 2017. Extraction of phenolic compounds and evaluation of the antioxidant and antimicrobial capacity of red onion skin (*Allium cepa* L.). **International Food Research Journal** 24(3):990-999.
- Zhang, Z.C., H.B. Wang, Q. Zhou, B. Hu, J.H. Wen and J.L. Zhang. Screening of effective xanthine oxidase inhibitors in dietary anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Cultivar Eshu No.8) and deciphering of the underlying mechanisms *in vitro*. **Journal of Functional Foods** 36 :102-111.





ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**  
**สารเคมีและวิธีการเตรียมสาร**

### สารเคมี

1. quercetin hydrate : Sigma-Aldrich
2. quercetin 3- $\beta$ -D-glucoside : Sigma-Aldrich
3. bovine milk xanthine oxidase : Sigma-Aldrich
4. xanthine : Sigma-Aldrich
5. Folin-Ciocalteu (FC) reagents : Loba Chemie
6. gallic acid : Sigma-Aldrich
7. sodium carbonate : Daejung Chemicals & Metals
8. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) : Sigma-Aldrich
9. butylated hydroxytoluene (BHT) : Sigma, St. Louis
10. kojic acid : Sigma, St. Louis
11. L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) : Sigma, St. Louis
12. mushroom tyrosinase : Sigma-Aldrich
13. L-ascorbic acid : Daejung Chemicals
14. allopurinol : Alfa Aesar
15. acetic acid glacial : QR&C
16. formic acid : Fisher Scientific UK
17. ethyl acetate : Fisher Scientific UK
18. hydroxyethyl cellulose (HEC) : ร้านเคมีภัณฑ์ (chemipan.com)
19. glycerine : ร้านเคมีภัณฑ์ (chemipan.com)
20. glydant : ร้านเคมีภัณฑ์ (chemipan.com)

ตารางผนวกที่ ก 1 การเตรียม butylated hydroxytoluene (BHT)

ความเข้มข้น (µg/ml)	BHT 100 µg/100ml (ml)	น้ำกลั่น (ml)
0	0	10
50	0.5	9.5
100	1.0	9.0
150	1.5	8.5
200	2.0	8.0
250	2.5	7.5
300	3.0	7.0

ตารางผนวกที่ ก 2 การเตรียมสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) เตรียมสารละลายเข้มข้นที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น (mg/L)	gallic acid 100 mg/L (ml)	น้ำกลั่น (ml)
0	0	10
20	2	8
40	4	6
60	6	4
80	8	2
100	10	0

**ภาคผนวก ข**  
**วิธีการทดลองและผลการทดลอง**



### วิธีการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

- เติมน้ำยาเคมี Folin-Ciocalteu (FC) 10% ปริมาตร 0.5 ml ผสมกับสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ อย่างละ 0.5 ml
- ตามด้วยเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต สารละลายในน้ำ 20 % ปริมาตร 1.5 ml จากนั้นนำไปแช่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- หลังจากนั้นวัดการดูดกลืนแสงที่ 765 nm โดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดสอบตัวอย่างละสามซ้ำ

### วิธีการวิเคราะห์ปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ

- นำสารสกัดเปลือกหอมแดงจากตัวทำละลายต่างชนิด และสารเคอควินโซลีนไฮเดรตและสารเคอควินโซลีนไกลโคไซด์ความเข้มข้น 5, 1 mmol/L ใส่หลอดอย่างละ 1 ml
- จากนั้นเติมเมทานอลตัวอย่างละ 3 ml โดยเติม 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 1 mmol/L ในเมทานอล ปริมาตร 0.5 ml แล้วเขย่าให้สารเข้ากัน
- จากนั้นบ่มตัวอย่าง 20 นาที ในที่มืด และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm การวัดทั้งหมดจะทำสามซ้ำ โดยเทียบกับเคอควินโซลีนไฮเดรต เคอควินโซลีนไกลโคไซด์ และ BHT เป็นสารมาตรฐาน

สูตรการคำนวณ เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (radical scavenging activity, RSA%) โดยคำนวณดังนี้

$$(RSA, \%) = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

เมื่อ  $A_{\text{control}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

$A_{\text{sample}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกัน กับสารละลาย

DPPH

### สูตรการคำนวณค่า $R_f$

$$R_f = \text{ระยะทางที่สารเคมีเคลื่อนที่ (cm)} / \text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (cm)}$$

### วิธีการวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

- ชั้นแรกเติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 12 ยูนิตต่อ 100  $\mu$ l ปริมาตร 500  $\mu$ l
- จากนั้นเติมสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน ปริมาตร 100  $\mu$ l ตามด้วยเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 6.8 ปริมาตร 4 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
- จากนั้นเติมสารละลาย L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ความเข้มข้น 2.5 mM ปริมาตร 200  $\mu$ l วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 nm โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 0 5 10 และ 15 นาที โดยใช้ ascorbic acid kojic acid เควอซิตินไฮเดรต และเควอซิตินไกลโคไซด์เป็นสารมาตรฐาน

### คำนวณหาค่า tyrosinase inhibition activity จากสูตรคำนวณดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = (B-C)/A \times 100$$

โดย A คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ของหลอดที่เติมแต่ tyrosinase

B คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตรของหลอดที่เติมตัวอย่าง และ tyrosinase

C คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตรของหลอดที่เติมตัวอย่าง และ tyrosinase แต่ไม่เติม L-DOPA

### วิธีการวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (Xanthine oxidase, XO)

- นำสารสกัดเปลือกหอมแดง และสารเควอซิตินและสารเควอซิตินไกลโคไซด์ อย่างละ 3 ml
- เติม phosphate buffer (pH 7.8) ความเข้มข้น 0.01 mmol/L ปริมาตร 1.5 ml
- เติม bovine milk XO (0.04 unit) 0.5 ml จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 10 นาที
- จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย xanthine 1 ml/L นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 30 นาที
- เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรด HCl 0.5 N ปริมาตร 2 ml และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 295 nm

คำนวณร้อยละในการยับยั้งสูงสุดครึ่งหนึ่ง (IC<sub>50</sub>) ตามสูตรดังนี้

สูตร  $\% \text{ xo inhibition} = (1 - \beta/\alpha) \times 100$

XO คือ เอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

$\alpha$  คือ กิจกรรมการยับยั้งที่ไม่มีการเติมสารทดสอบ

$\beta$  คือ กิจกรรมการยับยั้งที่มีการเติมสารทดสอบ

สารสกัดเปลือกหอมแดงนำมาประยุกต์ใช้ในการทำเซรั่ม

วิธีการทำเซรั่มจากสารสกัดเปลือกหอมแดง

- นำ hydroxyethyl cellulose (HEC) ปริมาณ 1.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร กวนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนบนเตาไฟฟ้า (hotplate) จนจนกว่าจะแข็งเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วยกออกจากเตาไฟฟ้า

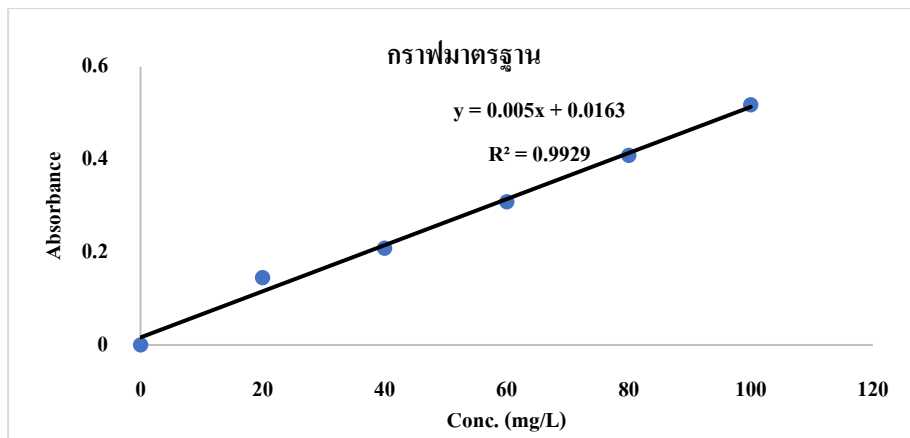
- เติมสาร glycerine ปริมาณ 3 กรัม แล้วกวนสารให้เข้ากัน

- เติมสาร glydant ปริมาณ 0.5 กรัม แล้วกวนสารให้เข้ากัน

- เติมสารสกัดเปลือกหอมแดง 1 มิลลิลิตร แล้วกวนให้เข้ากัน

ตารางผนวกที่ ข 1 ปริมาตรสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

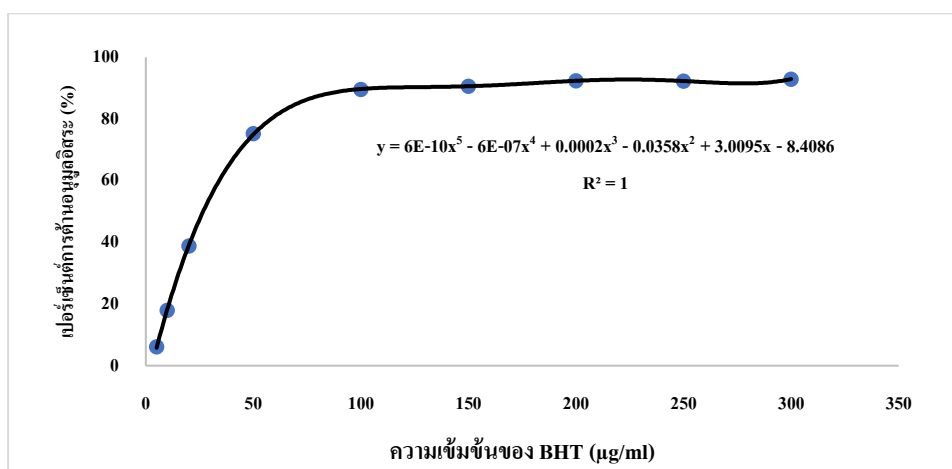
ชนิดของตัวทำละลาย	ปริมาตรสารสกัด (มิลลิลิตร ต่อ 10 กรัมเปลือกหอมแดง)
เอทานอล	2.2
เมทานอล	1.7
น้ำ	3.0



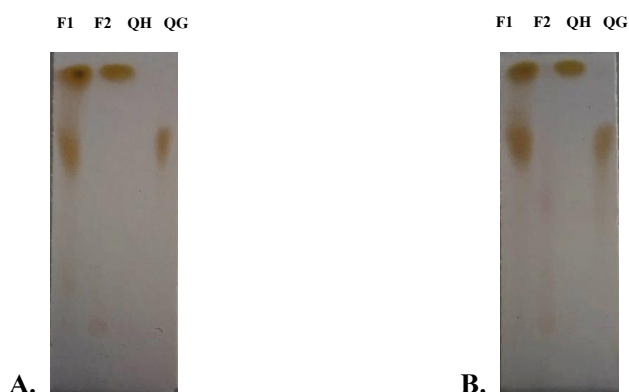
ภาพผนวกที่ ๑ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid)

ตารางผนวกที่ ๒ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน

ชนิดตัวทำละลาย ของสารสกัด	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด			ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ย ( mg GAE/10 g DW ) ± SD
	1	2	3	
น้ำ	23.58	25.76	26.35	25.23 ± 1.46
เอทานอล 95%	139.61	142.46	145.30	142.46 ± 2.84
เมทานอล 99.8%	108.32	104.42	107.02	106.59 ± 1.99



ภาพผนวกที่ ๒ 2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BHT



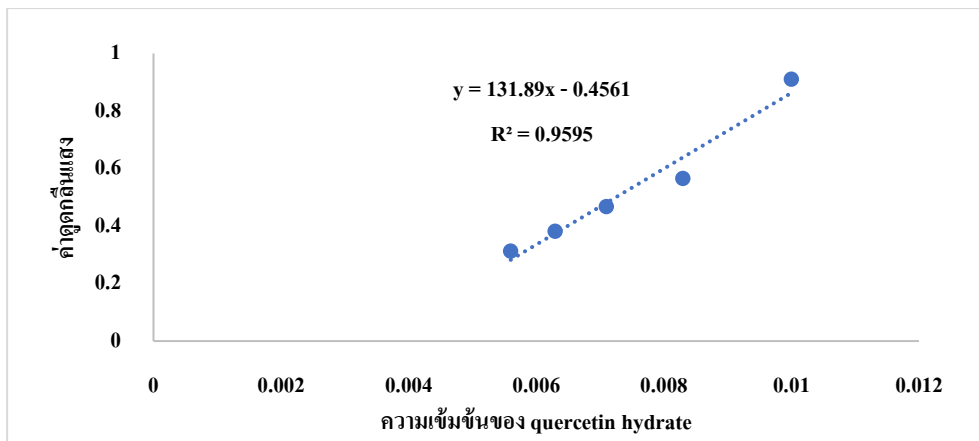
ภาพผนวกที่ ข 3 แผ่น TLC ด้วยระบบ ethyl acetate:formic acid:water (8:1:1) ของ fraction จากสารสกัดหอมแดงจากตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ผ่านการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (A) fraction by ethanol (B) fraction by methanol ; F1= Fraction 1, F2= Fraction 2, QH= quercetin hydrate, QG= quercetin 3- $\beta$ -D-glucoside

ตารางผนวกที่ ข 3 ค่า R<sub>f</sub> ของ fraction ของสารสกัดเปลือกหอมแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ และสารมาตรฐาน ด้วยระบบตัวชะ TLC คือ EFW (8:1:1)

ชนิดตัวทำละลาย ที่สกัด	ค่า R <sub>f</sub> ของสารสกัดจากเปลือกหอมแดง			
	fraction 1	fraction 2	QH	Q
Ethanol 95%	0.64	0	0.88	0.64
	0.88			
Methanol 99.8%	0.70	0	0.96	0.68
	0.93	0.46		

ตารางผนวกที่ ข 4 ค่า R<sub>f</sub> ของระบบตัวทำละลายของสารสกัดจากเปลือกหอมแดงที่สกัดด้วยตัว  
ทำละลายต่าง ๆ และสารมาตรฐาน

ชนิดตัว ทำละลายที่สกัด	ค่า R <sub>f</sub> ของระบบตัวทำละลาย TLC	
	n-butanol: acetic acid : water (4:1:5)	ethyl acetate: formic acid : water (8:1:1)
EtOH 95%	0.71	0.07
	0.83	0.30
	0.91	0.60
		0.86
QH	0.95	0.88
QG	0.86	0.61
MeOH 99.8%	0.71	0.09
	0.86	0.38
	0.94	0.65
		0.84
QH	0.94	0.85
QG	0.86	0.67
Water	0.79	0.85
	0.92	
QH	0.90	0.85
QG	0.82	0.67



ภาพผนวกที่ ข 4 กราฟมาตรฐานของสารละลาย quercetin hydrate

### การคำนวณหาปริมาณสารเคอควิซตินไฮเดรต (quercetin hydrate, QH)

สารสกัดจากเปลือกหอมแดงด้วยเอทานอล 95%

QH 1 M มีเนื้อสาร 302.25 g/L

QH 1 mM มีเนื้อสาร 302.25 mg/L

สารสกัดเข้มข้น 522 mM ใน 0.5 ml

ดังนั้น มีเนื้อสาร  $522 \text{ mM} \times 302.25 \text{ mg/L} = 157,774.5 \text{ mg/L}$

ใช้ 0.5 ml จะเป็น  $0.5 \text{ ml} \times 157,774.5 \text{ mg/L} / 1000 \text{ ml} = 78.89 \text{ mg}$

ทั้งหมด 3 ml จะเป็น  $3 \text{ ml} \times 78.89 \text{ mg} / 0.5 \text{ ml} = 473.34 \text{ mg}$

เปลือกหอมแดง 10 g จะมี QH = 473.34 mg

ถ้า เปลือกหอมแดง 1 g จะมี QH = 47.33 mg

สารสกัดจากเปลือกหอมแดงด้วยเมทานอล 99.8%

QH 1 M มีเนื้อสาร 302.25 g/L

QH 1 mM มีเนื้อสาร 302.25 mg/L

สารสกัดเข้มข้น 389.7 mM ใน 0.5 ml

ดังนั้น มีเนื้อสาร  $389.7 \text{ mM} \times 302.25 \text{ mg/L} = 117,786.83 \text{ mg/L}$

ใช้ 0.6 ml จะเป็น  $0.6 \text{ ml} \times 117,786.83 \text{ mg/L} / 1000 \text{ ml} = 70.67 \text{ mg}$

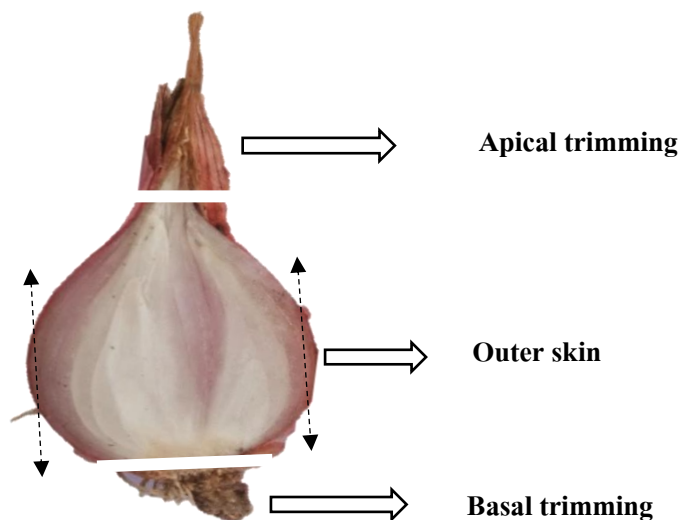
ทั้งหมด 3 ml จะเป็น  $3 \text{ ml} \times 70.67 \text{ mg} / 0.6 \text{ ml} = 353.35 \text{ mg}$

เปลือกหอมแดง 10 g จะมี QH = 353.35 mg

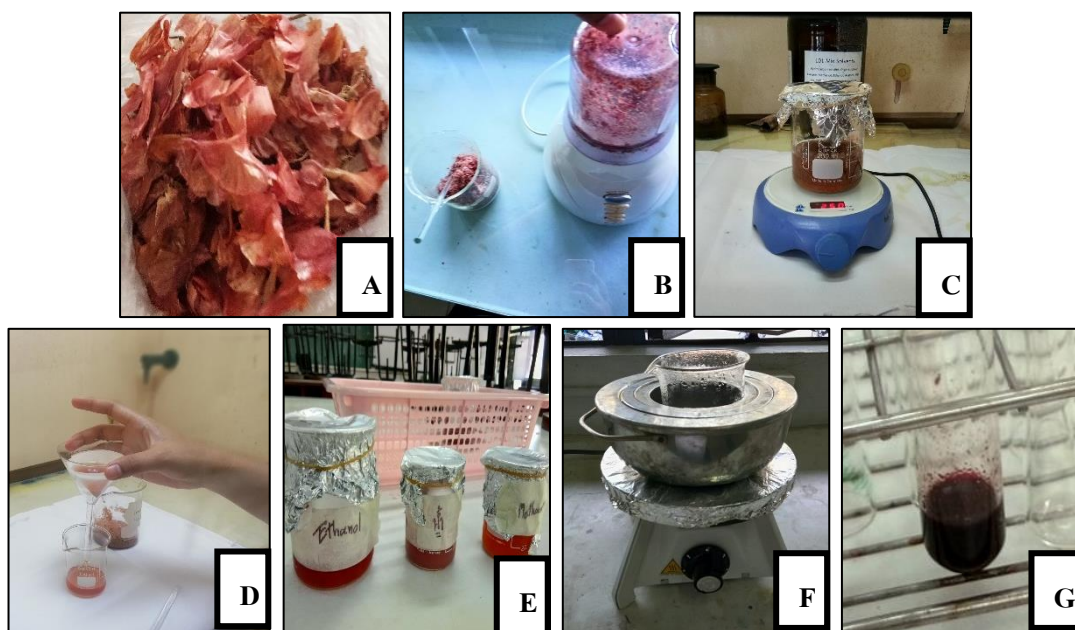
ถ้า เปลือกหอมแดง 1 g จะมี QH = 35.34 mg



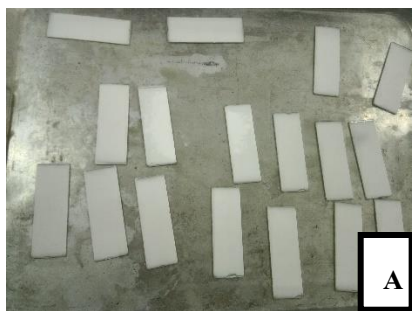
ภาคผนวก ค  
ภาพการทดลอง



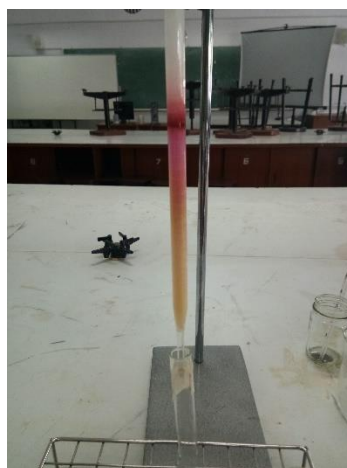
ภาพ ส่วนประกอบของหอมแดง



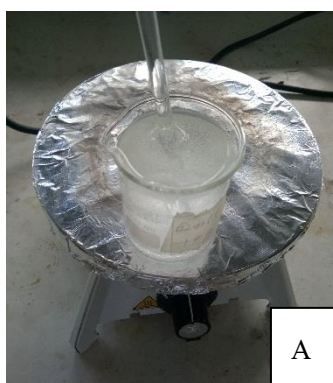
ภาพผนวกที่ 2 ขั้นตอนการสกัดสาร (A) เปลือกหอมแดง, (B) บดเปลือกหอมแดงให้ละเอียด, (C) เปลือกหอม 10 g กับ เอทานอล 100 ml กวนสารด้วยเครื่องกวนสารละลาย, (D) กรองสาร, (E) สารสกัดที่มีตัวทำละลาย, (F) ระเหยตัวทำละลายด้วยเตาไฟฟ้า และ (G) สารสกัดที่ระเหยตัวทำละลายออกแล้ว



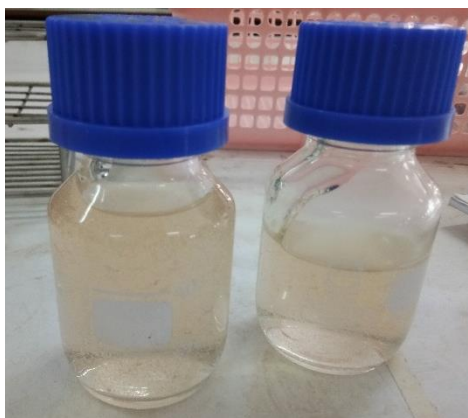
ภาพผนวกที่ ค 3 การเตรียมอุปกรณ์สำหรับ thin layer chromatography (A) การเตรียมแผ่น TLC และ (B) การชะด้วยตัวทำละลาย



ภาพผนวกที่ ค 4 การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสารสกัดเปลือกหอมแดง



ภาพผนวกที่ ค 5 การทำเซรัมจากสารสกัดเปลือกหอมแดง A = เติม HEC และให้ความร้อน, B = เติม glycerine และ C = เติม glydant และสารสกัดเปลือกหอมแดง



ภาพผนวกที่ ค 6 เซรัมที่มีส่วนผสมของสารสกัดเปลือกหอมแดง 1 %