การศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากต้นโคลงเคลงด้วยเทคนิค HPTLC และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

Identification of Phenolic Compounds in *Melastoma malabathricum* (L.) Extract by HPTLC Technique and their Food Pathogenic Bacteria Activities

อาอีเซาะส์ เบ็ญหาวัน* และสุนีย์ แวมะ
Aeesoh Benhawan* and Sunee Waema

สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา อำเภอเมือง จังหวัดยะลา 95000
Department of Chemistry, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University, Yala, 95000.Thailand
*Corresponding author, e-mail: aeesoh.b@yru.ac.th
(Recieived: Feb 16, 2021; Revised: Jun 26, 2021; Accepted: May 19, 2021)

บทคัดย่อ

โคลงเคลงเป็นสมุนไพรพื้นบ้าน พบมากในภาคใต้ของไทย มีสรรพคุณรักษาโรคและฆ่าเชื้อ ดังนั้นจึงวิจัยเพื่อศึกษาชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 5 ชนิด ได้แก่ คาเทชิน กรดแกลลิก รูติน ลูทีโอลิน และเควอซิติน ในสารสกัดอะซิโตนจากพืชโคลงเคลงด้วยเทคนิค HPTLC ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย ประหยัด รวดเร็ว และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากของเสียที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อย โดยสกัดสารจากส่วนผล ใบ ก้าน และรากด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง นำสารสกัดของทุกส่วนมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้ง 5 ชนิด ด้วยกราฟมาตรฐานที่มีความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่วิเคราะห์บนแผ่น (HPTLC 60F_{254} silica gel plate) เดียวกับสารสกัด มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($r > 0.99$) ช่วงของการวิเคราะห์เท่ากับ 100 – 2000 ng/band จากการวิเคราะห์ให้ผลดังนี้ ส่วนผลพบสารสำคัญมากที่สุด คือ คาเทชิน (0.027 %), กรดแกลลิก (0.034 %), ลูทีโอลิน (0.017 %) และเควอซิติน (0.020 %) และส่วนอื่น ๆ พบสารสำคัญเพียง 2 ชนิด ปริมาณร้อยละ 0.011-0.049 นอกจากนี้ได้มีการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร 3 สายพันธุ์ คือ *S. aureus, B. cereus* และ *E. coli* ทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าสารสกัดจากส่วนผล ก้าน และราก สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ ข้อค้นพบชี้ให้เห็นว่าโคลงเคลงเป็นพืชที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อบริโภคได้

คำสำคัญ : สารประกอบฟีนอลิก โคลงเคลง HPTLC ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

Abstract

Melastoma malabathricum is a native plant found in the Southern region, Thailand. It has been used to treat and disinfect. Thus, this study was carried out to identify and determine the contents of five phenolic compounds such as catechin, gallic acid, rutin, luteolin and quercetin in an acetone extract of *Melastoma malabathricum* from ultrasonication extraction. By extracting parts of fruit, leaf, stem and root; subjected to HPTLC analysis it was simple, economical, rapid and eco-friendly technique followed by small amount of waste produced, to quantify the contents of five phenolic constituents of biological interest. Results with the standard curve correlated between the peak area of absorbance at the wavelengths of 254 nm and 366 nm and the concentration of the standard solution, which were analyzed with the same HPTLC 60F254 silica gel plate as the extract. The result showed the linear calibration curve ($r > 0.99$), the analysis range was in the range of 100 - 2000 ng/band. The fruit was contained the most active compounds: catechin (0.027%), gallic acid (0.034%), luteolin (0.017%) and quercetin (0.020%). The other parts were found only two active components: 0.011-0.049%. In addition, the inhibitory effect of the extracts on the three bacteria strains; *S. aureus, B. cereus* and *E. coli*, was determined by agar well diffusion method. It was found that the stem and root extract were able to

inhibit only *S. aureus*. From the results of the studies, *Melastoma malabathricum* is useful as a food supplement and it may improve other food product developments.

Keywords: Phenolic compound, *Melastoma malabathricum*, HPTLC, Food pathogenic bacteria activities

บทนำ

สมุนไพรไทยถูกนำมาใช้ในการบำบัดรักษาโรคตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันแม้ว่าการแพทย์ตะวันตกหรือแพทย์แผนปัจจุบันเข้ามามีบทบาทในชีวิตของคนไทย ซึ่งในช่วงสิบปีนี้กระแสแพทย์แผนไทยเริ่มได้รับการยอมรับ ทำให้ผู้คนหันกลับมาสนใจแพทย์ทางเลือกในการรักษาและป้องกันโรค ประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิภาคเขตร้อน (Tropic) มีความหลากหลายของระบบนิเวศที่หลากหลาย (Habitat diversity) ความหลากหลายของชนิด (Species diversity) ตลอดจนความหลากหลายของสายพันธุ์ (Genetic diversity) โดยเฉพาะภาคใต้ตอนล่างบริเวณเขตจังหวัดปัตตานี ยะลา และนราธิวาส มีลักษณะเป็นป่าดิบชื้นจัดเป็นป่าฝนในเขตร้อน (Tropical rain forest) มีความคล้ายคลึงกับป่าดิบชื้นในประเทศมาเลเซีย ประกอบด้วยพรรณไม้หลายร้อยชนิด ส่งผลให้พื้นที่นี้มีการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรในด้านต่าง ๆ ด้วยการรับประทานเป็นอาหารหรือรักษาและป้องกันจากอาการผิดปกติของร่างกาย โคลงเคลง (*Melastoma malabathricum*) เป็นไม้พุ่มขนาดกลาง มีดอกสีม่วง ออกดอกตลอดปี พบมากทางภาคใต้ของไทย เป็นไม้พุ่มสูงประมาณ 1-3 เมตร มีสรรพคุณเป็นสมุนไพรใช้เป็นยาพื้นบ้านได้หลายประเภท เช่น แก้อาการปวดท้อง บิด ท้องร่วง ใช้รักษาแผลสด แผลอักเสบ แผลเป็นจากฝี รักษาโรคริดสีดวงทวาร โรคระดูขาวของสตรี ใช้ปรุงเป็นยาดับพิษไข้ และยาแก้ปวดท้องในเด็ก อีกทั้งมีฤทธิ์ระงับประสาท และฆ่าเชื้อราในช่องปาก (Joffry *et al*., 2012, pp. 1-48; Kumar *et al*., 2013, pp. 1-19; Zakaria *et al*., 2011, pp. 248-256)

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด สามารถต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidant) ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โครงสร้างมีส่วนประกอบของหมู่ไฮดรอกซีอยู่บนวงแหวนเบนซีน แบ่งออกเป็นกลุ่มกรดฟีโนลิก ฟลาโวนอยด์ สติลบีน ลิกนินส์และพอลิเมอร์ของลิกนินส์ โคลงเคลงเป็นพืชที่มีการค้นพบสารสำคัญในแต่ละส่วนที่แตกต่างกัน เช่น ส่วนใบมีรายงานการศึกษาองค์ประกอบมากที่สุด โดยพบสาร ดังนี้ ฟลาโวนอยด์ ไตรเทอร์พีน แทนนิน ซาปอนิน อัลคาลอยด์ สเตียรอยด์ ไกลโคไซด์และฟีนอลิก (Joffry *et al*., 2012, pp. 1-48) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในต้นโคลงเคลง ที่มีรายงานการค้นพบมากกว่า 74 ชนิด

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารหมายถึงกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในคน ซึ่งติดต่อมาสู่คนผ่านทางอาหารเป็นหลัก ทำให้เกิดโรคในกลุ่มที่เรียกว่า โรคจากอาหาร (Foodborne diseases) เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารที่พบได้บ่อย คือ *S. aureus* พบในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ต่าง ๆ ไข่ และผลิตภัณฑ์จำพวกนม เชื้อ *S. aureus* จะสร้าง enterotoxin ปนเปื้อนในอาหารหากรับประทานเข้าไปจะทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ เกิดท้องร่วงรุนแรง คลื่นไส้อาเจียน และปวดท้อง นอกจากนี้ *Salmonella* ยังเป็นเชื้อก่อโรคท้องร่วงจากการรับประทานอาหารที่ไม่สุก (Gastroenteritis) อาการที่สำคัญ คือ คลื่นไส้อาเจียน ท้องร่วงเป็นน้ำหรือมูกเลือด ปวดท้องและมีไข้ ส่วน *B. cereus* นั้นพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ จึงมักปนเปื้อนในอาหารจำพวกนม ไข่และอาจพบได้ในอาหารปรุงสำเร็จ เช่น ข้าวผัด ไอศกรีม ซอส เป็นต้น

สำหรับการวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอันได้แก่ คาเทชิน กรดแกลลิก รูติน ลูทีโอลิน และเควอซิติน ด้วยเทคนิค HPTLC ที่พัฒนาขึ้นจาก TLC ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการแยกและวิเคราะห์เชิงปริมาณ เนื่องจากวัฏภาคคงที่มีขนาดอนุภาคเล็ก (2-7 ไมโครมิเตอร์) และมีความสม่ำเสมอของอนุภาคหรือมีความแตกต่างของอนุภาคน้อยมาก ทำให้เกิดการแยกที่ดี เป็นเทคนิคที่ทำได้รวดเร็ว เชื่อถือได้ สามารถแยกสารและวิเคราะห์ได้โดยมีความถูกต้องและความเที่ยง ทำซ้ำได้ สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน ใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่มาก มีความซับซ้อนน้อย มีความละเอียดสูง ใช้สารปริมาณน้อย (Hussain *et al*., 2019, pp. 83-88) ส่งผลให้การศึกษาครั้งนี้มีของเสียที่ทิ้งสู่สิ่งแวดล้อมที่น้อยมากเมื่อเทียบกับเทคนิค HPLC นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานด้านองค์ประกอบของสารสำคัญของพืชในท้องถิ่น เพื่อประโยชน์ในการสร้างมูลค่าและเป็นฐานข้อมูลสำหรับต่อยอดงานวิจัยเพื่อพัฒนาสมุนไพรไทยต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาพฤกษเคมีด้วยวิธีการตรวจสอบการเกิดสี/การเกิดตะกอนของสารสกัดหยาบอะซิโตนจากส่วนผล ใบ ก้าน และรากโคลงเคลง
2. เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดทั้ง 4 ส่วนด้วยเทคนิค HPTLC โดยใช้สารมาตรฐานเปรียบเทียบ
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *B. cereus* และ *E. coli* ด้วยวิธี disc diffusion test

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุและสารเคมี

วัสดุที่สำคัญและสารมาตรฐานในงานวิจัยนี้ ได้แก่ 1) แผ่นโครมาโทกราฟี (HPTLC silica gel 60 F_{254} plates 20 x 10 cm; Merck, Darmstadt, Germany) 2) gallic acid (97.5-102.5 % (titration) Sigma-Aldrich, China) 3) rutin hydrate (≥ 94% (HPLC), powder, Sigma-Aldrich, China) 4) quercetin (≥ 98.0 % (HPLC), Sigma-Aldrich, packed in Switzerland) 5) (+)-catechin hydrate (≥ 96.0 % (sum of enantiomer, HPLC), Sigma-Aldrich, China) 6) luteolin (≥ 98% TLC, powder, Sigma-Aldrich, USA) 7) NP (2-Aminoethyl diphenylborinate for TLC derivatization, Germany) 8) PEG (polyethylene glycol 400, Sigma-Aldrich, Germany)

2. การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสาร

เก็บตัวอย่างต้นโคลงเคลงจากบริเวณเชิงเขา หมู่ 4 ตำบลสะเตงนอก อำเภอเมือง จังหวัดยะลา แยกส่วนของผล ใบ ก้าน และราก อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจนแห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งแต่ละส่วนปริมาณ 20 กรัม สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic) โดยมีอะซิโตนเป็นตัวทำละลาย เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศได้เป็นสารสกัดหยาบลักษณะข้นหนืด

3. การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (preliminary test)

งานวิจัยนี้ทำการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี/การเกิดตะกอนของสารสกัดหยาบอะซิโตน โดยทดสอบสาร 5 ประเภท ได้แก่ แอนทราควิโนน เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และแทนนิน ดัดแปลงจาก Yadav *et al*. (2014, pp. 539-542)

4. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารสำคัญโดยใช้สารมาตรฐานเปรียบเทียบด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีแผ่นบางสมรรถนะสูง (HPTLC)

ฉีดพ่นสารมาตรฐาน เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรในช่วง 1 – 20 ไมโครลิตร หรือปริมาณ 100 – 2000 นาโนกรัมต่อแถบ (Band) และตัวอย่างสารสกัดเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตรของเมทานอล ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อแถบ บนแผ่นโครมาโทกราฟีแบบบางสมรรถนะสูงชนิด HPTLC plates silica gel 60 F_{254} โดยแต่แถบมีความยาว 8 มิลลิเมตร ด้วยเครื่อง Linomat-5 (CAMAG, Switzerland) ร่วมกับเครื่องเป่าก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen aspirator) พัฒนาแผ่น HPTLC ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม (วัฏภาคเคลื่อนที่) โดยใช้เครื่องพัฒนาแผ่น ADC-2 (CAMAG, Switzerland) ตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยมีสารมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบ วิเคราะห์ปริมาณสารโดยการตรวจวัดความหนาแน่นของสารด้วยเครื่องตรวจวัด CAMAG TLC Scanner-3 ในรูปแบบการสะท้อนและการดูดกลืน (Reflectance-absorbance mode) ที่ความยาวคลื่นและสแกนที่ตำแหน่ง R_f ที่เหมาะสม โดยใช้หลอดดิวทีเรียม (Deuterium lamp) และหลอดฮาโลเจน-ทังสเตน (Halogen-Tungsten lamp) เป็นแหล่งกำเนิดรังสี ดำเนินการและประมวลผลโดยใช้โปรแกรม winCATS 1.2.6 software ซึ่งมีรายละเอียดของระบบมีดังนี้

4.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง สารมาตรฐานและน้ำยาตรวจสอบ (Derivatization reagents)

เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยชั่งสารสกัดหยาบ 1.000 กรัม ละลายในเมทานอล 10 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยชั่งสาร 0.0010 กรัม ละลายในเมทานอล 10 มิลลิลิตร กรองด้วยเยื่อไนลอนขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บสารละลายที่ได้ในภาชนะเก็บสาร (Vial) เตรียมน้ำยาตรวจสอบ NP reagent โดยชั่งสาร 2-Aminoethyl diphenylborinate 1 กรัม ละลายในเมทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียมน้ำยาตรวจสอบ PEG solution โดยชั่งสาร polyethylene glycol 400 1 กรัม ละลายในเอทานอล 100 มิลลิลิตร และเตรียมน้ำยาตรวจสอบ 10% sulfuric acid ผสม sulfuric acid เข้มข้น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับเมทานอลปริมาตร 90 มิลลิลิตร

4.2 วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)

สำหรับพัฒนาแผ่น (Develop) โดยระบบตัวทำละลายเคลื่อนไปเป็นระยะทาง 70 มิลลิเมตร สำหรับการวิเคราะห์คาเทชิน และกรดแกลลิก ประกอบด้วย toluene : ethyl acetate : methanol : formic acid ในอัตราส่วน 6 : 6 : 1 : 0.1 (Jaiswal *et al*, 2013, pp. 49-54) การวิเคราะห์รูติน ประกอบด้วย ethyl acetate: formic acid: water ในอัตราส่วน 80 : 10 : 10 (Broszat, 2018, pp. 27-29) การวิเคราะห์เควอซิติน ประกอบด้วย toluene : acetone : formic acid ในอัตราส่วน 4.5 : 4.5 : 1 (Varghese *et al*, 2013, pp. 122-126) และการวิเคราะห์ลูทีโอลิน ประกอบด้วย toluene : ethyl acetate : formic acid ในอัตราส่วน 10 : 9 : 1 (Broszat, 2018, pp. 27-29)

4.3 การตรวจหาสารด้วยน้ำยาตรวจสอบ (detecting agents)

การตรวจหาสารองค์ประกอบในพืชใช้วิธีพ่น (Spray) ด้วยน้ำยาตรวจสอบที่เป็นสารเตรียมอนุพันธ์เพื่อให้เกิดปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชัน (Functional group) ของสารประกอบกรดแกลลิก รูติน เควอซิติน และลูทีโอลิน ด้วย natural products (diphenyl-boryloxyethylamine) / polyethylene glycol (NP/PEG) reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 366 nm ส่วนคาเทชิน ไม่ใช้น้ำยาตรวจสอบ งานวิจัยนี้วิเคราะห์สารคาเทชินด้วยค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 254 nm ซึ่งได้ระบุในราตางที่ 2

4.4 การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณสารสำคัญของสารสกัด

วิเคราะห์เชิงปริมาณสารสำคัญทั้ง 5 ชนิด คือ คาเทชิน กรดแกลลิก รูติน เควอซิติน และลูทีโอลิน ในสารสกัดจากผล ใบ ก้าน และรากโคลงเคลงด้วยวิธีการเทียบกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด โดยประเมินลักษณะโครมาโทแกรมที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ค่า R_f เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิง พล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ที่วิเคราะห์บนแผ่นเดียวกันกับสารละลายของสารสกัด ได้เป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสมการ y = slope (x) + intercept แล้วคำนวณหาปริมาณของสารสำคัญโดยโปรแกรม winCATS 1.2.6 software

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบแบ่งเป็น แบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* และ *B. cereus* แบคทีเรียแกรมลบ 1 สายพันธุ์ คือ *E. coli* โดยเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นจุ่มไม้พันสำลีปราศจากเชื้อลงในอาหารที่เตรียมไว้ นำมาเกลี่ยบนอาหาร NA ที่เตรียมไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหาร การป้ายให้ป้าย 3 ระนาบ และทิ้งให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นนำแผ่นกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลมมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วหยดสารสกัดลงบนแผ่นกระดาษกรองปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยมีเอทานอลร้อยละ 95 เป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการทดลองแต่ละตัวอย่าง 3 ซ้ำ จากนั้นไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดบริเวณวงใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นกระดาษกรอง

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารจากส่วนผล ใบ ก้าน และรากโคลงเคลง

การศึกษาการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากผล ใบ ก้าน และรากโคลงเคลงในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการสกัดด้วยอัลตราซาวด์ (Ultrasonic assisted extraction) ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้เกิดฟองก๊าซที่จะไปดึงสารที่อยู่ภายในเซลล์ของพืชออกมาละลายในตัวทำละลาย เทคนิคการสกัดนี้ส่งผลให้อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ทำให้สารประกอบฟีนอลิกที่ต้องการสกัดละลายดีขึ้น ใช้ระยะเวลาการสกัดที่สั้นมาก ตัวทำละลายสกัดที่ใช้เป็นอะซิโตน ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว สามารถสกัดองค์ประกอบที่ไม่มีขั้วไปจนถึงสารที่มีขั้วปานกลาง อีกทั้งเป็นตัวทำละลายที่มีราคาถูก ระเหยง่าย จึงง่ายต่อการกำจัดในภายหลัง การระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) ใช้ความร้อนเพียง 45 องศาเซลเซียส ส่งผลดีต่อการคงสภาพขององค์ประกอบในสารสกัดเนื่องจากอุณหภูมิสูงจะทำให้สารออกฤทธิ์สลายหรือเปลี่ยนแปลงได้ ผลการสกัดจากส่วนต่าง ๆ ร้อยละผลผลิตที่ได้ (% Yield) แตกต่างกันดังตารางที่ 1 พบว่า สารสกัดจากใบมีร้อยละผลผลิตที่ได้สูงที่สุด รองลงมาคือส่วนราก ส่วนก้าน และต่ำที่สุดคือส่วนผล

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบอะซิโตนจากส่วนผล ใบ ก้าน ราก และกลุ่มสารสำคัญที่พบ

ส่วนที่ใช้สกัด	ร้อยละผลผลิต*	ผลการตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญ**				
		แอนทราควิโนน	เทอร์พีนอยด์	ฟลาโวนอยด์	ซาโปนิน	แทนนิน
ผล	1.50 ± 0.06	+	+	+	+	+
ใบ	4.30 ± 0.04	-	+	+	-	+
ก้าน	3.10 ± 0.07	-	+	+	-	-
ราก	3.35 ± 0.05	-	-	+	-	-

* Mean ± SD (n=3)

** + แทน พบ , - แทน ไม่พบ

2. การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้น (Preliminary test) เพื่อหากลุ่มสาระสำคัญในโคลงเคลง

การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาสีหรือการเกิดตะกอนซึ่งจะให้ผลเป็นสีต่าง ๆ หรือเกิดการขุ่นของตะกอนเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และมีความไวสูง แต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับกลุ่มสารพฤกษเคมีที่ต้องการจากการทดสอบหากลุ่มสารสำคัญ 5 ชนิด ได้แก่ แอนทราควิโนน เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และแทนนิน ในสารสกัดหยาบอะซิโตนของราก ก้าน ใบ และผล โคลงเคลง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 1 ซึ่งพบว่า ผลโคลงเคลงมีปรากฏกลุ่มสารสำคัญทั้ง 5 ชนิด ในขณะที่รากโคลงเคลง พบสารสำคัญเพียงชนิดเดียว คือ ฟลาโวนอยด์

3. ผลการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในโคลงเคลงด้วยเทคนิค HPTLC densitometer

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPTLC densitometer ในงานวิจัยนี้ ใช้การวิเคราะห์เชิงปริมาณแบบ external standard technique โดยฉีดสารมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 100-1200 ng/band ลงบนแผ่น HPTLC พัฒนาแผ่นด้วย mobile phase ที่เหมาะสมกับชนิดของสารมาตรฐานซึ่งระบบที่เหมาะสมนั้นควรทำให้สารเคลื่อนที่อยู่ในช่วง (R_f) 0.3-0.7 รวมไปถึงทำให้เกิดการแยกของสารตัวอย่างได้ชัดเจนที่สุด ในงานวิจัยนี้สารมาตรฐานลูทีโอลินให้ค่า R_f เท่ากับ 0.51 คาเทชิน รูติน และกรดแกลลิก ให้ค่า R_f น้อยกว่า 0.3 และเควอซิติน ให้ค่า R_f มากกว่า 0.7 ทั้งนี้ระบบตัวทำละลายที่เลือกสำหรับ คาเทชิน รูติน กรดแกลลิก และเควอซิตินทำให้เกิดการแยกของสารในตัวอย่างดีที่สุด หลังจากใช้เครื่องเดนซิโตมิเตอร์หาปริมาณสารโดยการวัดความเข้มของแถบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เครื่องจะประมวลผลการวิเคราะห์โดยทำการวิเคราะห์ความสูงของพีคหรือพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น (Band) ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Calibration curve) ที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ที่เข้าใกล้ 1 ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 กราฟมาตรฐานโครมาโตกราฟีแผ่นบางสมรรถนะสูง (HPTLC calibration curves) ของสารมาตรฐาน 5 ชนิด

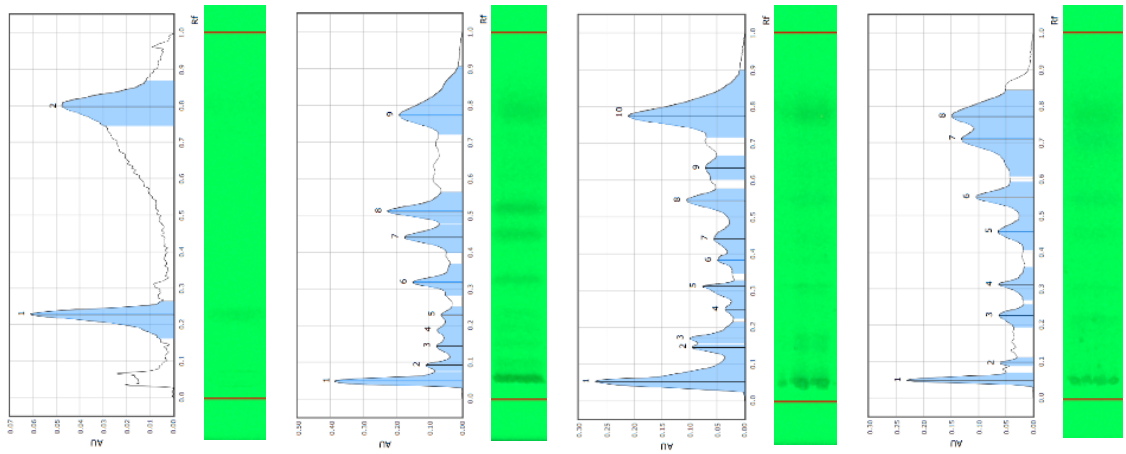
สารมาตรฐาน	สารเตรียมอนุพันธ์	R_f	สมการเส้นตรง (y = ax + b)	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ดี (r)	ส่วนของพืชตัวอย่าง	ปริมาณ (ng)	ร้อยละ
Catechin	-	0.23	y = 0.000004x + 0.0006	0.9922	ผล	538.3	0.027
					ก้าน	212.6	0.011
					ราก	667.0	0.033
Gallic acid	NP/PEG	0.26	y = 0.0007x - 0.0007	0.9902	ผล	677.2	0.034
					ราก	605.5	0.030
Rutin		0.25	y = 0.0005x + 0.0001	0.9977	ใบ	984.6	0.049
Luteolin		0.51	y = 0.00001x + 0.0034	0.9926	ผล	329.5	0.017
					ใบ	168.8	0.008
					ก้าน	874.2	0.044
Quercetin		0.75	y = 0.001x + 0.0028	0.9921	ผล	406.6	0.020

จากการแยกสารคาเทชิน กรดแกลลิก รูติน ลูทีโอลิน และเควอซิติน บนแผ่น HPTLC 60 F_{254} silica gel plate พัฒนาแผ่นดังกล่าวด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่และตรวจจับด้วยสารเคมีดังตาราง 3 โดยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็นระยะทาง 70 mm พบสารมาตรฐานเคลื่อนที่ได้ค่า R_f เท่ากับ 0.23 0.26 0.25 0.51 และ 0.75 ตามลำดับ พล็อตกราฟมาตรฐาน

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี USU. YRU Journal of Science and Technology ISSN : 2539-5688

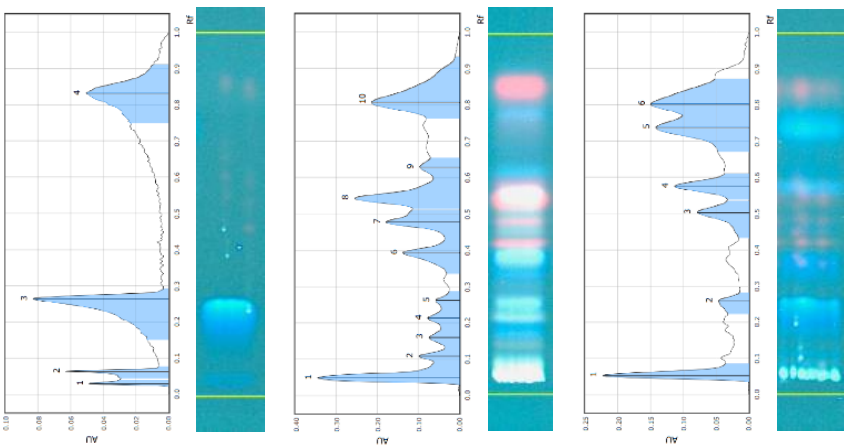
5-6 ความเข้มข้น พบว่าได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ดีเข้าใกล้ +1 (Correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9922 0.9902 0.9977 0.9926 และ 0.9921 ตามลำดับ การตรวจสอบเชิงปริมาณของสารทั้ง 5 ชนิดในสารสกัดของทั้ง 4 ส่วน ได้แก่ ผล ใบ ก้าน และรากของโคลงเคลง ด้วยการวัดความหนาแน่นของสาร (Densitometric evaluation) โดยใช้รูปแบบการสะท้อนและการดูดกลืน (Reflectance-absorbance mode) ที่ความยาวคลื่นและค่า R_f เดียวกับสารมาตรฐานและประมวลผลโดยใช้โปรแกรม winCAT 2.4.17207.2 software ดังตารางที่ 2

จากการวิเคราะห์ปริมาณคาเทชิน กรดแกลลิก รูติน ลูทีโอลิน และเควอซิติน ในส่วนต่าง ๆ ของต้นโคลงเคลง (ผล ใบ ก้าน และราก) ดังตารางที่ 2 พบว่าปรากฏพีคที่มีค่า R_f ตรงกับสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด โดยส่วนของผล พบสาร 4 ชนิด ได้แก่ คาเทชิน กรดแกลลิก ลูทีโอลิน และเควอซิติน โดยพบปริมาณกรดแกลลิกมากที่สุด เท่ากับ 677.2 ng รองลงมา คาเทชิน ปริมาณ 538.3 ng และพบลูทีโอลิน ปริมาณน้อยที่สุด เท่ากับ 329.5 ng ส่วนของใบพบองค์ประกอบของรูติน มากที่สุดปริมาณ 984.6 ng และพบลูทีโอลิน เพียง 168.8 ng ในส่วนของก้านพบ คาเทชิน และลูทีโอลิน ปริมาณ 212.6 และ 874.2 ng ตามลำดับ และพบองค์ประกอบของคาเทชิน และกรดแกลลิก ในรากในปริมาณ 667.0 และ 605.5 ng ตามลำดับ



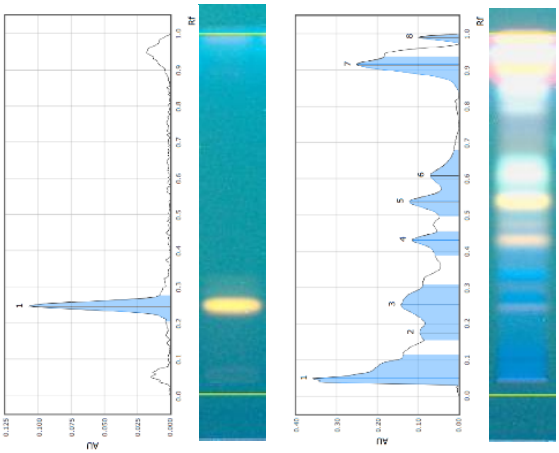
(C) (Mf) (Ms) (Mr)

ภาพที่ 1 HPTLC โครมาโตแกรมของคาเทชิน (C_1) ผล (Mf_1) ก้าน (Ms_1) และราก (Mr_1) หลังเกิดอนุพันธ์ NP/PEG



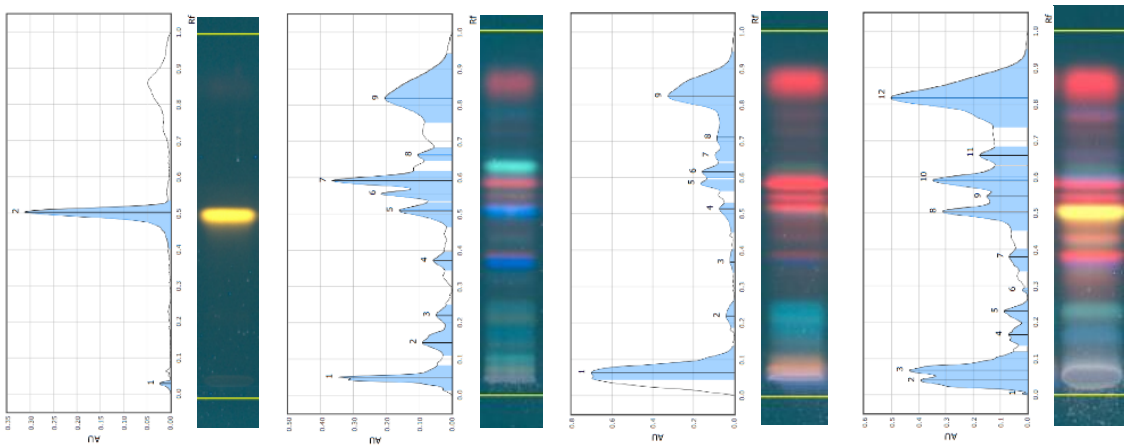
(G) (Mf) (Mr)

ภาพที่ 2 HPTLC โครมาโตแกรมของกรดแกลลิก (G_2) ผล (Mf_2) และราก (Mr_2) หลังเกิดอนุพันธ์ NP/PEG



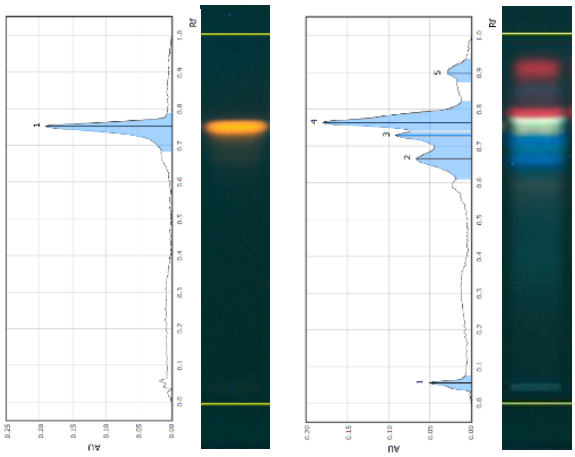
(R) (Ml)

ภาพที่ 3 HPTLC โครมาโตแกรมของรูติน (R3) และใบ (Ml3) หลังเกิดอนุพันธ์ NP/PEG



(L) (Mf) (Ml) (Ms)

ภาพที่ 4 HPTLC โครมาโตแกรมของลูทีโอลิน (L_4) ผล (Mf_4) ใบ (Ml_4) และก้าน (Ms_4) หลังเกิดอนุพันธ์กับ NP/PEG



(Q) (Mf)

ภาพที่ 5 HPTLC โครมาโตแกรมของเควอซิติน (Q_5) และผล (Mf_5) หลังเกิดอนุพันธ์ NP/PEG

ภาพที่ 1-5 HPTLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานและเอกลักษณ์ HPTLC โครมาโตแกรม (HPTLC fingerprint profile) ของผล (Mf) ใบ (Ml) ก้าน (Ms) และราก (Mr) ส่องภายใต้แสงยูวีความยาวคลื่น 366 และ 254 นาโนเมตร

จากโครมาโทแกรมที่ได้พบว่า สารสกัดจากผลมี band ที่มีค่า R_f ตรงกับ band ของสารมาตรฐานลูทีโอลิน กรดแกลลิก เควอซิติน และคาเทชิน ดังภาพที่ 1-5 สารสกัดจากใบมี band ที่มีค่า R_f ตรงกับ band ของสารมาตรฐานลูทีโอลิน และรูติน สารสกัดจากก้านมี band ที่มีค่า R_f ตรงกับ band ของสารมาตรฐานลูทีโอลิน และคาเทชิน และสารสกัดจากรากมี band ที่มีค่า R_f ตรงกับ band ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก และคาเทชิน โดยการศึกษาการแยกสารองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารสกัดด้วยระบบตัวทำละลาย (Mobile phase) ที่เหมาะสมจากรายงานที่ผ่านมา (Jaiswal *et al*, 2013, pp. 49-54; Broszat, 2018, pp. 27-29; Varghese *et al*, 2013, pp. 122-126) สามารถแยกองค์ประกอบที่สนใจออกมาได้และปรากฏออกมาชัดเจน สำหรับสารมาตรฐานลูทีโอลิน กรดแกลลิก รูติน และเควอซิติน มีการฉีดพ่นสารเตรียมอนุพันธ์ (Derivatizing reagent) เพื่อยืนยันเอกลักษณ์ของสาร ดังแสดงตารางที่ 2 พบว่า band ของลูทีโอลิน รูติน และเควอซิติน สามารถเรืองแสงเป็นสีเหลืองส้มภายใต้แสงยูวีความยาวคลื่น 366 nm ทั้งนี้เนื่องจากหมู่ –OH (Hydroxyl group) และออกซิเจน (Carbonyl group) สามารถให้อิเล็กตรอนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนบวกของโลหะจาก derivatizing reagent ทำให้เกิดการเรืองแสงที่ชัดเจนยิ่งขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nile & Park (2014, pp. 97-103)

4. ประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของสารสกัดหยาบจากส่วนราก ก้าน ใบ และผลของต้นโคลงเคลง ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 3 สายพันธุ์ได้แก่ *S. aureus*, *B. cereus* และ *E. coli* ด้วยวิธี disc diffusion test พบว่าสารสกัดหยาบจากราก ก้าน และผลของพืชโคลงเคลงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิด *S. aureus* ได้เพียงสายพันธุ์เดียว มีผลการยับยั้งของสารสกัดจากส่วนรากเท่ากับ 18.00 มิลลิเมตร สารสกัดจากส่วนของก้านเท่ากับ 18.00 มิลลิเมตร และสารสกัดจากส่วนของผลเท่ากับ 18.00 มิลลิเมตร แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *B. cereus* ได้ โดยสารสกัดจากส่วนราก ก้าน ใบ และผล ของพืชโคลงเคลงให้ผลการยับยั้งเท่ากับแผ่นกระดาษกรองเท่ากับ 6.00 มิลลิเมตร ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดจากส่วนราก ก้าน ใบ และผลของพืชโคลงเคลง

ส่วนของพืช	เชื้อแบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลาง* (มิลลิเมตร)	วงใส (Clear zone)	ผลที่ได้
ผล	*Escherichia coli*	6.00 ± 0.00	ไม่เกิด	ไม่เกิดการยับยั้ง
	Bacillus cereus			
	Staphylococcus aureus	18.00 ± 1.02	เกิด	เกิดการยับยั้ง
ใบ	*Escherichia coli*	6.00 ± 0.00	ไม่เกิด	ไม่เกิดการยับยั้ง
	Bacillus cereus			
	Staphylococcus aureus			
ก้าน	*Escherichia coli*	6.00 ± 0.00	ไม่เกิด	ไม่เกิดการยับยั้ง
	Bacillus cereus			
	Staphylococcus aureus	18.00 ± 0.98	เกิด	เกิดการยับยั้ง
ราก	*Escherichia coli*	6.00 ± 0.00	ไม่เกิด	ไม่เกิดการยับยั้ง
	Bacillus cereus			
	Staphylococcus aureus	18.00 ± 1.32	เกิด	เกิดการยับยั้ง

* Mean ± SD (n=3)

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาการระบุสารสำคัญที่มีในสารสกัดส่วนต่าง ๆ ในต้นโคลงเคลงของงานวิจัยนี้ เริ่มต้นศึกษาพฤษเคมีโดยการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นกับน้ำยาตรวจสอบ หรือสารเคมีที่เกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับสารสำคัญประเภทแอนทราควิโนน เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และแทนนิน ผลปรากฏว่าพบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากทุกส่วนของต้นโคลงเคลง ซึ่งสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารกลุ่มที่พบมากในพืชทั้งในรูปของอะกลัยโคนและกลัยโคไซด์ ฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีขั้ว เนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซีหลายหมู่ในโครงสร้าง ทำให้สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว สำหรับงานวิจัยนี้ใช้ตัวทำละลายอะซิโตนซึ่งเป็นสารที่มีขั้ว จึงสามารถดึงสารประกอบประเภทนี้ออกจากทุกส่วนของพืชได้ ซึ่งผลการพบนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Giri & Rajbhandari (2018, pp. 18-25) ซึ่งสกัดสารพฤกษเคมีจากส่วนใบ ดอก และผลของโคลงเคลงด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วปานกลางถึงสูง ดังนี้ EtOAc MeOH และ 50%MeOH ปรากฏพบ ฟลาโวนอยด์ในทุกส่วน ในขณะเมื่อใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วหรือขั้วต่ำ ได้แก่ Hexane และ CH_2Cl_2 ไม่ปรากฏว่ามีสารประเภทนี้ในทุกส่วน อย่างไรก็ตามการหากลุ่มสารสำคัญในพืชด้วยเทคนิคทางเคมีเบื้องต้นนี้ยังมีข้อจำกัดคือไม่จำเพาะเจาะจงกับกลุ่มสารเคมีที่ต้องการ อาจเกิดผลบวกอำพราง (False-positive reaction) หรือผลลบอำพราง (False-negative reaction) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการระบุสารสำคัญด้วยเทคนิค HPTLC ซึ่งเป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นจากเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) เป็นวิธีการตรวจสอบที่สะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ โดยประเมินค่า R_f และสีเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิง ทั้งนี้เป็นเทคนิคที่มีการแยกสารและตรวจสอบสารไปพร้อม ๆ กัน ในการหาปริมาณของสารทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ คาเทชิน กรดแกลลิก รูติน ลูทีโอลิน และเควอซิติน ในสารสกัดส่วนผล ใบ ก้าน และรากของต้นโคลงเคลง จะใช้ระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่มีรายงานมาแล้ว พบว่าหลังจากพัฒนาแผ่นวิเคราะห์ สามารถแยกสารที่สนใจออกมามีค่า R_f และสีตรงกับสารมาตรฐานอ้างอิง ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่มีอยู่โดยการวัดความเข้มของแถบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการนำค่าพื้นที่ใต้กราฟ (Area) คำนวณหาปริมาณสารสำคัญโดยใช้กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของปริมาณสารมาตรฐานกับพื้นที่ใต้กราฟ การศึกษาครั้งนี้ค้นพบสารคาเทชิน (ส่วนผล ก้าน และราก) และลูทีโอลิน (ส่วนผล ใบ และก้าน) ในต้นโคลงเคลงเป็นครั้งแรก จากรายงานวิจัยที่ผ่านยังไม่มีการค้นพบ กรดแกลลิก และเควอซิติน ในส่วนผล และกรดแกลลิกในส่วนราก (Joffry *et al*., 2012, pp. 1-48) นอกจากนี้งานวิจัยนี้ค้นพบ รูติน ในส่วนใบซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Awang *et al.* (2016, pp. 153-157) สำหรับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารพบว่าสารสกัดจากส่วนของราก ก้าน และผลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เพียงชนิดเดียว คือ *S. aureus* ส่วนสารสกัดจากทุกส่วนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *B. cereus* และ *E. coli* ได้ จากผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Alnajar *et al*. (2012, pp. 3547-3559) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของโคลงเคลง ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิด *S. aureus* ได้ ทั้งนี้สารสกัดจากผล ก้าน และรากยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ หากมองความสัมพันธ์ด้านองค์ประกอบของสารสำคัญ ทั้งสามส่วนนี้พบว่ามีสารคาเทชิน ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้ (Miklasinska *et al*., 2016, p. 244)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นสารสำคัญจากพืชโคลงเคลงด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPTLC) เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ สามารถแยกสาระสำคัญจากส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ผล ใบ ก้าน และราก อีกทั้งสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยพบว่าส่วนผลมีปริมาณสารสำคัญมากที่สุด ได้แก่ คาเทชิน ร้อยละ 0.027 กรดแกลลิก ร้อยละ 0.034 ลูทีโอลิน ร้อยละ 0.017 และเควอซิติน ร้อยละ 0.020 ส่วนใบพบรูติน ร้อยละ 0.049 และลูทีโอลิน ร้อยละ 0.008 ส่วนก้านพบคาเทชิน ร้อยละ 0.011 และลูทีโอลิน ร้อยละ 0.044 และส่วนรากมีปริมาณสารคาเทชิน ร้อยละ 0.033 และกรดแกลลิก ร้อยละ 0.030 อีกทั้งยังพบว่าสารสกัดจากส่วนของผล ก้าน และราก สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 18.00 มิลลิเมตร จากผลการศึกษาปริมาณสารสำคัญในงานวิจัยนี้ทำให้เห็นว่าพืชโคลงเคลงมีความน่าสนใจอย่างมากในการนำมาแปรรูปให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่รับประทานได้ โดยเฉพาะกลุ่มชาสมุนไพร เนื่องจากมีปริมาณคาเทชินเป็นองค์ประกอบอยู่ทั้งส่วนผล ก้าน และราก โดยเฉพาะส่วนของผลมีองค์ประกอบของสารสำคัญหลายชนิด

เอกสารอ้างอิง

Alnajar, Z. A. A., Abdulla, M. A., Ali, H. M., Alshawsh, M. A., & Hadi, A. H. A. (2012). Acute toxicity evaluation, antibacterial, antioxidant and immunomodulatory effects of *Melastoma malabathricum*. *Molecules*, *17*(3), 3547-3559.

Awang, M. A., Aziz, R., Sarmidi, M. R., Abdullah, L., Yong, P., & Musa, N. (2016). Comparison of different solvents on the extraction of *Melastoma malabathricum* leaves using Soxhlet extraction method. *Der Pharmacia Lettre, 8*(17), 153-157.

Broszat, M., (2018), *HPTLC Fundamental: Qualitative and quantitative analysis of botanical* [Class handout]. Muttenz, SWITZERLAND: CAMAG.

Giri, D. & Rajbhandari, M. (2018). Phytochemical analysis and constituents of hexane extract of *Melastoma malabathricum* L. *Journal of Institute of Science and Technology*, *23*(1), pp. 18-25. doi: 10.3126/jist.v23i1.22150.

Hussain, S. Z., Maqbool, K., & Naseer, B. (2019). High performance thin layer chromatography: Principle, working and applications. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4*(3), 83-88.

Jaiswal, Y., Tatke, P., Gabhe, S., & Vaidya, A. (2013). Rapid high performance thin layer chromatographic method for quantitation of catechin from extracts of cashew leaves–a short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 63*(1), 49-53.

Joffry, S. M., Yob, N. J., Rofiee, M. S., Affandi, M. M. R., Suhaili, Z., Othman, F., et al. (2012). *Melastoma malabathricum* (L.) Smith ethnomedicinal uses, chemical constituents, and pharmacological properties: a review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012:258434, 1-48. doi: 10.1155/2012/258434

Kumar, V., Ahmed, D., Gupta, P. S., Anwar, F., & Mujeeb, M. (2013). Anti-diabetic, anti-oxidant and anti-hyperlipidemic activities of *Melastoma malabathricum* Linn. leaves in streptozotocin induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine, 13*(1), 1-19.

Miklasinska, M., Kepa, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., Dziedzic, A., & Wasik, T. J. (2016). Catechin hydrate augments the antibacterial action of selected antibiotics against Staphylococcus aureus clinical strains. *Molecules, 21*(2), 244.

Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). HPTLC densitometry method for simultaneous determination of flavonoids in selected medicinal plants. *Frontiers in Life Science, 8*(1), 97-103. doi: 10.1080/21553769.2014.969387

Varghese, S.,Narmadha, R., Gomathi, D., Kalaiselvi, M., & Devaki, K. (2013). Phytochemical screening and HPTLC finger printing analysis of *Citrullus lanatus* (Thunb.) seed. *Journal of Acute Disease, 2*(2), 122-126.

Yadav, M., Chatterji, S., Gupta, S. K., & Watal, G. (2014). Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6*(5), 539-542.

Zakaria, Z. A., Rofiee, M. S., Mohamed, A. M., Teh, L. K., & Salleh, M. Z. (2011). In vitro antiproliferative and antioxidant activities and total phenolic contents of the extracts of *Melastoma malabathricum* leaves. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies, 4*(4), 248-256.