การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรไทย เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพจากภูมิปัญญาท้องถิ่น

Study of antioxidant activity of Thai Medicinal Plants: To Developing a Healthy Product Based on the Local Wisdom

โดย

วรวัฒน์ พรหมเด่น

และ

อรุณรัศมี แสงศิลา

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

พ.ศ. 2560

เลขที่สัญญารับทุน xx /2560

(ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์)

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรไทย เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพจากภูมิปัญญาท้องถิ่น

Study of antioxidant activity of Thai Medicinal Plants: To Developing a Healthy Product Based on the Local Wisdom

โดย

วรวัฒน์ พรหมเด่น

และ

อรุณรัศมี แสงศิลา

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

พ.ศ. 2560

(ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์)

หัวข้อวิจัย การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรไทยเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพจากภูมิปัญญาท้องถิ่น

ผู้ดำเนินการวิจัย วรวัฒน์ พรหมเด่น และ อรุณรัศมี แสงศิลา

หน่วยงาน มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

ปีวิจัยสมบูรณ์ พ.ศ. 2560

เลขที่สัญญารับทุน xx/2560

บทคัดย่อ

สารสกัดสมุนไพรไทยด้วยเมทานอลจำนวน 7 ชนิด ได้นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH และวิธี ABTS ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีพบว่ามีสารสกัดสมุนไพรจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ใบมะม่วงหิมพานต์ แก่นฝาง และแก่นแสมสาร ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลและเอทิลอะซิเตตฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าหรือเทียบเท่า acorbic acid และ Trolox ซึ่งสารมาตรฐานทั้งสองค่า SC_{50} ต่อวิธี DPPH เป็น 6.47 ± 0.89 และ 7.77 ± 0.28 μg/ml ตามลำดับ และมีค่า SC_{50} ต่อวิธี ABTS เป็น 13.74 ± 0.03 และ 14.89 ± 0.89 μg/ml ตามลำดับ องค์ประกอบทางพฤกษเคมีบ่งชี้ว่าสารสกัดมีสารประกอบฟีนอลค่อนข้างสูงซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง จากผลการทดลองนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดพืชสมุนไพรสามารถพัฒนาประยุกต์

เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือ ผลิตภัณฑ์ยาต่อไปได้ ซึ่งต้องทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและความเป็นพิษระดับเซลล์เพิ่มเติม

คำสำคัญ : สารต้านอนุมูลอิสระ, วิธี DPPH, วิธี ABTS

Research : Study of antioxidant activity of Thai Medicinal Plants: To Developing a Healthy Product Based on the Local Wisdom

Researchers : Worrawat Promden and Arunrassamee Sangsila

Organization : Buriram Rajabhat University

Academic Year : 2017

No. 48/2557

ABSTRACT

Keywords : Antioxidant, DPPH, ABTS,

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....*(i)*

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....*(ii)*

สารบัญ.....*(iii)*

สารบัญรูปภาพ.....*(v)*

สารบัญตาราง.....*(vi)*

บทที่ 1

บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....2

1.4 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....2

บทที่ 2

ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 อนุมูลอิสระ.....3

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ.....4

2.3 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ.....6

2.4 ข้อมูลพื้นฐานของสมุนไพรไทยที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....11

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย.....28

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....28

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย.....34

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานและแผนการดำเนินงาน.....45

บทที่ 4

ผลการวิจัย..... 46

4.1 ผลการสกัดสารสมุนไพรด้วยวิธี maceration ในตัวทำละลายเมทานอล.....46

4.2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....48

4.3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS.....48

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....52

เอกสารอ้างอิง.....55

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ลักษณะทั่วไปของอนุมูลอิสระ.....4

ภาพที่ 2.2 ลักษณะสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ.....5

ภาพที่ 3.1 กราฟระหว่างความเข้มข้นและค่า scavenging effect (%).....38

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แสดงตัวอย่างวิธีการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ.....10

ตารางที่ 3.1 รายการวัตถุดิบสมุนไพรแห้ง.....27

ตารางที่ 3.2 แสดงภาพถ่ายของวัตถุดิบสมุนไพรแห้งที่นำมาสกัด.....28

ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างตารางบันทึกผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH.....36

ตารางที่ 3.4 ตัวอย่างตารางบันทึกผลการคำนวณค่า scavenging effect (%).....37

ตารางที่ 4.1 แสดงร้อยละของปริมาณสารสกัดที่สามารถสกัดได้จากสมุนไพรแห้ง.....46

ตารางที่ 4.2 ค่าความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสมุนไพร ด้วยวิธี DPPH และ ABTS.....50

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันคนส่วนใหญ่ต้องเผชิญกับความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งเป็นภาวะความไม่สมดุลระหว่างการเกิดและการป้องกันอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระเกิดขึ้นภายในเซลล์ร่างกายมาก ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระหรือ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ (unpaired electron) ทำให้อนุมูลอิสระมีความไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบๆ โดยดึงหรือให้อิเล็กตรอนโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้เกิดความเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ อนุมูลอิสระจึงมีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย ไขมัน โปรตีนและกรดนิวคลีอิก นำไปสู่การตายหรือการกลายพันธุ์ของเซลล์ อนุมูลอิสระต่างๆ เกิดขึ้นได้จากกระบวนการการเผาผลาญในร่างกาย การหายใจระดับเซลล์ รวมทั้งมลภาวะต่างๆ ที่อยู่รอบตัวเรา เช่น ควันบุหรี่ สุรา ก๊าซจากท่อไอเสียรถยนต์ รวมถึงความเครียด โดยปกติแล้วร่างกายของเราจะมีกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งร่างกายสามารถสร้างขึ้นเองได้ แต่เมื่ออายุมากขึ้นความเครียดและวิถีชีวิตในปัจจุบัน ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระลดลง ไม่เพียงพอต่อการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในแต่ละวัน แต่หากร่างกายได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติโดยส่วนใหญ่พบได้ในพืชผัก ผลไม้และสมุนไพร ที่มีสารประเภทฟีนอล (Phenolic compound) เป็นองค์ประกอบ มีฤทธิ์

ในการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นการบริโภคผักผลไม้หรืออาหารที่มีสารประกอบฟีนอลอาจช่วยให้ร่างกายสามารถต้านอนุมูลอิสระและช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการเป็นโรคต่างๆ ได้

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรเหล่านี้จะเป็นองค์ความรู้เบื้องต้นเพื่ออธิบายหรือทำนายกลไกการรักษาโรคและเมื่อผนวกกับความรู้ทางด้านพฤกษเคมีที่มีอยู่ในพืชชนิดนั้นๆ จะทำให้สามารถต่อยอดไปสู่การวิจัยเชิงลึกของสารประกอบชนิดนั้นๆ ได้ พืชสมุนไพรไทย 4 ชนิดที่ถูกคัดเลือกเพื่อนำมาศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้คัดเลือกจากความหาได้ง่ายและสะดวกในการใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการทดลองซ้ำ และมีการใช้เป็นสมุนไพรในตำรับยาพื้นบ้านเป็นที่รู้จักอย่างกว้างขวาง การนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้มีแนวโน้มไปสู่การพัฒนาประยุกต์ไปสู่การพัฒนาเป็นสารสกัดสมุนไพรที่มีคุณภาพเพื่อการบรรเทาโรค ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว เป็นต้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของของสารสกัดพืชสมุนไพร
2. เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดสมุนไพร

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ศึกษาปริมาณสารพฤกษเคมี ได้แก่ phonolic compounds และ flavonoids จากสารสกัดของพืชสมุนไพรในท้องถิ่น 7 ชนิด คือ

<u>ตัวแปรที่ศึกษา</u>

1) ตัวแปรอิสระ คือ ชนิดพืชสมุนไพร ชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัด
2) ตัวแปรตาม คือ ปริมาณ phonolic compounds

2. ศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัด ด้วยวิธี DPPH และ ABTS

<u>ตัวแปรที่ศึกษา</u>

1) ตัวแปรอิสระ คือ ชนิดพืชสมุนไพร ชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัด
2) ตัวแปรตาม คือ ค่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ

1.4 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

พืชสมุนไพรมีทั้งที่เป็นทั้งพืชอาหารและสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสารพฤกษเคมีกลุ่ม phenolic compound ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาสาระสำคัญและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จะได้ข้อมูลพื้นฐานของพืชสมุนไพร เป็นการเพิ่มมูลค่าพืชเกษตรและสร้างความมั่นคงทางอาหาร เพื่อนำไปต่อยอดงานวิจัยในอนาคตได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ (unpaired electron) อย่างน้อย 1 ตัวโคจรรอบวงนอกสุด อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก ทำให้อนุมูลอิสระไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบๆ โดยดึงหรือให้อิเล็กตรอนโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction)

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระแบ่งได้ 2 ประเภท ดังนี้

1. อนุมูลอิสระที่เกิดปัจจัยภายในร่างกาย ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเอง เช่น การหายใจ ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการฆ่าเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาว

2. อนุมูลอิสระที่เกิดจากปัจจัยภายนอกร่างกาย ได้แก่ แสงแดด รังสีUV ควันจากท่อไอเสีย มลพิษในอากาศ ฝุ่น ควันบุหรี่ แอลกอฮอล์ การใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผสมสารเคมีต่างๆ สารเคมีปรุงแต่งในอาหาร อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว อาหารที่ผ่านกรรมวิธีที่ใช้ความร้อนสูง ยารักษาโรค เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) หรืออาจเรียกว่า สารกำจัดอนุมูลอิสระ คือโมเลกุลของสารที่สามารถจับกับตัวรับและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอื่นๆได้ ปฏิกิริยา

ออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาเคมี ที่เกี่ยวเนื่องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังตัวออกซิไดซ์ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถให้ผลิตภัณฑ์แก่สารอนุมูลอิสระ (free radical)

โดยปกติร่างกายของเราจะมีการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ โดยมีการสร้างเอนไซม์เพื่อควบคุมปริมาณสารอนุมูลอิสระเพื่อให้เกิดสภาวะสมดุล แต่หากมีอายุมากขึ้นกระบวนการสร้างเอนไซม์เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระลดลง ทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเกิดความไม่สมดุล ดังนั้นร่างกายจึงจำเป็นต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากการรับประทานเข้าไป เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน รวมถึงสารประกอบพอลิฟีนอล ที่พบได้ในพืชผัก ผลไม้ และสมุนไพร เป็นต้น

ระบบสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จะมีอยู่ 2 ระบบ คือ

1. ระบบต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) โดยให้ Enzyme เป็น Enzyme ที่มีในการทำลาย Free radical (อนุมูลอิสระ)ในร่างกาย ได้แก่

- เอ็นไซม์ Superoxide dismustase (SOD)
- เอ็นไซม์แคททะเลส (Catalase)
- เอ็นไซม์กลูทาโธโอน เพอร์ออกไซด์ (Glutathione peroxide or GSH.Px)

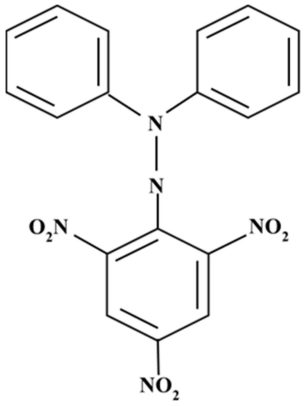
2. ระบบต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) โดยไม่ใช้ Enzyme ได้แก่

- วิตามินอี (Tocopherol)
- วิตามินซี (Ascorbic Acid)
- เบต้าแคโรทีน (Beta carotee)
- สารเคมีกันหืนต่างๆ เช่น BHT และ BHA
- ผลิตภัณฑ์ยาบางชนิด
- สารพฤกษเคมี (Phytonutrients)

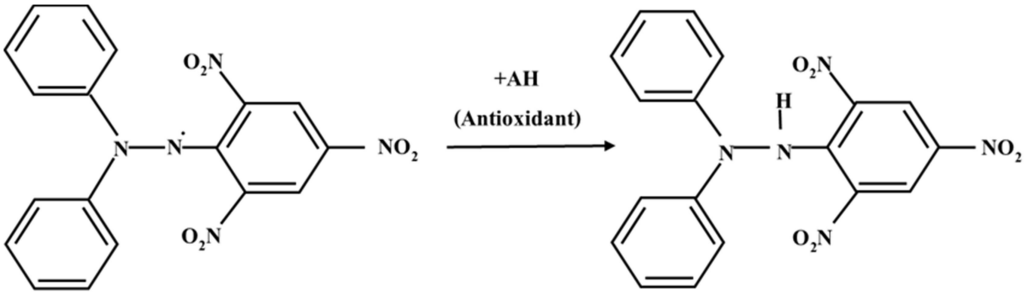
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity determination)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

DPPH assay ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่มีความเสถียรโดยการเตรียม DPPH ละลายในเมทานอล ได้สารละลายมีสีม่วงที่มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm และก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารที่ให้อิเล็กตรอน จะทำให้สารละลายสีม่วงจางลงเป็นสีเหลือง และก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical)



ภาพที่ 2 สมการ DPPH เกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH)

หากตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ซึ่งจะการคำนวณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระคำนวณโดยใช้สูตร

Scavenging effect (%) = [(A0 – A1)/A0] × 100 เมื่อกำหนดให้

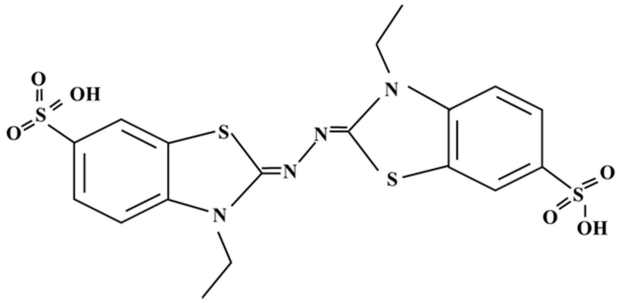
A0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงการทดลองชุดควบคุม

A1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงการทดลองชุดทดลองด้วยสารสกัด

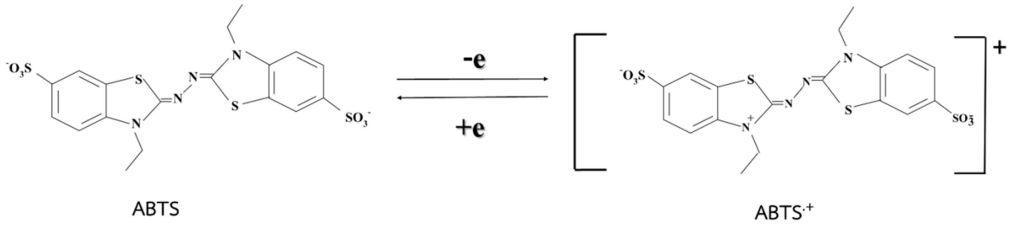
รายงานผลด้วยค่า SC50 (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50) โดยใช้กราฟของร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) กับค่าความเข้มข้นของสารสกัดสร้างสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นเพื่อเทียบกลับเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้มีการกำจัดอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

ABTS assay เป็นการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant capacity) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุมูลอิสระ ABTS•+ โดยการเตรียมสารละลาย ABTS ผสมกับสารละลาย potassium persulfate โดยสารละลายนี้จะมีสีเขียวปนน้ำเงิน และเมื่อเติมสารละลาย ABTS ลงในสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารที่ให้อิเล็กตรอน จะทำให้สารละลายสีเขียวปนน้ำเงินจางลง โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm และก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ 12-16 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา (อ้างอิง)



ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างของ ABTS (2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))



ภาพที่ 4 สมการ ABTS เกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH)

หากตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีเขียวก็จะลดลง ซึ่งจะการคำนวณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระคำนวณโดยใช้สูตร

Scavenging effect (%) = [(A0 – A1)/A0] × 100 เมื่อกำหนดให้

A0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงการทดลองชุดควบคุม

A1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงการทดลองชุดทดลองด้วยสารสกัด

รายงานผลด้วยค่า SC50 (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50) โดยใช้กราฟของร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) กับค่าความเข้มข้นของสารสกัด

สร้างสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นเพื่อเทียบกลับเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้มีการกำจัดอนุมูลอิสระ

ที่ร้อยละ 50

รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพรไทย

ใบของต้นราชพฤกษ์ (*Cassia fistula*) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล อะซิโตน และเอทิลอะซิเตต วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระถูกวัดโดยวิธี 1, 1-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่า สารสกัดจากใบราชพฤกษ์ ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล อะซิโตนและเอทิลอะซิเตต มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC50 เท่ากับ 2.49 ± 0.01, 2.41 ± 0.02, 3.06 ± 0.04, และ 2.74 ± 0.02 µg/mL ตามลำดับ และวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านมะเร็งและวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลรวม ฟลาโวนอยด์ quercimeritrin , scutellarein , และ rutin สารสกัดจากราชพฤกษ์ มีสารสารพฤกษเคมีที่สำคัญต่อการต้านจุลชีพบางชนิดที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Ahmed et al, 2016)

เมล็ดของมะขาม (*Tamarindus indica*) ที่สกัดด้วยทำละลายน้ำกลั่น วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระถูกวัดโดยวิธี 1, 1-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่า สารสกัดจากเมล็ดมะขาม มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ มีค่า เท่ากับ 4.65 ± 0.88 mg/mL และวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ฟลาโวนอยด์ และเทนนิน มีค่า เท่ากับ 6.84 ± 0.21, 4.64 ± 0.03 และ 0.24 ± 0.01 mg/mL ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดมะขามมีสารประกอบฟีนอลและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (S. Natukunda et al,2015)

ใบชมพู่มะเหมี่ยว (*Syzygium Malaccense*) สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีวิธี (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) DPPH พบว่า สารสกัดใบชมพู่มะเหมี่ยวที่สกัดด้วยเมทานอล ที่ความเข้มข้น 100 ug/ml มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยมี

เปอร์เซ็นการยับยั้ง เท่ากับ 78.73% และมีค่า IC50 เท่ากับ 25.74 ug/ml แสดงให้เห็นว่า ใบชมพู่ม่าเหมี่ยวที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Savita et al, 2011)

ฝักของพืชสกุลกระถิน (*Acacia shaffneri*) และ (*Acacia farnesiana*) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน (80:20) วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ [2,2-azino- bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid)] $ABTS^{\cdot+}$ พบว่าสารสกัดของพืชสกุลกระถิ่น *A. shaffneri* และ *A. farnesiana* มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 94.77 ± 0.36 และ 95.18 ± 0.26 mg/mL ตามลำดับ และวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS โดยมีค่า IC50 เท่ากับ 10.85 ± 0.08 และ 10.47b ± 0.36 mg/mL ตามลำดับ (Delgadillo Puga et al, 2015)

เปลือกกระถินณรงค์ (*Acacia auriculiformis*) สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทโดยวิธีการหมัก (maceration) วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine) DPPH, Reducing power assay, Lipid peroxidation by thiobarbituric acid assay, Chelating effects on ferrous ions และ Deoxyribose degradation assay พบว่าสารสกัดจากเปลือกกระถินณรงค์ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 71.2%, 73.66%, 83.37%, 75.63% และ 72.92% ตามลำดับ (Singh et al, 2007)

ใบอ้อยช้าง (*Lannea coromandelica*) ที่สกัดด้วยเมทานอล เอทิลอะซิเตตและน้ำ สารสกัดที่ได้ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ (0-100 µg/mL) วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH) พบว่าสารสกัดใบอ้อยที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์ต้านอนุมูลมากที่สุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ 63.9 ± 0.64 ug/ml และรองลงมาคือ ใบอ้อยช้างที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำ มีค่า EC_{50} เท่ากับ 86.5 ± 0.78 และ ± ND ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ยังมีค่าน้อยกว่าสารมาตรฐาน BHT ที่มีค่า EC50 เท่ากับ 46.4 ± 0.23 ug/ml แต่

อย่างไรก็ตามสารสกัดใบอ้อยช้างที่สกัดด้วยทั้งสามตัวทำละลาย ยังมีค่าน้อยกว่าสารมาตรฐาน BHT ที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 46.4 ± 0.23 ug/ml (T. Kumar and V. Jain, 2015)

ดอกอัญชัน (*Clitoria ternatea*) สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) และ ferric reducing antioxidant power assays (FRAP) ทำการทดสอบในหนู พบว่า สารสกัดจากดอกอัญชัน มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC50 เท่ากับ 84.15 ± 1.50 µg/mL และมีความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนของเหล็ก มีค่าเท่ากับ 0.33±0.01 mmol/mg (Iamsaard et al, 2014)

ดอกและใบของ กระถินณรงค์ (*Acacia auriculiformis*) ชงโคแดง (*Bauhinia kockiana*) ชงโค (*Bauhinia purpurea*) หางนกยูงไทย (*Caesalpinia pulcherrima*) พู่ชมพู (*Calliandra tergemina*) ทรงบาดาล (*Cassia surattensis*) กระถิน (*Leucaena leucocephala*) นนทรี (*Peltophorum pterocarpum*), และจามจุรี (*Samanea saman*) ทั้ง 9 ชนิด อยู่ในพืชวงศ์ Fabaceae สกัดด้วยเมทานอล 75% วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่า สารสกัดจากดอกชงโคแดง มีประมาณสารประกอบฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 8280 ± 498 mg GAE/100 g และ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 27.0 ± 5.0 และ 50.0 ± 5.0 µg / mL ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดจากใบหางนกยูงไทย มีประมาณสารประกอบฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีค่าเท่ากับ 5030 ± 602 mgGAE/100 g และ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 50.0 ± 5.0 µg/mL ตามลำดับ (Chew et al, 2011)

ส่วนต่างๆ ของหม่อน (*Morus alba*) อยู่ในพืชวงศ์ Moraceae ได้แก่ ใบ (TL) ผล (TF) เปลือกลำต้น (TSB) และเปลือกราก (TRB) ที่สกัดด้วยตัวทำลายเมทานอล วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและสารต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-

1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, hydroxyl radical scavenging assay, ferrous reducing antioxidant capacity และ lipid peroxidation inhibition assay ในสารสกัดของ TSB มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดตามด้วย TRB TF และ TL เมื่อวัดโดยวิธี DPPH และ hydroxyl radical scavenging activity สารสกัดจาก TSB มีประสิทธิภาพมากที่สุดโดยมีค่า IC_{50} 37.75 และ 58.90 µg/mL ตามลำดับ สารสกัดจาก TSB มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation มากที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เป็น 145.31 µg/ml นอกจากนี้ความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนของเหล็กได้ตามลำดับดังนี้ TSB> TRB> TL> TF พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ของ TSB สูงกว่าสารสกัดอื่น ๆ (Khan et al, 2013)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. Microplate Reader Spectrophotometer UV/VIS
3. Microplate Reader Spectrophotometer Fluorescent
4. 96-wells plate
5. Pipette 2, 10,20, 100, 200, 1000 µl
6. Multi-Chanel pipette 20 µl

3.1.2 สารเคมี

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, USA)
2. ABTS (2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))
3. Trolox
4. Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, USA)
5. Methanol
6. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
7. Ethylacetate

8. Hexane

ที่	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ส่วนที่นำมาใช้	ชื่อไทย
1	1AO-YL	*Anacardium occidentale*	ANACARDIACEAE	ใบอ่อน	มะม่วงหิมพานต์
	1AO-ML			ใบแก่	
2	9CS	*Caesalpinia sappan*	FABACEAE	แก่น	ฝาง

ตารางที่ 3.1 สมุนไพรที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

3	13SG	*Syzygium gratum*	MYTACEAE	ใบ	เสม็ดแดง
4	18AA	*Acacia auriculiformis*	FABACEAE	ใบ	กระถินณรงค์
5	25BM	*Butea monosperma*	FABACEAE	ดอก	ทองกวาว
6	26AB	*Averrhoa bilimbi*	OXALIDACEAE	ใบ	ตะลิงปลิง
7	28SG	*Senna garrettiana*	FABACEAE	แก่น	แสมสาร

ตารางที่ 3.2 แสดงภาพถ่ายของวัตถุดิบสมุนไพรแห้งที่นำมาสกัด

รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์/ส่วนที่นำมาใช้
YL-1AO	 *Anacardium occidentale* ใบอ่อนมะม่วงหิมพานต์
ML-1AO	 *Anacardium occidentale* ใบแก่มะม่วงหิมพานต์
9CS	 *Caesalpinia sappan* แก่นฝาง
13SG	

	Syzygium gratum ใบเสม็ดแดง
รหัส	**ชื่อวิทยาศาสตร์/ส่วนที่นำมาใช้**
18AA	 *Acacia auriculiformis* ใบกระถินณรงค์
25BM	 *Butea monosperma* ดอกทองกวาว
26AB	 *Averrhoa bilimbi* *ใบตะลิงปลิง*

28SG	 *Senna garrettiana* แก่นแสมสาร

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

นำสมุนไพรทั้ง 7 ชนิด มาล้างนำให้สะอาด และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C อบเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียด

การเตรียมสารสกัด

นำสมุนไพรที่บดละเอียด 5 กรัม นำไปแช่ลงในตัวทำละลาย Heaxane ที่ปิดสนิทด้วย Aluminium foil เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยออก (ทำการสกัด 2 ซ้ำ) นำกากที่เหลือสกัดด้วยตัวทำละลาย Ethyl Acetate และ Methanol ด้วยกระบวนการข้างต้น แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาร้อยละของสารสกัด เก็บสารสกัดในภาชนะปิดสนิท ป้องกันแสง เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาสเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ดัดแปลงจาก (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995)

1. เติมสารละลายสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ เช่น 1000, 500, 250, 125, μg/mL จำนวน 10 μL ลงใน 96-well microplate (การทดลองชุดควบคุมคือ ตัวทำละลาย DMSO และกลุ่มควบคุมบวกของสารมาตรฐานคือ สารละลายกรดแอสคอร์บิกใน DMSO ความเข้มข้น 500 -125 μg/mL และสารละลาย Trolox ใน DMSO ความเข้มข้น 400-25 μg/mL)

2. เติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 100 μM ในตัวทำละลายเมทานอล โดยปิเปตลงใน 96-well microplate ช่องละ 190 μL

3. ปิดฝาและบ่ม microplate ไว้ที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 30 นาที

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

5. คำนวณค่า Scavenging effect จากสูตรต่อไปนี้

Scavenging effect (%) = $(A_0 - A_1) / A_0]$

เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของการทดลองกลุ่มทดสอบ

6. คำนวณค่า SC_{50} (ความเข้มข้นที่ทำให้มีค่า Scavenging effect 50%) โดยการวาดกราฟของความเข้มข้นกับค่า Scavenging effect (%) แล้วลากเส้นหาจุดที่มีค่า Scavenging effect เป็น 50 % (ทั้งนี้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบให้คำนวณจากปริมาตรสุทธิของปฏิกิริยาคือ 200 μL)

ตัวอย่างขั้นตอนการวัดผลและการคำนวณค่า % SC_{50}

1. เตรียมปฏิกิริยาใน 96 wells plate ในแต่ละช่องประกอบด้วย สารสกัดความเข้มข้นต่างๆ 5 μL และ สารละลาย DPPH 195 μL ภายหลังการบ่มที่ 37 ºC เป็นเวลา 30 นาที นำไปอ่านค่าในเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 515 nm

ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างตารางบันทึกผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH แสดงข้อมูลการทำซ้ำ 3 ครั้ง และ Blank

ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 515 nm	ความเข้มข้นสารสกัด A μg/mL					
	25	12.5	6.25	3.13	1.56	Blank
ซ้ำครั้งที่ 1	0.059	0.131	0.31	0.394	0.458	0.48
ซ้ำครั้งที่ 2	0.068	0.124	0.285	0.377	0.462	0.634
ซ้ำครั้งที่ 3	0.0635	0.119	0.291	0.3925	0.463	0.557
					ค่าเฉลี่ยของ Blank =	0.557

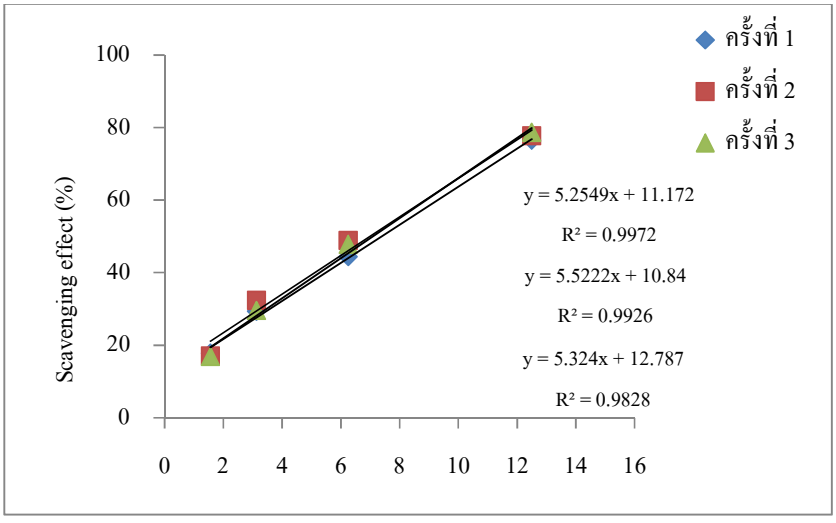
2. คำนวน Scavenging effect (%) ในทุกๆ การทดลองที่อ่านค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยสูตร

$$\text{Scavenging effect (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0]$$

ตารางที่ 3.4 ตัวอย่างตารางบันทึกผลการคำนวณค่า scavenging effect (%) โดยใช้ข้อมูลดิบในตารางที่ 3.3

Scavenging effect (%)	ความเข้มข้นสารสกัด A μg/mL				
	25.00	12.50	6.25	3.13	1.56
ซ้ำครั้งที่ 1	89.41	76.48	44.34	29.26	17.77
ซ้ำครั้งที่ 2	87.79	77.74	48.83	32.32	17.06
ซ้ำครั้งที่ 3	88.6	78.64	47.76	29.53	16.88

3. คำนวณค่า SC_{50} โดยการวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นและค่า scavenging effect (%)



ภาพที่ 3.1 กราฟระหว่างความเข้มข้นและค่า scavenging effect (%) แสดงสมการเส้นตรงและค่าสหสัมพันธ์ ของการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อใช้ในการคำนวณค่า SC_{50}

ลากเส้นแนวโน้มและสร้างสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น เมื่อแทนค่า y เป็น 50% จะสามารถคำนวณหาค่า x ได้ ซึ่งจะเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ scavenging effect 50% (SC_{50})

ในกรณีนี้จะได้

ซ้ำครั้งที่ 1 y = 7.39 μg/mL

ซ้ำครั้งที่ 2 y = 7.09 μg/mL

ซ้ำครั้งที่ 3 y = 6.99 μg/mL

4. ทำการหาค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ครั้ง จะได้ค่าเฉลี่ยของ SC_{50} ของสารสกัด A เป็น 7.16 ± 0.21 μg/mL

การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

เตรียมสารละลาย ABTS ให้มีความเข้มข้น 7 mM โดยชั่ง ABTS 5 mg ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1000 µl เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย 100 mM $K_2S_2O_8$ ปริมาตร 100 µl เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยทิ้งไว้โดยให้ทำปฏิกิริยากันในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 – 18 ชั่วโมง จะได้สารละลายสีเขียวแกมน้ำเงินเข้มของอนุมูล $ABTS^{\cdot+}$ ก่อนนำมาใช้ทำการเจือจางด้วยสารละลาย 50% ethanol โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.7 ± 0.02

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีขั้นตอนดังนี้

1. เติมสารละลายสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ เช่น 1000, 500, 250, 125, μg/mL จำนวน 10 μL ลงใน 96-well microplate (การทดลองชุดควบคุมคือ ตัวทำละลาย DMSO และกลุ่มควบคุมบวกของสารมาตรฐานคือ สารละลายกรดแอสคอร์บิกใน DMSO ความเข้มข้น 500 -125 μg/mL และสารละลาย Trolox ใน DMSO ความเข้มข้น 400-25 μg/mL)

2. เติมสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ โดยปิเปตลงใน 96-well microplate ช่องละ 190 μL

3. ปิดฝาและบ่ม microplate ไว้ที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 6 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการยับยั้งและคำนวณฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดังสมการ

$$\text{Scavenging effect (\%)} = [(A0 - A1)/A0] \times 100$$

A0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงการทดลองชุดควบคุม

A1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงการทดลองชุดทดลองด้วยสารสกัด

5. คำนวณค่า SC_{50} (ความเข้มข้นที่ทำให้มีค่า Scavenging effect 50%) โดยการวาดกราฟของความเข้มข้นกับค่า Scavenging effect (%) แล้วลากเส้นหาจุดที่มีค่า Scavenging effect เป็น 50 % (ทั้งนี้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบให้คำนวณจากปริมาตรสุทธิของปฏิกิริยาคือ 200 μL) เช่นเดียวกับวิธี DPPH ที่กล่าวแล้วข้างต้น

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

นำตัวอย่าง 10 μL ทำปฏิกิริยาบนจานหลุมกับสารละลาย 10% Folin-Ciocalteau ปริมาตร 100 μL และเติมสารละลาย 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 90 μL บ่มไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของ

สารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) ความเข้มข้นระหว่าง 0-100 μg/mL รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในหน่วย mg GAE / 1 g Extract

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานและแผนการดำเนินงาน

กิจกรรม	ปี พ.ศ. 2559			ปี พ.ศ.2560								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. ศึกษาเอกสารบทความวิจัย	↔											
2. เตรียมสารเคมีและอุปกรณ์	↔											
3. เริ่มการทดลองปฏิบัติการ			↔	↔	↔	↔	↔					
4. วิเคราะห์ข้อมูล								↔	↔	↔		
5. สรุปผลการทดลอง และเขียนรายงาน									↔	↔	↔	
6. นำเสนอผลงานวิชาการ									↔	↔	↔	
7. ส่งรายงาน												↔

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดสารสมุนไพรด้วยวิธี maceration ในตัวทำละลายต่างๆ

จากสมุนไพรอบแห้งนำมาสกัดด้วยวิธี maceration ในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ภายหลังการระเหยเอาตัวทำละลายออก ได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) ได้ผลดังตารางที่ 4.1 ผลการสกัดสารสมุนไพรทั้ง 7 ชนิด ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนพบว่าได้ yield ร้อยละ 0-4.7 ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตได้ yield ร้อยละ 0.6-3.5 และตัวทำละลายเมทานอล ได้ yield ร้อยละ 2-18 อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการสกัดจะขึ้นอยู่กับปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ จำนวนครั้งของการสกัด ความละเอียดของวัตถุดิบสมุนไพรที่ป่นเป็นชิ้นเล็กๆ และระยะเวลาในการบ่มตัวทำละลายกับตัวอย่างสมุนไพร ในการทดลองครั้งนี้เลือกใช้เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอลเป็นตัวทำละลายเนื่องจากทั้งสามชนิดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ ปานกลาง และสูง ตามลำดับ จะทำให้ได้สารสกัดที่ได้ในแต่ละส่วนเป็นโมเลกุลที่มีขั้วแตกต่างกันซึ่งหมายถึงเป็นสารต่างชนิดกัน อย่างไรก็ตามสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซนจะเป็นสารกลุ่มที่ไม่มีขั้ว ซึ่งจะไม่เหมาะสมนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี ABTS ได้ เนื่องจากระบบที่ใช้วิเคราะห์เป็นระบบที่ใช้ตัวทำละลายมีขั้ว

ตารางที่ 4.1 แสดงร้อยละของปริมาณสารสกัดที่สามารถสกัดได้จากสมุนไพรแห้ง

ลำดับที่	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	น้ำหนักสมุนไพรอบแห้งเริ่มต้น (g)	น้ำหนักของสารสกัดที่สกัดได้ (g)			ร้อยละของสารสกัดที่ได้ (% yield)		
				H	Et	M	H	Et	M
1	1AO-YL	*Anacardium occidentale*	22.2	0	0.16	3.15	-	0.72	14.19
	1AO-ML	*Anacardium occidentale*	23.89	0	0.34	1.52	-	1.42	6.36
2	9CS	*Caesalpinia sappan*	5.00	0.04	0.09	0.31	0.80	1.80	6.20
3	13SG	*Syzygium gratum*	5.07	0.09	0.17	0.10	1.78	3.35	1.97
4	18AA	*Acacia auriculiformis*	5.04	0.11	0.07	0.95	2.18	1.39	18.85
5	25BM	*Butea monosperma*	5.00	0.04	0.03	0.65	0.80	0.60	13.00
6	26AB	*Averrhoa bilimbi*	1.70	0.08	0.06	0.23	4.71	3.53	13.53
7	28SG	*Senna garrettiana*	5.00	0.03	0.03	0.28	0.60	0.60	5.60

* H ; Hexane

* Et ; Ethyl acetate

* M ; Methaol

4.2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เทคนิคการวิเคราะห์การฟอกจางสี DPPH เป็นวิธีที่อาศัยหลักการ ET–base assay เพื่อการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืช ทั้งนี้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดจากพืชจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุล $DPPH^{\bullet}$ ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระชนิดไนโตรเจนที่เดิมมีคุณสมบัติการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชันหรือได้รับอิเล็กตรอนจะมีการ

เปลี่ยนสีจากสีม่วงกลายเป็นสีเหลืองทำให้คุณสมบัติการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ลดลง การฟอกจางสีได้มากยิ่งแสดงคุณสมบัติของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี ซึ่งนิยมรายงานผลในค่าของ SC_{50} ซึ่งหมายถึงค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้โมเลกุลของ $DPPH^{\cdot}$ ในปฏิกิริยาถูกกำจัดไป 50% ดังนั้นค่า SC_{50} ที่มีตัวเลขน้อยจึงแสดงถึงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้สูง

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสมุนไพร 7 ชนิด ที่สกัดด้วยวิธี maceration โดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต และเมทานอล ได้แสดงค่า SC_{50} ดังตารางที่ 4.2 สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวธี DPPH สูงที่สุดคือสารสกัดเมทานอลของ**แก่นฝาง (9CS)** ซึ่งมีค่า SC_{50} เป็น 0.74**±0.01** μg/ml สารสกัดเมทานอลของใบอ่อนและใบแก่มะม่วงหิมพานต์ (1AO-YL และ 1AO-ML) ใบเสม็ดแดง (13SG), ใบกระถินณรงค์ (18AA) และแก่นแสมสาร (28SG) มีค่า SC_{50} ประมาณ 7-9 μg/ml ในขณะที่ค่า SC_{50} ของสารสกัดเอทิลอะซิเตตพบว่ามีค่าต่ำลงกว่าสารสกัดเมทานอลยกเว้น**แก่นฝาง (9CS)** และแสมสารที่มีค่า SC_{50} เป็น 6.63±0.61 และ 3.16±2.49 μg/ml ตามลำดับ ค่า SC_{50} ของกลุ่มทดสอบผลบวกคือ ascorbic acid (วิตามินซี) และ Trolox มีค่า 6.47 ± 0.89 และ 7.77 ± 0.28 μg/ml ตามลำดับ

4.3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

การศึกษาการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้สาร 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) เป็นการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบหนึ่งที่อาศัยหลักการ ET–base assay โดยติดตามการยับยั้งอนุมูล $ABTS^{\cdot+}$ ที่สังเคราะห์ขึ้นจากการการทำปฏิกิริยาของ ABTS และ $K_2S_2O_8$ ซึ่งมีสีเขียวแกมน้ำเงิน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ อนุมูล $ABTS^{\cdot+}$ จะถูกรีดิวซ์กลับไปเป็น ABTS ที่ไม่มีสีดังเดิม สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสมุนไพร 7 ชนิด ที่

สกัดด้วยวิธี maceration โดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต และเมทานอล ได้แสดงค่า SC_{50} ดังตารางที่ 4.2 สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวธี ABTS สูงสุดพบสารสกัดเมทานอลและสารสกัดเอทิลอะซิเตตของแก่นแสมสาร (28SG) มีค่า SC_{50} 3.43±0.51 และ 11.56±1.06 μg/ml ตามลำดับ และตามด้วย สารสกัดเมทานอลของใบอ่อนและใบแก่มะม่วงหิมพานต์ (1AO-YL และ 1AO-ML) มีค่า SC_{50} 9.63±1.94 และ 12.62±2.98 μg/ml ตามลำดับ ซึ่งมีค่า SC_{50} ต่ำกว่า ของ

			ค่าเฉลี่ย SC_{50} (μg/ml)

กลุ่มทดสอบผลบวกคือ ascorbic acid (วิตามินซี) และ Trolox ซึ่งมีค่า 13.74 ± 0.03 และ 14.89

รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	DPPH		ABTS	
			Methanol	Ethyl acetate	Methanol	Ethyl acetate
1AO-YL	*Anacardium occidentale*	ANACARDIACEAE	7.71 ± 0.13	17.19 ± 1.15	9.63 ± 1.94	33.15 ± 2.79
1AO-ML			9.07± 0.21	92.45 ± 5.44	12.62 ± 2.98	29.09 ± 1.45
9CS	*Caesalpinia sappan*	FABACEAE	0.744 ± 0.01	6.63 ± 0.61	20.22 ± 2.04	24.38 ± 1.88
13SG	*Syzygium gratum*	MYTACEAE	9.21 ± 0.14	132.68 ± 10.25	48.16 ± 2.94	81.67 ± 5.84
18AA	*Acacia auriculiformis*	FABACEAE	9.58 ± 0.26	46.23 ± 1.36	33.12 ± 1.82	132.57 ± 7.17
25BM	*Butea monosperma*	FABACEAE	76.57 ± 2.91	29.81 ± 0.10	86.08 ± 8.32	52.31 ± 1.30
26AB	*Averrhoa bilimbi*	OXALIDACEAE	63.57 ± 3.65	39.71 ± 1.58	77.46 ± 9.52	49.28 ± 4.24
28SG	*Senna garrettiana*	FABACEAE	8.62 ± 0.19	3.16 ± 2.49	3.43 ± 0.51	11.56 ± 1.06
Vitamin C			6.47 ± 0.89		13.74 ± 0.03	
Trolox			7.77 ± 0.28		14.89 ± 0.89	

± 0.89 μg/ml ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า SC_{50} ต่ออนุมูล DPPH และ ABTS ของสารสกัดจากสมุนไพร

4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมโดยใช้ Folin-Ciocalteau's reagent ซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยารีดักชั่นของ phosphomolybdic-phosphotungstic acid และหมู่ phenolic hydroxyl group ของสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ได้เป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ใช้สารมาตรฐาน gallic acid เป็นตัวแทนในการเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในสารสกัด ปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดสมุนไพรแสดงดังตารางที่ 4.X พบว่าสารสกัดเมทานอลของใบอ่อนและใบแก่ของมะม่วงหิมพานต์ (1AO-YL และ 1AO-ML) แก่นฝาง (9CS) และแก่นแสมสาร (28SG) ที่มีปริมาณสารฟีนอลรวมสูงประมาณ 450-560 mg GAE / 1 g extract ในขณะที่สารสกัดเอทิลอะซิเตตของแก่นแสมสาร (28SG) ปริมาณสารฟีนอลรวมสูงที่สุดคือประมาณ 890 mg GAE / 1 g extract

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดจากสมุนไพร

รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	Total Phenolic Compound mg GAE / 1 g extract	
			Methanol	Ethyl acetate
1AO-YL	*Anacardium occidentale*	ANACARDIACEAE	561.39 ± 9.72	172.78 ± 5.77
1AO-ML			491.31 ± 36.47	508.89 ± 71.39
9CS	*Caesalpinia sappan*	FABACEAE	450.11 ± 11.32	548.20 ± 10.30
13SG	*Syzygium gratum*	MYTACEAE	439.36 ± 3.59	83.87 ± 8.47
18AA	*Acacia auriculiformis*	FABACEAE	393.18 ± 79.70	116.16 ± 2.63
25BM	*Butea monosperma*	FABACEAE	137.46 ± 2.34	134.92 ± 20.00
26AB	*Averrhoa bilimbi*	OXALIDACEAE	128.87 ± 4.84	192.64 ± 6.26
28SG	*Senna garrettiana*	FABACEAE	534.84 ± 4.70	889.30 ± 10.18

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยหลักการวิเคราะห์แบบ ET base assay โดยใช้วิธี DPPH และ ABTS ซึ่งได้ค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นค่า SC_{50} ทั้งนี้ใช้การวิเคราะห์โดยเทคนิคทั้งสอง ใช้ทั้ง ascorbic acid และ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบผลบวก ซึ่งเป็นที่ทราบโดยทั่วไปว่า ascorbic acid คือวิตามินซี ในขณะที่ Trolox เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี ซึ่งวิตามินทั้งสองชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี ในการทดลองครั้งนี้ ผลการทดลองพบว่า ascorbic acid และ Trolox มีค่า SC_{50} ต่อ DPPH เป็น 6.47 ± 0.89 และ 7.77 ± 0.28 μg/ml ตามลำดับ และกรณีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ABTS พบว่า ascorbic acid และ Trolox มีค่า SC_{50} ต่อ ABTS เป็น 13.74 ± 0.03 และ 14.89 ± 0.89 μg/ml ตามลำดับ ดังนั้น

สารสกัดหยาบของสมุนไพรที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทิลอะซิเตตที่มีค่า SC_{50} ต่ำกว่าค่า SC_{50} ของสารมาตารฐาน ascorbic acid และ Trolox จะแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ซึ่งได้แก่ สารสกัดของใบอ่อนและใบแก่มะม่วงหิมพานต์ สารสกัดแก่นฝาง และ สารสกัดแก่นแสมสาร

จากการศึกษาวิจัยสรุปได้ว่าสารสกัดสมุนไพรไทยทุกชนิดในการศึกษาครั้งนี้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดมาจากวงศ์ *Anacardiaceae* *และ วงศ์ Fabaceae* ซึ่งพืชกลุ่มนี้มีการใช้เป็นสมุนไพรไทยโดยทั่วไป และมีแนวโน้มที่จะสามารถ

พัฒนาต่อยอดงานวิจัยชิ้นนี้ไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือผลิตภัณฑ์ยาได้ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังต้องการศึกษารายละเอียดโดยใช้เทคนิคทางวิทยาศาสตร์ขั้นสูงขึ้น ได้แก่ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพระดับเซลล์ และความเป็นพิษต่อเซลล์ต่างๆ อีกทั้งยังจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงสารพฤกษเคมีสำคัญที่มีอยู่ในสมุนไพรแต่ละชนิดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย (สวอ.) (2555). **อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ**. เชียงใหม่ : สมาร์ท โคตติ้ง แอนด์ เซอร์วิส.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช และ ธนศักดิ์วุฒิธรรมเวช. (2550). **สารานุกรมสมุนไพร**. กรุงเทพฯ : โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮาส์.

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). **Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report).** *Pure and Applied Chemistry,* 85(5), 957-998.

Benzi, G., & Moretti, A. (1995). **Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease?** *Neurobiology of Aging,* 16(4), 661-674.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. *LWT - Food Science and Technology,* 28(1), 25-30.

Chotchoungchatchai, S., Saralamp, P., Jenjittikul, T., Pornsiripongse, S., & Prathanturarug, S. **Medicinal plants used with Thai Traditional Medicine in**

modern healthcare services: A case study in Kabchoeng Hospital, Surin Province, Thailand. *Journal of Ethnopharmacology,* 141(1), 193-205.

Ganapaty, S., Thomas, P. S., Ramana, K. V., Vidyadhar, K., & Chakradhar, V. (2002). **A review of phytochemical studies of *Cassia* species.** *Journal of Natural Remedies,* 2(2), 102-120.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). **The chemistry behind antioxidant capacity assays**. *J Agric Food Chem,* 53(6), 1841-1856.

Kimura, Y., Sumiyoshi, M., Taniguchi, M., & Baba, K. (2008). **Antitumor and antimetastatic actions of anthrone-C-glucoside, cassialoin isolated from *Cassia garrettiana* heartwood in colon 26-bearing mice**. *Cancer Sci,* 99(11), 2336-2348.

Levy, A. P. (2006). **Application of pharmacogenomics in the prevention of diabetic cardiovascular disease: Mechanistic basis and clinical evidence for utilization of the haptoglobin genotype in determining benefit from antioxidant therapy.** *Pharmacology & Therapeutics,* 112(2), 501-512.

Nishikawa, M. (2008). **Reactive oxygen species in tumor metastasis.** *Cancer Letters,* 266(1), 53-59.

Ono, K., Hamaguchi, T., Naiki, H., & Yamada, M. (2006). **Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease,* 1762(6), 575-586.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). **Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements**. *J Agric Food Chem,* 53(10), 4290-4302.

Reutrakul, V., Ningnuek, N., Pohmakotr, M., Yoosook, C., Napaswad, C., Kasisit, J., et al. (2007). **Anti HIV-1 flavonoid glycosides from *Ochna integerrima*.** *Planta Med,* 73(7), 683-688.

Schöneicha, C. (1999). **Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach**. *Experimental Gerontology,* 34(1), 19-34.

Siriwatanametanon, N., Fiebich, B. L., Efferth, T., Prieto, J. M., & Heinrich, M. **Traditionally used Thai medicinal plants: In vitro anti-inflammatory, anticancer and antioxidant activities**. *Journal of Ethnopharmacology,* 130(2), 196-207.