จุลทรรศน์ลักษณะ ปริมาณฟีนอลรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชะเอมไทย

Microscopical characters, total phenolic content, and antioxidant activity of *Albizia myriophylla* Benth.

Nazneen Bakasatae[1], Narkis Yapa[1], Vitsarut Issalamikkun[1], Papawarin Issarachote[1], Oraphan Sakulkeo[1], and Nantiya Joycharat[1,2*]

[1]Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

[2]Excellent Research Laboratory on Natural Products, Faculty of Science and Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand

[*]Corresponding Author, E-mail: nantiya.j@psu.ac.th

Received: 19 February 2018 | Revised: 22 August 2018 | Accepted: 18 January 2019

บทคัดย่อ

ชะเอมไทย (*Albizia myriophylla* Benth.) วงศ์ Fabaceae เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ทางการแพทย์พื้นบ้านในภาคใต้ของไทย โดยใช้เป็นสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยารักษาโรคต่างๆ เช่น ฟันผุ เบาหวาน และผิวหนังอักเสบ การศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อจากผงยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของส่วนเนื้อไม้ชะเอมไทยจากแหล่งธรรมชาติ 3 แหล่ง (VI01 VI02 และ VI03) ในภาคใต้ของประเทศไทย พบเนื้อเยื่อผงยาต่างๆ ได้แก่ พาเรงคิมาแนวรัศมี (ray parenchyma) พาเรงคิมาแนวรัศมีซึ่งมีเม็ดแป้ง (ray parenchyma with starch grains) พาเรงคิมาแนวรัศมีซึ่งมีผลึกแคลเซียมออกซาเลต (ray parenchyma with prism of calcium oxalate) ท่อน้ำชนิดมีรูมีขอบ (border-pitted vessels) โฟล์เอ็มไฟเบอร์ (phloem fibers) โฟล์เอ็มพาเรงคิมาซึ่งมีเม็ดแป้งเรียงตัวภายใน (phloem parenchyma with starch grains) ไฟเบอร์ซึ่งมีผลึกแคลเซียมออกซาเลต (fibers with calcium oxalate prism) สโตนเซลล์ (stone cell) ผลึกแคลเซียมออกซาเลต (prisms of calcium oxalate) และเม็ดแป้ง (starch grains) โดยเนื้อเยื่อที่พบมากที่สุดในเนื้อไม้ชะเอมไทยจากทั้ง 3 แหล่ง คือ เม็ดแป้ง ท่อน้ำชนิดมีรูมีขอบ โฟล์เอ็มพาเรงคิมาซึ่งมีเม็ดแป้งเรียงตัวภายใน และไฟเบอร์ซึ่งมีผลึกแคลเซียมออกซาเลต เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP พบว่าสารสกัดเอทานอล (DPPH, IC_{50} 46.23–67.95 µg/mL; FRAP, 380.53–847.31 mM $FeSO_4$/g) ของเนื้อไม้ชะเอมไทยจากทั้ง 3 แหล่งที่ศึกษา มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดน้ำ (DPPH, IC_{50} 53.53–67.95 µg/mL; FRAP, 239.78–377.05 mM $FeSO_4$/g) ทั้งนี้สารสกัดจากตัวอย่าง VI01 แสดงแนวโน้มในการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดชะเอมไทยอีก 2 ตัวอย่างที่ศึกษา เมื่อทดสอบปริมาณฟีนอลรวมด้วยวิธีทางสเปกโทรโฟโตเมตรี พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่าง VI01 VI02 และ VI03 มีความสอดคล้องกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP โดยสารสกัดเอทานอลจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดน้ำของชะเอมไทย รวมถึงตัวอย่าง VI01 มีแนวโน้มในการมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สูงกว่าสารสกัดชะเอมไทยอีก 2 ตัวอย่างที่ศึกษา (VI02 และ VI03) การศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดน้ำจากตัวอย่างชะเอมไทย VI01 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีใกล้เคียงกับสารสกัดน้ำของชะเอมไทยร่วมกับชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* L.) ทั้งนี้สารสกัดเอทานอลของชะเอมไทยร่วมกับชะเอมเทศมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดและมีฤทธิ์ต้าน

อนุมูลอิสระที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่นๆ ที่ศึกษา ผลการศึกษาในครั้งนี้ได้ให้ข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์เบื้องต้นที่สัมพันธ์กับการใช้เนื้อไม้ชะเอมไทยเป็นวัตถุดิบสมุนไพรในทางการแพทย์พื้นบ้านไทยสำหรับรักษาโรคที่มีสาเหตุเกี่ยวเนื่องกับภาวะเครียดออกซิเดชัน

ABSTRACT

Albizia myriophylla Benth. of Fabaceae family is a medicinal plant used in southern Thailand. It is used as a medicinal ingredient in various preparations for the treatment of caries, diabetes and dermatitis. The investigation of microscopic character of 3 collections (VI01 VI02 and VI03) of *A. myriophylla* in southern Thailand led to the identification of ray parenchyma, ray parenchyma with starch grains, ray parenchyma with prism of calcium oxalate, border-pitted vessels, phloem fibers, phloem parenchyma with starch grains, fibers with calcium oxalate prism, stone cell, prisms of calcium oxalate, and starch grains in their powdered drugs. The most common tissues in powdered drugs of the 3 collections of *A. myriophylla* were starch grains, border-pitted vessels, and phloem parenchyma with starch grains. From DPPH and FRAP methods, the ethanol extract (DPPH, IC_{50} 46.23-67.95 µg/mL; FRAP, 380.53-847.31 mM $FeSO_4$/g) from all 3 collections of *A. myriophylla* showed higher antioxidant capacity than the water extract (DPPH, IC_{50} 53.53-67.95 µg/mL; FRAP, 239.78-377.05 mM $FeSO_4$/g) of this plant. Among the extracts of 3 collections of *A. myriophylla*, VI01 extract showed the best antioxidant activity. The total phenolic content of the extracts from 3 collections of *A. myriophylla* was analyzed using spectrophotometry. The results have revealed that the total phenolic content in VI01, VI02, and VI03 extracts was in accordance with their antioxidant activity in DPPH and FRAP assays. In this case, the ethanol extracts of all 3 collections had higher total phenolic content than their water extracts. VI01 appeared to have higher total phenolic content than the others. Furthermore, it was found that the water extract from VI01 had total phenolic content and good antioxidant activity similar to that containing *A. myriophylla* and licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). In this study, the ethanol extract containing *A. myriophylla* and *G. glabra* had the highest total phenolic content and demonstrated good antioxidant activity compared to the others tested. Our results provide preliminary scientific data related to the use of *A. myriophylla* wood as a raw material in Thai traditional medicine for the treatment of oxidative stress associated diseases.

คำสำคัญ: ชะเอมไทย ชะเอมเทศ สารต้านอนุมูลอิสระ ฟลาโวนอยด์

Keywords: *Albizia myriophylla*, Antioxidant, Flavonoid, *Glycyrrhiza glabra*

บทนำ

ชะเอมไทย (*Albizia myriophylla* Benth.) วงศ์ Fabaceae (Leguminosae-Mimosoideae) ชื่ออื่น ชะเอมป่า ตาลอ้อย ส้มป่อยหวาน อ้อยช้าง ย่านงาย (เต็ม, 2557) เป็นไม้เถายืนต้น มีหนามตามลำต้นและกิ่งก้าน ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกสองชั้น (bipinnately compound leaf) ใบย่อยรูปขอบขนาน ดอกเป็นช่อออกที่ปลายกิ่งมีลักษณะเป็นพู่ กลีบดอกสีขาว มีกลิ่นหอม ผลเป็นฝัก มีสีเหลืองถึงน้ำตาล (Saralamp et al., 1996) ชะเอมไทยเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาพื้นบ้านและถูกใช้ในการรักษาโรคที่หลากหลายทั้งในไทยและในต่างประเทศ (นันทิยา และสุรศักดิ์, 2556) ในตำรายาไทยมีบันทึกว่า เนื้อไม้ (ต้น, เถา) รสหวาน แก้โรคในลำคอ แก้ลม แก้เลือดออกตามไรฟัน ขับเสมหะ แก้น้ำลายเหนียว บำรุงธาตุและกำลัง บำรุงกล้ามเนื้อให้เจริญ ราก รสหวาน แก้ไอ ขับเสมหะ บำรุงหัวใจ ใบขับโลหิตระดู ดอก ช่วยย่อยอาหาร นอกจากนี้การแพทย์พื้นบ้านในภาคใต้ของไทย มีการใช้ชะเอมไทยเป็นสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยารักษาโรคต่างๆ เช่น ฟันผุ (ประกอบ, 2547) เบาหวาน (พฤฒาจารย์, 2534; อาทร และคณะ, 2536) และผิวหนังอักเสบ

(Chusri et al., 2012) จากรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่าชะเอมไทยมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Steinrut et al., 2011) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Joycharat et al., 2012) และฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Rukayadi et al., 2008) จากรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชนี้พบสารกลุ่มต่างๆ ดังนี้ phenolic acids (เปลือก), triterpene saponins (ลำต้น), lignan glycosides (เปลือก), iminosugars (เนื้อไม้) และ flavonoids (เนื้อไม้) (Ito et al., 1994; Yoshikawa et al., 2002; Asano et al., 2005; Panmei et al., 2007; Joycharat et al., 2013) โดยสารสำคัญที่พบจากเนื้อไม้ ดังนี้ albizzine, palustrine (Phavanantha et al., 1990), DMJ, DMDP, 2-*O*-ß-D-glucopyranosyl-DMJ, 4-*O*-ß-D-glucopyranosyl-DMJ (Asano et al., 2005), lupinifolin, 8-methoxy-7,3',4'-trihydroxyflavone, 7,8,3',4'-tetrahydroxyflavone, lupeol, ß-sitosterone, stigmasta-5,22-dien-3-one, ß-sitosterol และ stigmasterol (Joycharat et al., 2013; 2016)

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ อะตอม หรือโมเลกุลของสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ (unpaired electron) อยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดซึ่งมีระดับพลังงานสูงจึงไวต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้อย่างรวดเร็ว โดยอนุมูลอิสระอาจถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ (Meghashri., 2012) หรือจากปัจจัยภายนอก เช่น รังสี แสงแดด ควันบุหรี่ มลพิษทางอากาศ และยาฆ่าแมลง เป็นต้น (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009) ในสภาวะที่มีอนุมูลอิสระมากเกิน แต่ปริมาณสารต้านออกซิเดชัน (antioxidants) ไม่เพียงพอ จะส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ทำให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุลในร่างกาย เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และอาจเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจขาดเลือด โรคเบาหวาน โรคทางระบบประสาท และโรคชราภาพก่อนวัยอันควร (White, 1999) โดยปกติในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดต่างก็มีระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย (antioxidant defense system) เพื่อธำรงไว้ซึ่งสมดุลอนุมูลอิสระ สารต้านออกซิเดชันที่พบในร่างกาย เช่น เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบหรือโปรตีนบางอย่าง เช่น bilirubin ubiquinol และ transferrin เป็นต้น มีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่างๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะและยังมีกลไกในการต้านออกซิเดชันหลายรูปแบบ เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ การเสริมฤทธิ์และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (Rahman, 2007) นอกจากระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายแล้ว สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) ซึ่งพบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช เช่น วิตามินเอ ซี อี หรือ เบต้าแคโรทีน รวมทั้งสารประกอบพอลิฟีนอล เป็นต้น ก็มีบทบาทสำคัญเพื่อช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น (Shapoval and Gromovaia, 2003) ปัจจุบันการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ เช่น สาหร่ายทะเล แบคทีเรีย เชื้อรา และพืชชั้นสูง (Chattopadhyay et al., 2008) ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบพอลิฟีนอล ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในพืชสมุนไพรและมีรายงานวิจัยพบว่ามีผลต่อการรักษาโรคเรื้อรังหลายชนิด

การนำสมุนไพรมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตยาจำเป็นต้องมีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของวัตถุดิบดังกล่าวที่ได้มา เนื่องจากในธรรมชาติอาจพบพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน การพิสูจน์เอกลักษณ์จึงเป็นเครื่องยืนยันถึงชนิดพันธุ์ของวัตถุดิบพืชที่ใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับยาหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพรว่าเป็นสมุนไพรที่ต้องการจริง ไม่มีการปนปลอมด้วยพืชอื่นๆ การใช้พืชไม่ถูกชนิดจะส่งผลต่อความแปรปรวนของปริมาณหรือชนิดของสารสำคัญที่มีอยู่ในสมุนไพร และอาจทำให้ยานั้นไม่เกิดผลในการรักษา (นพมาศ และนงลักษณ์, 2551) ทั้งนี้ข้อมูลลักษณะทางกายภาพที่ได้จากการตรวจสอบจุลทรรศน์ลักษณะ (Microscopical characters) ของสมุนไพร จัดเป็นข้อกำหนดหนึ่งของการจัดทำมาตรฐานของสมุนไพรในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ซึ่งนอกจากจะมีประโยชน์ในการใช้ประกอบการพิสูจน์เอกลักษณ์แล้วนั้น ยังมีประโยชน์ในการตรวจหาสิ่งปลอมปนได้อีกด้วย (สมพร, 2542; ถนอมจิต, 2553) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อจากผงยาที่สังเกตจากกล้องจุลทรรศน์ (Histological character) ตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (Total phenolic content) รวมถึงทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเนื้อไม้ชะเอมไทยจาก 3 แหล่งเก็บตามธรรมชาติที่

แตกต่างกันในเขตภาคใต้ของไทย โดยชะเอมไทยจากแหล่งเก็บที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด จะถูกคัดเลือกไปเตรียมเป็นสมุนไพรองค์ประกอบในพิกัดยาชะเอมทั้ง 2 และนำไปตรวจสอบปริมาณสารฟีนอลรวม และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในลักษณะเดียวกัน ทั้งนี้เพื่อเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับลักษณะของเนื้อเยื่อจากผงยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ปริมาณสารสำคัญ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรชนิดนี้

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างพืชสมุนไพร

ตัวอย่างเนื้อไม้ชะเอมไทย (*A. myriophylla*) ได้มาจากแหล่งธรรมชาติ 3 แหล่งที่แตกต่างกันในพื้นที่ภาคใต้ของไทย ได้แก่ 1) อ. เมือง จ.พัทลุง (VI01) 2) อ.นาหม่อม จ.สงขลา (VI02) และ 3) อ. สิงหนคร จ.สงขลา (VI03) ในช่วงเดือนตุลาคม-ธันวาคม 2559 ตรวจสอบเอกลักษณ์ของตัวอย่างทั้งหมดโดยผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรทัย เนียมสุวรรณ อาจารย์ผู้เชี่ยวชาญทางด้านอนุกรมวิธานพืช คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงของชะเอมไทย (voucher specimens) จากแหล่งธรรมชาติ 3 แหล่ง ได้แก่ VI01 VI03 และ VI03 เก็บรักษาไว้ที่คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับตัวอย่างรากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* L.) ได้มาจากร้านขายยาแผนโบราณ จ.สงขลา และตรวจสอบเอกลักษณ์ของตัวอย่างโดยเภสัชกรแผนโบราณที่ประจำอยู่ ณ. ร้านขายยาแผนโบราณนั้น

2. การตรวจสอบจุลทรรศน์ลักษณะของเนื้อเยื่อจากผงยา (Histological character)

การตรวจสอบลักษณะของเนื้อเยื่อจากผงยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ทำโดยนำผงยาของตัวอย่างเนื้อไม้ชะเอมไทย (*A. myriophylla*) จากทั้ง 3 แหล่ง คือ VI01 VI02 และ VI03 ที่บดละเอียดแล้ว มาผ่านแร่ง เบอร์ 100 จากนั้นตรวจสอบเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ของผงยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เมื่อย้อมผงยาด้วยน้ำกลั่น และสารละลายไอโอดีนความเข้มข้น 2% (2% iodine solution) โดยศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อจากผงยาตัวอย่าง ที่กำลังขยาย 100x และ 400x ถ่ายภาพของเนื้อเยื่อ และวัดขนาดเนื้อเยื่อ

3. การเตรียมสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำ

3.1 การเตรียมสารสกัดเอทานอล ทำโดยชั่งผงยาแห้งมา 200 g (กรณี VI01-VI03 ใช้ตัวอย่างละ 200 g และกรณีพิกัดยาชะเอมทั้ง 2 ใช้สัดส่วนเท่ากันของสมุนไพรองค์ประกอบ รวม 200 g) สกัดด้วยเอทานอลโดยวิธีแช่หมัก (maceration) ที่อุณหภูมิห้อง กรองแยกสารสกัดมาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง Rotary evaporator และระเหยแห้งต่อด้วย Water bath บันทึกน้ำหนักสารสกัดเอทานอลที่ได้ คำนวณ % yield ของสารสกัด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

3.2 การเตรียมสารสกัดน้ำ ทำโดยชั่งผงยาเช่นเดียวกับข้อ 3.1 ห่อด้วยผ้าขาวบาง ใส่ลงในหม้อสแตนเลส ต้มในน้ำ 1200 mL คิดเป็นอัตราส่วนผงยาแห้งต่อน้ำ 1:6 ต้มเคี่ยวจนเหลือปริมาตรสารสกัด 400 mL กรองสารสกัด และนำไปทำให้แห้งโดยเครื่อง Freeze dry บันทึกน้ำหนัก คำนวณ % yeild ของสารสกัด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

4. การตรวจสอบปริมาณสารฟีนอลรวม (Total phenolic content)

วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยดัดแปลงจากวิธีที่เคยมีรายงานไว้แล้วของ Wang et al. (2018) ดังนี้ เตรียมสารละลายของสารทดสอบในตัวทำละลายไดเมทิล-ซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปิเปตสารทดสอบ 30 µL ลงใน 96-well plate เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 150 µL นำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารสะสาย Na_2CO_3 120 µL แล้วนำไปบ่มในที่มืดอีกครั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 760 nm คำนวณค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) รายงานผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารทดสอบแห้ง 1 กรัม (mg gallic acid equivalent/g dry extract; mg GAE/g)

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.1 วิธี DPPH (Diphenylpicryhydrazyl radical scavenging assay) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารทดสอบตามวิธีที่เคยมีรายงานไว้แล้วของนันทิยา และคณะ (2560) ดังนี้ สารละลายของสารทดสอบเตรียมในตัวทำละลาย 70% เอทานอล โดยการเจือจางแบบ two-fold dilution สารละลาย DPPH (0.031 g/L) เตรียมในตัวทำละลายเมทานอล

ผสมสารละลายของสารทดสอบแต่ละความเข้มข้น และสารละลาย DPPH ใน 96-well microtiterplate ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง คำนวณค่าประสิทธิภาพในการลดปริมาณอนุมูลอิสระลงครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) จากกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control)

5.2. วิธี FRAP (Ferric reducing antioxidant power assay) ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารทดสอบโดยดัดแปลงจากวิธีที่เคยมีรายงานไว้แล้วก่อนหน้านี้ (Yildirim et al., 2001) ดังนี้ การเตรียมสารละลาย FRAP ทำโดยผสมสารละลาย 0.3 M Acetate buffer (pH 3.6) กับสารละลาย 20 mM Ferric chloride และ สารละลาย 20 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) ให้เข้ากัน ในอัตราส่วน 10:1:1 และเตรียมสารทดสอบในตัวทำละลาย DMSO การทดสอบทำโดยผสมสารละลายของสารทดสอบและสารละลาย FRAP ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 596 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาค่าความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ Fe^{3+} เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} (FRAP value) ของสารทดสอบ จากกราฟมาตรฐานของเฟอรัสซัลเฟส ($FeSO_4$) ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ $FeSO_4$ กับค่า absorbance (ความเข้มข้นของ $FeSO_4$; 0.75, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0 และ 24.0 µM มีค่า absorbances ที่ 596 nm; 0.1243, 0.1323, 0.1600, 0.2107, 0.3250 และ 0.5667 ตามลำดับ) โดยต้องเจือจางสารทดสอบให้อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน

ผลการวิจัย

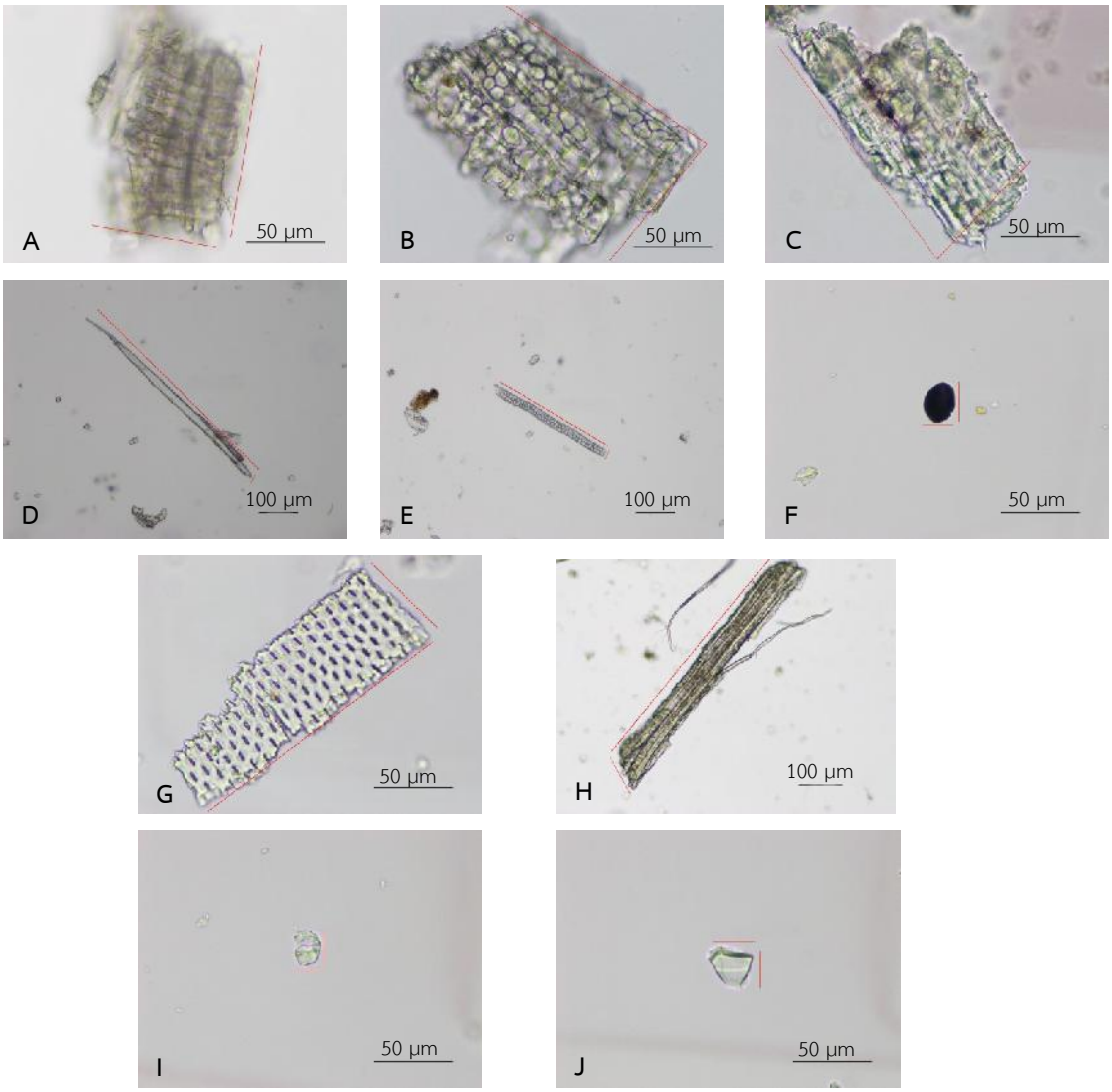
1. จุลทรรศน์ลักษณะของเนื้อเยื่อจากผงยาชะเอมไทย (*A. myriophylla*)

การศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อจากผงยา (Histological character) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของตัวอย่างเนื้อไม้ชะเอมไทย VI01 VI02 และ VI03 พบเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 1 A-J

2. ปริมาณสารฟีนอลรวมในสารสกัดจากเนื้อไม้ชะเอมไทย (*A. myriophylla*)

สารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของเนื้อไม้ชะเอมไทยจากแหล่งธรรมชาติทั้ง 3 แหล่ง (VI01 VI02 และ VI03) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 54.3–113.5 mg GAE/g และ 26.0–65.3 mg GAE/g ตามลำดับ โดยพบว่าสารสกัดเอทานอล (113.5 mg GAE/g) และสารสกัดน้ำ (65.3 mg GAE/g) ของชะเอมไทย VI01 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด ในขณะที่สารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของชะเอมไทย VI02 และ VI03 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 1) เมื่อนำชะเอมไทย VI01 ไปเตรียมเป็นสมุนไพรองค์ประกอบในพิกัดยาชะเอมทั้ง 2 (*A. myriophylla* และ *G. glabra*) พบว่าเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลรวม (ตารางที่ 2) สารสกัดเอทานอลของพิกัดยาชะเอมทั้ง 2 (162.94 mg GAE/g) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรองค์ประกอบในพิกัดยา (สารสกัดเอทานอลของชะเอมไทย VI01; 113.5 mg GAE/g และสารสกัดเอทานอลของชะเอมเทศ; 115.23 mg GAE/g) ในขณะที่พบว่าสารสกัดน้ำของชะเอมไทย VI01 (65.3 mg GAE/g) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ใกล้เคียงกับสารสกัดน้ำของพิกัดยาชะเอมทั้ง 2 (58.05 mg GAE/g) ทั้งนี้พบว่าสารสกัดน้ำของชะเอมเทศมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยที่สุด (36.63 mg GAE/g)

เนื้อเยื่อที่พบมากที่สุดในตัวอย่างผงยาจากเนื้อไม้ชะเอมไทยทั้ง 3 แหล่งเก็บ (VI01 VI02 และ VI03) คือ starch grains ส่วนเนื้อเยื่อที่พบรองลงมาในตัวอย่าง VI01 คือ fibers with calcium oxalate prism และ border-pitted vessels ตามลำดับ ในขณะที่เนื้อเยื่อที่พบรองลงมาในตัวอย่าง VI02 คือ border-pitted vessels และ ray parenchyma with starch grains ตามลำดับ และเนื้อเยื่อที่พบรองลงมาในตัวอย่าง VI03 คือ border-pitted vessel และ phloem (bast) fibers ตามลำดับ



รูปที่ 1 A-J เนื้อเยื่อผงยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของตัวอย่างเนื้อไม้ชะเอมไทย (*A. myriophylla* Benth.) จาก 3 แหล่งธรรมชาติ (VI01,VI02 และ VI03) ที่กำลังขยาย 400x; **A.** ray parenchyma **B.** ray parenchyma with starch grains **C.** ray parenchyma with prism of calcium oxalate **D.** phloem (bast) fiber **E.** phloem parenchyma with starch grains **F.** starch grain staining with 2% iodine solution **G.** fragment of border-pitted vessels **H.** fibers with calcium oxalate prism **I.** stone cell **J.** prisms of calcium oxalate

ตารางที่ 1 ค่า % yield ปริมาณสารฟีนอลรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชะเอมไทย (VI01–VI03)

สารทดสอบ	Yield (%)	DPPH (IC_{50}; µg/mL)	FRAP (mg Fe (II)/g)	Total phenol (mg GAE/g)
สารสกัดเอทานอล VI01	3.22	46.23±0.11	847.31±4.01	113.5±0.007
สารสกัดเอทานอล VI02	2.35	67.95±0.73	461.11±0.34	65.5±0.005
สารสกัดเอทานอล VI03	2.26	60.61±1.66	380.53±1.61	54.3±0.004
สารสกัดน้ำ VI01	1.06	53.53±0.73	377.05±1.91	65.3±0.004
สารสกัดน้ำ VI02	1.56	105.42±0.88	366.04±1.75	35.0±0.007
สารสกัดน้ำ VI03	2.19	119.08±0.8	239.78±2.83	26.0±0.004

3. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเนื้อไม้ชะเอมไทย (*A. myriophylla*)

สารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของเนื้อไม้ชะเอมไทยจากแหล่งธรรมชาติทั้ง 3 แหล่ง มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} ที่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 46.23–67.95 µg/mL และ 53.53–119.08 µg/mL ตามลำดับ ด้วยวิธี DPPH และมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่ $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ได้เป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 380.53–847.31 mM Fe (II)/g และ 239.78–377.05 Fe (II)/g ตามลำดับ ด้วยวิธี FRAP (ตารางที่ 1) โดยผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดเอทานอล (IC_{50} 46.23 µg/mL) และสารสกัดน้ำ (IC_{50} 53.53 µg/mL) ของชะเอมไทย VI01 ให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ในขณะที่สารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของชะเอมไทย VI02 และ VI03 ให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน และจากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่าสารสกัดเอทานอล (847.31 mM Fe (II)/g) ของชะเอมไทย VI01 ให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยสารสกัดเอทานอลของชะเอมไทย VI02 และ VI03 ให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดน้ำจากชะเอมไทยทั้ง 3 แหล่ง พบว่าสารสกัดน้ำของชะเอมไทย VI01 (377.05 mM Fe (II)/g) และ VI02 (366.04 mM Fe (II)/g) ให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีใกล้เคียงกัน ในขณะที่สารสกัดน้ำของชะเอมไทย VI03 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด (239.78 mM Fe (II)/g)

เมื่อนำชะเอมไทย VI01 ไปเตรียมเป็นสมุนไพรองค์ประกอบในพิกัดยาชะเอมทั้ง 2 พบว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP สารสกัดเอทานอลของพิกัดยาชะเอมทั้ง 2 (DPPH: IC_{50} 15.16 µg/mL; FRAP: 966.38 mM Fe (II)/g) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดเอทานอลของชะเอมไทย VI01 ในขณะที่พบว่าสารสกัดน้ำของชะเอมไทย VI01 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดน้ำของพิกัดยาชะเอมทั้ง 2 เล็กน้อย ทั้งนี้พบว่าสารสกัดเอทานอลของชะเอมเทศ (DPPH: IC_{50} 19.38 µg/mL; FRAP: 1113.05 mM Fe (II)/g) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP ที่ดีกว่าสารสกัดน้ำของชะเอมไทย VI01 เป็นอย่างมาก (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่า % yield ปริมาณสารฟีนอลรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพิกัดยาชะเอมทั้ง 2 และสมุนไพรองค์ประกอบ

สารทดสอบ	Yield (%)	DPPH (IC_{50}; µg/mL)	FRAP (mg Fe (II)/g)	Total phenol (mg GAE/g)
สารสกัดเอทานอลชะเอมทั้ง 2	5.07	15.16±0.2	966.38±0.53	162.94±0.001
สารสกัดเอทานอล VI01	3.22	46.23±0.11	847.31±4.01	113.5±0.007
สารสกัดเอทานอลชะเอมเทศ	6.80	19.38±0.21	1113.05±4.54	115.23±0.01
สารสกัดน้ำชะเอมทั้ง 2	3.33	66.0±1.7	321.63±0.69	58.05±0.001
สารสกัดน้ำ VI01	1.06	53.53±0.73	377.05±1.91	65.3±0.004
สารสกัดน้ำชะเอมเทศ	8.47	138.46±4.4	320.47±6.27	36.63±0.008

วิจารณ์ผลการวิจัยและสรุปผลการวิจัย

ชะเอมไทย (*A. myriophylla*) เป็นตัวยาที่ปรากฏในคัมภีร์แพทย์แผนไทย โดยส่วนใหญ่มีการใช้ร่วมกับชะเอมเทศ (*G. glabra*) ในจุลพิกัดชะเอมทั้งสอง ชะเอมไทยเป็นสมุนไพรไทยชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายโดยหมอพื้นบ้านในภาคใต้ของไทย ทั้งในรูปแบบของสมุนไพรเดี่ยวและเป็นส่วนประกอบในตำรับยาต่างๆ (Neamsuvan et al., 2015) โดยเนื้อไม้ (เถา) มีรสหวานสอดคล้องกับการประเมินความหวานโดยวิธีทางประสาทสัมผัสของ Yoshikawa et al. (2002) ซึ่งพบว่าสารกลุ่มไตรเทอร์พีนซาโปนิน (triterpene saponins) บางชนิดที่สกัดจากเปลือกต้นของชะเอมไทยให้ความหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครสถึง 600 เท่า ชะเอมไทยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นตัวอย่างพืชที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ 3 แหล่งในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย การตรวจสอบเนื้อเยื่อพื้นฐานของผงยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยย้อมผงยาด้วยน้ำกลั่นและการตรวจสอบเม็ดแป้งในเนื้อเยื่อด้วยสารละลายไอโอดีนความเข้มข้น 2% บ่งชี้ว่าตัวอย่างที่ศึกษาเป็นส่วนเนื้อไม้ โดยชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อที่พบ ได้แก่ พาเรงคิมาแนวรัศมี (ray parenchyma) ขนาดกว้าง 80 ไมครอน ยาว 123 ไมครอน ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อมีการเรียงสานกันของพาเรงคิมาแนวยาวตั้งฉากกับพาเรงคิมาแนว

รัศมี ท่อน้ำชนิดผนังมีรูมีขอบ (border-pitted vessels) ขนาดกว้าง 58 ไมครอน ยาว 178 ไมครอน ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อมีลักษณะกลวงทรงกระบอก มีท่อเปิดภายใน บริเวณผิวของเนื้อเยื่อมีผนังทุติยภูมิที่เพิ่มความเข็งแรงแบบมีรูมีขอบ โฟล์เอ็มพาเรงคิมาซึ่งมีเม็ดแป้งเรียงตัวภายใน (phloem parenchyma with starch grains) ขนาดกว้าง 24 ไมครอน ยาว 321 ไมครอน ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อมีลักษณะยาว ภายในมีช่องว่างที่มีเม็ดแป้งบรรจุอยู่ โฟล์เอ็มไฟเบอร์ (phloem fiber) ขนาดกว้าง 23 ไมครอน ยาว 573 ไมครอน ลักษณะเซลล์เรียวยาว หัวท้ายเรียวแหลม มีช่องว่างภายในเซลล์ พาเรงคิมาแนวรัศมีซึ่งมีเม็ดแป้ง (ray parenchyma with starch grains) ขนาดกว้าง 96 ไมครอน ยาว 156 ไมครอน ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อมีการเรียงสานกันของพาเรงคิมาตั้งฉากกับพาเรงคิมาแนวรัศมี ภายในบรรจุเม็ดแป้ง พาเรงคิมาแนวรัศมีซึ่งมีผลึกแคลเซียมออกซาเลต (ray parenchyma with prism of calcium oxalate) ขนาดกว้าง 86 ไมครอน ยาว 167 ไมครอน ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อมีการเรียงสานกันของพาเรงคิมาตั้งฉากกับ พาเรงคิมาแนวรัศมี ภายในบรรจุผลึกของแคลเซียมออกซาเลต ไฟเบอร์ซึ่งมีผลึกแคลเซียมออกซาเลต (fibers with calcium oxalate prism) ขนาดกว้าง 96 ไมครอน ยาว 580 ไมครอน ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อมีลักษณะเป็นมัดของเส้นใยที่มีผลึกแคลเซียมออกซาเลตอยู่ภายใน สโตนเซลล์ (stone cell) ขนาดกว้าง 16 ไมครอน ยาว 24 ไมครอน ลักษณะเซลล์ค่อนข้างกลม ผนังหนา มีช่องว่างในเซลล์ ผลึกแคลเซียมออกซาเลต (prisms of calcium oxalate) ขนาดกว้าง 23 ไมครอน ยาว 26 ไมครอน ลักษณะเป็นเหลี่ยม รูปร่างไม่แน่นอน มีขอบชัดเจน และเม็ดแป้ง (starch grains) ขนาดกว้าง 20 ไมครอน ยาว 25 ไมครอน รูปร่างไม่แน่นอนค่อนข้างกลม ย้อมสารละลายไอโอดีน 2% ติดสีน้ำเงินเข้ม โดยเนื้อเยื่อที่พบเป็นส่วนใหญ่ในผงยาจากเนื้อไม้ชะเอมไทยทั้ง 3 แหล่ง คือ starch grains, border-pitted vessels, ray parenchyma with starch grains, phloem (bast) fibers และ fibers with calcium oxalate prism เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลรายงานวิจัยที่ผ่านมาของ นฤมลและประนอม (2534) พบว่าเนื้อเยื่อ ray parenchyma with starch grains และ phloem parenchyma with starch grains ไม่เคยมีรายงานในผงยาของพืชชะเอมไทย (*A. myriophylla*) มาก่อนหน้านี้ ข้อมูลจากงานวิจัยนี้เป็นการเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับเอกลักษณ์ผงยาจากเนื้อไม้ชะเอมไทยรวมถึงอาจใช้เป็นข้อมูลในการบ่งชี้ถึงสิ่งปลอมปนหรือเพื่อช่วยเป็นข้อมูลประกอบในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเนื้อไม้ชะเอมไทยร่วมกับวิธีอื่น เช่น การตรวจด้วยทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีหรือทีแอลซี (Thin Layer Chromatography; TLC) ได้อีกด้วย

จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดเอทานอลของเนื้อไม้ชะเอมไทย (*A. myriophylla*) มีองค์ประกอบของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์หลายชนิด เช่น lupinifolin, 8-methoxy-7,3',4'-trihydroxyflavone, 7,8,3',4'-tetrahydroxyflavone และ 3,4,7,3'-tetrahydroxyflavan เป็นต้น (Joycharat et al., 2013; 2016) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งพบว่าสารสกัดเอทานอลของเนื้อไม้ชะเอมไทยจากทั้ง 3 แหล่งธรรมชาติ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดน้ำจากส่วนเนื้อไม้ของพืชชนิดนี้ ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าสารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติหลายชนิด เป็นสารสำคัญที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ ของพืชสมุนไพร รวมทั้งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Shapoval and Gromovaia, 2003) จากข้อมูลรายงานวิจัยที่ผ่านมายังพบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์หลายชนิดที่แยกได้จากเนื้อไม้ชะเอมไทยเป็นตัวออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญของพืชสมุนไพรชนิดนี้ โดยพบว่า lupinifolin, 8-methoxy-7,3',4'-trihydroxyflavone และ 7,8,3',4'-tetrahydroxyflavone แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด เช่น *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร lupinifolin ซึ่งพบเป็นสารประกอบเคมีในพืชหลายชนิดรวมทั้งพืชสมุนไพรไทยชนิดอื่นที่มีชื่อท้องถิ่นว่าชะเอม เช่น *Derris reticulata* และ *Myriopteron extensum* เป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคฟันผุ *S. mutans* ได้ในระดับดีมาก (Joycharat et al., 2013; 2016) โดยคาดว่าสารชนิดนี้น่าจะเป็นตัวออกฤทธิ์ที่สำคัญของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านเชื้อก่อโรคฟันผุ (นันทิยา และคณะ 2557) นอกจากนี้จากรายงานวิจัยเมื่อไม่นานมานี้ยังพบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ 2 ชนิด จากชะเอมไทยได้แก่ 8-methoxy-7,3',4'-trihydroxyflavone และสาร 7,8,3',4'-tetrahydroxyflavone อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการรักษาโรคเบาหวานของตำรับยาที่มีชะเอมไทยเป็นสมุนไพรองค์ประกอบ โดยพบว่าสารทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว

แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอะคาร์โบส ดังนั้นจากผลการศึกษานี้จึงมีความเป็นไปได้อย่างมากที่สารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดเอทานอลของชะเอมไทย โดยเฉพาะในกลุ่มฟลาโวนอยด์จะเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรชนิดนี้

ในปัจจุบันพบว่าการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชะเอมไทยยังมีไม่มากนัก ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดเอทานอลจากส่วนเถาของพืชสมุนไพรชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 14.45 mg/mL และมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.70 mg/mL (Steinrut et al., 2011) ในขณะที่ในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้รายงานข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำจากเนื้อไม้ชะเอมไทยโดยใช้การทดสอบด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตัวอย่างชะเอมไทยที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติทั้ง 3 แหล่ง มีลักษณะเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ สารสกัดเอทานอลจากตัวอย่างพืชสมุนไพรชนิดนี้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP ที่ดีกว่าสารสกัดน้ำอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาตัวอย่างชะเอมไทยจากแต่ละแหล่งที่ศึกษาพบว่าแต่ละตัวอย่างแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันไป โดยตัวอย่าง VI01 จาก อ.เมือง จ.พัทลุง ซึ่งพื้นที่เก็บมีลักษณะเป็นพื้นราบในสวนยาง ใกล้แหล่งน้ำ จะมีแนวโน้มของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าตัวอย่าง VI02 ซึ่งพื้นที่เก็บมีลักษณะเป็นพื้นราบในสวนยางที่ไม่พบแหล่งน้ำบริเวณใกล้เคียง และตัวอย่าง VI03 ซึ่งพื้นที่เก็บมีลักษณะเป็นพื้นที่สูงบนเขา ทั้งนี้เป็นที่ทราบกันดีว่าฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรชนิดต่างๆ อาจมีความแปรผันกันไปเนื่องจากชนิดและปริมาณสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบ โดยปริมาณสารสำคัญที่มีในสมุนไพรชนิดเดียวกัน จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง โดยสิ่งแวดล้อมต่างๆ ของพืช รวมถึงแหล่งปลูกนับว่าเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งซึ่งอาจส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญได้ (รัตนา, 2547; วีณา, 2554) การศึกษาในครั้งนี้ของคณะผู้วิจัยซึ่งพบความสอดคล้องกันระหว่างปริมาณสารฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตัวอย่างเนื้อไม้ชะเอมไทยจากทั้ง 3 แหล่งธรรมชาติที่ศึกษา คือ สารสกัดเอทานอลซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดน้ำจะพบแนวโน้มของการมีปริมาณสารฟีนอลรวมที่สูงกว่าด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยต่างๆ ที่ผ่านมาโดยข้อมูลผลการศึกษามักจะพบความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพร (Thaipong et al., 2006) นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รายงานข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพิกัดยาชะเอมทั้ง 2 และพืชสมุนไพรองค์ประกอบ คือ ชะเอมไทย (*A. myriophylla*) และชะเอมเทศ (*G. glabra*) โดยจากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเอทานอลของพิกัดยาชะเอมทั้ง 2 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดเอทานอลของชะเอมไทย ในขณะที่สารสกัดน้ำของชะเอมไทยแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกับสารสกัดน้ำของพิกัดยาชะเอมทั้ง 2 โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดต่างๆ เรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ดังนี้ สารสกัดเอทานอลพิกัดยาชะเอมทั้ง 2 > สารสกัดเอทานอลชะเอมเทศ > สารสกัดเอทานอลชะเอมไทย > สารสกัดน้ำชะเอมไทย > สารสกัดน้ำพิกัดยาชะเอมทั้ง 2 > สารสกัดน้ำชะเอมเทศ ทั้งนี้เนื่องจากการปรุงยาตามหลักเภสัชกรรมไทย จะไม่ทำการสกัดกลั่นเอาตัวยาออกฤทธิ์ออกมาใช้ในรูปแบบสารบริสุทธิ์ แต่จะใช้สมุนไพรหลายชนิดร่วมกันเพื่อหวังผลในการช่วยเสริมฤทธิ์ในการรักษาโรค โดยชะเอมทั้ง 2 เป็นสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยาแผนไทยหลายตำรับซึ่งมีสรรพคุณ ได้แก่ แก้โรคในปากในลำคอ (เช่น โรคเหงือกอักเสบ เจ็บคอ แผลในปาก) แก้ไอ ขับเสมหะ ทำให้ชุ่มคอ แก้กระหายน้ำ แก้เลือดออกตามไรฟัน บำรุงธาตุ บำรุงกำลัง บำรุงปอด บำรุงหัวใจ แก้ไข้ แก้อ่อนเพลีย (คณะกรรมการคัดสรรและเผยแพร่วรรณกรรมของชาติ 2542) โดยจากรายงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่พบข้อมูลสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชะเอมไทย ในขณะที่พบข้อมูลสารประกอบเคมีในชะเอมเทศหลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จำพวกชาลโคน (chalcones) จะเป็นสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมุลอิสระในพืชชนิดนี้ (Hosseinzadeh and Nassiri-Asl, 2015) ซึ่งจากรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีกับฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดที่โครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยพันธะคู่ระหว่าง C-2 และ C-3 หมู่คาร์บอนิลที่ C-4 และหมู่ไฮดรอกซี (hydroxy group) ใน B-ring จะมีส่วนสำคัญเป็นอย่างมากต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชสมุนไพร (Zhang et al., 2015) ทั้งนี้พืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระจะช่วยป้องกันหรือลด

ภาวะแทรกซ้อนจากโรคต่างๆที่มีสาเหตุสัมพันธ์กับภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ได้ (Jin et al., 2012)

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้เป็นการเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับเอกลักษณ์ผงยาจากเนื้อไม้ชะเอมไทย โดยเป็นครั้งแรกของการรายงานการพบเนื้อเยื่อ parenchyma rays with starch grains และ phloem fiber with starch grains ในผงยาจากเนื้อไม้พืชสมุนไพรนี้ นอกจากนี้จากผลการศึกษายังพบว่าสารสกัดเอทานอลจากเนื้อไม้ชะเอมไทยมีแนวโน้มในการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดน้ำจากเนื้อไม้ของพืช โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้จะสอดคล้องกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP คือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดชะเอมไทยจะมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรชนิดนี้ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้อาจใช้เป็น ข้อมูลเบื้องต้นเพื่อช่วยประกอบในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเนื้อไม้ชะเอมไทยร่วมกับวิธีทีแอลซี รวมถึงอาจเป็นข้อมูลเบื้องต้นสนับสนุนการเลือกใช้เนื้อไม้ชะเอมไทยเป็นวัตถุดิบสมุนไพรสำหรับรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียดออกซิเดชันได้ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

คณะกรรมการคัดสรรและเผยแพร่วรรณกรรมของชาติ. (2542). แพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ ภูมิปัญญาทางการแพทย์และมรดกทางวรรณกรรมของชาติ. กรุงเทพฯ: สถาบันภาษาไทย กรมวิชาการ กระทรวงศึกษาธิการ. หน้า 193-194.

ถนอมจิต สุภาวิดา. (2553). การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเภสัชเวท การตรวจเนื้อเยื่อพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์. สงขลา: ศูนย์สมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 9-10.

นันทิยา จ้อยชะรัด จันจีรา บุญมา ศรัญญา เมืองเหนือ ภัคจิรา ภูริศักดิ์ไพศาล ชิดหทัย สุวรรณวงศ์ และสุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ. (2557). ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Streptococcus mutans* ของสารลูปินิโฟลินในสารสกัดหยาบเอทานอลของชะเอม. ว.วิทย. มข. 42(4): 806-819.

นันทิยา จ้อยชะรัด เดโช ธรรมมณี ณภัทร พรหมจรรย์ สฤษดิ์ ตรีมณี ธนเทพ ปูเงิน ชลทิต สนธิเมือง และสุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ. (2560). ลักษณะทางกายภาพ ปริมาณสารลูปินิโฟลิน และฤทธิ์ทางชีวภาพของเนื้อไม้ชะเอม. ว. วิทย. มข. 45(1): 68-82.

นันทิยา จ้อยชะรัด และสุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ. (2556). ฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุล *Albizia*. ว. วิทย. มข. 41(3): 542-566.

นพมาศ สุนทราเจริญนนท์ และนงลักษณ์ เรืองวิเศษ. (2551). วิเคราะห์วิจัย คุณภาพเครื่องยาไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: คอนเซ็พท์เมดิคัส.

นฤมล มงคลชัยภักดิ์ และประนอม เดชวิศิษฏ์สกุล. (2534). คุณสมบัติทางเภสัชเวทของเนื้อไม้ชะเอมไทยและเหง้าชะเอมจีน. ว. กรมวิทย. พ. 33(3): 91-100.

พฤฒาจารย์ วิพุธโยคะ รัตนรังษี. (2534). เพชรน้ำหนึ่งของโบราณาจารย์. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์. หน้า 297.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ: บริษัท แอคทีฟ พริ้นท์ จำกัด.

ประกอบ อุบลขาว จิตตะเสน เจริญ และจำรูญ วงศ์กระจ่าง. (2547). ศึกษาภูมิปัญญาด้านการใช้สมุนไพรบำบัดโรคด้วยตนเองของหมอชาวบ้าน ในจังหวัดสงขลา. รายงานวิจัย. สำนักงานคณะกรรมการวัฒนธรรมแห่งชาติ กระทรวงวัฒนธรรม. กรุงเทพฯ.

วีณา จิรัจฉริยากูล. (2554). พฤกษเภสัชภัณฑ์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

เต็ม สมิตินันทน์. (2557). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ. หน้า 393.

สมพร ภูติยานันต์. (2542). การตรวจเอกลักษณ์ พืชสมุนไพร ภาคพิเศษ. กรุงเทพ: โครงการพัฒนาตำราสถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. หน้า 702-713.

อาทร ริ้วไพบูลย์ วัชรา ริ้วไพบูลย์ วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล คงเดช ลิโทชวลิต พัณณิกา ชื่นกลิ่นธูป อุไร บุญญะกรรจ์ และเกยูร บุญทัศนา. (2536). การใช้สมุนไพรของผู้ป่วยเบาหวาน ที่มารับบริการที่โรงพยาบาลชุมชนในจังหวัดนครปฐม. วารสารกรมการแพทย์. 18(5): 232-238

Asano, N., Yamauchi, T., Kagamifuchi, K., Shimizu, N., Takahashi, S., Takatsuka, H., Ikeda, K., Kizu, H., Chuakul, W., Kettawan, A., Okamoto, T. (2005). Iminosugar-production Thai medicinal plant. J Nat Prod. 68(8): 1238-1242.

Chattopadhyay, K. and Chattopadhyay, B. D. (2008). Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation & antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein. Indian J Med Res. 127(6): 571-576.

Chusri, S., Chaicoch, N., Thongza-Ard, W., Limsuwan, S., Voravuthikunchai, S. P. (2012). In vitro antibacterial activity of ethanol extracts of nine herbal formulas and its plant components used for skin infections in southern Thailand. J Med Plant Res. 6(44): 5616-5623.

Hosseinzadeh, H. and Nassiri-Asl M. (2015). Pharmacological Effects of *Glycryrhiza* spp. and its bioactive constituents: update and review. Phytother Res. 29(12): 1868-1886.

Ito, A., Kasai, R., Duc, N.M., Ohtani, K., Nham, N.T., Yamasaki, K. (1994). Alkaloid from bark of *Albizzia myriophylla*. Chem Pharm Bull. 42: 1966-1967.

Jin, S.E., Son, Y.K., Min, B-S., Jung, H.A. and Choi, J.S. (2012). Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from *Pueraria lobata* roots. Arch Pharm Res. 35(5): 823-837.

Joycharat, N., Boonma, C., Thammavong, S., Yingyongnarongkul, B., Limsuwan, S. and Voravuthikunchai, S. P. (2016). Chemical constituents and biological activities of *Albizia myriophylla* wood. Pharm Biol. 54(1): 62-73.

Joycharat, N., Limsuwan, S., Subhadhirasakul, S., Voravuthi-kunchai, S. P., Pratumwan, S., Madahin, I., Nuankaew, W. and Promsawat, A. (2012). Anti-*Streptococcus mutans* efficacy of Thai herbal formula used as a remedy for dental caries. Pharm Biol. 50(8): 941-947.

Joycharat, N., Thammavong, S., Limsuwan, S., Homlaead, S., Voravuthikunchai, S. P., Yingyongnarongkul, B., Dej-adisai, S. and Subhadhirasakul, S. (2013). Antibacterial substances from *Albizia myriophylla* wood against cariogenic *Streptococcus mutans*. Arch Pharm Res. 36(6): 723-730.

Limon-Pacheco, J. and Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mutat Res. 674(1-2): 137-147.

Meghashri, S., Chauhan, J. B., Zameer, F. (2012). Contribution of herbal principles towards cytoprotective, antioxidant and anti-*Rhizopus* activities. S Afr J Bot. 81: 29-33.

Neamsuvan, O., Madeebing, N., Mah, L., Lateh, W. (2015). A survey of medicinal plants for diabetes treating from Chana and Nathawee district, Songkhla province, Thailand. J Ethnopharmacol. 174: 82-90.

Panmei, C., Singh, P. K., Gautam, S., Variyar, P. S., Devi, G. A. S., Sharma, A. (2007). Phenolic acids in *Albizia* bark used as a starter for rice fermentation in zou preparation. J Food Agric & Environ. 5(3-4): 147-150.

Phavanantha, P., Taga, T. (1990). Crystal and molecular structure of an alkaloid palustrine, 17-(1-hydroxypropyl)-1,5.10-triazabicyclo (11,4o1) heptadec-14-en-11-one. 16th conference on science and technology of Thailand: 389-390.

Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clin Interv Aging. 2(2): 219–236.

Rukayadi, Y., Shim, J. S., Hwang, J. K. (2008). Screening of Thai medicinal plants for anticandidal activity. Mycoses 51(4): 308-312.

Saralamp, P., Chuakul, W., Temsiririrkkul, R., Clayton, T. (1996). Medicinal Plant in Thailand. Bangkok: Mahidol University.

Shapoval, G. S. and Gromovaia, V. F. (2003). Mechanism of antioxidant protection of an organism from oxidative stress. Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal. 75(2): 5-13.

Steinrut, L., Itharat, A., Ruangnoo, S. (2011). Free radical scavenging and lipid peroxidation of Thai medicinal plants used for diabetic treatment. J Med Assoc. Thai. 94: 178-182.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrnec, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. J Food Comp Anal. 19(6-7): 669-675.

Wang, L., Luo, Y., Wu, Y., Wu, Z. (2018). Impact of fermentation degree on phenolic compositions and bioactivities during the fermentation of guava leaves with *Monascus anka* and *Bacillus* sp. J Funct Foods. 41: 183–190.

White, M. J. (1999). Mediators of inflammation and inflammatory process. J Allergy Clin Immunol. 103: S378–S381.

Yildirim, A., Mavi, A., Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. J Agri Food Chem. 49(8): 4083-4089.

Yoshikawa, M., Morikawa, T., Nakano, K., Pongpiriyadacha, Y., Murakami, T. and Matsuda, H. (2002). Characterization of new sweet triterpene saponins from *Albizia myriophylla*. J Nat Prod. 65(11): 1638-1642.

Zhang, Y., Gan, R., Li, S., Zhou, Y., Li, A., Xu, D., Li, H. (2015). Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. Molecules. 20(12): 21138-21156.

❑❑❑❑❑