

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเหงือกช้าง ช้างไทย มะเดื่ออินเดีย และผลด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์

Antioxidant Activity of *Markhamia stipulata*, *Caryota maxima*, *Amphineurion marginatum* Extracts and Cytotoxicity Effect on Human Dermal Fibroblast Cells

นวลไย ยารักษา^{1*}

Nualyai Yaraksa^{1*}

Received: December 6, 2018; Revised: February 1, 2019; Accepted: February 6, 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย 3 ชนิด ได้แก่ เหงือกช้าง (*Markhamia stipulata*) ช้างไทย (*Caryota maxima*) และมะเดื่ออินเดีย (*Amphineurion marginatum*) และศึกษาผลด้านความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ชนิดไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ โดยสกัดสารด้วยตัวทำละลายเมทานอลหาปริมาณฟีนอลรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu วิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay และวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากมะเดื่ออินเดียมีปริมาณฟีนอลรวมมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 106.34 ± 2.40 mgGAE/g extract และยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.15 ± 0.01 mg/L และความสามารถในการให้อิเล็กตรอนอิสระของสารสกัดเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP พบว่าสารสกัดทั้งหมดมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนอิสระ และมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่ใช้ โดยพบว่าสารสกัดจากมะเดื่ออินเดีย มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนอิสระได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากช้างไทย และสารสกัดจากเหงือกช้าง ตามลำดับ ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ของสารสกัดสมุนไพร พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 62.5 ถึง 1,000 mg/L สารสกัดช้างไทย ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ ส่วนสารสกัดจากเหงือกช้าง และสารสกัดมะเดื่ออินเดียแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ที่ความเข้มข้น 1,000 mg/L จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากช้างไทยและ

¹ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี อุบลราชธานี

¹ Faculty of Science, Ubon Ratchathani Rajabhat University, Ubon Ratchathani

* Corresponding Author E - mail Address: nualyai.yaraksa@gmail.com

มะเดื่ออินทียี่สิบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ต่ำ

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; สารสกัดสมุนไพร; แคหางค่าง; เชื้อใหญ่; มะเดื่ออิน

Abstract

The aims of this study were to investigate antioxidant activity of crude extracts from three Thai medicinal plants (*Markhamia stipulata*, *Caryota maxima* and *Amphineurion marginatum*) and examine the cytotoxicity effect on human dermal fibroblast cells. The solvent used for extraction was methanol. The Folin-Ciocalteu analysis was used for the standard method of phenolic determination and the antioxidant was evaluated by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging capacity (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. The results showed that the extract of *Amphineurion marginatum* had the highest total phenolic content of 106.34 ± 2.40 mgGAE/g extract and the highest antioxidant capacity against DPPH with IC_{50} value of 11.15 ± 0.01 mg/L. For the reducing capability of all extracts with FRAP method, they showed the reducing antioxidant activities and possessed concentration dependence by which *Amphineurion marginatum* extract revealed highest reducing ferric ability followed by *Caryota maxima* and *Markhamia stipulata* extracts, respectively. The cytotoxic assay of the extracts on human dermal fibroblast cells revealed that *Caryota maxima* extract showed did not have cytotoxic effects at concentrations of 62.5 - 1,000 mg/L. The extracts of *Markhamia stipulata* and *Amphineurion marginatum* were cytotoxic at concentration of 1,000 mg/L. The results suggested that *Caryota maxima* and *Amphineurion marginatum* extracts showed promising antioxidant effect but low cytotoxicity effect on human dermal fibroblast cells.

Keywords: Antioxidant Activity; Medicinal Plant Extracts; *Markhamia stipulata*; *Caryota maxima*; *Amphineurion marginatum*

บทนำ

อนุมูลอิสระในร่างกาย มีปัจจัยที่เกิดขึ้นมากมายทั้งภายนอกและภายในร่างกาย สารที่นำมาใช้ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้าน อนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (Radical Scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (Singlet Oxygen Quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Metal Chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain-Breaking)

เสริมฤทธิ์ (Synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme Inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น [1] จึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ วิถีชีวิตในปัจจุบันที่เปลี่ยนแปลงไป การไม่ใส่ใจสุขภาพ ไม่ว่าจะเป็นเรื่องการคัดเลือกคุณค่า และปริมาณของอาหารที่รับประทานที่ไม่เหมาะสม การพักผ่อนไม่เพียงพอ ไม่มีเวลาสำหรับการออกกำลังกายและมลภาวะรอบตัว ซึ่งล้วนเป็นปัจจัยที่เพิ่มอนุมูลอิสระในตัวเรา ซึ่งในทางการแพทย์พบว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์เสื่อมนำไปสู่การแก่ชราหรือความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน และโรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น [2] ทำให้พบปัญหาสุขภาพจากโรคเรื้อรังมากขึ้นในช่วงอายุที่น้อยลงด้วยเหตุนี้จึงเป็นผลที่ทำให้ต้องใช้ยาในการรักษา แต่การใช้ยารักษาในปริมาณมากเป็นเวลานาน ๆ อาจจะส่งผลเสียต่อร่างกายได้เช่นเดียวกัน แต่ในปัจจุบันมีอีกหนทางเลือกในการรักษาโรคคือ การใช้พืชสมุนไพร การบริโภคผักและผลไม้ ซึ่งมีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด โดยพืชเป็นแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น cucurminoids จาก *Curcumaca cassumunar* และ catechin derivatives จากชา *Thea sianensis* เป็นต้น [3] โดยกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ที่พบในสมุนไพรได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์และวิตามินต่าง ๆ [4]

กระแสนิยมด้านสมุนไพรกำลังพัฒนาอย่างรวดเร็ว เป็นที่สนใจอย่างมากในปัจจุบัน ไม่ว่าจะเป็นการใช้สมุนไพรเพื่อเป็นยารักษาโรค เป็นองค์ประกอบสำคัญหรือเป็นสารออกฤทธิ์ในเวชสำอาง และเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมไปด้วยทรัพยากรสมุนไพรที่หลากหลายทางผู้วิจัยมีความสนใจเกี่ยวกับสมบัติของพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ในการรักษาบาดแผล และรักษาโรคผิวหนัง พืชสมุนไพรที่ช่วยในการรักษาบาดแผล ส่วนใหญ่จะมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง สารสกัดสมุนไพรจะทำหน้าที่ดักจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากกระบวนการอักเสบในขณะที่เกิดบาดแผล และนอกจากนี้ยังส่งเสริมการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เอ็นโดเธลิอัล และเคราตินocytes ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหายของบาดแผล [5] จากภูมิปัญญาท้องถิ่นพบว่าพืชสมุนไพรแคหางค่าง (*Markhamia stipulata*) เชือกใหญ่ (*Caryota maxima*) และมะเดื่อดิน (*Amphineurion marginatum*) มีสมบัติช่วยในการหายของบาดแผล โดยเฉพาะแผลที่พุพอง เป็นตุ่มหนอง โดยจะพบได้มากตามป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง ป่าหญา ทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคใต้ และทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ [6] พบว่า สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทานอลของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดนี้ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio cholerae* (clinical), *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 และ *Escherichia coli* ATCC25922 และสารสกัดมะเดื่อดินสามารถยับยั้งการสร้างสารไนตริกออกไซด์ (Nitric Oxide, NO) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ซึ่งเป็น inflammatory mediator ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ แต่พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) เป็นไปได้ว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดนี้น่าจะมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพรไทย 3 ชนิด ได้แก่ แคหางค่าง เชือกใหญ่ และมะเดื่อดิน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ [6] พบว่าสารสกัดที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) จากนั้นศึกษาผลด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ ซึ่งเป็น

ด่านแรกในการสัมผัสกับสารเคมีโดยตรงเป็นตัวทดสอบ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำพืชสมุนไพรนี้ไปประยุกต์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวพรรณหรือเครื่องสำอางที่ได้จากธรรมชาติแทนสารสังเคราะห์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แหล่งที่มาของตัวอย่างพืช

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย คือ พืชสมุนไพร 3 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย แคหางค่าง เขืองใหญ่ และมะเดื่อดิน จากพื้นที่ศูนย์การเรียนรู้วัดป่าดงไทรทอง อำเภอบ้านดุง จังหวัดอุดรธานี เก็บตัวอย่างช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2560 ขอความอนุเคราะห์ศูนย์วิจัยอนุกรมวิธานประยุกต์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อระบุชื่อวิทยาศาสตร์

2. การสกัดสมุนไพรด้วยเมทานอล

นำส่วนเปลือกไม้ของสมุนไพรที่ใช้ทดสอบมาอบแห้งแล้วบดหยาบ ซึ่งตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดแล้ว 500 กรัม แช่ด้วยเมทานอลด้วยอัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 ต่อ 4 เป็นเวลา 1 วัน กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman filter paper เบอร์ 1 และนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator (BÜCHI Rotavapor R-124, Marshall Scientific) ทำการหมักซ้ำ 3 รอบ นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบลดความดันโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 50 - 60 องศาเซลเซียส (°C) จนได้ของเหลวเหนียว จากนั้นชั่งน้ำหนักสารและคำนวณหาปริมาณเนื้อสารที่สกัดได้ (% yield) และนำสารสกัดไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3. การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent

ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Singleton, V. L. and Rossi, J. A. [7] ซึ่งสารสกัดหยาบสมุนไพร 0.1 g ละลายในเมทานอล 10 mL จากนั้นปิเปตสารสกัด 100 μ L ใส่ในหลอดทดลองเติมน้ำกลั่น 4.5 mL เติม Folin-ciocalteu's reagent 100 μ L และเติม 7 % Na_2CO_3 300 μ L ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Lambda 12, Perkin Elmer) นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้น 50 100 150 200 และ 250 mg/L

4. การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay

ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Kriengsak, T., et al. [8] เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบและสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกให้มีความเข้มข้น 6.25 12.5 25 และ 50 mg/L ปิเปตสารละลายของสารสกัดแต่ละความเข้มข้นใส่ในขวดสีชาจำนวน 3 ขวด ขวดละ 400 μ L จากนั้นเติม 6 μ M DPPH 3.8 mL นำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Lambda 12, Perkin Elmer) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชันเป็น % Inhibition (% Inhibition = $[(\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs}_{\text{DPPH+test}}) \times 100] / \text{Abs}_{\text{DPPH}}$ เขียนกราฟระหว่าง % Inhibition และความเข้มข้น รายงานเป็นค่า IC_{50} (50 % Inhibition concentration) และเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

5. การวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระ ด้วยวิธี **Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay**

ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก สุชาติ มาณอก และปวีณา ลิ้มเจริญ [9] วิธีเตรียมสารละลาย **FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)** ทำได้โดยการเตรียมสารละลาย acetate buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) ในสารละลาย 40 mM ของ HCl และ 20 mM ของ ferric chloride แล้วนำมาผสมกันในสัดส่วน 10 : 1 : 1 (V/V) ตามลำดับ จะได้สารละลายที่เรียกว่า สารละลาย FRAP [10] จากนั้นเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบ 3 ความเข้มข้น คือ 1,000 500 และ 250 ppm

วิธีวิเคราะห์ ปิเปตสารละลายของสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมา 300 μL ใส่ในขวดสีชาสามขวดต่อหนึ่งความเข้มข้น เติม 3 mL ของสารละลาย FRAP นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้ FRAP reagent เป็นกลุ่มควบคุม คำนวณความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (FRAP value) โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ Ferrous sulfate (FeSO_4) แสดงค่าในรูปมิลลิกรัมสมมูลของ Fe^{2+} /กรัมสารสกัด (mg Fe^{2+} equivalent/g sample extract)

6. ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์ชนิดไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ ด้วยวิธี **MTT assay**

เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ (Normal Human Dermal Fibroblast; NHDF) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่มีส่วนประกอบของ 10 % (v/v) fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 mg/L streptomycin และ 25 mg/L amphotericin B จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5 % อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ และทำการ sub-cultured ทุก ๆ 3 วัน นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์มาเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์ต่อ 1 well จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5 % อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ หลังจากครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออก และเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดสมุนไพรอยู่ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (62.5 - 1,000 mg/L) ส่วนกลุ่มควบคุม (control) คือ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ไม่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จากนั้นนำไปเลี้ยงใน 5 % CO_2 incubator ที่มีอุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากงานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม เปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ละลายอยู่ในความเข้มข้น 0.5 mg/ml จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5 % อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที เปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากงานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม จากนั้นเติม 100 % DMSO ปริมาณ 150 μL /well เพื่อละลายผลึก formazan salt ผสมสารละลายให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวแล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader (Model 680, BioRad) โดยสาร MTT จะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบสีม่วง formazan โดยเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิต ค่าความเข้มของสีที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ คำนวณค่าร้อยละความมีชีวิต (Cell Viability) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดสมุนไพร โดยแสดง

ค่าร้อยละความมีชีวิตในรูปของ % of control โดยให้กลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดสมุนไพรมีค่าร้อยละความมีชีวิตเท่ากับ 100 %

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. (n = 3) (P < 0.05) ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) โดยวิธี Dunnett's test

ผลการวิจัย

1. การสกัดสารจากสมุนไพร

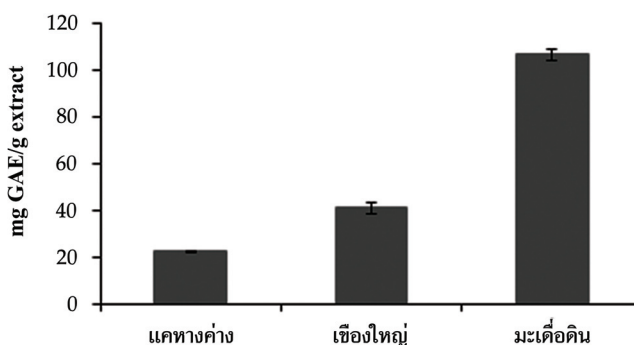
สมุนไพรไทยจำนวน 3 ชนิด เมื่อนำมาสกัดด้วยเมทานอลได้สารสกัดที่ได้มีลักษณะดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งสารสกัดแฉทางค่างได้ผลผลิต (%yield) สูงสุดคือร้อยละ 8.19

ตารางที่ 1 ลักษณะของสารสกัดสมุนไพรและร้อยละของสารสกัดค่อน้ำหนักแห้ง (%Yield)

ชนิดของสารสกัดหยาบ	ลักษณะของสารสกัด	%Yield
แฉทางค่าง	เหนียว สีแดงอมส้ม	8.19
เชียงใหญ่	เหนียวข้น สีเขียวเข้ม	5.70
มะเดื่อดิน	เหนียวข้น สีแดงอมสีน้ำตาล	4.45

2. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

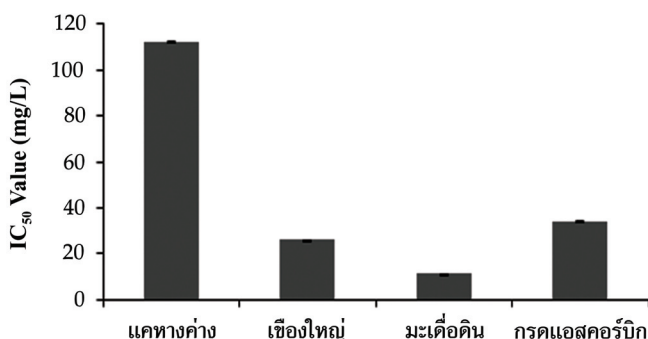
ในการทดสอบสารสกัดพืชสมุนไพรไทย 3 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย แฉทางค่าง เชียงใหญ่ และมะเดื่อดิน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลพบว่า สารสกัดจากมะเดื่อดินมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด คือ 106.34 ± 2.40 mgGAE/g extract รองลงมาคือ สารสกัดเชียงใหญ่ มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 40.78 ± 2.72 mgGAE/g extract และสารสกัดแฉทางค่างมีปริมาณฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด คือ 22.15 ± 0.58 mgGAE/g extract ผลแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากแฉทางค่าง เชียงใหญ่ และมะเดื่อดิน

3. การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

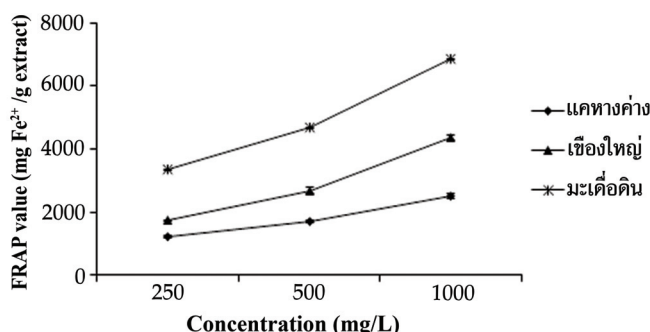
จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองเมื่อทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดจากมะเดื่อดินมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้มากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.15 ± 0.01 mg/L รองลงมาคือ สารสกัดจากเชื้อใหญ่ กรดแอสคอร์บิก และสารสกัดจากแห้วหางค่าง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 26.07 ± 0.02 , 34.22 ± 0.01 และ 112 ± 0.27 mg/L ตามลำดับ ผลแสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธี DPPH assay ของสารสกัดหยาบจากแห้วหางค่าง เชื้อใหญ่ มะเดื่อดิน และกรดแอสคอร์บิก

4. การวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระ ด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay

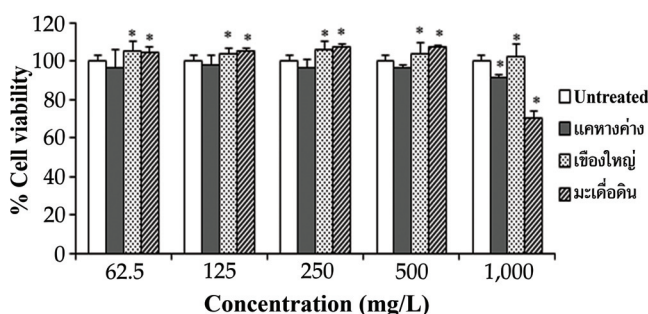
ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนอิสระ และมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่ใช้ แต่มี FRAP value (mg Fe^{2+} equivalent/g sample extract) ที่แตกต่างกัน เช่น เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้น 1,000 mg/L จะเห็นลำดับของความสามารถในการให้อิเล็กตรอนจากสูงไปต่ำดังนี้ คือ สารสกัดจากมะเดื่อดิน สารสกัดจากเชื้อใหญ่ และสารสกัดจากแห้วหางค่าง ตามลำดับ โดยค่า FRAP value (mg Fe^{2+} equivalent/g sample extract) ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธี FRAP assay ของสารสกัดหยาบจากแควทางค่าง เชียงใหญ่ และมะเดื่อคิน

5. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์ชนิดไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรไทย 3 ชนิดต่อเซลล์ชนิดไฟโบรบลาสต์ของมนุษย์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 62.5 ถึง 1,000 mg/L สารสกัดจากเชียงใหญ่ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ ส่วนสารสกัดจากแควทางค่าง และสารสกัดจากมะเดื่อคิน ที่ความเข้มข้น 62.5 - 500 mg/L ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึง 1,000 mg/L จะแสดงความเป็นพิษอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเป็นที่น่าสนใจว่า สารสกัดจากเชียงใหญ่และสารสกัดจากมะเดื่อคินสามารถกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวน (Cell Proliferation) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ 0.5 % DMSO) ผลแสดงดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ร้อยละความมีชีวิต (% Cell Viability) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากแควทางค่าง เชียงใหญ่ และมะเดื่อคิน

* แสดงถึงความแตกต่างของชุดข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Untreated control)

การอภิปรายผล

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดพืชสมุนไพรไทย 3 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย แคหางค่าง เชื้อใหญ่ และมะเดื่อดิน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลในครั้งนี้ เลือกรทดสอบคุณสมบัติในการเป็น ตัวขจัดอนุมูลอิสระ (Free radical scavenger) ด้วยวิธี DPPH ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจาก DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร โดยอนุมูล DPPH[•] เป็นอนุมูลไนโตรเจนคงตัว มีสีม่วง อยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว ไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดเป็นอนุมูลเหมือนกับกรณีอนุมูล ABTS^{•+} โดยเป็นการวัด ความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีไฮโดรเจนอะตอม ซึ่งเป็นวิธีเบื้องต้นที่นิยมใช้ ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยทั่วไป [9] โดยผลที่ได้จากการทดลองวิธีนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัด จากพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยสารสกัดจากมะเดื่อดินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล อิสระได้ดีที่สุด อีกทั้งยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า กรดแอสคอร์บิก และยังสอดคล้องกับ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยพบว่าสารสกัดจากมะเดื่อดินมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด (106.34±2.40 mgGAE/g extract) ซึ่งปริมาณฟีนอลิกที่สูงจะส่งผลให้มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างหลักประกอบด้วย วงอะโรมาติกแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล ส่วนมากเป็นสารที่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายจำพวกแอลกอฮอล์ได้ดี กลไกของสารจำพวกฟีนอลที่แสดง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ เมื่อมีอนุมูลอิสระมาติดอิเล็กตรอนไปแต่โครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่น จึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (Delocalization) ทำให้โครงสร้างเสถียร ไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป ปฏิกิริยาถูกใช้จึงสิ้นสุดลง [9] นอกจากนี้ยังได้ศึกษาสมบัติในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนของสารตัวอย่างแก่อนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นภายในระบบ โดยอาศัยการวัดปฏิกิริยา Reduction ของ Fe³⁺-TPTZ ไปเป็น Fe²⁺-TPTZ ด้วยวิธี FRAP assay ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับวิธี DPPH โดยสารสกัดจากมะเดื่อดินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถให้อิเล็กตรอนในการรีดิวซ์ Fe³⁺ เป็น Fe²⁺ ได้ดีที่สุด จากงานวิจัยครั้งนี้พบว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดี มีความสามารถในการช่วยลด การอักเสบได้ กล่าวคือ สารสกัดจากมะเดื่อดินซึ่งมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุด สามารถยับยั้งการสร้างสารไนตริกออกไซด์ (Nitric Oxide, NO) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ซึ่งเป็น inflammatory mediator ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ [6] โดยสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้าน ออกซิเดชันจะทำหน้าที่ดักจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากกระบวนการอักเสบในขณะที่เกิดบาดแผล และนอกจากนี้ ยังส่งเสริมการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เอ็นโดทีเลียล และเคราติโนไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่บทบาทสำคัญ ในกระบวนการหายของบาดแผล [5] เนื่องจากสารสกัดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นสารสกัดหยาบ ซึ่งประกอบด้วยสารพฤษเคมีหลายชนิด ซึ่งต้องมีการศึกษาโครงสร้างเพื่อระบุชนิดของสารที่เป็นตัวออก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป

เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพร 3 ชนิดไปประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ยา หรือครีมบำรุงผิวที่ช่วยต้านอนุมูลอิสระได้อย่างปลอดภัย ผู้วิจัยได้ศึกษาผลด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ ชนิดไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 62.5 - 1,000 mg/L สารสกัดเชื้อใหญ่ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ ส่วนสารสกัดแคหางค่างและสารสกัด มะเดื่อดินที่ความเข้มข้น 62.5 - 500 mg/L ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ และเป็นที่น่าสนใจว่า

สารสกัดจากเชียงใหญ่และสารสกัดจากมะเดื่อดินสามารถกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวน (Cell Proliferation) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ 0.5 % DMSO) ซึ่งคาดว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรสองชนิดนี้มีผลต่อการกระตุ้นการสร้างเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในชั้นผิวหนัง ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหายของบาดแผล แต่สารสกัดจากแคหางค่างและสารสกัดจากมะเดื่อดินเมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึง 1,000 mg/L จะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Satsue, S. et al. [11] ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์เพาะเลี้ยงของสารสกัดด้วยน้ำ และเอทานอลของพืช 2 ชนิดคือ บัวบก และแกนสับปะรด พบว่าที่ความเข้มข้น 500 mg/L มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ซึ่งที่ความเข้มข้น 1,000 mg/L ของสารสกัดใบบัวบกด้วย 95 % เอทานอล อาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์ได้

บทสรุป

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย 3 ชนิด ได้แก่ แคหางค่าง เชียงใหญ่ และมะเดื่อดิน พบว่าสารสกัดจากมะเดื่อดินมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด และยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดจากเชียงใหญ่ กรดแอสคอร์บิก และสารสกัดแคหางค่าง เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay และความสามารถในการให้อิเล็กตรอนอิสระของสารสกัดเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay โดยพบว่าสารสกัดจากมะเดื่อดินสามารถให้อิเล็กตรอนอิสระได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากเชียงใหญ่ และสารสกัดแคหางค่าง ตามลำดับ และมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่ใช้ ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ของสารสกัดสมุนไพรพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 62.5 - 1,000 mg/L สารสกัดจากเชียงใหญ่ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ ส่วนสารสกัดจากแคหางค่าง และสารสกัดจากมะเดื่อดินแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ที่ความเข้มข้น 1,000 mg/L จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเชียงใหญ่และมะเดื่อดินที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี และยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ต่ำ จึงควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์เพื่อนำไปพัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์บำรุงผิวต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณพื้นที่ศูนย์การเรียนรู้วัดป่าดงไทรทอง อำเภอทุ่งฝน จังหวัดอุดรธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร และขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม (ศปพ.) มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์และอนุเคราะห์เครื่องมืออุปกรณ์การทดลอง และสถานที่ทำการทดลอง

References

- [1] Phansawan, B. (2013). Free radicals, Antioxidants and Antioxidant Activity Determination. **Journal Science and Technology**. Vol. 21, No. 3, pp. 275-286 (in Thai)
- [2] Papus, M. A. (1998). **Antioxidants Status, Diet, Nutrition and Health**. U.S.A: CRC Press
- [3] Kaewamatawong, R. and Jounmunkong, Z. (2006). DPPH Free Radical Scavenging Activity and Total Phenol Compounds Content of Some Thai Medicinal Plant Extracts. **Journal of Ubon Ratchathani university**. Vol. 8, No. 2, pp. 76-88 (in Thai)
- [4] Halee, A. and Rattanapun, B. (2017). Study of Antioxidant Efficacies of 15 Local Herbs. **KMUTT Research and Development Journal**. Vol. 40, No. 2, pp. 283-293 (in Thai)
- [5] Ipek, S., Esra, K. A., Lutfun, N., and Satyajit, D. S. (2012). Wound Healing and Antioxidant Properties: Do They Coexist in Plants?. **Free Radicals and Antioxidants**. Vol. 2, Issue 2, pp. 1-7
- [6] Yaraksa, N. (2019). Antibacterial Activity Against four Human Pathogenic Bacteria and Anti-inflammatory Activity Evaluated from Five Thai Medicinal Plants. **SNRU Journal of Science and Technology**. Vol. 11, No. 1, pp. 1-10
- [7] Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. Vol. 16, pp. 144-158
- [8] Kriengsak, T., Unaroj, B., Kevin, C., Luis, C.-Z., and David, H. B. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC Assays Forestimating Antioxidant Activity from Guava Fruit Extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. Vol. 19, pp. 669-675. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.01.003
- [9] Manok, S. and Limcharoen, P. (2015). Investigating Antioxidant Activity by DPPH, ABTS and FRAP Assay and Total Phenolic Compounds of Herbal Extracts in Ya-Hom Thepphachit. **Advanced Science**. Vol. 15, No. 1, pp. 106-117
- [10] Sharma, N. K., Dey, S., and Prasad, R. (2007). In Vitro Antioxidant Potential Evaluation of *Euphorbia hirta* L. **Pharmacologyonline**. Vol. 1, pp. 91-98
- [11] Satsue, S., Thapphasaraphong, S., and Damrongrungruang, T. (2014). Antioxidant and Collagen Stimulating Activities in Human Gingival Fibroblast Cell Culture of Plant Extracts. **Isan Journal of Pharmaceutical Sciences**. Vol. 9, (Supplement), pp. 38-43 (in Thai)