ISSN: 1686-8420 (Print), 2651-2289 (Online)

RMUTT Research Journal
Science and Technology
Rajamangala University of Technology Thanyaburi

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยพื้นบ้านสะค้านและมะแขว่นในเขตท้องถิ่นภาคเหนือ

Anti-oxidant activity, phenolic and flavonoid constituents of Crude extracts from *Piper ribesioides* and *Zanthoxylum limonella* traditional herbal medicine in Northern Thailand

สุวดี โพธิ์วิจิตร[1] ปิยานี รัตนชำนอง[2] อุดมลักษณ์ มาตย์สถิตย์[3] และ วีระศักดิ์ อัศววงศ์อารยะ[1*]

Suwadee Phowichit[1], Piyanee Ratanachamnong[2], Udomlak Matsathit[3] and Weerasak Ussawawongaraya[1*]

[1]ภาควิชาฟิสิกส์อุตสาหกรรมและอุปกรณ์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10800

[2]ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10400

[3]ภาควิชาพรีคลินิก คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี จังหวัดปัตตานี 94000

[1]Department of Industrial Physics and Medical instrumentation, Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Bangkok 10800, THAILAND

[2]Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, THAILAND

[3]Department of Preclinic, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani Campus, Pattani 94000, THAILAND

[*]Corresponding Author E-mail: weerasak.u@sci.kmutnb.ac.th

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article history: Received 25 January 2019 Accept 21 May 2019 Online 13 June 2019 doi.org/10.14456/rj-rmutt.2019.3	The objective of current study was to evaluate an anti-oxidant activity with different solvent polarities (methanol, ethyl acetate, dichloromethane, and hexane) derived from stem of *Piper ribesioides* together with stalk and seed of *Zanthoxylum limonella*

ISSN: 1686-8420 (Print), 2651-2289 (Online)

Keywords:
Piper ribesioides, Zanthoxylum limonella, total phenolic content, total flavonoid content, anti-oxidant activity

traditional herbal medicine in Northern Thailand. Natural antioxidant in medicinal plants were defined for provide antioxidant activity by DPPH scavenging assay together with quantification of the phenolic and flavonoid constituents using Folin Ciocalteau and Aluminium chloride method, respectively. The polar methanol extract showed greatest antioxidant effect, while ethyl acetate was the second order reaction both in *P. ribesioides* and *Z. limonella*. The ability of methanol extract from stem of *P. ribesioides* exhibited strongest antioxidant DPPH radical scavenging with IC_{50} values as 0.2 mg/ml, which was correlated with maximum value of total phenolic acid (68.83 ± 0.38 mg equivalent of gallic acid per gram, mgGAE/g) and flavonoid content (37.13± 0.47 mg equivalent of quercetin per gram, mgQE/g). Similarly, the highest anti-oxidant activity of *Z. limonella* stalk and seed extract on methanol extract showed IC_{50} values as 0.26 and 0.37 mg/ml, respectively. Stalk showed higher phenolic content (53.67 ± 0.45 mgGAE/g) than seed (24.15 ± 0.48 mgGAE/g) as well as total flavonoid content of stalk (25.76 ± 0.43 mgQE/g) and seed (10.25 ± 0.63 mgQE/g). A relationship between antioxidant activities and increasing levels of total phenolic compounds -or flavonoids was found to be active based on solvent polarities in the extraction of these medicinal plants. Our findings revealed the preliminary scientific evidence for develop traditional herbal medicine into a valuable source for the future of human health care.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรท้องถิ่นเขตภาคเหนือของประเทศไทยภายใต้ตัวทำละลายต่างขั้ว คือ ลำต้นสะค้าน ส่วนก้านและส่วนเมล็ดมะแขว่น ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สารอนุมูลอิสระ 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (DPPH) พร้อมวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธีโฟลินซิโอแคลตู (Folin Ciocalteau) และวิธีอลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride) ตามลำดับ สารสกัดหยาบทั้งสองชนิดในเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมาคือในเอทิลอะซีเตท สารสกัดจากลำต้นสะค้านในเมทานอลออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} = 0.2 mg/ml มีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด (68.83 ± 0.38 mgGAE/g) และปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุด (37.13 ± 0.47 mgQE/g) ขณะที่สารสกัดจากก้านและเมล็ดมะแขว่นในเมทานอลสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ มีค่า IC_{50} = 0.26 และ 0.37 mg/ml ตามลำดับ โดยก้านมะแขว่นมีปริมาณฟีนอลิก

ISSN: 1686-8420 (Print), 2651-2289 (Online)

(53.67 ± 0.45 mgGAE/g) มากกว่าเมล็ดมะแขว่น (24.15 ± 0.48 mgGAE/g) สอดคล้องกับปริมาณฟลาโวนอยด์ของก้าน (25.76 ± 0.43 mgQE/g) และเมล็ดมะแขว่น (10.25 ± 0.63 mgQE/g) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณรวมฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่เพิ่มขึ้นและให้ผลที่ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วสูง ข้อมูลการศึกษานี้จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการพัฒนาสมุนไพรพื้นบ้านให้เกิดมูลค่าต่ออุตสาหกรรมการรักษาต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: สะค้าน มะแขว่น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

บทนำ

สารอนุมูลอิสระ (Free radical) คือ อะตอม โมเลกุล หรือ ไอออนที่ไม่เสถียร ที่เกิดขึ้นจากระบบภายในร่างกายมีการหลั่งสารอนุมูลอิสระออกมาเอง หรือได้รับจากปัจจัยภายนอก เช่น พฤติกรรมการสูบบุหรี่ มลภาวะทางสิ่งแวดล้อม และอื่นๆ ที่ส่งผลกระทบต่อการเกิดพยาธิสภาพร้ายแรงในมนุษย์ เช่น ความเสื่อมของเซลล์ประสาท ความชรา โรคเบาหวาน โรคมะเร็งและโรคหัวใจและหลอดเลือด ความรุนแรงของโรคเกิดขึ้นจากระดับของสารอนุมูลอิสระสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจนร่างกายไม่สามารถควบคุมสมดุลได้ ทำให้เกิดสภาวะความเครียดของออกซิเจน เรียกว่า “Oxidative stress” กระทบต่อกระบวนการเมตาบอไลท์ธาตุออกซิเจนในร่างกายจนเกิดอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวที่วงนอกสุดและกลายเป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียร มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยพยายามเข้าแย่งดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลข้างเคียง ส่งทำให้โมเลกุลข้างเคียงขาดอิเล็กตรอนถัดไปเรื่อยๆแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ ท้ายที่สุดส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลในร่างกาย ทั้งสารไขมัน โปรตีนและ DNA (1) สารอนุมูลอิสระ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (Radical reactive oxygen species: ROS) ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide anion radical:$O_2^{\bullet-}$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide: H_2O_2) ไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical: $OH^{\bullet}$) และเพอร์รอกไซด์ (Peoxide radical: $ROO^{\bullet}$) 2) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (Reactive nitrogen species: RNS) ได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide radical; NO) เพอร์รอกซีไนเตรท (Peroxy nitrate: $ONOO^-$) ไนโตรเจนไดออกไซด์ (Peroxy nitrate: NO_2) และไดไนโตรเจนไตรออกไซด์ (Dinitrogen trioxide: N_2O_3) (2) ในแต่ละวันร่างกายได้รับปัจจัยเสี่ยงต่างๆ มากมายที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระและมีผลทำลายสุขภาพของมนุษย์ ดังนั้น การศึกษาวิจัยเพื่อหาสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชธรรมชาติ (Natural antioxidants) จึงเข้ามามีบทบาทที่สำคัญเนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดที่พบในพืชสามารถเข้ากำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังมีผลข้างเคียงต่ำต่อสุขภาพมนุษย์ เมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์จำพวกฟีนอลิก ได้แก่ Butylated hydroxytoluene (BHT) และ Butylated hydroxyanisole (BHA) ที่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และการรักษา เนื่องจาก พบว่ากระบวนการเมตาบอไลท์สาร BHT และ BHA ก่อให้เกิดสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งและหากได้รับสารในปริมาณที่สูงเกินไปจะสะสมในร่างกายจนเป็นพิษต่อ ปอด ตับและไต (3)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ (Enzyme) ได้แก่ superoxide dismutase, catalase, และ glutathione peroxidase 2) สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Nonenzymatic) โดยส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่มักพบในพืชธรรมชาติ ได้แก่ ascorbic acid หรือวิตามินซีและกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) จำพวกฟีนอล (phenol) ฟีนอลิค

ISSN: 1686-8420 (Print), 2651-2289 (Online)

(phenolic acids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แทนนิน (tannins) ไกลโคไซด์ (glycosides) อัลคาลอยด์ (alkaloids) ลิกนิน (lignins) และอื่นๆ (1) กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระเกิดขึ้นจากการที่สารเข้าไปชะลอเวลาหรือยับยั้งการทำลายเซลล์ผ่านกระบวนให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระในระบบหรือเข้ากำจัดสารอนุมูลอิสระ โดยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ให้ได้ก่อนที่โมเลกุลสำคัญจะถูกทำลาย (4, 5) จากงานวิจัยทางการแพทย์พบว่า พืชสมุนไพรไทยหลายชนิดมีสรรพคุณทางเภสัชวิทยาในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยกตัวอย่างเช่น ขี้เหล็ก (*Senna siamea*) (6) พลูคาว (*Houttuynia cordata*) (7) กำลังวัวเถลิง (*Anaxagorea luzonensis* A. Gray) (8) พริกไทย (*Piper nigrum*) (9) และอื่นๆ นอกจากนี้ ยังมีพืชสมุนไพรของไทยอีกหลายชนิดที่ยังไม่มีรายงานศึกษาวิจัยทั้งที่ชาวบ้านนิยมนำมาปรุงอาหารเพื่อรับประทาน เช่น สะค้าน (*Piper ribesioides*) และมะแขว่น (*Zanthoxylum limonella*) จัดเป็นพืชท้องถิ่นที่พบมากเขตภาคเหนือของประเทศไทย มีการนำพืชไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย แต่กลับพบว่ายังขาดข้อมูลพื้นฐานในแง่มุมของการต้านอนุมูลอิสระจากส่วนประกอบต่างๆในพืช โดยส่วนใหญ่จะเน้นศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดในรูปแบบน้ำมันหอมระเหย (essential oil) เท่านั้น (10)

สะค้าน (*P. ribesioides*) มีชื่อท้องถิ่นเรียกว่า "ตะค่าน" จัดเป็นไม้เถาขนาดกลาง วงศ์พริกไทย หรือ Family Piperaceae ชาวบ้านนิยมรับประทานส่วนของลำต้นโดยนำมาปรุงอาหารประเภทแกงเพื่อให้มีกลิ่นหอม ใช้เป็นเครื่องเทศน์ปรุงอาหารเพื่อให้รสขมและเพิ่มความเผ็ดร้อน มีสารในกลุ่มต่างๆดังต่อไปนี้ กลุ่ม Lignans ได้แก่ cubebin, hinokinin กลุ่ม Terpenes ได้แก่ α-Elemol กลุ่ม Steroids ได้แก่ sitosterol กลุ่ม Alkaloids/amides ได้แก่ (2*E*,4*E*)-*N*-Isobutyldecadienamide, 4-Hydroxy-3-methoxy-N-methylpiperolactam กลุ่ม Miscellaneous compounds ได้แก่ crotepoxide, methyl2*E*,4*E*,6*E*- 7- phenylheptatrienoate, senediol, stearic acid ($CH_3(CH_2)_{16}COOH$), bornyl *p*-coumarate, 3,7-Dimethyl-3-hydroxy-4-(p-coumaroyloxy-1,6-octa diene), palmitic acid, และ methyl piperate (11) นอกจากนี้ยังมีพฤกษเคมีในน้ำมันหอมระเหย ชนิด monoterpenes และ sesquiterpenes จากรายงานการวิจัย พบว่า สารสกัดจากใบของสะค้าน (leaves) มีคุณสมบัติขับลม (carminative) ขับเสมหะ (expectorant) แก้อาการปวดท้อง (abdominal pain) หอบหืด (asthma) แก้ท้องเสีย (diarrhea) ต้านเชื้อรา (antifungal) (12) และฆ่าเหา (pediculicidal) (13) สารสกัดหยาบจากลำต้นและเมล็ดสะค้านในตัวทำละลาย methanol (MeOH) ethyl acetate (EtOAc) dichloromethane (DCM) และ hexane (Hx) สามารถยับยั้งเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสายพันธุ์ *Nilaparvata lugens stal* (14) สารสกัดหยาบจากใบสะค้านด้วยตัวทำละลาย MeOH EtOAc และ Hx สามารถยับยั้งการเกิดภาวะอัลไซเมอร์ได้ผ่านกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ butyrylcholine sterase (BchE) แต่ไม่สามารถยับยั้งผ่านวิถีของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AchE) (12)

มะแขว่น *(Z. limonella)* มีชื่อท้องถิ่นเรียกว่า "พริกหอม" จัดเป็นไม้ยืนต้น วงศ์ส้ม หรือ Family Rutaceae ชาวบ้านนำเมล็ดและผลแห้งมาปรุงอาหารเป็นเครื่องเทศน์ รสเผ็ดร้อน เมล็ดสดกินแก้ลมวิงเวียน มีสรรพคุณขับลมในลำไส้ ส่วนผลและเมล็ดมักนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหย เพื่อนวดคลายความเมื่อยล้า (muscle strain) มีสารสำคัญ sabinene, terpinene-4-ol และ limonene (15) มีฤทธิ์ไล่ยุง (mosquito-repellant activity) (16, 17) และฆ่าเหา (pediculicidal) (15) สารสกัดน้ำมันจากเมล็ด (essential oil from seed) ชั้น MeOH มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดีกว่า

ISSN: 1686-8420 (Print), 2651-2289 (Online)

พริกไทย (*Piper nigrum*) และ ผักชี (*Coriandrum sativum*) (18) ขณะที่ชั้น water ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี trolox equivalent antioxidant capacity มีค่า TEAC= 5.05 mM trolox/gdw (19) สารสกัดน้ำมันจากผลมะแขว่น (essential oil from fruits) ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งวิธี (DPPH, β-carotene bleaching, Ferric reducing antioxidant power assay และ Superoxide anion scavenging) เมื่อให้ร่วมกับอบเชย (*Cinnamomum verum*) มีการเสริมฤทธิ์แบบ Synergistic effect ในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus aureus, Pseudomonas fluorescens* และ *Salmonella risen (20)* Tangitijareonkun *et al*., 2012 ทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า สารสกัดหยาบจากลำต้นมะแขว่นชั้น DCM > สารสกัดหยาบจากลำต้นชั้น MeOH > สารสกัดน้ำมันจากผลมะแขว่น และเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ malondialdehyde (MDA) ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 และ DU-145 พบว่า สารทั้งสามชนิดไม่สามารถต้านอนุมูลอิสระจากกระบวนการ lipid peroxidation ที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ แต่หากให้สารก่อนเกิดอนุมูลอิสระเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถลดระดับอนุมูลอิสระ MDA ในเซลล์ลงได้ โดยสารสกัดหยาบจากลำต้นชั้น DCM และ ชั้น MeOH ช่วยเพิ่มระดับสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione และ catalase ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากทั้งสองชนิด ขณะที่สารสกัดน้ำมันจากผลมะแขว่นเพิ่มระดับเอนไซม์ catalase เป็นหลัก (21)

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยต้องการศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่างๆในพืชที่ชาวบ้านนิยมนำมาบริโภค ได้แก่ ลำต้นสะค้าน (Stems of *P. ribesioides*) ก้านมะแขว่น (Stalk of *Z. limonella*) และเมล็ดมะแขว่น (Seeds of *Z. limonella*) ที่สกัดหยาบด้วยตัวทำละลายต่างชนิด (ได้แก่ MeOH , EtOAc, DCM, และ Hx) ด้วยวิธี DPPH scavenging assay จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics content: TPC) และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content: TFC) ด้วยวิธี Folin Ciocalteau และ Aluminium chloride colorimertic ตามลำดับ การนำสมุนไพรพื้นบ้านประจำถิ่นมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจะช่วยการสร้างองค์ความรู้ใหม่ทางวิทยาศาสตร์ ทำให้ทราบถึงคุณประโยชน์จากพืชสมุนไพรไทย ตลอดจนสามารถนำข้อมูลพื้นฐานไปต่อยอดหาโครงสร้างสารสำคัญเพื่อพัฒนางานวิจัยทางการแพทย์ที่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี (Chemicals)

วิตามินซี (L-ascorbic acid) 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (1,1–diphenyl-2 picryl hydrazyl: DPPH) ไดเมตทอกซิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide: DMSO) และตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ MeOH, EtOAc, DCM และ Hx จาก (Merck, Germany) โฟลินซิโอแคลทูรีเอเจนต์ (Folin Ciocalteu's reagent) กรดแกลลิก (Gallic acid: GAE), โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) โพแทสเซียมอะซิเตต (Potassium acetate), อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และเคอร์ซิติน (quercetin) จาก (Sigma-Aldrich, USA)

พืชสมุนไพรและการสกัดสารจากพืช (Plant materials and Extraction)

เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรพื้นบ้านในเขตท้องถิ่นภาคเหนือ จังหวัดน่าน ประเทศไทย ได้แก่ ส่วนลำต้นสะค้าน ส่วนก้านมะแขว่น และส่วนเมล็ดมะแขว่น เพื่อสกัดสารหยาบ (crude extract) โดยวิธีการสกัดแบบแช่ (Soaking) ในตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ MeOH, EtOAc,

ISSN: 1686-8420 (Print), 2651-2289 (Online)

DCM และ Hx เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยเทคนิค Soxhlet method จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยเพื่อเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (Vacuum Rotary Evaporator, BUCHI B-850) ที่อุณหภูมิ 60 °C นำสารตัวอย่างเข้าตู้อบให้แห้งและเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ใส่ในภาชนะทึบแสงเพื่อคงคุณสมบัติสำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณของสารสกัดหยาบ (the yields of the extracts) ต่อปริมาณน้ำหนักแห้งของพืช 100 g จากสมการ ปริมาณของสารสกัดหยาบ (g/100 g ของนน.แห้งของพืช) = (นน.ของสารหลังระเหยตัวทำละลาย x 100)/ นน.แห้งของพืช (22)

การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents; TPC by Folin-Ciocalteu reagent: FCR)

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเกิดขึ้นจากสารฟีนอลในพืชมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงจึงเข้าทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin Ciocalteu's reagent เกิดสีม่วงหรือน้ำเงินของ Molybdate ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้กรดแกลลิกเป็นสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิธีการคือ เตรียมสารสกัดหยาบจากพืชที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Folin Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร ปริมาณ 500 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer คำนวณหาค่าปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (R^2=0.995) รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายแต่ละชนิด (mg gallic acid equivalent (GAE)/g of crude extract) วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้ One-way Anova ชนิด Tukey's test (23)

การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid contents; TFC by Aliminium Chloride method)

การศึกษาครั้งนี้จะใช้เคอร์ซิตินเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิธีการคือ เตรียมสารสกัดหยาบจากพืชที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 100 ไมโครลิตรของเอทานอล 95% ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายอลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ความเข้มข้น 10% ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และน้ำบริสุทธิ์ปริมาณ 2.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร จากนั้นบ่มที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดสารตัวอย่างเป็น blank คำนวณหาค่าปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอร์ซิติน (R^2=0.995) รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของของเคอร์ซิตินต่อกรัมของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายแต่ละชนิด (mg quercetin equivalent (QE) /g of crude extract) วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้ One-way Anova ชนิด Tukey's test (23)

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบด้วยวิธี DPPH assay (Antioxidant activity by DPPH assay)

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระแบบเสถียรในกลุ่ม RNS ที่มีสีม่วง DPPH radical จะ

ISSN: 1686-8420 (Print), 2651-2289 (Online)

เกิดปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง วิธีการคือ เตรียมสารสกัดหยาบจากพืชที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน จากนั้นหยอดสารตัวอย่างในแต่ละกลุ่มปริมาตร 10 ไมโครลิตร/หลุม ลงใน 96 well plate ทำการเติม DPPH solution ในเอทานอลที่มีความเข้มข้น 80 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 190 ไมโครลิตร/หลุม ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย เครื่อง Automated microplate reader ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ที่ไม่มีสารสกัดจากพืช) และใช้วิตามินซี เป็นสาร Positive control แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและความเข้มข้น จากสูตร % inhibition = $[(A_{control} - A_{sample})/ A_{control} \times 100]$ เมื่อกำหนดให้ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่มควบคุม และ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่มตัวอย่างของสารที่นำมาศึกษา สร้างกราฟเปอร์เซนต์การยับยั้งและความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อหาค่า 50% Inhibition หรือค่า IC_{50} จากนั้นนำค่า IC_{50} ของ DPPH ไปหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation coefficient, r) โดยเปรียบเทียบกับปริมาณสารฟีนอลิกและปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด หากค่า r เข้าใกล้ 1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันมาก วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้ One-way Anova (ชนิด Dunnett's test) (20)

การวิเคราะห์สถิติ (Statistical analysis)

ทุกการทดลองต้องมีการทดสอบอย่างน้อย 3 ครั้ง แสดงข้อมูลในรูปแบบของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้ One-way Anova ด้วยระดับนัยสำคัญที่ P-values < 0.05, P-values < 0.01,และ P-values < 0.001 โดยใช้โปรแกรมสถิติวิเคราะห์สำเร็จรูป Graphpad prism version 5 (GraphPad software, San Diego, CA, USA)

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

การหาปริมาณสารสกัดสารจากพืช (Determination of Plant Extract Yield)

ผลการสกัดสารจากพืชสมุนไพรด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ของลำต้นสะค้าน ก้านมะแขว่น และเมล็ดมะแขว่นภายใต้ตัวทำละลายต่างขั้ว เรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากมากไปน้อยสุด ดังนี้ MeOH > EtOAc > DCM > Hx ปริมาณของสารสกัดหยาบจากลำต้นสะค้าน (Stems of *P. ribesioides*) คิดเป็นร้อยละ 0.21 0.38 0.32 และ 0.50 ของน้ำหนักแห้งของพืชตามลำดับ ลักษณะของสารสกัดข้นหนืดสีดำและสีน้ำตาลเข้ม ขณะที่ปริมาณของสารสกัดหยาบจากก้านมะแขว่น (Stalk of *Z. limonella*) คิดเป็นร้อยละ 3.34 1.38 1.74 และ 4.14 ของน้ำหนักแห้งของพืชตามลำดับ ลักษณะของสารสกัดมีสีน้ำตาลและเหลืองอ่อนใส และปริมาณของสารสกัดหยาบจากเมล็ดมะแขว่น (Seeds of *Z. limonella*) คิดเป็นร้อยละ 7.09 1.27 3.84 และ 6.08 ของน้ำหนักแห้งของพืชตามลำดับ ลักษณะของสารสกัดค่อนมีสีเหลืองใส ดังตารางที่ 1 ผลของการสกัดสารจากพืชตัวอย่าง พบว่า สารสกัดจากพืชทุกชนิดประกอบด้วยสารมีขั้วและไม่มีขั้วเป็นองค์ประกอบจึงสกัดได้ในปริมาณที่ไม่ต่างกันมากนักเมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดขั้วสูงและขั้วต่ำ แต่หากเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้จากพืชทั้งสามชนิด (% yields of the extracts) จะเห็นว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดมะแขว่นมีปริมาณสูงสุดทั้งการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดขั้วสูงและขั้วต่ำ (ร้อยละ 7.09 และ 6.08 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดสารแบบต่อเนื่องด้วยเทคนิค Soxhlet method เหมาะสมในการสกัดสารที่ส่วนเมล็ดของมะแขว่นมากที่สุด ในการศึกษาครั้งต่อไปอาจต้องพัฒนาวิธีการสกัดที่เหมาะสมกับสะค้านและก้านมะแขว่นเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ปริมาณมากขึ้น โดยพิจารณาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดทั้งหมด คือ องค์ประกอบของตัวทำละลาย อัตราส่วนของตัวทำละลายและตัวถูกละลายที่เป็น solid และอุณหภูมิที่ใช้ (24)

ISSN: 1686-8420 (Print), 2651-2289 (Online)

การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents; TPC)

พืชสมุนไพรทุกชนิดในทุกชั้นตัวทำละลายมีสารฟีนอลิก โดยพบปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดในตัวทำละลายที่มีขั้วสูงสุดและลดลงในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ (รูปที่ 1) จากตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารสกัด 1 กรัม มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเทียบเท่ากรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัม (mgGAE/g) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากลำต้นสะค้าน (Stems of *P. ribesioides*) ชั้น MeOH = 68.83 ± 0.38 ในขณะที่ชั้น Hx มีค่าเพียง 10.50 ± 0.16 เท่านั้น ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดชั้น MeOH คิดเป็น 2 3 และ 7 เท่าของชั้น EtOAc DCM และ Hx ตามลำดับ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p< 0.001)* หากเปรียบเทียบผลของสารฟีนอลิกชั้น MeOH ของพืชตัวอย่างกับพืชวงศ์เดียวกัน คือ พริกไทยดำ (*Piper nigrum*) ราชาแห่งเครื่องเทศน์ที่ชาวบ้านใช้ปรุงอาหารทั่วโลก และประเทศไทยยังเป็นแหล่งหลักในการผลิตเพื่อส่งออก พริกไทยดำถูกนำมาใช้ทางการแพทย์แบบอายุรเวท (Ayurvedic Medicine) อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระเพราะประกอบด้วยวิตามินเอ วิตามินซีและสารฟีนอลิกทั้งชนิด neutral และ acidic (25) จากรายงานการศึกษายังไม่พบการวิจัยส่วนของลำต้นของพริกไทย แต่พบการใช้ส่วนต่างๆ ดังนี้ สารสกัดจากใบพริกไทยดำ (*P. nigrum*leaf) = 6.68 ± 0.02 สารสกัดจากเมล็ดพริกไทยดำ (*P. nigrum*seed) = 4.12 ± 0.02 (26) และ สารสกัดจากผลพริกไทยดำ (*P. nigrum*fruit) = 1.728 ± 0.004(23) จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากลำต้นสะค้านมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าใบพริกไทยดำ 10 เท่า มากกว่าเมล็ดพริกไทยดำ 16 เท่า และมากกว่าผลพริกไทยดำถึง 40 เท่า จึงสรุปได้ว่าสารสกัดจากลำต้นสะค้านมีองค์ประกอบของสารฟีนอลิกที่สูงในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากก้านมะแขว่น (Stalk of *Z. Limonella)* และ สารสกัดหยาบจากเมล็ดมะแขว่น (Seeds of *Z. limonella*) พบค่าสูงสุดในชั้น MeOH เท่ากับ 53.67± 0.45 และ 24.15 ± 0.48 mgGAE/g ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้มีความแตกต่างจากชั้นตัวทำละลายชนิดอื่นอยู่ราว 3 เท่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p< 0.001)* โดยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากก้านมะแขว่นในทุกชั้นตัวทำละลายมีมากกว่าในเมล็ดมะแขว่นประมาณ 2 เท่า (รูปที่ 1) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า สารสกัดหยาบจากก้านและเมล็ดมะแขว่นยังมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดต่ำกว่าสารสกัดน้ำมันจากผลมะแขว่น (essential oil of *Z. limonella* fruit) = 75.2 mgGAE/g oil (27) หากเปรียบเทียบปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบตัวอย่าง พบว่า ส่วนลำต้นสะค้าน > ส่วนก้านมะแขว่น > ส่วนเมล็ดมะแขว่น

จากการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบในลำต้นสะค้าน ก้านมะแขว่นและเมล็ดมะแขว่นเป็นโมเลกุลที่มีขั้วจึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว คือ MeOH และ EtOAc บทบาทของตัวทำละลายขั้วสูงจะช่วยให้การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากพืชตัวอย่างได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ จึงมักนำมาสกัดสารออกฤทธิ์จำพวก phenol และ polyphenol (25) ซึ่งพันธะไฮโดรเจนระหว่างสภาพขั้วตัวทำละลายและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ในสารประกอบฟีนอลิกมีผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยตัวทำละลายที่มีขั้ว (เช่น water, MeOH, EtOAc, acetonitrite, *tert*-butyl alcohol และ acetic) จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (เช่น DCM, chloroform, hexane, petroleum ether, n-decane และ chlorobenzene) Snelgrove *et al.,* 2001 อธิบายว่า เนื่องจากตัวทำละลายจะเข้าจับกับอนุมูลอิสระก่อนที่หมู่-OH ในสาร phenol จะเข้าจับอนุมูลอิสระโดยตรงและทำให้ความเป็นอนุมูลอิสระหมดไป (28) โดยสอดคล้องกับรายงานวิจัยในสมุนไพรชนิดอื่นๆ เช่น ใบพลูตีนช้าง (*P. umbellatum*leaf) (29) ผลพริกไทยหาง (*P. cubeba*fruit) (30) และ ผลและใบสมอพิเภก (*Terminalia bellerica* fruit and leaf) สาร

ISSN: 1686-8420 (Print), 2651-2289 (Online)

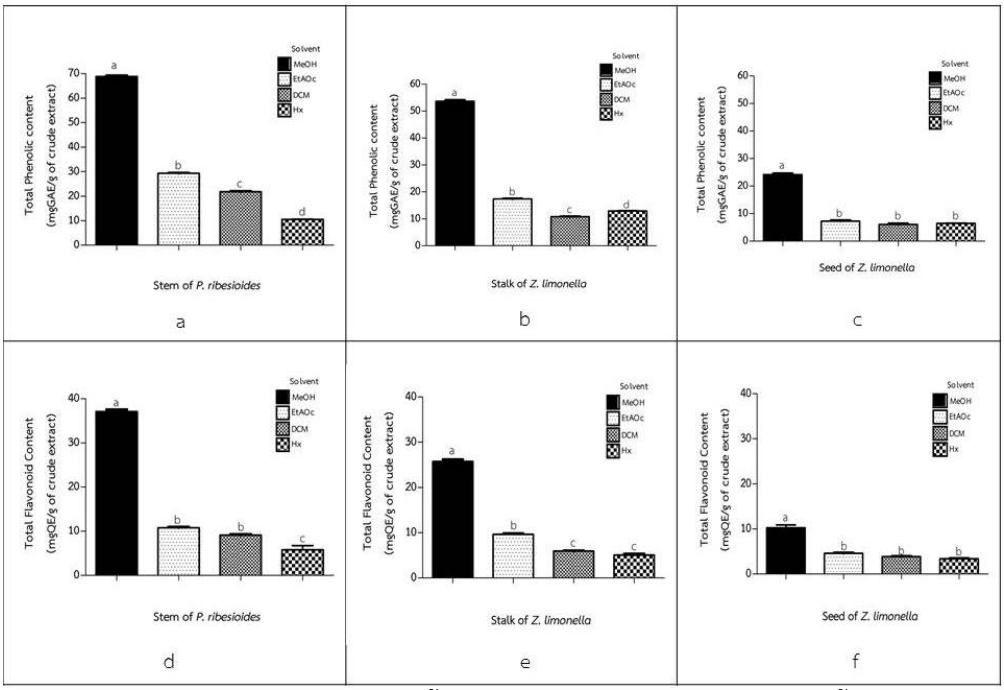
ฟีนอลิกในพืชจะออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระขั้นที่ 2 โดยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระแบบด้วยการให้ H atom แก่อนุมูลอิสระแย่งจับกับออกซิเจน รวมทั้งกำจัดอนุมูลอิสระชนิดเพอร์รอกไซด์ที่เข้าทำลายโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ก่อนจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางชีวภาพต่างๆของร่างกายต่อไป (1)

ตารางที่ 1 ปริมาณรวมสารสกัดหยาบและปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของพืชสมุนไพร

Scientific name	Part used	Solvent	Yield (%)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)
Piper ribesioides	Stem	MeOH	0.21	68.83 ± 0.38[a]	37.13 ± 0.47[a]
: Family Piperaceae		EtOAc	0.38	29.29 ± 0.21[b]	10.78 ± 0.20[b]
		DCM	0.32	21.75 ± 0.24[c]	9.11 ± 0.20[b]
		Hx	0.50	10.50 ± 0.16[d]	5.78 ± 0.97[c]
Zanthoxylum limonella	Stalk	MeOH	3.34	53.67 ± 0.45[a]	25.76 ± 0.43[a]
: Family Rutaceae		EtOAc	1.80	17.36 ± 0.15[b]	9.64 ± 0.31[b]
		DCM	1.74	10.82 ± 0.13[c]	5.93 ± 0.12[c]
		Hx	4.14	12.93 ± 0.14[d]	5.06 ± 0.24[c]
Zanthoxylum limonella	Seed	MeOH	7.09	24.15 ± 0.48[a]	10.25 ± 0.63[a]
: Family Rutaceae		EtOAc	1.27	7.25 ± 0.33[b]	4.58 ± 0.13[b]
		DCM	3.84	6.07 ± 0.34[b]	3.86 ± 0.10[b]
		Hx	6.08	6.46 ± 0.14[b]	3.39 ± 0.18[b]

Note: Yield (g/100g of dry plant material)

[abcd] The different letters in each column indicate the significant difference at $p<0.05$



รูปที่ 1 แสดงปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของพืชสมุนไพรในตัวทำละลายต่างขั้ว

ISSN: 1686-8420 (Print), 2651-2289 (Online)

การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid contents; TFC)

พืชสมุนไพรทุกชนิดพบสารฟลาโวนอยด์สูงสุดในตัวทำละลายที่มีขั้วสูงสุดและลดลงในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ (รูปที่ 1) ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารสกัด 1 กรัม มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเทียบเท่าเคอร์ซิตินในหน่วยมิลลิกรัม (mgQE/g) ดังนี้ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากลำต้นสะค้าน (Stems of *P. ribesioides*) ชั้น MeOH = 37.13 ± 0.47 และมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เป็น 3 4 และ 6 เท่าของชั้น EtOAc DCM และ Hx ตามลำดับ โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p< 0.001)* การตรวจพบสารฟลาโวนอยด์ชั้น MeOH ในปริมาณสูงสุดบ่งชี้ว่าสารฟลาโวนอยด์ในพืชตัวอย่างมีสภาพขั้วสูงใกล้เคียงกับตัวทำละลายชั้น MeOH ตามกฎ Like dissolve like rule) (31) ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกกลุ่มใหญ่ประเภท polyphenol พบมากในรูปของไกลโคไซด์ ละลายในน้ำได้ มีบทบาทหลักในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยการให้อิเล็กตรอนหรือให้ H atom แก่อนุมูลอิสระ กำจัดโลหะหนักจำพวก Fe^{2+} และ Cu^{+} ยับยั้งเอนไซม์ที่กระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระ ตลอดจนกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย (32) จากรายงานวิจัย ยังไม่พบการศึกษาสารฟลาโวนอยด์จากส่วนของลำต้นพริกไทย แต่พบสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของพืชวงศ์พริกไทยชั้น MeOH ดังนี้ สารสกัดจากใบพริกไทยดำ (*P. nigrum*leaf) = 1.51 ± 0.01 (33) และสารสกัดจากผลพริกไทยดำ (*P. nigrum*fruit) = 0.002 ± 0.002 (23) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจากลำต้นสะค้านมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากกว่าใบพริกไทยดำ 24 เท่า และมากกว่าในผลพริกไทยดำถึง 18,506 เท่า จึงสรุปได้ว่าพบสารฟลาโวนอยด์สูงมากในลำต้นสะค้านเมื่อเทียบกับพริกไทยซึ่งเป็นสมุนไพรที่บริโภคกันอย่างแพร่หลาย สำหรับปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากก้านมะแขว่น (Stalk of *Z. limonella*) และ เมล็ดมะแขว่น (Seed of *Z. limonella*) ชั้น MeOH มีค่า = 25.76 ± 0.43 และ 10.25 ± 0.63 mgQE/g ตามลำดับ โดยปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากก้านมะแขว่นมีมากกว่าในเมล็ดมะแขว่นประมาณ 1.5 และ 2 เท่า ในชั้นตัวทำละลายขั้วต่ำและสูง ตามลำดับ (รูปที่ 1) และหากเปรียบเทียบปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบพบว่า สารสกัดหยาบจากลำต้นสะค้าน > ส่วนก้านมะแขว่น > ส่วนเมล็ดมะแขว่น

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบด้วยวิธี DPPH assay (Antioxidant activity by DPPH assay)

สารสกัดหยาบจากสะค้านและมะแขว่นออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีประสิทธิภาพสูงสุดในตัวทำละลายมีขั้วสูงไปยังขั้วต่ำ (ตารางที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดเฉพาะชั้น MeOH พบว่า สารสกัดจากลำต้นสะค้าน (Stems of *P. ribesioides*) มีค่า IC_{50} = 0.2 mg/ml > ส่วนก้านมะแขว่น (Stalk of *Z. Limonella*) มีค่า IC_{50} = 0.26 mg/ml > ส่วนเมล็ดมะแขว่น (Seed of *Z. limonella*) มีค่า IC_{50} = 0.37 mg/ml ตามลำดับ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มของกรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซีซึ่งเป็นสาร Positive control (IC_{50} เท่ากับ 0.006 mg/ml) หากเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดระหว่างชั้น MeOH กับชั้นอื่นๆ พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าแตกต่างกับชั้นที่มีขั้วต่ำทั้งชั้น DCM และ Hx อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(p< 0.001)* ผลที่เกิดขึ้นนี้เกิดจากสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่พบว่าเป็นสารสำคัญในพืชสมุนไพรตัวอย่างทุกชนิดสามารถละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วสูงได้มากกว่าในตัวทำละลายชั้นที่มีขั้วต่ำและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นแปรผันตามปริมาณสารที่ตรวจพบ เมื่อพิจารณาผลความสัมพันธ์ด้วย Pearson correlation พบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ของสาร

ISSN: 1686-8420 (Print), 2651-2289 (Online)

สกัดชั้น MeOH ของลำต้นสะค้าน (Stems of *P. ribesioides*) มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุดมีค่า r = 0.74 และ 0.99 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของลำต้นสะค้านมีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดี สำหรับสารสกัดจากก้านมะแขว่น (Stalk of *Z. limonella*) ชั้น MeOH พบปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีบทบาทต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่า r= 0.97 ขณะที่สารสกัดจากเมล็ดมะแขว่น (Seed of *Z. limonella*) ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดีในชั้น EtOAc มีค่า r = 0.72 และ 0.99 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPH ของพืชสมุนไพรในตัวทำละลายต่างขั้ว

Scientific name	Part used	Solvent	IC_{50} (mg/ml)
Piper ribesioides	Stem	MeOH	0.20 ± 0.01 ^{ns}
: Family Piperaceae		EtOAc	0.39 ± 0.02 ***
		DCM	3.32 ± 0.06 $^{***\ ###}$
		Hx	15.66 ± 0.08 $^{***\ ###}$
Zanthoxylum limonella	Stalk	MeOH	0.26 ± 0.02 ^{ns}
: Family Rutaceae		EtOAc	1.09 ± 0.07 ^{ns}
		DCM	4.37 ± 0.07 $^{***\ ###}$
		Hx	22.61 ± 0.94 $^{***###}$
Zanthoxylum limonella	Seed	MeOH	0.37 ± 0.02 ^{ns}
: Family Rutaceae		EtOAc	14.07 ± 1.34 $^{***##}$
		DCM	52.17 ± 1.09 $^{***###}$
		Hx	424.74 ± 2.90 $^{***###}$
Ascorbic acid (Vitamin C)			0.006 ± 4.6

Note: $^{***}p< 0.001$ compared with Ascorbic acid, $^{##}p< 0.01$, $^{###}p< 0.001$ compared with MeOH solvent

กระบวนการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้เกี่ยวข้องกับโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่ –OH บริเวณวงแหวน aromatic ring โดยเฉพาะสารฟลาโวนอยด์ที่พบจำนวน –OH ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป อีกทั้งหลังจากให้ H atom แก่อนุมูลอิสระแล้วโครงสร้างยังคงความเสถียรและสามารถเข้าทำปฏิกิริยาต่อกับอนุมูลอิสระขั้นที่ 2 ในรูป alkoxyl ($RO^{\bullet}$) ได้อีกครั้ง (34) H atom ของหมู่ –OH จะกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ โดยจับกับอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวของอนุมูลอิสระ DPPH บริเวณ N atom ทำให้อนุมูลอิสระของ DPPH ได้รับโปรตอนหรือถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ จนเกิดความเสถียรและเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองตรวจสอบได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง นั่นหมายถึง พืชสมุนไพรจะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระมากขึ้นเมื่อหมู่ –OH มีจำนวนมากและมีตำแหน่งที่เหมาะสม ประกอบกับคุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่แม้ว่าจะสูญเสียอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระแต่โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก

ISSN: 1686-8420 (Print), 2651-2289 (Online)

ยังมีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูงทำให้อิเล็กตรอนสามารถย้ายไปทั่วโครงสร้าง (Delocalization) และคงความเสถียรเอาไว้ได้ (35) อย่างไรก็ตาม หากเปรียบเทียบผลการทดลองครั้งนี้กับรายงานการวิจัยก่อนหน้า ยังไม่พบการศึกษาจากส่วนของลำต้นพริกไทย แต่พบผลจากสารสกัดจากผลพริกไทยดำ (*P. nigrumfruit*) ชั้น EtOH (IC_{50} = 1.11 mg/ml) (36) ดังนั้น สารสกัดจากลำต้นสะค้านจึงมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าในผลพริกไทยดำ ในส่วนของมะแขว่น ชั้น MeOH พบว่าสารสกัดน้ำมันจากผลมะแขว่น (essential oil of *Z. limonella*fruit) (IC_{50} = 5.66 mg/ml) และสารสกัดจากลำต้นมะแขว่น (*Z. Limonellastem*) (IC_{50} = 0.12 mg/ml) (37) ดังนั้น สารสกัดหยาบจากก้านและเมล็ดมะแขว่นสามารถต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดน้ำมันจากผลมะแขว่นแต่น้อยกว่าส่วนของลำต้น

สรุปผล

พืชสมุนไพรเข้ามามีบทบาทสำคัญมากขึ้น จากการมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี อันช่วยป้องกันการเกิดพยาธิสภาพของโรคต่างๆในมนุษย์ คุณสมบัติดังกล่าวเกิดขึ้นจาก พบสารสำคัญจำพวกฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ได้ทั้งในส่วนของใบ ดอก ผล ลำต้น เมล็ดและเปลือกไม้ ทำหน้าที่ในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ เข้ายับยั้งการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และกำจัดไอออนของโลหะหนัก ทำให้สามารถเข้าชะลอความรุนแรงของสภาวะความเครียดของออกซิเจนในการทำลายเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทำให้การเจริญเติบโตและการพัฒนาดำเนินไปอย่างเป็นปกติ (1) จากการศึกษา พบว่า สารสกัดจากลำต้นสะค้าน (Stems of *P. ribesioides*) ก้านมะแขว่น (Stalk of *Z .limonella*) และเมล็ดมะแขว่น (Seed of *Z. limonella*) มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงสุดในตัวทำละลายมีขั้วสูงคือชั้นเมทานอล รองลงมาคือในเอทิลอะซีเตท ซึ่งองค์ประกอบของตัวทำละลาย (solvent composition) ที่มีขั้วนั้นสามารถดึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารพฤษเคมีในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ประเภท phenolic acids และ polyphenol ออกจากพืชสมุนไพรทั้งหมดได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งปริมาณของสารที่เพิ่มขึ้นยังมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี สารสกัดหยาบจากลำต้นสะค้านสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากก้านมะแขว่นและสารสกัดหยาบจากเมล็ดมะแขว่นตามลำดับ การศึกษาในครั้งนี้ได้มุ่งเน้นการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรภายใต้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดเปรียบเสมือนการเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดภายใต้สารอินทรีย์ที่เป็นตัวกลางต่างขั้วกัน ซึ่งผู้วิจัยได้เลือกใช้สารตัวกลางชนิดเอทิลอะซิเตตเป็นตัวแทนของสารที่มีขั้วสูงเมื่อเข้าสู่ร่างกายสามารถผ่านกระบวนการเมแทบอไลท์เพื่อกำจัดออกนอกร่างกายได้ (38) แต่อย่างไรก็ตามน้ำเป็นองค์ประกอบหลักในเซลล์มนุษย์ที่มีความปลอดภัยสูงและกำจัดออกนอกร่างกายได้ง่ายกว่า ในการศึกษาครั้งต่อไปจึงควรเพิ่มการสกัดสารตัวอย่างโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จะทำให้สามารถเปรียบเทียบคุณประโยชน์ของสมุนไพรหากต้องการนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมสำหรับบริโภคได้ดีมากยิ่งขึ้น ผลการวิจัยที่เกิดขึ้นจะเป็นองค์ความรู้ใหม่ในการทราบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่างๆในพืชที่ชาวบ้านนิยมนำมาบริโภคในท้องถิ่น ทำให้เห็นถึงคุณประโยชน์และนำไปต่อยอดเพื่อศึกษาในโมเดลทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป เช่น การยับยั้งแบคทีเรีย การต้านอัลไซเมอร์และการยับยั้งมะเร็ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้านสะค้านและมะแขว่นจาก ดร.ณัฐชยา คำรังษี และทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัย

ISSN: 1686-8420 (Print), 2651-2289 (Online)

เทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระเหนือ ประจำ ปีงบประมาณ 2561 สัญญาเลขที่ 6143105

เอกสารอ้างอิง

1. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev. 2010;4(8):118-26.

2. Mah SH, Teh SS, Ee GC. Anti-inflammatory, anti-cholinergic and cytotoxic effects of Sida rhombifolia. Pharm Biol. 2017;55(1):920-8.

3. Papas AM. Diet and antioxidant status. Food Chem Toxicol. 1999;37(9-10):999-1007.

4. Bakkalbasi E, Mentes O, Artik N. Food ellagitannins-occurrence, effects of processing and storage. Crit Rev Food Sci Nutr. 2009;49(3):283-98.

5. Fantini M, Benvenuto M, Masuelli L, Frajese GV, Tresoldi I, Modesti A, et al. In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. Int J Mol Sci. 2015;16(5):9236-82.

6. Kaur G, Alam MS, Jabbar Z, Javed K, Athar M. Evaluation of antioxidant activity of Cassia siamea flowers. J Ethnopharmacol. 2006;108(3):340-8.

7. Toda S. Antioxidative effects of polyphenols in leaves of Houttuynia cordata on protein fragmentation by copper-hydrogen peroxide in vitro. J Med Food. 2005;8(2):266-8.

8. Gonda R, Takeda T, Akiyama T. Studies on the constituents of Anaxagorea luzonensis A. GRAY. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2000;48(8):1219-22.

9. Gulcin I. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (Piper nigrum) seeds. Int J Food Sci Nutr. 2005;56(7):491-9.

10. Salehi B, Zakaria ZA, Gyawali R, Ibrahim SA, Rajkovic J, Shinwari ZK, et al. Piper Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. Molecules. 2019;24(7):1364.

11. Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. Phytochemistry of genus Piper. Phytochemistry. 1997;46(4):597-673.

12. Salleh WM, Hashim NA, Ahmad F, Heng YK. Anticholinesterase and antityrosinase activities of ten piper species from malaysia. Adv Pharm Bull. 2014;4(2 Suppl):527-31.

13. Watcharawit R, Soonwera M. Pediculicidal effect of herbal shampoo against Pediculus humanus capitis in vitro. Trop Biomed. 2013;30(2):315-24.

14. Phankaen Y, Pluempanupat W, Mourad AK, Bullangpoti V. Bioefficacy of Piper Ribesioides

(Piperaceae) Extracts against Nilaparvata Lugens Stal. (Homoptera: Delphacidae). Commun Agric Appl Biol Sci. 2014;79(2):229-32.

15. Charoensup R, Duangyod T, Phuneerub P, Singharachai C. Pharmacognostic specification of Zanthoxylum limonella (Dennst.) Alston: Fruits and seeds in Thailand. J Adv Pharm Technol Res. 2016;7(4):134-8.

16. Das NG, Dhiman S, Talukdar PK, Rabha B, Goswami D, Veer V. Synergistic mosquito-repellent activity of Curcuma longa, Pogostemon heyneanus and Zanthoxylum limonella essential oils. J Infect Public Health. 2015;8(4):323-8.

17. Pitasawat B, Champakaew D, Choochote W, Jitpakdi A, Chaithong U, Kanjanapothi D, et al. Aromatic plant-derived essential oil: an alternative larvicide for mosquito control. Fitoterapia. 2007;78(3):205-10.

18. Nakagawa K, Promjareet A, Priprem A, Netweera V, Hara H. Investigation of scavenging activities and distribution of paramagnetic species in Zanthoxylum limonella seeds. Free Radic Res. 2016;50(12):1432-40.

19. Palasuwan A, Soogarun S, Lertlum T, Pradniwat P, Wiwanitkit V. Inhibition of Heinz Body Induction in an inVitro Model and Total Antioxidant Activity of Medicinal Thai Plant. Asian Pacific J Cancer Prev. 2005;6:458-63.

20. Nanasombat S, Wimuttigosol P. Antimicrobial and Antioxidant Activity of Spice Essential Oils. Food Sci Biotechnol. 2011;20(1):45-53.

21. Tangjitjaroenkun J, Chavasiri W, Thunyaharn S, Yompakdee C. Bactericidal effects and time-kill studies of the essential oil from the fruits of Zanthoxylum limonella on multi-drug resistant bacteria. J Essent Oil Res. 2012;24(4):363-70.

22. Stanojevic L, Stankovic M, Nikolic V, Nikolic L, Ristic D, Canadanovic-Brunet J, et al. Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of Hieracium pilosella L. Extracts. Sensors (Basel). 2009;9(7):5702-14.

23. Ahmad AHA, Mujeeb M, Khan AS, Alhadrami AAH, Bhandari A. Quantification of total phenol, flavonoid content and pharmacognostical evaluation including HPTLC fingerprinting for the standardization of Piper nigrum Linn fruits. Asian Pac J Trop Biomed. 2015;5(2):101-07.

24. Upadhya V, Pai SR, Sharma AK, Hegde HV, Kholkute SD, Joshi RK. Compound Specific Extraction of Camptothecin from Nothapodytes nimmoniana and Piperine from Piper nigrum Using Accelerated Solvent Extractor. J Anal Methods Chem. 2014;2014:932036.

25. Shanmugapriya KSPS, Payal H, Mohammed SP, Williams B. Antioxidant potential

ISSN: 1686-8420 (Print), 2651-2289 (Online)

of pepper (Piper nigrum Linn.) leaves and its antimicrobial potential against some pathogenic microbes. Indian J Nat Prod Resour. 2012;3(4):570-77.

26. Uyoh A, Chukwurah N, Akarika C, Antia A. Potentials of Two Nigerian Spices—Piper nigrum and Monodora myristica as Sources for Cheap Natural Antioxidant. Am J Plant Sci. 2013;4:1105-15.

27. Supabphol RTJ. Chemical Constituents and Biological Activities of Zanthoxylum limonella (Rutaceae): A Review. Trop J Pharm Res. 2014;13(12):2119-30.

28. Snelgrove D, Lusztyk J, Banks J, Mulder P, Ingold K. Kinetic Solvent Effects on Hydrogen-Atom Abstractions: Reliable, Quantitative Predictions via a Single Empirical Equation. J Am Chem Soc. 2001;123:469-77.

29. Geetha E, Irulandi K, Mehalingam P. Evaluation of antioxidant and free radical scavenging activities of different solvent extracts of leaves of Piper umbellatum. Asian J Pharm Clin Res. 2017;10(2):274-76.

30. Nahak G, Sahu R. Phytochemical Evaluation and Antioxidant activity of Piper cubeba and Piper nigrum. J Appl Pharm Sci. 2011;8:153-7.

31. Reichardt CWT. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry. Edition T, editor. Germany; 2005.

32. Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia. 2011;82(4):513-23.

33. Radzali M, Nur Dalila Hani MZ. Antioxidant properties of leaf crude extracts of Piper nigrum L. In: Proceedings of the Seminar on Medicinal and Aromatic Plants, (MAPS 2008) AGRIS. 2009.

34. Dugas AJ, Castaneda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston GW. Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. J Nat Prod. 2000;63(3):327-31.

35. Pietta P. Flavonoids as antioxidants. J NatProd. 2000;63:1035-42.

36. Luanchoy S, Tiangkul S, Wongkrajang Y, Temsiririrkkul R, Peungvicha P, Nakornchai S. Antioxidant Activity of a Thai Traditional Formula for Longevity. Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014;41(3):1-5.

37. Supabphol RT. Chemical Constituents and Biological Activities of Zanthoxylum limonella (Rutaceae): A Review. Trop J Pharm Res. 2014;13(12):2119-30.

38. Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? Alcohol Res Health. 2006;29(4):245-54.