

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ:ฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมือกจากต้นเงาะก้วย
และต้นหมาน้อย

“Antioxidant activities and phenolic and flavonoid content of mucilage
extracts from *Mesona chinensis* and *Cissampelos pareira* L.”

หัวหน้าโครงการวิจัย

ดร. เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์

615.321
ก768ถ
2556
ร.2

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประจำปีงบประมาณ 2556

15.321

๗๖๘ ๗

555

2

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ: ฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมือกจากต้นเงาะก้วย
และต้นหมาน้อย

“Antioxidant activities and phenolic and flavonoid content of mucilage
extracts from *Mesona chinensis* and *Cissampelos pareira* L.”

หัวหน้าโครงการวิจัย

ดร. เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประจำปีงบประมาณ 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ: ฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกจากต้นเฉาก๊วยและต้นหমান้อย

บทคัดย่อ

พืชสมุนไพรท้องถิ่นของประเทศไทยหลายชนิดรวมทั้งต้นเฉาก๊วยและต้นหมาน้อยมีสารเมือก (mucilage) อยู่เป็นปริมาณมาก ซึ่งสารเมือกจากพืชเหล่านี้มีการนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกจากพืชทั้งสองชนิด ซึ่งเป็นพืชที่มีการนำสารเมือกมาประกอบอาหาร รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์กับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของพืชทั้งสองชนิดนี้ จากการศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยด้วยวิธี DPPH assay เมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำ น้ำร้อน เอทานอล เฮกเซน อะซิโตน และเอทิลอะซิเตท พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้ตัวทำละลายต่างๆสำหรับใบเฉาก๊วยกับใบหมาน้อยจะแตกต่างกัน และไม่แปรตามสภาพขั้วของสารสกัด โดยพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในใบเฉาก๊วยจะมีค่าต่ำที่สุดเมื่อใช้เอทิลอะซิเตทในการสกัด ($IC_{50} = 4.4 \text{ mg/mL}$) ส่วนในใบหมาน้อยจะมีค่าต่ำที่สุดเมื่อใช้เอทานอลในการสกัด ($IC_{50} = 9.0 \text{ mg/mL}$) แต่สารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดจะแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อใช้น้ำร้อนในการสกัดเช่นเดียวกัน (IC_{50} ของใบเฉาก๊วย = 1.0 mg/mL และ IC_{50} ของใบหมาน้อย = 0.2 mg/mL) ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยเมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ พบว่าทั้งปริมาณของโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ไม่ได้แปรผันกับสภาพขั้วของตัวทำละลาย และเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับปริมาณโพลีฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์ของพืชทั้งสองชนิดจากการใช้ตัวสกัดที่แตกต่างกัน พบว่าไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ชัดเจน

Abstract

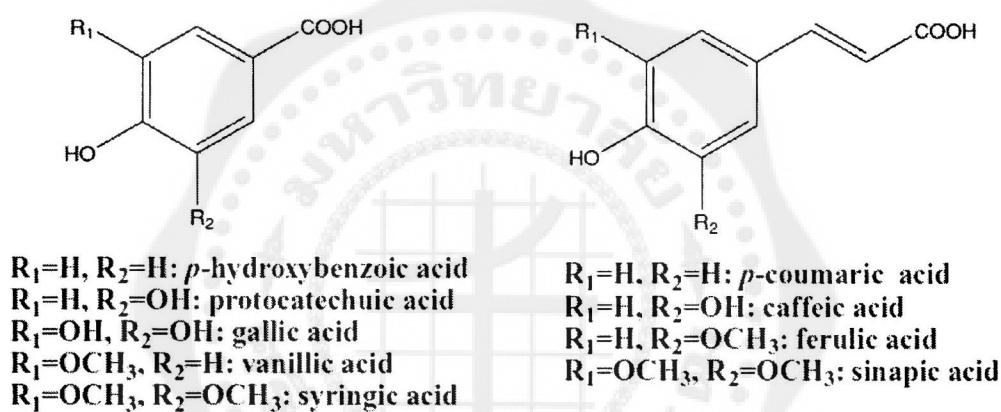
Mesona chinensis and *Cissampelos pareira* L. are mucilage plant. They are widely used in many purposes especially as food gradient. Different solvents including water, hot water, ethanol, hexane, acetone, and ethyl acetate were used for extracting phytochemicals from the plant leaves. The extracts of each solvent were investigated for their antioxidant activity by DPPH assay. IC_{50} of *Mesona chinensis* extracts ranged from 1.0-4.4 mg/mL, while IC_{50} of *Cissampelos pareira* L. ranged from 0.2-9.0 mg/mL. In both cases, hot water provided the best antioxidant efficiency. Total phenolic contents of *Mesona chinensis* and *Cissampelos pareira* L. varied from 10.87-157.75 and 23.31-186.80 μg gallic acid equivalent/mL, respectively. In addition, flavonoid contents varied from 0.01-0.47 and 0.04-0.32 μg quercetin equivalent/mL, respectively. However, there were no correlation between the total phenolic and/or flavonoid contents and antioxidant activity in these plant leaves.

บทที่ 1 บทนำ

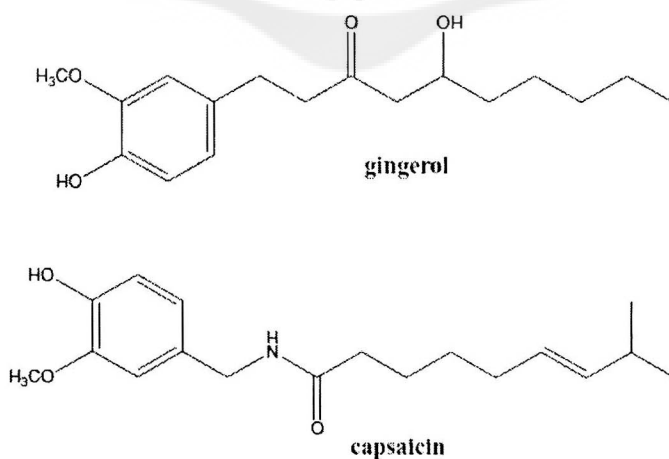
สารต้านอนุมูลอิสระคือสารประกอบที่มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซเดชันของไลปิดหรือโมเลกุลอื่นๆได้ โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะไปยับยั้ง oxidizing chain reaction ในขั้นของการเกิด initiation หรือไม่ก่ิขึ้นของการเกิด propagation ในธรรมชาติสามารถพบสารต้านอนุมูลอิสระได้ในทุกส่วนของพืช ทั้งพืชที่ใช้เป็นอาหารและพืชอื่นๆ สำหรับตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในพืช ได้แก่ vitamins, phenols, carotenoids, flavonoids, dietary glutathione, และ endogeneous metabolites เป็นต้น [1] พืชผักและผลไม้ต่างชนิดกันก็อาจมีองค์ประกอบที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันด้วย [2-4] โดยสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชพบว่ามีคุณสมบัติในการเป็น singlet และ triplet oxygen quenchers, free radical scavengers, peroxide decomposers, enzyme inhibitors, และ synergists [1] ซึ่งมีการรายงานว่าสารประกอบพืชต่างๆจะช่วยรักษาหรือลดสภาวะเจ็บป่วยจากโรคได้หลายชนิด เช่นโรคหัวใจ [5] โรคเบาหวาน [6-8] โรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น นอกจากนี้ยังช่วยในการเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ช่วยลดความชราตามวัยและลดการอักเสบได้ [9-10] ดังนั้นพืชสมุนไพรต่างๆจึงมีความสำคัญอย่างมากในการถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคจนถึงปัจจุบัน โดยสารเคมีในพืชที่มีฤทธิ์ทางยาเหล่านี้ส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยเฉพาะกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์อื่นๆ

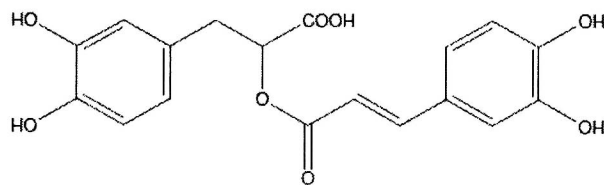
โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกโดยทั่วไปจะประกอบด้วยวงอะโรมาติกตั้งแต่หนึ่งวงขึ้นไป และมีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่ที่วงอะโรมาติกอย่างน้อยหนึ่งหมู่ ทำให้โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกมีความหลากหลายอย่างมาก คือกว่า 8,000 โครงสร้างที่มีการค้นพบจนถึงปัจจุบัน [11] โดยสารประกอบฟีนอลิกสามารถแบ่งออกเป็นหลายกลุ่มย่อยตามลักษณะโครงสร้าง ได้แก่ (1) phenolic acid และสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียง (2) flavonoids (3) tannin (4) stilbenes (5) curcuminoids (6) coumarins (7) lignans (8) quinines และ (9) อื่นๆ ทั้งนี้การแบ่งกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกขึ้นอยู่กับจำนวนของวงฟีนอลและการเชื่อมต่อของแต่ละวงฟีนอลเข้าด้วยกัน [12]

Phenolic acids และ analogs; phenolic acids เป็นกลุ่มหลักในบรรดาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยสามารถพบได้ทั่วไปในอาณาจักรพืช โดย phenolic acids ที่พบมากได้แก่สารที่มีโครงสร้างเป็น (1) hydroxybenzoic acid ได้แก่ gallic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, และ syringic acid และ (2) hydroxycinnamic acids ได้แก่ ferulic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid, และ sinapic acid ดังแสดงในภาพที่ 1 [13] ส่วนตัวอย่างโครงสร้างสารที่เป็น analog ของ phenolic acid เช่น capsaicin, rosmarinic acid, gingerol และ cynarin เป็นต้น (ภาพที่ 2)

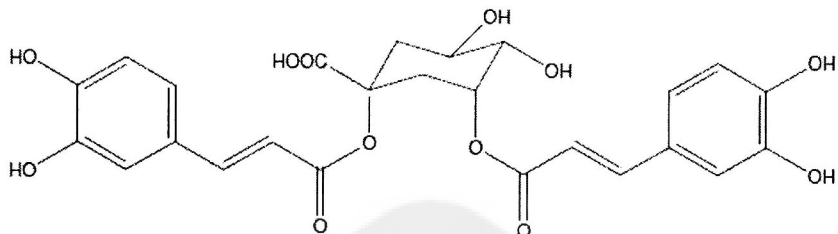


ภาพที่ 1 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของ phenolic acid ที่พบมากในพืช

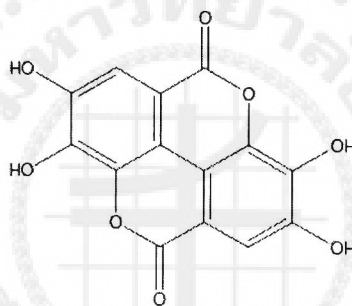




rosmarinic acid



cynarin (1,3-dicaffeoylquinic acid)

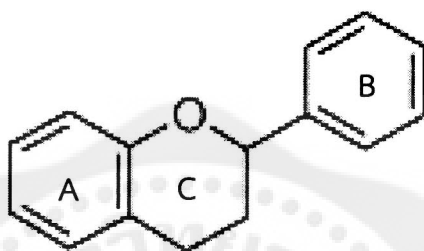


ellagic acid

ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างของสารบางชนิดที่เป็น analog ของ phenolic acid

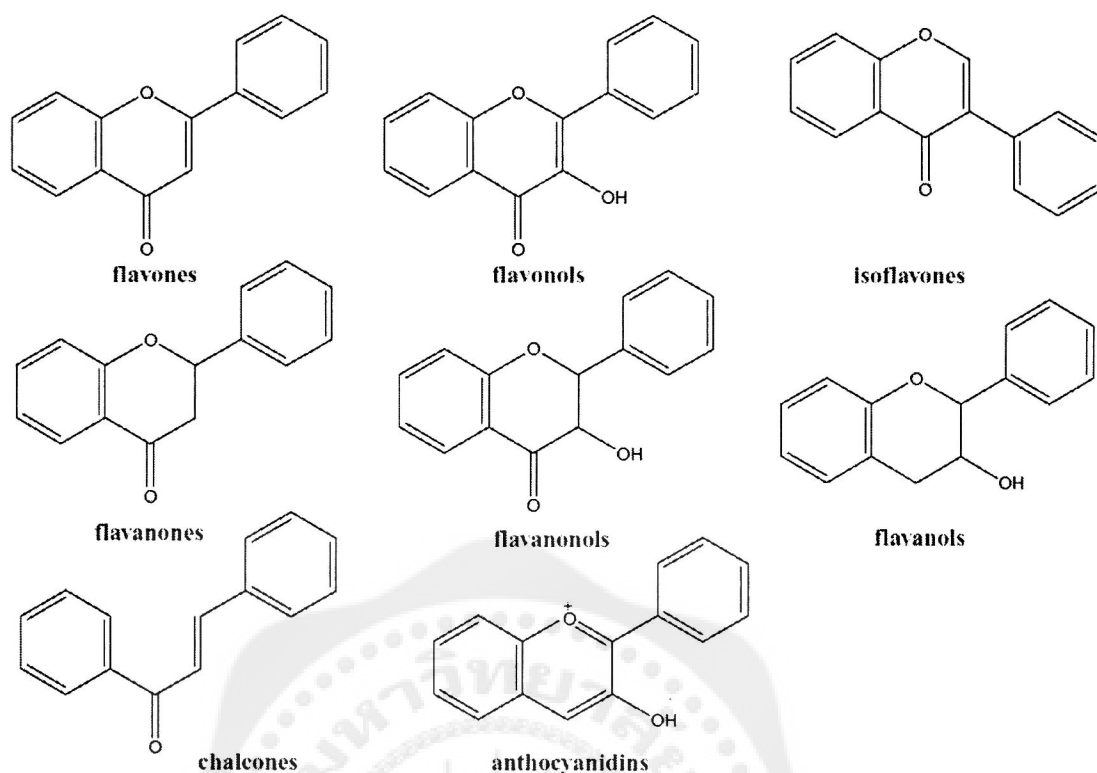
มีการศึกษาและรายงานคุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลิกมาเป็นเวลานานว่าเป็นกลุ่มสารที่ส่งผลทางชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตหลายอย่าง รวมทั้งการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [14] พืชที่มีคุณสมบัติเป็นสมุนไพรนั้นในปัจจุบันได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์หลายอย่างนอกเหนือจากการใช้ในทางการแพทย์ อาทิเช่น อาหาร เครื่องดื่ม สารปรุงแต่ง และเครื่องสำอาง [15] ดังนั้น crude extract จากส่วนต่างๆของพืชและสมุนไพรจึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางยาจะเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารแก่ผู้บริโภค

สารประกอบฟลาโวนอยด์จัดเป็นหนึ่งในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งประกอบด้วยสมาชิกกว่า 4,000 โครงสร้างที่พบในธรรมชาติ [16] สารประกอบฟีนอลิกที่จัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์จะมีลักษณะโครงสร้างพื้นฐานที่ประกอบด้วยโครงสร้างหลักเป็น phenylbenzopyrone ($C_6-C_3-C_6$) คือจะประกอบด้วยวงอะโรเมติก 2 วง (วง A และ B) ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยคาร์บอน 3 ตัว และถูกเกิดเป็นวงขึ้นด้วยออกซิเจนทำให้เกิดโครงสร้างคล้ายวง pyran (วง C) ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของ phenylbenzopyrone

สารประกอบฟลาโวนอยด์สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ตามลักษณะของวง C (ระดับความอิ่มตัว การเกิดออกซิเดชัน และการเปิดหรือปิดวง) ดังนี้ flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanols, anthocyanins, chalcones, isoflavonoids, neoflavonoids และ biflavonoids ดังแสดงในภาพที่ 4 [11] นอกจากนี้โครงสร้างฟลาโวนอยด์ของแต่ละกลุ่มย่อยยังสามารถแตกต่างกันได้เมื่อมีหมู่แทนที่ ณ ตำแหน่งต่างๆของวง A และ B จึงทำให้โครงสร้างของฟลาโวนอยด์มีความหลากหลายอย่างมาก โดยฟลาโวนอยด์ในธรรมชาตินั้นสามารถพบได้ทั้งในรูปของฟลาโวนอยด์อิสระและในรูปที่เชื่อมต่อกับโมเลกุลอื่นเช่นสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต [17]



ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

เนื่องจากโครงสร้างและหมู่แทนที่ที่แตกต่างกันส่งผลให้สารประกอบฟลาโวนอยด์แต่ละตัวมี phenoxyl radical stability ที่แตกต่างกันซึ่งนำไปสู่การมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันด้วย โดยฟลาโวนอยด์ต่างๆโดยทั่วไปสามารถพบได้ในพืชผักผลไม้ที่มนุษย์และสัตว์กินเป็นอาหาร และยังพบว่าฟลาโวนอยด์เป็นสารหลักในกลุ่มฟีนอลิกที่พบในพืชสมุนไพรและผักผลไม้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ [13, 18-23] และถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางยาของพืชผักและสมุนไพรเป็นจำนวนมากมาเป็นระยะเวลานาน แต่ก็ยังมีพืชอีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาอย่างครอบคลุม ทำให้ยังคงต้องทำการศึกษาต่อไปเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของพืชที่มีสารเมือกเป็นองค์ประกอบและถูกใช้ในการประกอบเป็นอาหารซึ่งได้แก่ต้นเงาะก๊วยและต้นหมาน้อย เนื่องจากสารเมือกในพืชโดยทั่วไปจะมีคาร์โบไฮเดรตสายยาว

(polysaccharide) เป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งสารเมือกนี้มีบทบาทหลายอย่างทั้งกักเก็บน้ำ ให้ความชุ่มชื้น และทำหน้าที่เป็นอาหารสำรองสำหรับพืชด้วย โดยพืชที่มีสารเมือกเหล่านี้เป็นที่ทราบกันดีว่ามีคุณสมบัติในการดูดซับและจัดสรรพืชในระบบทางเดินอาหารและควบคุมการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กจำพวก แบคทีเรีย ยีสต์ และราที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งสารเคมีในพืชเหล่านี้แสดงคุณสมบัติในการเป็นยาปฏิชีวนะ ลดกรดในกระเพาะอาหาร เป็นสารช่วยลดการระคายเคือง ช่วยให้ความชุ่มชื้น ช่วยในการสมานแผล และช่วยในการกำจัดสารพิษได้ อย่างไรก็ตามสารเมือกจากพืชเหล่านี้ไม่ได้รับความสนใจเท่าที่ควรในการนำไปใช้ประโยชน์ในทางยา ถึงแม้ว่าสมุนไพรหลายชนิดจะมีสารเมือกเป็นองค์ประกอบอยู่ปริมาณมาก ดังนั้น การศึกษาถึงฤทธิ์ทางยาของสารเมือกจากพืชจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการช่วยให้คนทั่วไปได้เห็นถึงประโยชน์ของสารที่ผลิตโดยพืชที่อาจถูกมองข้ามไป โดยในโครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมือกจากต้นเฉาก๊วยและต้นหนาน้อย ซึ่งเป็นพืชที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในสังคมไทยในการนำมาประกอบเป็นอาหารและเครื่องดื่ม โดยที่เราอาจจะเคยได้ยินกันมาว่าพืชเหล่านี้มีสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาอย่างจริงจังเกี่ยวกับคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารเมือกจากพืชทั้งสองชนิดนี้ โดยจะทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารโพลีฟีนอลรวมและปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อใช้ตัวทำละลายในการสกัดต่างชนิดกัน

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ต้นหมาน้อย (*Cissampelos pareira* L.) เป็นพืชตระกูลไม้เถาเลื้อยในวงศ์ Menispermaceae ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยวรูปหัวใจ ผิวใบมีขนนุ่มปกคลุม สามารถพบได้ทั่วไปทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ใบของต้นหมาน้อยสามารถนำมาประกอบเป็นอาหารได้ โดยการนำใบของต้นหมาน้อยมาคั้นช้ำกับน้ำแล้วกรองเอาเฉพาะน้ำสีเขียวที่เกิดการแข็งตัวได้ ซึ่งนอกจากจะนำมาเป็นอาหารแล้ว ต้นหมาน้อยยังมีสรรพคุณทางยาหลายอย่าง เช่นช่วยลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเส้นเลือด เนื่องจากในใบของต้นหมาน้อยจะมีสารเพคตินที่ช่วยในการดูดซับคอเลสเตอรอลได้ นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณในการเป็นยาบำรุง ยาแก้ร้อนใน และยาแก้ปวดท้อง ซึ่งนอกจากเพคตินแล้ว ในต้นหมาน้อยยังพบสารเคมีที่สำคัญอื่นๆด้วย เช่นสารจำพวกอัลคาลอยด์ ที่พบมากในส่วนของราก โดยรากของต้นหมาน้อยมีการนำไปใช้ในทางยาหลายขนาน เช่น โรคหัวใจ ป้องกันการแท้งบุตร ช่วยในการคลายกล้ามเนื้อ [24] และยังมีคุณสมบัติในการต้านสารก่อมะเร็งอีกด้วย [25] สารอื่นๆที่พบในรากต้นหมาน้อยได้แก่ quercitol และ sterol [26] สำหรับใบและลำต้นของต้นหมาน้อยก็มีสรรพคุณทางยาหลายอย่างเช่นกัน โดยส่วนของลำต้นใช้ในการลดไข้ และบำรุงโลหิต ส่วนของใบใช้สำหรับแก้หืด และพอกแผลที่เกิดจากฝีเป็นต้น

ส่วนเถากวายเป็นขนมที่เป็นที่นิยมและรู้จักกันอย่างแพร่หลายสำหรับคนไทย โดยขนมเถากวายนั้นทำมาจากสารเมือกที่สกัดออกมาจากต้นเถากวาย (*Mesona chinensis*) ซึ่งต้นเถากวายเป็นไม้พุ่มกึ่งเลื้อยขนาดเล็ก จัดอยู่ในตระกูลเดียวกับสะระแหน่จึงมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก มีดอกสีขาวออกดอกเป็นช่อคล้ายดอกกะเพรา เถากวายเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการแก้ร้อนใน กระหายน้ำ และช่วยลดความดันโลหิตสูงได้ จากงานวิจัยในการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดสารเคมีจากต้นเถากวายเป็นพบว่า สารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [27]

ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาถึงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระจากสารเมือกของพืชทั้งสองชนิดนี้ซึ่งเป็นที่นิยมมาบริโภค จากการสกัดโดยใช้น้ำตามกระบวนการของการสกัดเพื่อนำไปใช้ในการประกอบอาหาร และเปรียบเทียบปริมาณที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นสารสกัด นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระต่อปริมาณของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วย โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่จะทำการศึกษาในงานวิจัยนี้คือสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารเคมีที่พบในอัตราส่วนที่มากในพืชโดยทั่วไป



บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1. พืชที่มีสารเมือกเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ต้นเงาะก้วยและต้นหมาน้อย โดยใช้เฉพาะส่วนใบในการศึกษา

3.1.2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1. Spectrophotometer

2.2. Shaker

2.3. Hot plate

2.4. กระดาษกรอง

2.5. เครื่องชั่ง

2.6. เครื่องแก้วพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ

3.1.3. สารเคมี

3.1. DPPH (2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)

3.2. Trolox (6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

3.3. Folin-ciocalteau reagent

3.4. Gallic acid

3.5. Quercetin

3.6. NaNO_3

3.7. AlCl_3

3.8. Solvents; water, hot water, ethanol, hexane, acetone, และ ethyl acetate

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1. การเตรียมสารสกัดจากต้นเหาก้วยและต้นหมาน้อย

นำใบพืชที่ล้างสะอาดไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C จนแห้งสนิท โดยใช้เป็นเวลาประมาณ 48-72 ชั่วโมง จากนั้นนำใบพืชไปบดให้ละเอียดแล้วสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ น้ำ น้ำร้อน เอทานอล เฮกเซน อะซิโตน และเอทิลอะซิเตท โดยการแช่ใบพืชน้ำหนักประมาณ 100 กรัม ในตัวทำละลายปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วกรองเอาสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายด้วยเอทานอลให้เป็น 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปทำการวิเคราะห์

3.2.2. การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของใบเหาก้วยและใบหมาน้อยด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

วิธีในการศึกษาทำการดัดแปลงมาจากวิธีของ Cam และคณะ (2009) [28] โดยมีวิธีการดังนี้

1. เตรียมสารละลาย 0.1 mM DPPH ในเอทานอล
2. ปิเปตสารสกัดของใบเหาก้วยและใบหมาน้อยในตัวทำละลายแต่ละชนิดปริมาตร 0.00, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 และ 2.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 1-7 แล้วเติม Absolute ethanol ปริมาตร 2.00, 1.95, 1.90, 1.75, 1.50, 1.00 และ 0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 1-6 ตามลำดับ จากนั้นเติม 0.1 mM DPPH ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอดทดลอง แล้วผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

3. คำนวณค่า %inhibitor จากสมการ

$$\%inhibitor = \frac{(A_{control} - A_{sample})}{A_{control}} \times 100$$

เมื่อ $A_{control}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในหลอดที่ 1 ซึ่งไม่มีการเติมสารสกัดเลย

และใช้ Absolute ethanol เป็นสารละลาย blank

4. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %inhibition กับปริมาณของสารสกัด เพื่อหาค่า IC_{50}

5. เปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารสกัดกับ Trolox เมื่อเตรียมสารละลาย Trolox ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น

เท่ากับ 100 $\mu\text{g/mL}$

3.2.3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย

1. การสร้างกราฟมาตรฐานของ Gallic acid

1.1. เตรียมสารละลาย Gallic acid ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

1.2. ปิเปตสารละลาย Gallic acid ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, และ 12.5 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 mL แล้วปรับปริมาตรจนครบ 25 mL ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลาย Gallic acid เข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

1.3. ปิเปตสารละลาย Gallic acid ที่ความเข้มข้น 10-50 $\mu\text{g/mL}$ ความเข้มข้นละ 0.4 mL ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 2.0 mL ลงทุกหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งพักไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 7.5% sodium carbonate ปริมาตร 1.6 mL แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

1.4. สร้างกราฟมาตรฐานของ Gallic acid โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ Gallic acid

2. การหาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย

2.1. ปิเปตสารสกัดใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ปริมาตร 0.4 mL ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 2.0 mL เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งพักไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 7.5% sodium carbonate ปริมาตร 1.6 mL แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

2.2. คำนวณปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมเป็น Gallic acid equivalents

3.2.4. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย

1. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดของใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย

1.1 นำสารสกัดจากใบพืชมา 1 mL ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร แล้วเติม 5% (w/w) NaNO_2 ปริมาตร 0.7 mL และ 30% (v/v) ethanol ปริมาตร 10 mL ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้เป็นเวลาประมาณ 5 นาที

1.2 เติม 10% (w/w) AlCl_3 ปริมาตร 0.7 mL ลงในขวดวัดปริมาตร ผสมให้เข้ากันก่อนตั้งไว้เป็นเวลาประมาณ 5 นาที จากนั้นเติม 1 M NaOH ปริมาตร 5 mL ลงไป แล้วปรับปริมาตรเป็น 25.00 mL ด้วย absolute ethanol ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้นาน 10 นาทีก่อนทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 430 nm วิธีในการศึกษาทำการดัดแปลงมาจากวิธีของ Ghasemzadeh และคณะ [29]

2. สร้างกราฟมาตรฐานของ Quercetin โดยเตรียมสารมาตรฐานในสถานะเดียวกันกับสารสกัดเพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ quercetin (ใน ethanol) ระหว่าง 0.03 – 0.5 $\mu\text{g/mL}$ และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 430 nm

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของใบเผือกวัยและใบหมาน้อยด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

จากการศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากใบเผือกวัยและใบหมาน้อยด้วยวิธี DPPH assay เมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำ น้ำร้อน เอทานอล เฮกเซน อะซิโตน และเอทิลอะซิเตท พบว่าเมื่อค่า%inhibition จะแปรผันตามปริมาณของสารสกัดของพืชทั้ง 2 ชนิดสำหรับตัวทำละลายทุกชนิดที่ทำการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

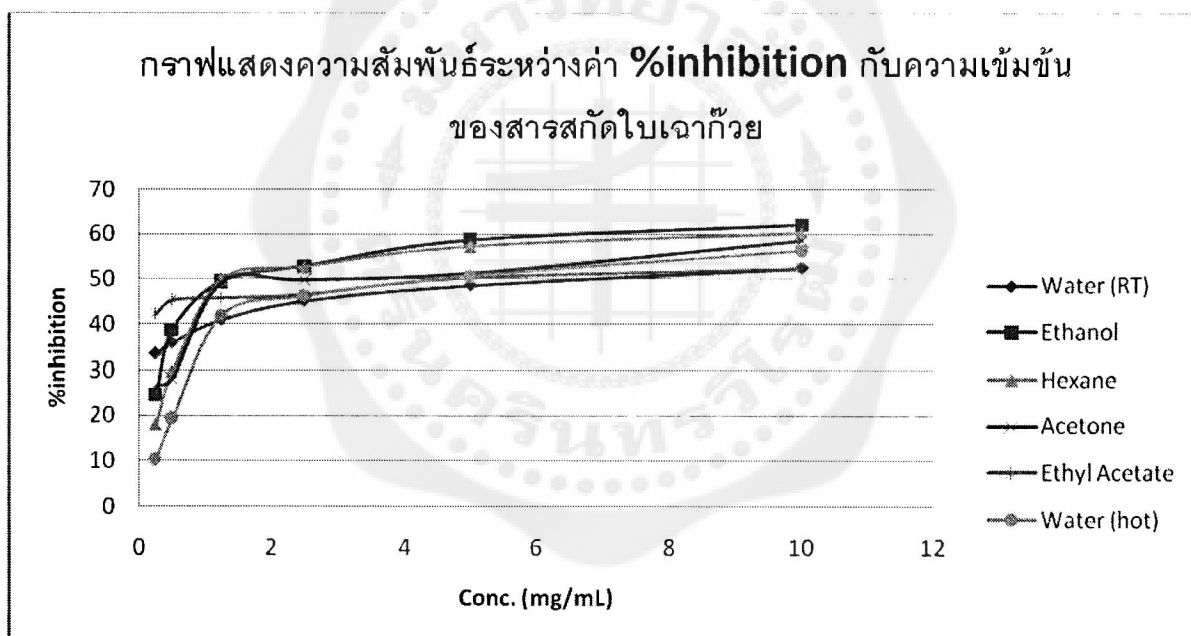
ตารางที่ 1 แสดงค่า %inhibition ของสารสกัดจากใบเผือกวัยที่ความเข้มข้นต่างๆสำหรับสารสกัดแต่ละชนิด

ปริมาณใบเผือกวัย (mg/mL)	%inhibition					
	water	Ethanol	Hexane	Acetone	Ethyl Acetate	Hot water
0.25	33.60	24.68	18.06	26.44	42.35	10.34
0.50	36.03	38.75	29.77	28.20	45.35	19.39
1.25	41.00	49.48	50.03	49.29	45.89	42.00
2.50	45.17	52.90	52.85	49.81	46.64	46.28
5.00	48.64	58.67	57.41	51.33	50.30	50.71
10.00	52.42	62.05	60.26	58.57	52.27	56.39

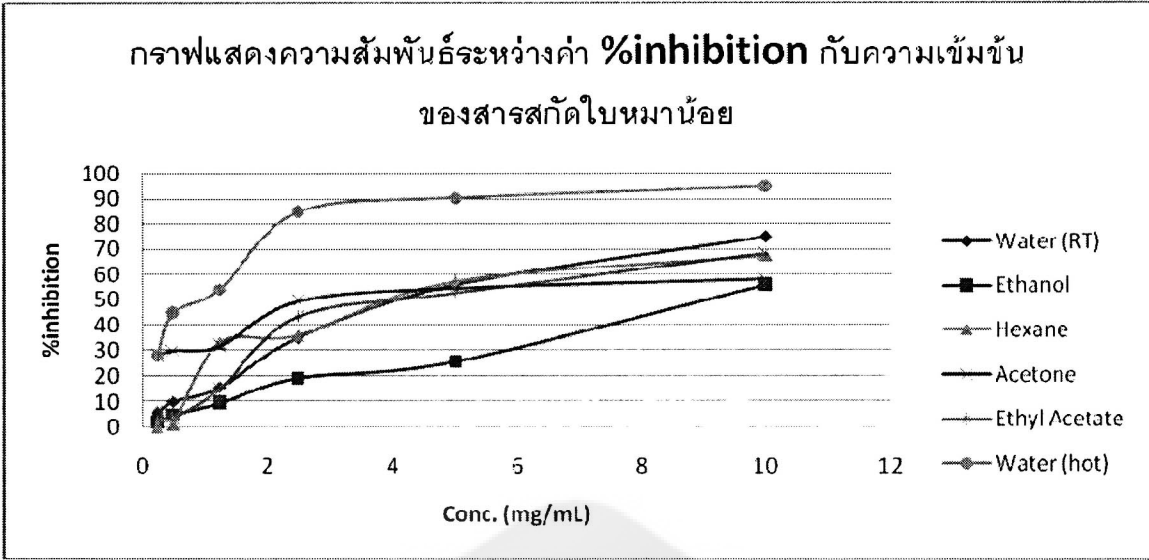
ตารางที่ 2 แสดงค่า %inhibition ของสารสกัดจากใบหมาน้อยที่ความเข้มข้นต่างๆสำหรับสารสกัดแต่ละชนิด

ปริมาณใบหมาน้อย (mg/mL)	%inhibition					
	Water	Ethanol	Hexane	Acetone	Ethyl Acetate	Hot water
0.25	5.78	1.90	0.09	27.94	2.65	28.27
0.50	9.97	4.93	1.247	29.94	3.42	44.63
1.25	15.69	9.39	33.12	31.68	15.12	54.15
2.50	34.84	19.31	36.02	49.28	43.47	84.62
5.00	55.80	25.81	57.19	54.66	52.86	90.46
10.00	74.86	55.81	67.54	58.25	68.63	95.09

โดยประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจะถูกรายงานผลเป็นค่า IC_{50} ซึ่งหมายถึงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH เหลืออยู่ 50% โดยสารสกัดที่ให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่าแสดงว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า และจากข้อมูลในตารางที่ 1 และ 2 สามารถนำมาพลอตกราฟเพื่อหาค่า IC_{50} ของสารสกัดจากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยได้ดังแสดงในภาพที่ 1 และ 2 ตามลำดับ พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้ตัวทำละลายต่างๆสำหรับใบเฉาก๊วยกับใบหมาน้อยจะแตกต่างกัน และไม่แปรตามสภาพขั้วของสารสกัด ดังแสดงในตารางที่ 3



ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า %inhibition สำหรับ DPPH assay กับปริมาณสารสกัดจากใบเฉาก๊วยเมื่อใช้ตัวทำละลายต่างๆ



ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า %inhibition สำหรับ DPPH assay กับปริมาณสารสกัดจากใบหมาน้อยเมื่อใช้ตัวทำละลายต่างๆ

ตารางที่ 3 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดจากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยด้วยวิธี DPPH assay เมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ

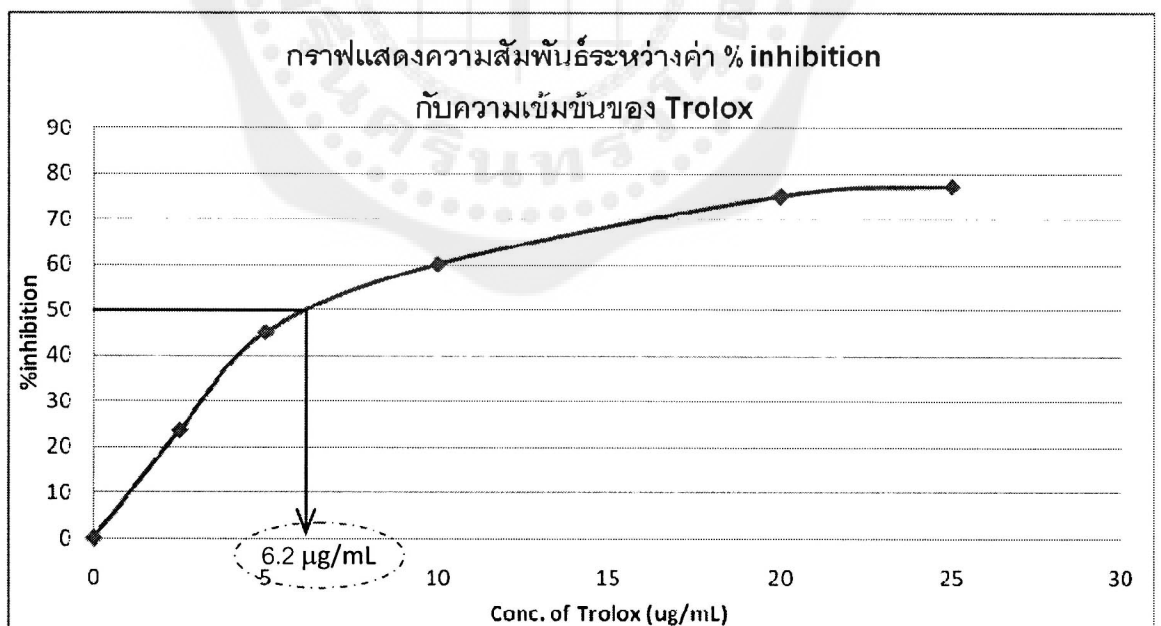
ชนิดของตัวทำละลาย	IC_{50} (mg/mL) ของใบเฉาก๊วย	IC_{50} (mg/mL) ของใบหมาน้อย
Water	6.0*	4.0 [#]
Ethanol	1.4	9.0
Hexane	1.2	3.9
Acetone	1.2	2.8
Ethyl Acetate	4.4	4.0
Hot water	5.0*	1.0*

หมายเหตุ * สารสกัดถูกเจือจางลงไป 5 เท่าก่อนนำไปทำการตรวจวัด

สารสกัดถูกเจือจางลงไป 2 เท่าก่อนนำไปทำการตรวจวัด

จากตารางที่ 3 สามารถสรุปได้ว่าเมื่อใช้ใบพืชในปริมาณที่เท่ากัน การใช้น้ำร้อนจะสามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระออกมาได้มากที่สุดทั้งในกรณีของใบเฉาก๊วย (1 mg/mL) และใบหมาน้อย (0.2 mg/mL) ในขณะที่การใช้เอทานอลจะสามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากใบหมาน้อยออกมาได้ปริมาณน้อยที่สุด ส่วน ethyl acetate สามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระออกมาจากใบเฉาก๊วยได้น้อยที่สุด

จากการนำสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox ที่มีความเข้มข้นต่างๆ (0 - 25 $\mu\text{g/mL}$) มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้น (ภาพที่ 3) เพื่อหาค่า IC_{50} พบว่า trolox มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.2 $\mu\text{g/mL}$

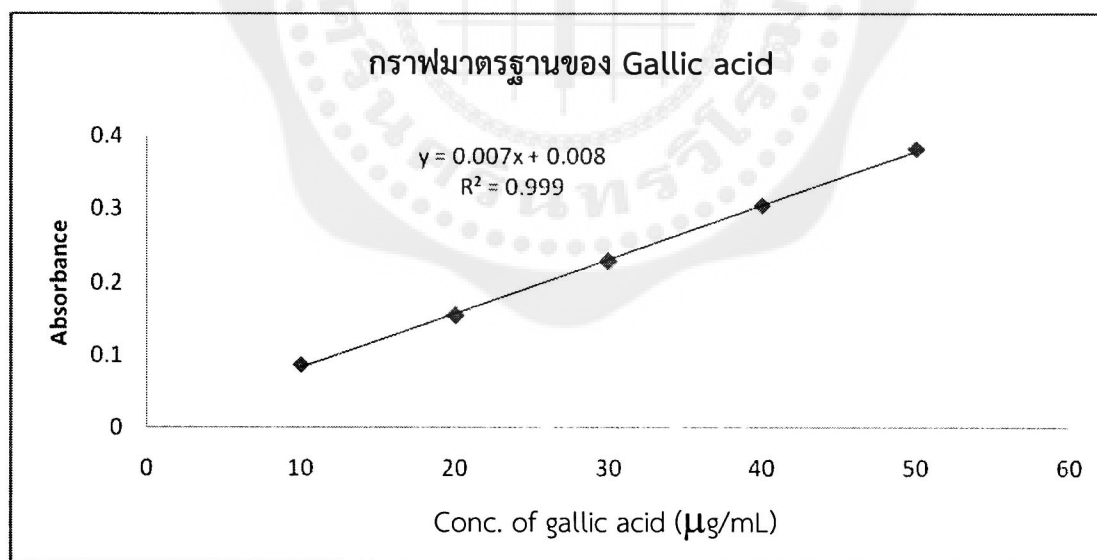


ภาพที่ 3 แสดงการหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Trolox

ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ระหว่างสารมาตรฐาน trolox กับสารสกัดใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยจะแตกต่างกันอย่างมาก โดยสารมาตรฐาน trolox จะมีค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่ามาก นั่นคือมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดจากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยอย่างมาก แต่จะเห็นว่าความเข้มข้นของสารสกัดคำนวณมาจากน้ำหนักของใบแห้งของพืชทั้ง 2 ชนิด ไม่ใช่ น้ำหนักของสารสกัดโดยตรง ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุให้ค่า IC_{50} ของสารสกัดใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยมีค่าที่สูง

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย

ในการตรวจวัดปริมาณของสารประกอบโพลีฟีนอลรวมของสารสกัดจากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's method เมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid (ภาพที่ 4) ให้ผลการตรวจวัดดังแสดงในตารางที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงกราฟมาตรฐานของ gallic acid

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณโพลีฟีนอลรวมของสารสกัดจากใบเนกาอียและใบหมาน้อยด้วยวิธี Folin-Ciocalteu’s method โดยใช้ gallic acid เป็นโพลีฟีนอลมาตรฐานเมื่อใช้ตัวทำละลายต่างๆ

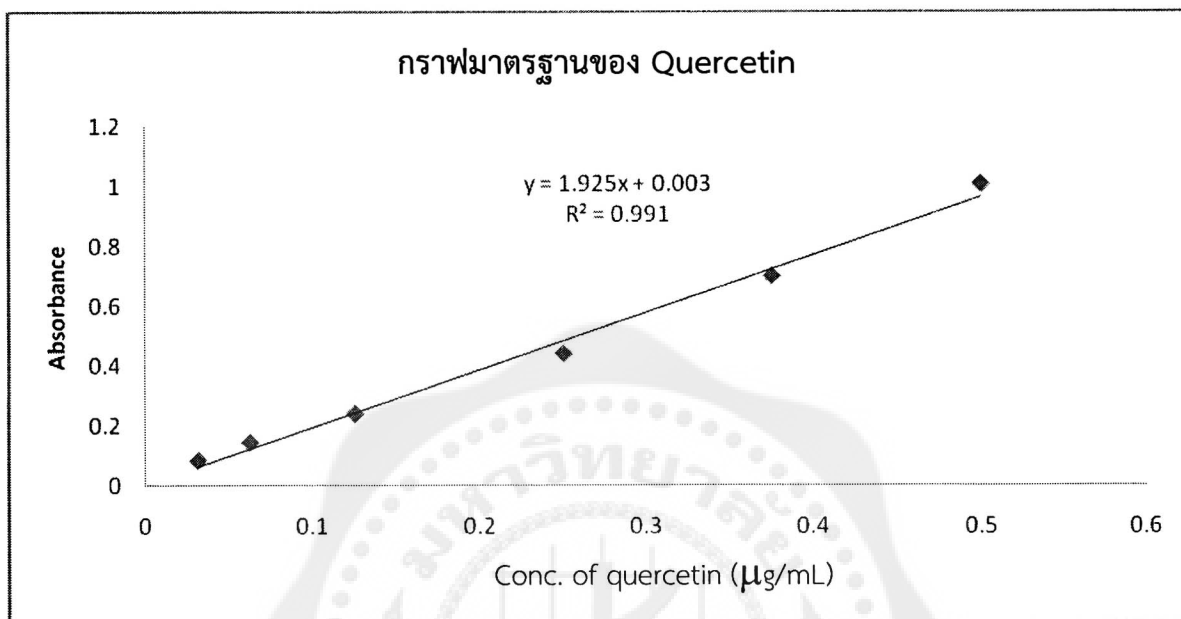
ชนิดของตัวทำละลาย	โพลีฟีนอลรวมในใบ เนกาอีย (µg/mL)	โพลีฟีนอลรวมในใบ หมาน้อย (µg/mL)
Water	15.33*	23.98*
Ethanol	30.87	27.77
Hexane	24.66	32.09
Acetone	19.26	26.82
Ethyl Acetate	10.87	23.31
Hot water	31.55*	37.36*

หมายเหตุ * สารสกัดถูกเจือจางลงไป 5 เท่าก่อนนำไปทำการตรวจวัด

จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าปริมาณของโพลีฟีนอลในสารสกัดขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ไม่ได้แปรผันกับสภาพขั้วของตัวทำละลาย โดยปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมที่สกัดได้จากพืชทั้งสองชนิดจะมีทิศทางไปในแนวเดียวกันคือจะพบปริมาณน้อยที่สุดเมื่อใช้เอทิลอะซีเตทในการสกัด และใกล้เคียงกับปริมาณที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล เฮกเซน และอะซีโตน ส่วนการสกัดด้วยน้ำ และน้ำร้อนจะพบปริมาณโพลีฟีนอลรวมสูงขึ้นค่อนข้างมากตามลำดับ โดยน้ำร้อนสามารถสกัดสารโพลีฟีนอลจากใบเนกาอียและใบหมาน้อยออกมาได้มากที่สุด คือ 157.75 และ 186.80 µg/mL ตามลำดับ

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย

ในการตรวจวัดปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วย Colorimetric aluminum chloride method โดยใช้ quercetin เป็นฟลาโวนอยด์มาตรฐาน (ภาพที่ 5) ให้ผลการตรวจวัดดังแสดงในตารางที่ 5



ภาพที่ 5 แสดงกราฟมาตรฐานของ Quercetin

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากใบเนกาถ้วยและใบหมาน้อยด้วยวิธี Colorimetric aluminum chloride method โดยใช้ quercetin เป็นฟลาโวนอยด์มาตรฐาน เมื่อใช้ตัวทำละลายต่างๆ

ชนิดของตัวทำละลาย	ฟลาโวนอยด์ในใบ เนกาถ้วย (µg/mL)	ฟลาโวนอยด์ในใบ หมาน้อย (µg/mL)
Water	0.21*	0.13*
Ethanol	0.01	0.06
Hexane	0.47	0.21
Acetone	0.07	0.09
Ethyl Acetate	0.04	0.04
Hot water	0.22*	0.16*

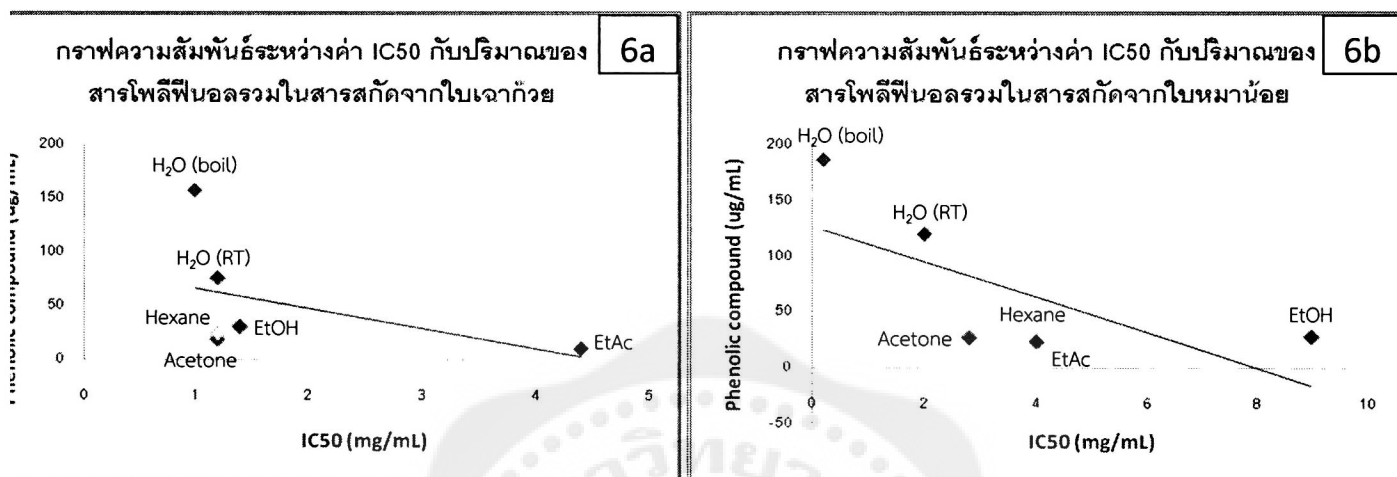
หมายเหตุ * สารสกัดถูกเจือจางลงไป 2 เท่าก่อนนำไปทำการตรวจวัด

จากตารางที่ 5 พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากทั้งใบเนกาถ้วยและใบหมาน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายในการสกัด และมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันคือการใช้ น้ำ น้ำร้อน และเอทิลเอเซน จะสามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์ออกมาได้ปริมาณสูงกว่าการใช้เอทานอล อะซีโตน และเอทิลอะซีเตท

4.4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระต่อปริมาณของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

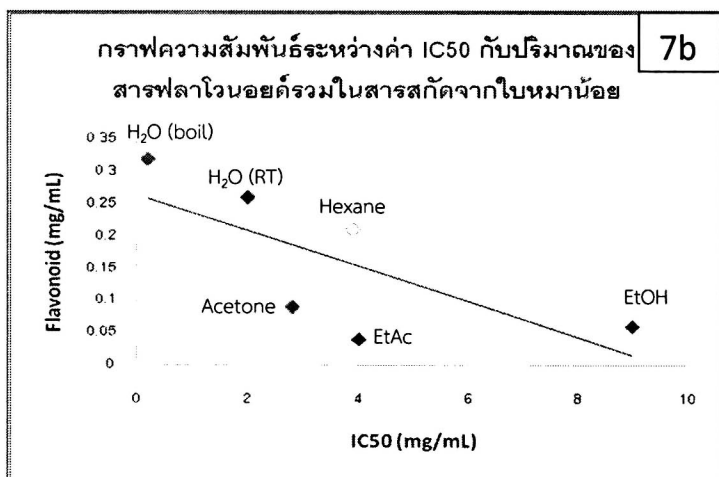
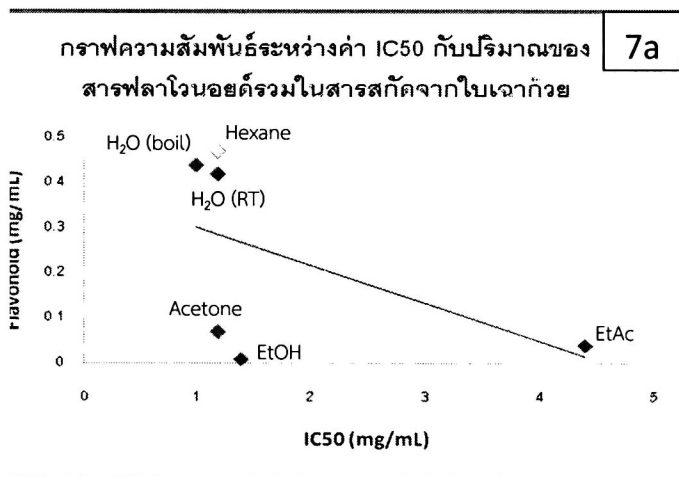
เนื่องจากสารเคมีในพืชหลายชนิดมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งสารประกอบฟีนอลิกและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารเคมีหลักที่พบมากในพืชโดยทั่วไป ดังนั้นจากข้อมูลการหาค่า

IC_{50} และการตรวจวัดปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกกับปริมาณของฟลาโวนอยด์ (หัวข้อ 4.1-4.3) จึงนำมาสร้างกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} กับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จากสารสกัดใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยเมื่อใช้ตัวสกัดต่างชนิดกัน ดังแสดงในภาพที่ 6-7



ภาพที่ 6 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) ของสารสกัดในตัวทำละลายชนิดต่างๆ กับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก (6a: ใบเฉาก๊วย, 6b: ใบหมาน้อย)

โดยสัญลักษณ์ $\blacklozenge$ = น้ำร้อน, $\blacklozenge$ = น้ำ ญ.อุณหภูมิต่ำ, $\blacklozenge$ = อะซีโตน, $\blacklozenge$ = เฮกเซน, $\blacklozenge$ = เอทิลอะซีเตต, และ $\blacklozenge$ = เอทานอล



ภาพที่ 7 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (IC₅₀) ของสารสกัดในตัวทำละลายชนิดต่างๆ กับปริมาณของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (7a: ใบเฉาก๊วย, 7b: ใบหมาน้อย)

โดยสัญลักษณ์ ◆ = น้ำร้อน, ◆ = น้ำ ฝน อุณหภูมิห้อง, ◆ = อะซีโตน, ◇ = เฮกเซน, ◆ = เอทิลอะซีเตต, และ ◆ = เอทานอล

จากกราฟความสัมพันธ์ 6-7 พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ไม่ได้มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งจากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย เนื่องจากตัวทำละลายที่สามารถสกัดเอาสารประกอบฟีนอลิกหรือฟลาโวนอยด์ออกมาจากใบพืชได้มากกว่า ไม่ได้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า (มีค่า IC₅₀ น้อยกว่า)

บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

เนื่องจากมนุษย์มีการนำพืชต่างๆมาใช้ประโยชน์ในหลายด้านโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เป็นอาหารและยารักษาโรค เพราะสารเคมีในพืชหลายชนิดเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของผู้บริโภค และในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบเนาก้วยและใบหมาน้อยซึ่งเป็นพืชที่ให้สารเมือกและมีการนำสารเมือกนี้มาประกอบเป็นอาหารอย่างแพร่หลาย โดยได้มีการเลือกใช้ตัวสกัดที่หลากหลายเพื่อศึกษาความสามารถในการสกัดเอาสารต้านอนุมูลอิสระออกจากใบเนาก้วยและใบหมาน้อยได้แก่ น้ำ น้ำร้อน เอทานอล เฮกเซน อะซิโตน และเอทิลอะซิเตท

จากการศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากใบเนาก้วยและใบหมาน้อยด้วยวิธี DPPH assay เมื่อใช้ตัวสกัดแต่ละชนิด และรายงานผลเป็นค่า IC_{50} พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้ตัวทำละลายต่างๆสำหรับใบเนาก้วยกับใบหมาน้อยจะแตกต่างกัน และไม่แปรตามสภาพขั้วของสารสกัด โดยพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในใบเนาก้วยจะมีค่าต่ำที่สุดเมื่อใช้เอทานอลในการสกัด ส่วนในใบหมาน้อยจะมีค่าต่ำที่สุดเมื่อใช้เอทิลอะซิเตทในการสกัด แต่สารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดจะแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อใช้น้ำร้อนในการสกัดเช่นเดียวกัน คือ ใบเนาก้วย ให้ค่า IC_{50} ที่ 1 mg/mL และใบหมาน้อยให้ค่า IC_{50} 0.2 mg/mL และเมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้จากสารสกัดของพืชทั้งสองชนิดกับ Trolox พบว่า Trolox ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 6.2 μ g/mL ทั้งนี้การที่ค่า IC_{50} จากสารสกัดใบเนาก้วยและใบหมาน้อยมีค่าที่สูงกว่า Trolox มาก เนื่องจากปริมาณของสารสกัดคำนวณจากน้ำหนักแห้งของใบพืชซึ่งรวมน้ำหนักของกากใบด้วย ไม่ใช่เพียงน้ำหนักของ crude extract

ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมในสารสกัดใบเนาก้วยและใบหมาน้อย พบว่าปริมาณของโพลีฟีนอลในสารสกัดขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ไม่ได้แปรผันกับสภาพขั้วของตัวทำละลาย โดยปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลรวมที่สกัดได้จากพืชทั้งสองชนิดจะมีทิศทางไปในแนวเดียวกันคือจะพบปริมาณน้อยที่สุดเมื่อใช้เอทิลอะซิเตทในการสกัด และใกล้เคียงกับปริมาณที่ได้จากการสกัดด้วยเอทา

นอล เฮกเซน และอะซีโตน ส่วนการสกัดด้วยน้ำ และน้ำร้อนจะพบปริมาณโพลีฟีนอลรวมสูงขึ้นค่อนข้างมากตามลำดับ

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับปริมาณโพลีฟีนอลรวมของพืชทั้งสองชนิด พบว่าไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ชัดเจน ทั้งนี้โดยทั่วไปแล้วสารสกัดที่พบปริมาณโพลีฟีนอลรวมสูง ควรที่จะมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีด้วย แต่จากผลที่ไม่เป็นไปตามที่คาดหมาย นั้นแสดงว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของพืชทั้งสองชนิดอาจเป็นผลมาจากสารประกอบชนิดอื่นเป็นหลัก นอกเหนือจากสารประกอบจำพวกโพลีฟีนอล ดังที่มีการรายงานในงานวิจัยอื่นๆก็พบเช่นเดียวกันว่าฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของโพลีฟีนอลรวม [30-32]

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาปริมาณของสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกันกับสารประกอบโพลีฟีนอล พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากทั้งใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายในการสกัด และมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน โดยพบว่าการใช้น้ำร้อน และเฮกเซน จะสามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์ออกมาได้ปริมาณสูงกว่าการใช้เอทานอล อะซีโตน และเอทิลอะซีเตต

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัด พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันเช่นเดียวกับกรณีของโพลีฟีนอลรวม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดมีความซับซ้อนประกอบด้วยสารหลายชนิดรวมทั้งสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีโครงสร้างหลากหลาย แต่เป็นที่ทราบกันดีว่ามีสารประกอบฟลาโวนอยด์บางชนิดที่มีโครงสร้างเฉพาะเท่านั้นที่จะสามารถให้โปรตอน และแสดงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ [33-34]

จากการศึกษาสรุปได้ว่าพบน้ำร้อนเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารออกฤทธิ์ทั้งสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย อีกทั้งสารสกัดจากการใช้น้ำร้อนยังให้

ค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุดในตัวทำละลายที่ทำการศึกษาทั้งหมดอีกด้วย นั่นคือการสกัดด้วยน้ำร้อนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี และสอดคล้องกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ถูกสกัดออกมาได้มาก ในขณะที่การสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นไม่พบความสอดคล้องที่ชัดเจน ซึ่งการที่น้ำร้อนมีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดสารเคมีเหล่านี้จากพืชก็ถือเป็นข้อดีกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากไม่เป็นพิษต่อร่างกายผู้บริโภค

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของทั้งใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยไม่สอดคล้องกับปริมาณของทั้งสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์อย่างชัดเจน ดังนั้นเพื่อให้ทราบว่าสารเคมีตัวใดหรือกลุ่มใดที่ส่งผลต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของพืชทั้งสองชนิดจึงควรได้รับการศึกษาต่อไป โดยการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเพื่อศึกษาองค์ประกอบของสารสกัด นอกจากนี้การนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อต่างๆก็สิ่งที่น่าสนใจอย่างมาก

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Larson R.A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 1988, 27, 969-978.
2. Cao G., Sofic E. and Prior R. L. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 3426-3441.
3. Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L. and Oomah B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, 4113-4117.
4. Wang H., Cao G., and Prior R.L. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 701-705.
5. Verlangieri A.J., Kapeghian J.C., el-Dean S. and Bush M. Fruit and vegetable consumption and cardiovascular mortality. *Med. Hypoth.*, 1985, 16, 7-15.
6. Ames B.M., Shigena M.K. and Hagen T.M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, 90, 7915-7922.
7. Dragsted L.O., Strube M. and Larsen J.C. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacol. Toxicol.*, 1993, 72, 116-135.
8. Willett C.W. Micronutrients and cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1994, 59, 162S-165S.
9. Ascherio A., Rimm E.B., Giovannucci E.L., Colditz G.A., Rosner B., Willett W.C., Sacks F. and Stampfer M.J. A prospective study of nutritional factors and hypertension among US men. *Circulation*, 1992, 86, 1475-1484.

10. Sacks F.M. and Kass E.H. Low blood pressure in vegetarians: effects of specific food and nutrients. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1988, 48, 795-800.
11. Huang W.-Y. and Cai Y.-Z. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer.*, 2009, 62, 1-20.
12. Fresco P., Borges F., Diniz C., and Marques M.P.M. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med. Res. Rev.*, 2006, 26, 747-766.
13. Cai Y.-Z., Sun M., Xing J., Luo Q. and Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.*, 2006, 78, 2872-2888.
14. Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.-P., Pihlaja K., Kujala, T. S., et al.. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 3954-3962.
15. Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. and Vidal, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, 2006, 97, 654-660.
16. Ren W.Y., Qiao Z.H., Wang H.W., Zhu L. and Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med. Res. Rev.*, 2003, 23, 519-534
17. Hollman P.C.H. and Katan M.B. Flavonols, flavones, and flavanols-nature, occurrence, and dietary burden. *J. Sci. Food. Agric.*, 2000, 80, 1081-1093.

18. Cai Y.-Z., Luo Q., Sun M. and Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, 2004, 74, 2157–2184.
19. Shan B., Cai Y.-Z., Sun M. and Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 7749–7759.
20. Surveswaran S., Cai Y.-Z., Corke H. and Sun M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.*, 2007, 102, 938–953.
21. Huang W.-Y., Cai Y.-Z., Xing J., Corke H. and Sun M. Comparative analysis of bioactivities of four *Polygonum* species. *Planta Med.*, 2008, 74, 43–49.
22. Bao J.S., Cai Y.-Z., Sun M., Wang G.Y. and Corke H. Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 2327–2332.
23. Huang W.-Y., Cai Y.-Z., Xing J., Corke H. and Sun M. A potential antioxidant resource: endophytic fungi isolated from traditional Chinese medicinal plants. *Econ. Bot.*, 2007, 61, 14–30.
24. Anand Bafna and Shrihari Mishre. Antioxidant and Immunomodulatory Activity of the Alkaloidal Fraction of *Cissampelos pareira* Linn. *Sci. Pharm.*, 2010, 78, 21-31.
25. Kupachan SM, Patel AC And Fujita E. Cissampareine, new cytotoxic alkaloid from *Cissampelos pareira*. Cytotoxicity of bisbenzylisoquinoline alkaloids. *J. Pharm. Sci.*, 1965, 54, 580-583.

26. จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก, 2548. สมุนไพรบำบัดเบาหวาน. โรงพิมพ์ เซเว่น พรินติ้ง กรุ๊ป จำกัด. กรุงเทพมหานคร.
27. Kuang W. et al., Antioxidant Activities of the 95% Ethanol Extracts of nine Chinese Herbs Commonly Used in Hakka Area. *Adv. Mat. Res.*, 2011, 246, 396-398.
28. Cam M., Hisil H., Durmaz G. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem.*, 2009, 112, 668-673.
29. Ghasemzadeh A., Jaafar H.Z.E. and Rahmat A. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, 2010, 15, 4324-4333.
30. Ghasemi K., Ghasemi Y. and Ebrahimzadeh M.L. Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid content of 13 Citrus Species Peels and Tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2009, 22, 277-281.
31. Heinonen I.M., Lehtonen P.J. and Hopia A.I. Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, 25-31.
32. Anagnostopoulou M.A., Kefalas P., Papageorgiou V.P., Assimopoulou A.N. and Boskou D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chem.*, 2006, 94, 19-25.
33. Mensor L.L., Menezes F.S., Leitao G.G., Reis A.S, dos Santos T.C., Coube C.S. and Leitao S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Phytother. Res.*, 2001, 15, 127-130.

34. Hou W.C., Lin R.D., Cheng K.T., Hung Y.T., Cho C.H., Chen C.H, Hwang S.Y. and Lee M.H.
Free radical scavenging activity of Taiwanese native plants. *Phytomedicine*, 2003, 10, 170-175.

