

บทที่ 3

คุณสมบัติทางพฤกษเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิตของสารสกัดของ สะเดา น้อยหน่าและ แมงลักคา

Phytochemical and Cytotoxic Properties of Neem, Custard Apple and Mintweed Extracts

3.1 คำนำ

พืชผลิตสารเคมี (phytochemicals) ทั้งชนิด primary metabolites และ secondary metabolites สาร primary metabolites หมายถึงสารที่ผลิตโดยกระบวนการ carboxylic acids ของ Krebs cycle, α -amino acids, carbohydrates, fats, proteins and nucleic acids และเป็นสารจำเป็น (essential) ต่อการดำรงชีพของพืช ซึ่งสิ่งมีชีวิตทั้งหมดมีเหมือนกัน ส่วนสาร secondary metabolites ของพืชเป็นสารเชิงซ้อนกลุ่มใหญ่หลายชนิด การผลิต secondary metabolites พืชใช้วิธีอื่นที่ไม่ใช่วิธีของ primary metabolites และ secondary metabolites เป็นวิธิตะกูล (family) หรือชนิดพันธุ์ (genus) ของพืชและมีความสัมพันธ์กับวิวัฒนาการของพืช ส่วนประกอบของสาร phytochemicals กลุ่มนี้จึงเฉพาะในแต่ละพืช ซึ่งสามารถใช้ secondary metabolites เป็นเครื่องมือในการจำแนกพืชด้วยพฤกษเคมี (botanical classification หรือ chemotaxonomy) (Mann, 1987; Torssell, 1997) สาร secondary metabolites จึงเป็น non-essential metabolites ของชีวิตพืช แต่ช่วยเป็น species fitness สำหรับการดำรงชีพให้รอด เช่น ใช้เป็นสารเคมีป้องกันศัตรูพืช ป้องกันการถูกขูดขีด และ ป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลต หรือ ใช้ช่วยในการผสมเกสร พืชสามารถผลิตสารพิษ หรือสารเลียนแบบสารที่ศัตรูพืชผลิต เช่น growth hormone หรือ pheromone สารที่ไม่เป็นที่พึงประสงค์ สารมีกลิ่นหอม สารลดการย่อยอาหารหรือการกินอาหารของศัตรูพืช สารไล่แมลง สารต้าน oxidation เป็นต้น

Phytochemicals เป็นสารเชิงซ้อนที่โมเลกุลซับซ้อนมาก มีมากกว่า 8,000 ชนิดที่จำแนกได้แล้ว เป็นผลจากการกลายพันธุ์ของพืช และแบ่งกลุ่มตามโครงสร้างโมเลกุล ที่สำคัญคือสารในกลุ่ม alkaloids, Isoprenoids/Terpenes, Rubber-like Polymer/Polyisoprenes, Phenolic compounds, Rare amino acids/Tannin, Plant amines และ Glycosoides (Sensbusch, 2003)

Phytochemicals หลายชนิดเหล่านี้ทำหน้าที่ต่างๆ กัน ซึ่งอาจมีฤทธิ์เป็น (1) antioxidants ป้องกันเซลล์และลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งในสิ่งมีชีวิต เช่น ally sulfides ในกระเทียม carotenoid, ในผลไม้ flavonoids ในผัก ผลไม้ และ polyphenols ในชาและองุ่น (2) hormone action, คล้าย hormone ของคน เช่น Isoflavones เป็น phytoestrogen (3) enzyme stimulants กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ เช่น indoles ในถั่ว soy และ beans และ terpenes ในส้มและ berries (4) สารรบกวน DNA replication เช่น saponins ในถั่ว beans และ capsaicin ในพริก (5) anti-bacterial effect เช่น allicin ใน กระเทียม (6) physical action จับเชื้อเซลล์ป้องกันการจับติดของเชื้อโรค เช่น proanthocyanidins (www.phytochemicals.info) นอกจากนี้ phytochemicals จากพืชหลายชนิดมีศักยภาพในการควบคุมแมลง เป็นสาร antifeedants, repellents, growth factors, growth inhibitors, attractants, chemosteriles หรือ insecticides เนื่องจากเป็นสารละลายง่ายในธรรมชาติ จึงมีศักยภาพเชิงพาณิชย์ที่จะใช้แทนสารสังเคราะห์ในการกำจัดแมลง ดังงานวิจัยนี้ได้ทดลองควบคุมแมลงวันทองด้วยสารสกัดใบสะเดา ใบน้อยหน่า และ ใบแมงลัก

Phenolic compounds มีความสัมพันธ์กับ antioxidant activity เนื่องจากมีคุณสมบัติ reducing property เป็นสารให้ hydrogens หรือ electrons (hydrogen- or electron donating agents) ซึ่งสามารถประเมินได้จาก ศักยภาพการเป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavengers) หรือเป็นต้านออกซิเดชั่น (antioxidants) Total phenolic compounds (TPC) สามารถทำหน้าที่เป็นสาร antioxidants ได้หลายวิธี ที่สำคัญคือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของ free radicals แม้มีความเข้มข้นน้อยกว่าสารที่ถูก oxidized หรือเกิด radicals บน TPC ซึ่งต้องเสถียรเพื่อไม่ให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ก้าวหน้าต่อไป (Halliwell *et al.*, 1995) หรือ มีศักยภาพยับยั้งการเกิด radicals จากการเปลี่ยน metal-chelation (Rice-Evans, Miller and Paganga, 1997) ปริมาณ TPC มากอาจจะให้ radical scavenging activity สูง (Paixao *et al.*, 2007)

3.1.1 สะเดา Neem (*Azadirachta indica* A. Juss)

Classification: *Azadirachta indica* A. Juss.

Kingdom	<i>Plantae</i> – Plants
Subkingdom	<i>Tracheobionta</i> – Vascular plants
Superdivision	<i>Spermatophyta</i> – Seed plants
Division	<i>Magnoliophyta</i> – Flowering plants
Class	<i>Magnoliopsida</i> – Dicotyledons
Subclass	<i>Rosidae</i>
Order	<i>Sapindales</i>
Family	<i>Meliaceae</i> – Mahogany family
Genus	<i>Azadirachta</i> A. Juss. – azadirachta
Species	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss. – neem



Figure 3.1 Neem:
Azadirachta indica A. Juss

สะเดา (Figure 3.1) มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อรา (fungicide) (Geraldo, Arroteia, and Kemmelmeier, 2010) และหนอนตัวกลม (nematicide) (Schmutterer, 1995; Pundt, 2000) เป็นพิษต่อเห็บ (mite, *Tetranychus cinnabrinus*) (Mansour *et al.*, 1997) สะเดาผลิตสารชื่อ azadirachtin มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลง ที่ยับยั้งการกิน การผลิตไข่ของ cockchafer (*Melolontha melolontha*) (Kaethner, 1991) และใช้ควบคุมหมัด (fleas) สุนัขและแมว (Guerrini and Kriticos, 1998) ค้างคาวรากรกกล้วย (Musabyimana *et al.*, 2001) และอาจใช้สะเดาเป็นแหล่งธรรมชาติผลิตยา และ ผลิตสารกำจัดศัตรูพืชที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Schmutterer, 1995; Agarwal, 1996; Alam, 1996; Mulla and Su, 1999; Joshi and Lockwood, 2000; Daniel, 2000; Kumar, 2002). นอกจากสาร azadirachtin ในใบและเปลือกสะเดายังพบมีสาร gallic acid, benzoic acid, *p*-coumaric acid, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, and *trans*-cinamic acid (Xuan *et al.*, 2004)

3.1.2 น้อยหน่า Custard apple (*Annona squamosa* L.)

Classification: *Annona squamosa* L.

Kingdom	<i>Plantae</i> – Plants
Subkingdom	<i>Tracheobionta</i> – Vascular plants
Superdivision	<i>Spermatophyta</i> – Seed plants
Division	<i>Magnoliophyta</i> – Flowering plants
Class	<i>Magnoliopsida</i> – Dicotyledons
Subclass	<i>Magnoliidae</i>
Order	<i>Magnoliales</i>
Family	<i>Annonaceae</i> – Custard-apple family
Genus	<i>Annona</i> L. – annona
Species	<i>Annona squamosa</i> L. – custard apple / sugar apple



Figure 3.2 Custard apple:
Annona squamosa L.

น้อยหน่าเป็นพืชผลไม้ในกลุ่ม custard apple family ในประเทศไทยเพาะปลูกน้อยหน่าสายพันธุ์ *Annona squamosa* (Figure 3.2) สารสกัดเมล็ดน้อยหน่าด้วย ethanol และ methanol มีฤทธิ์กำจัด ตัว pupae (*Callosobruchus chinensis*) ได้ถึง 100% (Al-Lawati *et al.*, 2002) และ กำจัดด้วง khapra (*Trogoderma granarium*) (Rao, Sharma, and Sharma, 2005) สารสกัดใบและเมล็ดน้อยหน่ายังสามารถควบคุมแมลงได้อีกหลายชนิด เช่น เพลี้ย หนอนฝ้าย ตั๊กแตน มด แมลงหวี่ (www.oisat.org) สารเคมีในผลน้อยหน่าประกอบด้วย diterpenoid compound kaur-16-en-18-oic acid, α -pinene, sabinene และ limonene (Andrade *et al.*, 2001) ในสารสกัดใบด้วย petroleum ether ประกอบด้วย n-alkanes, n-alkanols, 16-hentriacontanone, and sterols ซึ่งพบมีฤทธิ์ต้าน gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, และ *Streptococcus viridans*) และต้าน gram-negative bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas pvocyanea*, และ *Klebsiella* (Patel and Kumar, 2008)

3.1.3 แมงลักคา Mintweed (*Hyptis suaveolens* L., Poit)

Classification: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.

Kingdom	<i>Plantae</i> – Plants
Subkingdom	<i>Tracheobionta</i> – Vascular plants
Superdivision	<i>Spermatophyta</i> – Seed plants
Division	<i>Magnoliophyta</i> – Flowering plants
Class	<i>Magnoliopsida</i> – Dicotyledons
Subclass	<i>Asteridae</i>
Order	<i>Lamiales</i>
Family	<i>Lamiaceae</i> – Mint family
Genus	<i>Hyptis</i> Jacq. – bushmint
Species	<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit. – mintweed / chan / pignut



Figure 3.3 Mintweed:
Hyptis suaveolens (L.)

แมงลักคา (Figure 3.3) เป็นพืชสมุนไพร ใช้รักษาอาการติดเชื้อในทางเดินอาหาร เกร็งปวด และอาการผิวหนังติดเชื้อ (Wulff, 1987) แมงลักคามีฤทธิ์แรงต่อเชื้อราในโรงเก็บอาหาร (stored food commodities) (Mishra and Dubey, 1994) มีฤทธิ์ต้าน bacteria ทั้ง gram-negative และ gram-positive (Asekun *et al.*, 1999; Nantitanon, Chowwanapoonpohn and Okonogi, 2007) ควบคุม เพลี้ย *Aphis gossypii* Glov. และ *Orthaga* sp. (กนก อุไรสกุล, 2540) ควบคุม American ballworms (*Heliothis armigera* Hubn.) (รัชดาภรณ์ พิทักษ์ธรรม, 2544) แมลงในโรงเก็บผลิตผล (Palsson and Jaeson, 1999) และยุง (Tanprasit, 2005) ประชาชนพื้นเมืองในหลายพื้นที่ของโลกใช้ใบแมงลักคาต้มไฟให้เกิดควันไล่แมลง (Aycard *et al.*, 1993) ใน essential oil สกัดจากแมงลักคามีสารประกอบหลักคือ 1,8-cineole, β -pinene, sabinene, β -caryophyllene, α -pinene, 4-terpinenol, α -bergamotene, limonene, bicyclogermacrene, β -phellandrene and, α -copaene, β -clemene, and eugenol (Preezada, 1997)

3.2 วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อวิเคราะห์หา ปริมาณ total phenolic compounds (TPC) รูปแบบการแยกของสารพฤกษเคมี (TLC fingerprints) คุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารสกัดใบสะเดา ใบน้อยหน่า ใบและเมล็ดแมงลักคา โดยเปรียบเทียบคุณสมบัติเหล่านี้จากสารสกัดด้วยน้ำและ ethanol ทั้งนี้เพื่อเป็นการตรวจคุณสมบัติเบื้องต้นของพฤกษเคมีจากพืชเหล่านี้ก่อน ศึกษาการควบคุมโดยชีวภาพต่อแมลงวันทอง

3.3 อุปกรณ์และวิธีการ

3.3.1 วัสดุและสารเคมี

Folin Ciocalteu's phenol reagent, DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl radical) และ TLC sheet, pre-coated silica gel 60F₂₅₄ จาก Merck, Germany เครื่องสกัด universal extraction Buchi model B811 จาก Buchi, Germany, Lyophilizer ของ LabConco, U.S.A., *Artemia salina* จาก Sandders™ Great Salt Lake, Brine shrimp company, U.S.A. และสารเคมีมาตรฐานระดับงานวิเคราะห์

3.3.2 แหล่งของพืชและการสกัด

ใบสะเดา ใบน้อยหน่า ใบแมงลักคา และ เมล็ดแมงลักคา เก็บในป่าบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและบริเวณใกล้เคียงรอบๆ มหาวิทยาลัยฯ ทำความสะอาดใบพืช สับละเอียด อบแห้งที่ 45°C 2 วัน ส่วนเมล็ดแมงลักคา แช่น้ำและกำจัดเมือกโดยการเอาเมล็ดถู/ขูดกับกะซอนเหล็ก แล้วอบแห้งบดใบพืชและเมล็ดแห้งให้เป็นผงละเอียด

นำ พืชบด 10 กรัม สกัดในน้ำหรือ 95% ethanol ในเครื่องสกัดอัตโนมัติ universal extraction ที่อุณหภูมิสูงกว่า 100° C ระเหยสารสกัดหยาบ และทำแห้งด้วย lyophilier ที่ -54°C เก็บผงสกัดที่ -20°C ระหว่างการทดลองสารสกัดที่ทำสารละลายแล้วเก็บที่ 4°C

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolic compounds (TPC)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenoloic compounds - TPC) ของสารสกัดใบสะเดา (neem leaf extract - NLE) สารสกัดใบน้อยหน่า (custard leaf extract - CLE) สารสกัดใบแมงลักคา (mintweed leaf extract - MLE) และ สารสกัดเมล็ดแมงลักคา (mintweed seed extract - MSE) วัดโดยวิธี Folin Ciocalteu's method (Swain and Hills, 1959; Matthaus, 2002). ละลายสารสกัดและสารมาตรฐานใน methanol

นำสารละลายตัวอย่าง 100 μL ใส่ใน 2 mL ของ Sodium carbonate บ่ม 2 นาที แล้วใส่ 100 mL Folin Ciocalteu's phenol reagent ซึ่งละลายใน methanol (1:1) บ่ม 30 นาที วัด absorbance ที่ $A_{750\text{ nm}}$ ใช้ pure gallic acid เป็นสารมาตรฐานเทียบ ทำ triplicate และ แสดงปริมาณของ total phenolic compounds เป็น milligram gallic acid equivalent (GAE)/L

3.3.4 Antioxidant activity โดย DPPH assay

วิเคราะห์คุณสมบัติ antioxidation ของสารสกัดโดยวัดจาก free radical scavenging activity ต่อ DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl radical) (sigma-Aldrich) ด้วยวิธีของ Brand-Williams *et al.*, (1995) และ Sanches-Moreno, Larrauri and Saura-Calixto (1999) โดยปรับเปลี่ยนเล็กน้อย ใช้ gallic acid เป็น positive control และ methanol เป็น negative control เตรียมสารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้น 31.5, 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 ppm ใน methanol นำ 0.5 ml สารสกัดละลาย ใส่ในสารละลายซึ่งมี 0.2 mM DPPH ใน 1 ml methanol ผสมให้เข้ากันและเก็บในที่มืด 30 นาที วัดการดูดแสงที่ $A_{517\text{ nm}}$ ใช้ methanol เป็น blank และแต่ละความเข้มข้นทำ triplicate คำนวณหา percent ของ $\text{DPPH}^\bullet$ radicals ที่เหลือจากสูตรข้างล่าง

$$\% \text{DPPH}_R^\bullet = \frac{\text{DPPH}_t^\bullet}{\text{DPPH}_{t=0}^\bullet} \times 100$$

$\text{DPPH}_R^\bullet$ ความเข้มข้นของ $\text{DPPH}^\bullet$ ที่

$\text{DPPH}_t^\bullet$ ความเข้มข้นของ $\text{DPPH}^\bullet$ ที่เวลา t

$\text{DPPH}_{t=0}^\bullet$ เป็นความเข้มข้นของ $\text{DPPH}^\bullet$ ที่เวลา 0 (zero time)

แสดงผลเป็น % DPPH[•] ที่หายไป ณ เวลาที่ตรวจหา ดังนั้น % ของ DPPH[•] radical scavenging activity หรือ % radical inhibition ของสารสกัดคำนวณจากสูตรข้างล่างนี้

$$\% \text{ Radical scavenging activity} = 1 - \frac{A_{\text{SAMPLE}}}{A_{\text{CONTROL}}} \times 100$$

A_{SAMPLE} คือ absorbance ของสารละลายเมื่อมี extract

A_{CONTROL} คือ absorbance ของสารละลาย DPPH[•]

Radical scavenging activity ของสารสกัดตัวอย่างแสดงเป็นความเข้มข้นของสารสกัด (ppm) ที่ลดปริมาณ DPPH[•] ตั้งต้นไป 50% หรือเป็น 50% inhibitory concentration (IC₅₀)

3.3.5 Thin layer chromatography (TLC) fingerprinting

Spot สารสกัด 5 μ l ด้วย capillary บน TLC sheet (2.5 x 7 cm) ซึ่ง pre-coated ด้วย silica gel 60F₂₅₄ หนา 0.25 mm ณ ตำแหน่งห่างจากปลายแผ่น 1 cm นำ spotted sheet วางใน 125 ml beaker บรรจุ 10 ml solvent system ซึ่งเป็น mobile phase ในการทดลองนี้ใช้ 3 solvent systems ที่เหมาะสมที่สุด คือ Ethyl acetate : methanol : water (81:11:8 v/v/v), n-buthanol : glacial acetic : water (40:10:50 v/v/v), and chloroform : methanol : glacial acetic acid (47.5:47.5:5 v/v/v) จากนั้นปิด beaker ป้องกันสารละลายระเหย ปล่อยให้ solvent วิ่งขึ้นถึงประมาณ 1 cm จึงนำ TLC sheet ออก ทำให้แห้ง และตรวจหาสารด้วยแสง UV ที่ A₂₅₄ nm วัดระยะทางเคลื่อนที่ของสารบน TLC sheet คำนวณระยะทางเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) และถ่ายภาพเป็นหลักฐาน

$$R_f = \frac{\text{Distance from start to center of substance spot (cm)}}{\text{Distance from start to solvent front (cm)}}$$

3.3.6 ทดสอบความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (cytotoxicity) โดย Brine shrimp lethal assay (BSLA)

วิเคราะห์ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Brine Shrimp Lethal Assay (BSLA) (McLaughlin and Rogers, 1998) โดยเตรียมน้ำทะเลเทียม (120 g/l) ในกล่องซึ่งกันเป็น 2 ช่องไม่เท่ากัน เพาะกุ้งฝอย (brine shrimp – *Artemia salina*) โดยใส่ไข่แห้ง (cysts) 1g/500ml ในช่องเล็ก ปิดช่องนี้เพื่อกันแสงด้วยกระดาษดำ เลี้ยง brine shrimp ที่ 25°C ประมาณ 24 ชั่วโมง ได้ตัวอ่อน nauplii ส่องไฟที่ช่องใหญ่เพื่อติดตามตัวอ่อน nauplii ออกมาจากที่เพาะไข่ในช่องเล็ก (Figure 3.4)

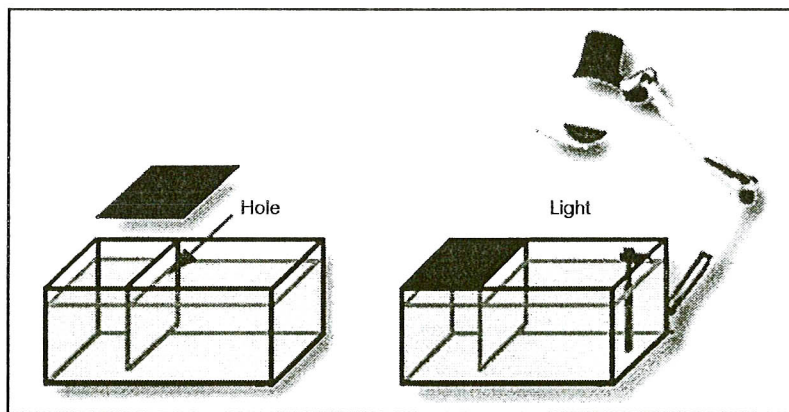


Figure 3.4 The two-chamber container with a perforate divider and light. The smaller chamber was for brine shrimp egg hatching. The larger chamber was for the nauplii, migrated toward the light.

ถ่ายย้าย 10 nauplii/10 µl ใส่ในหลุมของ 24-well plate (Solis *et al.*, 1993) ซึ่งบรรจุ 4 mL น้ำทะเลเทียมที่มีสารสกัดใบสะเดา (NLE) ใบน้อยหน่า (ALE) ใบแมงลักคา (MLE และ เมล็ดแมงลักคา (MSE) ซึ่งละลายใน 0.01% DMSO ที่ 10 - 1000 µg/mL เลี้ยงต่อ และนับจำนวน nauplii ตายที่ 24 ชั่วโมง ทดลอง 6 replicates คำนวณหา % corrected mortality ด้วย Abbot's formula (Abbott, 1925)

$$\text{Corrected \%} = \left(1 - \frac{n \text{ ใน T หลัง treatment}}{n \text{ ใน Co หลัง treatment}} \right) * 100$$

n = Insect population , T = treated , Co = control

วิเคราะห์หา 50% lethal concentration (LC₅₀) โดย Probit Analysis (Finney, 1971)

3.4 ผลการทดลองและวิจารณ์

3.4.1 สารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds - TPC) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging - FRS) ของสารสกัด

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic contents - TPC) ในสารสกัดด้วยน้ำและ ethanol ใบ สะเดา (NLE/w, NLE/e) ใบน้อยหน่า (CLE/w, CLE/e) ใบแมงลักคา (MLE/w, MLE/e) และเมล็ดแมงลัก คา (MSE/w, MSE/e) แสดงใน Table 3.1 TPC ในสารสกัดเรียงจากมากไปน้อยต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ $NLE/e > CLE/w > NLE/w > CLE/e > MSE/w > MLE/w > MLE/e > MSE/e$ ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 338 ± 41.83 , 309 ± 44.45 , 297 ± 31.67 , 261 ± 30.74 , 254 ± 30.51 , 251 ± 31.55 , 245 ± 26.48 และ 179 ± 13.38 mgGAE/L ตามลำดับ

Table 3.1 Total phenolic compounds and free radical scavenging by DPPH of the water and ethanolic leaf and seed extracts of neem, custard apple and mintweed.

Plant part	Extract	Total phenolic compounds (mgGAE/L)	Radical scavenging inhibition, DPPH (IC ₅₀) (ppm)
		Mean $\pm$ S.D., n = 5	Mean $\pm$ S.D., n = 5
Neem leaf	NLE/w	$297 \pm 31.67^*$	$172.99 \pm 4.53^*$
	NLE/e	$338 \pm 41.83^*$	$211.53 \pm 8.61^*$
Custard apple leaf	CLE/w	$309 \pm 44.45^*$	$163.55 \pm 8.99^*$
	CLE/e	$261 \pm 30.74^*$	$218.62 \pm 3.64^*$
Mintweed leaf	MLE/w	251 ± 31.55	288.92 ± 13.91
	MLE/e	245 ± 26.48	226.39 ± 6.22
Mintweed seed	MSE/w	$254 \pm 30.51^*$	156.44 ± 3.99
	MSE/e	$179 \pm 13.28^*$	155.48 ± 7.06

N - neem, C - custard apple, M - mintweed, L - leaf, S - seed, w - water and e - ethanol
t-Test analysis of variance, n = 5 and *significant difference between same plant ($P < 0.05$)

ปริมาณ TPC ของสารสกัดใบสะเดาด้วย ethanol มากกว่าสกัดด้วยน้ำ ($NLE/e > NLE/w = 1.14$) เท่า TPC ของสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยน้ำมีมากกว่าสกัดด้วย ethanol ($CLE/w > CLE/e = 1.18$ เท่า) TPC ของใบแมงลักสกัดด้วยสารละลายทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกันมาก ($MLE/w \cong MLE/e$) ในขณะที่ TPC ของเมล็ดแมงลักสกัดด้วยน้ำมากกว่าสกัดด้วย ethanol ($MSE/w > MSE/e = 1.14$ เท่า) TPC ของสารสกัดจากแมงลักคามีปริมาณมากเมื่อใช้น้ำเป็นสารทำละลาย อาจเป็นเพราะสารมี polarity มากกว่า (Goli *et al.*, 2005)

DPPH เป็นสารให้ hydrogen หรือรับ electron ได้เป็น radical ฤทธิ์ต้าน/กำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ของสารสกัดของพืชทั้งสามชนิดสามารถวัดได้จากการใช้ $DPPH^\bullet$ ซึ่งเป็น free radicals ที่พร้อมจะรับ electrons หรือ hydrogen radicals เพื่อให้ $DPPH^\bullet$ เป็นโมเลกุลเสถียร สารสกัดจากพืชซึ่งส่วนมากเป็น phenolic compounds จะทำปฏิกิริยากับ $DPPH^\bullet$ ทำให้ได้ DPPH โมเลกุลเสถียร ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งหรือกำจัด $DPPH^\bullet$ ได้ 50% หรือ 50% inhibition concentration (IC_{50}) แสดงใน Table 3.1 ประสิทธิภาพการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดเรียงจากมากไปหาน้อย หรือโดยเรียงค่า IC_{50} จากค่าน้อยไปมากดังนี้ $MSE/e > MSE/w > CLE/w > NLE/w > NLE/e > CLE/e > MLE/e > MLE/w$ ซึ่งมีค่า IC_{50} 155.48 ± 7.06 ; 156.44 ± 3.99 ; 163.55 ± 8.99 ; 172.99 ± 4.53 ; 211.53 ± 8.61 ; 218.62 ± 3.64 ; 226.39 ± 6.22 และ 288.92 ± 13.91 ppm (ug/mL) ตามลำดับ

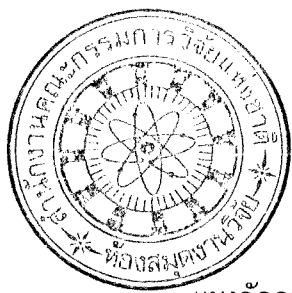
ค่า IC_{50} ของสารสกัดใบสะเดา NLE/w เท่ากับ 172.99 ± 4.53 ppm ค่า IC_{50} ของ NLE/e เท่ากับ 211.53 ± 8.61 ppm (Figure 3.5 A) ค่า IC_{50} ของ NLE/w < NLE/e 1.22 เท่า นั่นคือ NLE/w มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า NLE/e อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ค่า IC_{50} ของสารสกัดใบน้อยหน่า CLE/w เท่ากับ 163.55 ± 8.99 ppm ค่า IC_{50} ของ CLE/e เท่ากับ 218.62 ± 3.64 ppm (Figure 3.5 B) CLE/w มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า CLE/e 1.34 เท่า ($P < 0.05$)

ค่า IC_{50} ของสารสกัดใบแมงลัก MLE/w เท่ากับ 288.92 ± 13.91 ppm ค่า IC_{50} ของ MLE/e เท่ากับ 226.39 ± 6.22 ppm (Figure 3.5 C) ซึ่งประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน

ค่า IC_{50} ของสารสกัดเมล็ดแมงลัก MSE/w เท่ากับ 156.44 ± 3.99 ppm และค่า IC_{50} ของ MSE/e 155.48 ± 7.06 ppm (Figure 3.5 D) ประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน

สารสกัดเมล็ดแมงลัก MSE แสดง free radical scavenging activity สูงกว่าสารสกัดพืชอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดใบและเมล็ด



แมงลักกา ประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระของ $MSE/w > MLE/w$ 1.85 เท่า และ $MSE/e > MSE/e$ 1.55 เท่า

มีหลักฐานแสดงสารสกัดสะเดาจากเปลือกและใบสะเดาจากเชิงเขาของประเทศเนปาลมีศักยภาพเป็น radical scavenger กำจัด DPPH[•] ต่างๆ กันขึ้นกับชนิดสารทำละลาย แต่ปริมาณ TPC ไม่ต่างกัน สารสกัดเปลือกสะเดาด้วย hexane กำจัด DPPH[•] ได้ 10 เท่า ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ สารสกัดใบสะเดาด้วยน้ำ กำจัด DPPH[•] ได้ 3 เท่า ดีกว่าสารสกัดด้วย methanol และ ดีกว่าสารสกัดด้วยอนุพันธ์ของสารแอลกอฮอล์อื่นๆ (Ghimera, 2009) ซึ่งผลต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบสะเดาจากหลักฐานนี้สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตามสาร azadirachtin ซึ่งเป็น active compound ของสะเดาในสารสกัดด้วย 80% methanol สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำถึงเกือบ 200 เท่า Manjula (2011) พบว่าใบสะเดาอินเดียที่ใช้ในทางการแพทย์ สกัดด้วย ethanol, methanol มีปริมาณ TPC ประมาณ 1.7 เท่ามากกว่าสกัดด้วยน้ำ แต่ความสามารถเป็น radical scavenger ของสารสกัดด้วยสารละลายทั้ง 3 ชนิดนี้ (ethanol, methanol และน้ำ) ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าใบสะเดาไทยจาก 13 จังหวัดจากทุกภาคของประเทศไทย สกัดด้วยน้ำ มีปริมาณ TPC แสดงความสัมพันธ์ผกผันกับ radical scavenging activity และสัมพันธ์กับพื้นที่ปลูกสะเดา (Sithisarn and Gritsanapan, 2005; Sithisarn *et al.*, 2007)

ประเทศในเขตร้อน นำทุกส่วนของน้อยหน่าไปใช้ทางการแพทย์พื้นบ้าน รักษาหลายโรคเช่น โรคน้ำหนู (epilepsy), บิด (dysentery), หัวใจ (cardiac problems), หน้ามืด (fainting), พยาธิ (worm infestation), ท้องผูก (constipation), เลือดออก (hemorrhage), ปัสสาวะขัด (dysuria), ไข้ กระหายน้ำ เนื่องจากร้ายแรง (malignant tumors), แท้งลูก (abortifacient) และแผลในอวัยวะทางเดินอาหาร (ulcer) (Yadav *et al.*, 2011) และพบว่าน้อยหน่าเป็นแหล่งสำคัญของสาร antioxidants ในธรรมชาติสำหรับรักษาโรคได้ ปริมาณ TPC ของสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยน้ำซึ่งเป็นสาร polar solvent ให้ผล free radical scavenging ด้วย DPPH ได้ดีกว่าสารสกัดด้วย ethanol ซึ่งเป็นสาร non-polar solvent (Kothari and Seshadri, 2010) ผลการวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้ก็พบเช่นกัน อย่างไรก็ตาม สารสกัดใบด้วย ethanol ของน้อยหน่าสายพันธุ์ *A. squamosa* กำจัด DPPH[•] ได้ดี (Vanitha *et al.*, 2010) แต่ยังได้น้อยกว่า *A. reticulate* และ *A. muricata* (Baskar, Rajeswari and Kumar, 2007)

ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าประสิทธิภาพ free radical scavenging ของสารสกัดใบและเมล็ดแมงลักกาด้วยน้ำดีกว่า (IC_{50} น้อยกว่า) สกัดด้วย ethanol และ IC_{50} ผกผันกับปริมาณของ TPC ดังจะเห็นได้จากสารสกัดเมล็ดแมงลัก MSE/e มี TPC น้อยที่สุด และแสดง IC_{50} ของ antioxidant activity โดย DPPH assay น้อยที่สุด นั่นคือ สารสกัดของแมงลักกาสกัดด้วย ethanol มีประสิทธิภาพ free radical scavenging activity สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และ สูงกว่าสารสกัดพืชอื่นๆ มีหลักฐานพบสารสกัดแมงลักกาส่วนใบ

(Narayanaswamy and Balakrisnan, 2011) และ ส่วนเหนือดิน (aerial parts) (Khomdram and Singh, 2011) สกัดด้วยน้ำและ ethanol ของ *H. suaveolens* มีค่า IC_{50} ของ antioxidant activity ผกผันกับ TPC ซึ่งสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้

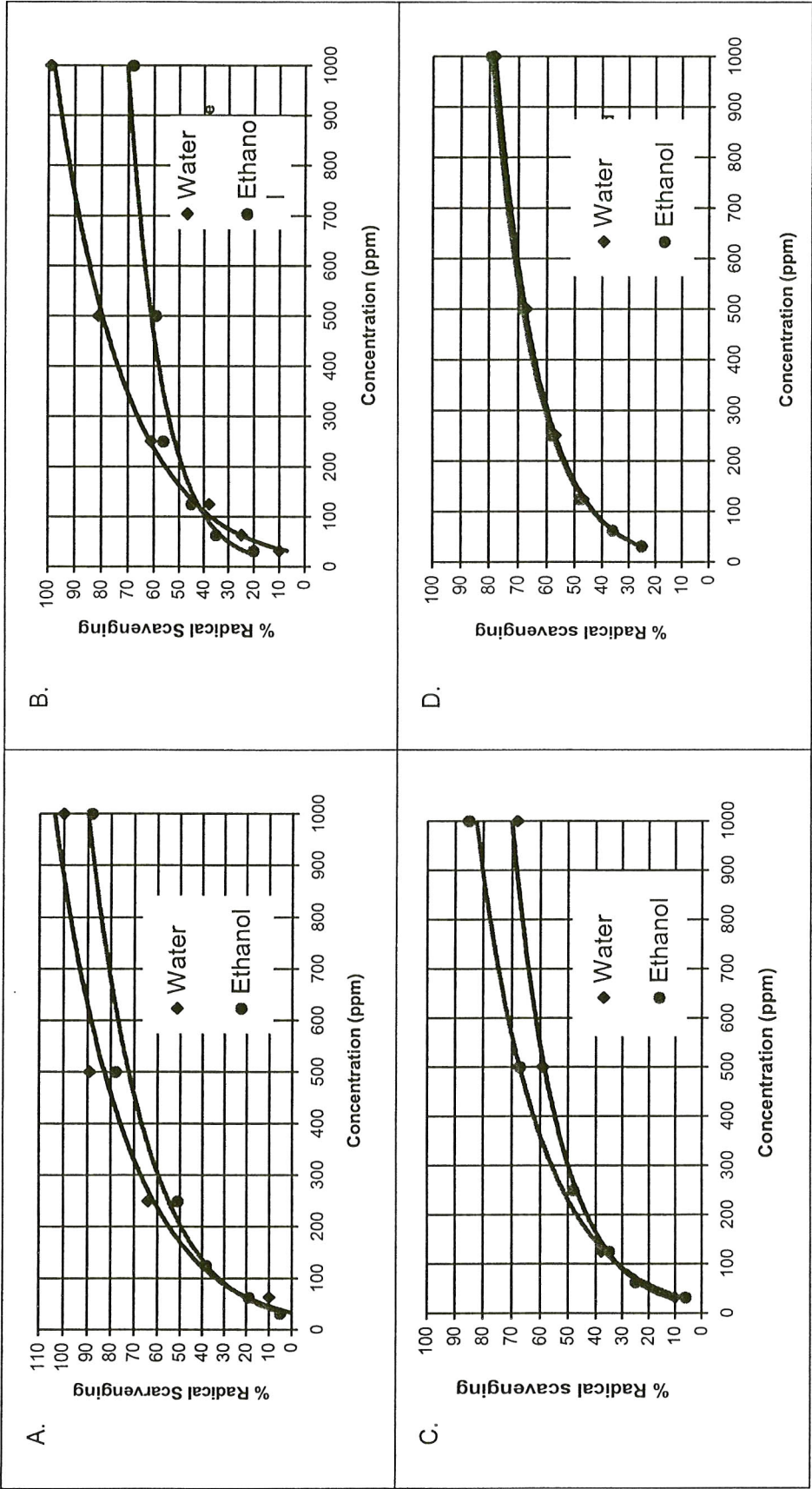


Figure 3.5 Radical scavenging of crude extracts of neem leaves (panel A), custard apple leaves (panel B), mintweed leaves (panel C), and mintweed seeds (panel D).

3.4.2 Thin layer chromatographic (TLC) fingerprinting

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้หารูปแบบการแยกของสารพฤษเคมี (fingerprint profile) โดยเปรียบเทียบจากระบบ mobile phase ซึ่งเป็นสารทำละลายที่นำสารพฤษเคมีให้เคลื่อนที่แยกกันด้วยระยะทางต่างกัน แล้วแต่คุณสมบัติทางเคมีของสารแต่ละชนิด ในการศึกษานี้ได้ทดลองใช้ mobile phase systems จนได้ 3 ระบบที่เหมาะสมสามารถแยกสารสกัดได้ คือ System A ประกอบด้วย ethyl acetate : methanol : water ในอัตราส่วน 81:11:8 (v/v/v) System B ประกอบด้วย n-butanol : glacial acetic acid : water ในอัตราส่วน 40:10:50 (v/v/v) และ System C ประกอบด้วย chloroform : methanol : glacial acetic acid ในอัตราส่วน 47.5:47.5:5 (v/v/v) จะเห็นได้ว่า mobile phase 3 systems นี้สามารถแยกสารเคมีในสารสกัดของใบสะเดา ใบน้อยหน่า ใบแมงลัก และ เมล็ดแมงลักได้ต่างกัน และได้แถบเฉพาะของสารสกัดตาม mobile phase system นั้นคือ สารสกัดใบสะเดาแยกใน mobile system A หรือ B หรือ C แยกได้ Fingerprints ของ NLE/w คล้ายของ NLE/e (Figure 3.6) ในทำนองเดียวกัน Fingerprints ของ CLE/w คล้ายของ CLE/e (Figure 3.6) Fingerprint ของ MLE/w คล้ายของ MLE/e และ Fingerprint ของ MSE/w คล้ายของ MSE/e (Figure 3.7) การเคลื่อนที่ของสารพฤษเคมีของสารสกัดใน mobile phase system แยกออกจากกันเป็นแถบซึ่งมีระยะทางเคลื่อนที่สัมพัทธ์ หรือ R_f บนแผ่น TLC ต่างๆ กันดังแสดงใน Table 3.2 จะสังเกตเห็นสารที่สกัดด้วยน้ำมี polarity สูงกว่าจะ adsorbed บนแผ่น TLC แน่นกว่าสารสกัดด้วย ethanol เป็นผลให้ได้ค่า R_f ต่ำ ยกเว้น สารสกัดของใบแมงลักที่ค่า R_f ใกล้เคียงกัน และเมื่อตรวจดูแถบด้วยแสง UV ที่ A_{365} nm แถบของสารปรากฏสีแตกต่างกัน (Table 3.2)

Thin layer chromatography (TLC) เป็นเทคนิคในการตรวจหาเบื้องต้นของสารสกัดตัวอย่างพืชสมุนไพร เพื่อให้รู้ characteristic fingerprints เบื้องต้นของพืชสมุนไพรนั้นๆ ก่อนที่จะใช้เทคนิคระดับสูง เช่น high performance chromatography TLC fingerprinting จึงเป็นวิธีที่สะดวกในการหาเชิงคุณภาพ (quality) กึ่งปริมาณ (semiquantity) และใช้ตรวจหาสิ่งเจือปนในสารประกอบของพืชสมุนไพรด้วย TLC fingerprinting ยังใช้วิเคราะห์พืชสมุนไพรที่ใกล้สูญพันธุ์ (endangered medicinal plants) ในแอฟริกาใต้ ใช้หลักฐานของ TLC fingerprints วิเคราะห์หาส่วนต่างๆ ของพืช เพื่อเอาส่วนต่างๆ เหล่านั้นใช้ทดแทนกัน โดยเปรียบเทียบ R_f ของ TLC chromatogram ภายใตแสงสว่าง (VIS) UV ที่ A_{254} nm และ A_{365} nm (Zschocke *et al.*, 2000) และใช้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของพืชสมุนไพรที่เกิดจากการเก็บ ตั้งแต่พืชสดจนถึงอายุเก็บ 5 ปี (Stafford, Jager, and van Staden, 2005) TLC fingerprint ยังใช้ร่วมกับการวิเคราะห์หา free radical scavenging activity ของสารสกัดได้ด้วย (Lavhale and Mishra, 2007) และใช้ TLC fingerprint ตรวจหาสารสำคัญในสารสกัดพืชโดยเทียบค่า R_f กับสารมาตรฐานบริสุทธิ์ (Cui *et al.*, 2005; Anandjiwala *et al.*, 2007)

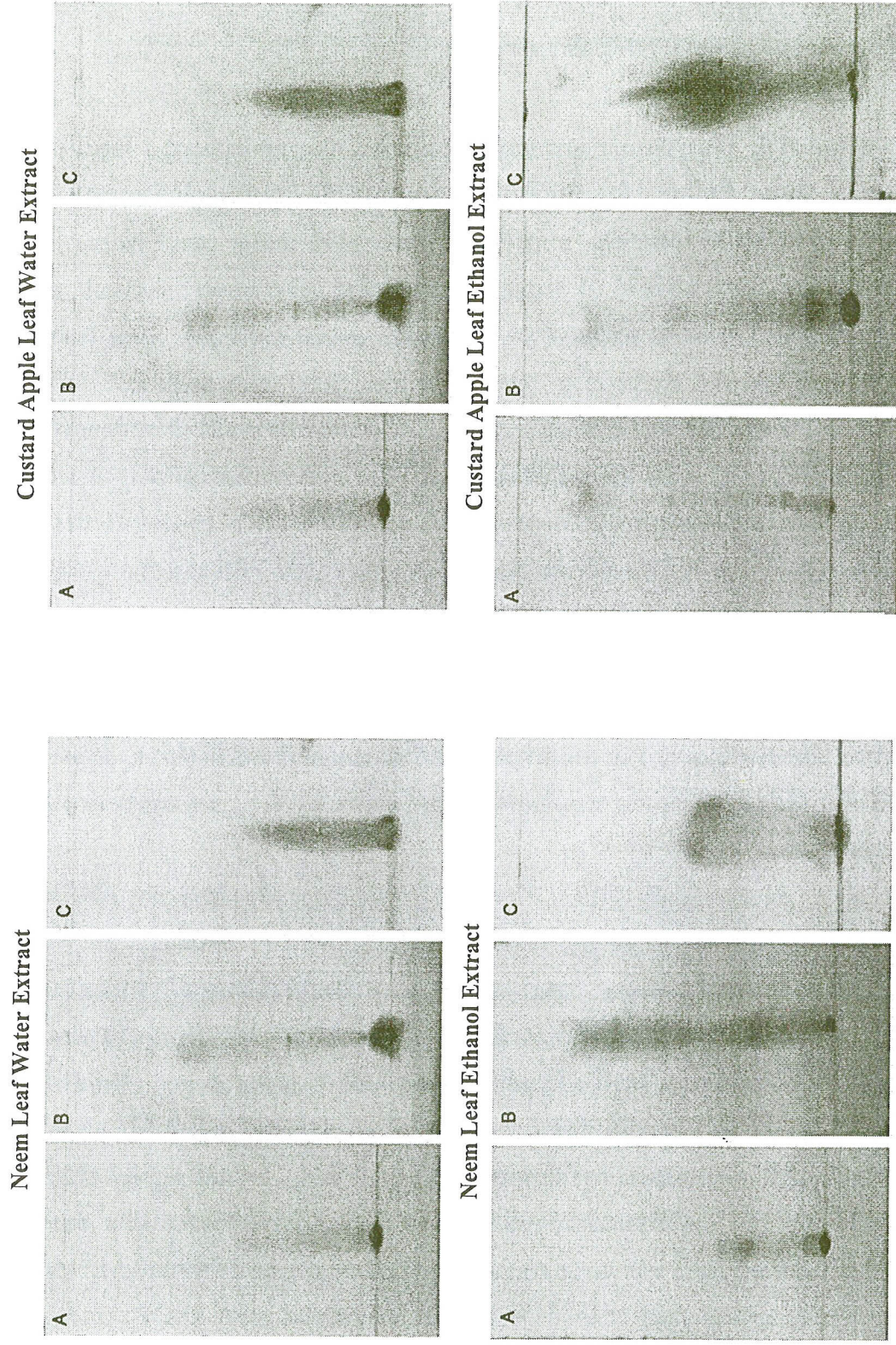


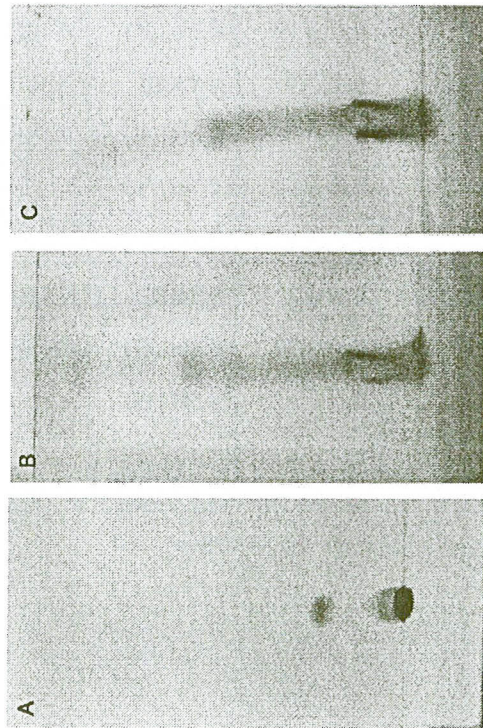
Figure 3.6 Thin layer chromatographic fingerprints of neem leaf extracts and custard apple leaf extracts.

A, mobile phase system composed of ethyl acetate : methanol : water at proportion of 81:11:8 (v/v/v)

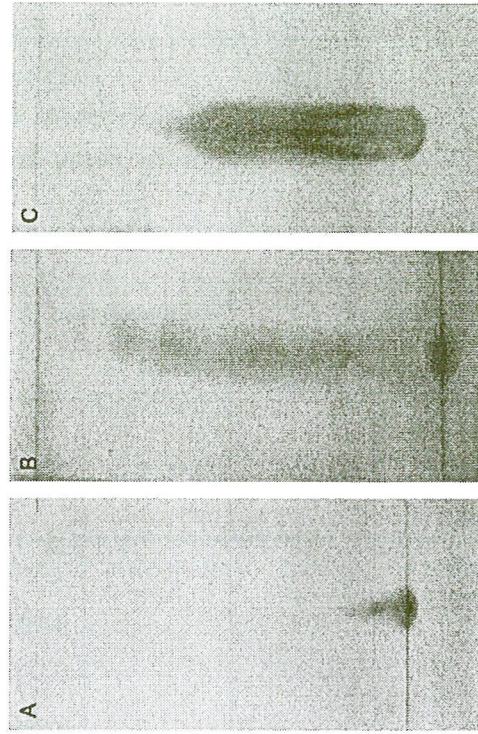
B, mobile phase system composed of n-buthanol : gracial acetic acid : water at proportion of 40:10:50 (v/v/v)

C, mobile phase system composed of chloroform : methanol : gracial acetic acid at proportion of 47.5:47.5:5 (v/v/v)

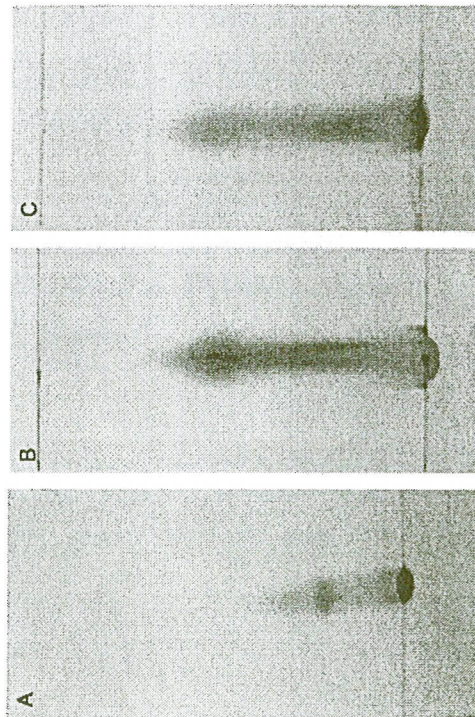
Mintweed Leaf Water Extract



Mintweed Seed Water Extract



Mintweed Leaf Ethanol Extract



Mintweed Seed Ethanol Extract

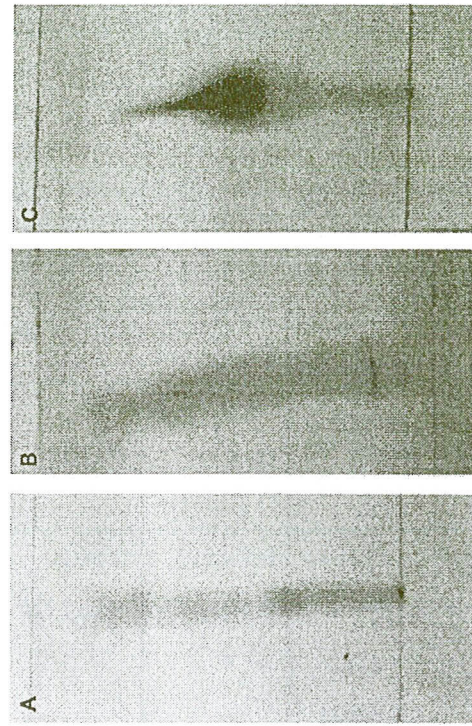


Figure 3.7 Thin layer chromatographic fingerprints of mintweed leaf extracts and mintweed seed extracts.

A, mobile phase system composed of ethyl acetate : methanol : water at proportion of 81:11:8 (v/v/v)

B, mobile phase system composed of n-butanol : gracial acetic acid : water at proportion of 40:10:50 (v/v/v)

C, mobile phase system composed of chloroform : methanol : gracial acetic acid at proportion of 47.5:47.5:5 (v/v/v)



Table 3.2 Comparison of R_f values and color appearances of neem, custard apple, and mintweed extracts separated by thin layer chromatography using three mobile phase systems. System A contained ethyl acetate : methanol : water (81:11:8 (v/v/v)), System B contained n-buthanol : glacial acetic acid : water (40:10:50 (v/v/v)), and System C contained chloroform : methanol : glacial acetic acid (47.5:47.5:5 (v/v/v)). The band color was detected under UV A_{365} nm.

Mobile Phase System	R_f values							
	Neem leaf extract		Custard apple leaf extract		Mintweed leaf extract		Mintweed seed extract	
	NLE/w	NLE/e	CLE/w	CLE/e	MLE/w	MLE/e	MSE/w	MSE/e
A	0.40(DB)	0.34(DB) 0.42(LY) 0.54(LG) 0.82(DG)	0.24(DB) 0.34(LB)	0.14(B) 0.80(LG)	0.24(B)	0.24(G)	0.10(DB)	0.34(DB) 0.44(LY) 0.56(LG) 0.74(G) 0.82(DG)
B	0.11(B) 0.24(Y) 0.44(Y) 0.61(LY)	0.31(Y) 0.47(G) 0.63(Y) 0.74(LY)	0.06(B) 0.14(B) 0.40(LB) 0.47(G) 0.58(Y)	0.19(B) 0.46(Y) 0.60(LY) 0.82(G)	0.15(B) 0.28(LB) 0.46(LY) 0.60(LY) 0.80(LY)	0.19(B) 0.42(LB) 0.51(Y) 0.64(LY) 0.81(LG)	0.12(B) 0.21(LB) 0.44(Y) 0.66(LY) 0.78(LY) 0.84(DY)	0.36(LY) 0.44(LY) 0.56(LY) 0.75(G)
C	0.09(LB) 0.31(G)	0.31(LB) 0.39(G) 0.49(LG) 0.66(Y)	0.63(LB)	0.38(B) 0.49(LB)	0.35(B) 0.56(LB)	0.14(B) 0.50(LB)	0.24(B) 0.40(LB) 0.50(LG)	0.51(G) 0.65(LB)

N - neem, C - custard apple, M - mintweed, L - leaf, S - seed, w - water and e - ethanol; DB - Dark brown, LB - Light brown, B - Brown, DG - Dark green, LG - Light Green, G - Green, LY - Light yellow, and Y - Yellow.

3.4.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารสกัด

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเกือบทั้งหมดเป็นพิษ (toxic) ที่ปริมาณมาก (high dose) การตรวจหาความเป็นพิษของสารธรรมชาติจากพืชได้โดยดูจากการตายของสัตว์ขนาดเล็ก (*in vivo* lethality) การวิเคราะห์ด้วย Brine Shrimp Lethality Assay (BSLA) เป็น bioassay system ที่สะดวก ค่าใช้จ่ายไม่มาก และไม่ต้องการการปลอดเชื้อและไม่ต้องใช้สัตว์ชั้นสูง เนื่องจากใช้กุ้งฝอย *Artemia salina* เป็นสัตว์ทดลองต้นแบบ

ในการวิเคราะห์หาความเป็นพิษของสารสกัดแต่ละพืช (single extract treatment) พบว่า สารสกัดใบพืชด้วย ethanol มีฤทธิ์ของความเป็นพิษสูงกว่าสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) ตรงข้ามกับสารสกัดเมล็ดแมงลักคาน้ำมีพิษน้อยกว่าสกัดด้วย ethanol ($P < 0.05$) (Figure 3.8 และ Table 3.4) 50% lethal concentration (LC_{50}) ที่ 24 ชั่วโมงของสารสกัดเรียงจากน้อยไปมาก หรือจากฤทธิ์มากไปน้อย คือ $MLE/e > MLE/w > MSE/w > NLE/e > MSE/e > CLE/e > NLE/w > CLE/w$ ซึ่งมีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.14 ± 0.02 , 0.86 ± 0.07 , 3.65 ± 0.41 , 6.33 ± 1.12 , 6.37 ± 0.60 , 27.78 ± 3.27 , 48.37 ± 5.13 และ 115.06 ± 8.97 ppm ตามลำดับ และสารสกัดใบและเมล็ดแมงลักคามีพิษสูงกว่าสารสกัดพืชอื่น

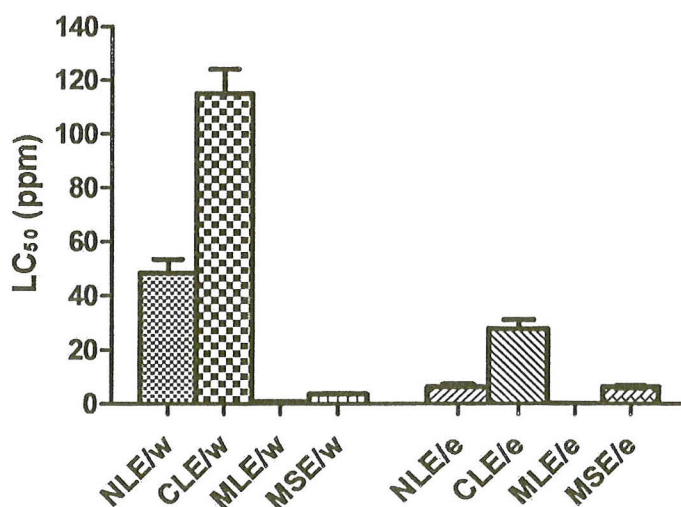


Figure 3.8 Cytotoxic effects of individual extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds monitored and screened by brine shrimp lethal assay (BSLA). The toxicity was expressed as 50% lethal concentration (LC_{50}) at 24 hours. N - neem, C - custard apple, M - mintweed, L - leaf, S - seed, w - water and e - ethanol. Bars were S.D. (n = 6).

NLE/e (LC_{50} = 6.33 ppm) พิษสูงกว่า NLE/w (LC_{50} = 48.37 ppm) 7.7 เท่า
 CLE/e (LC_{50} = 27.78 ppm) พิษสูงกว่า CLE/w (LC_{50} = 115.06 ppm) 4 เท่า
 MLE/e (LC_{50} = 0.14 ppm) พิษสูงกว่า MLE/w (LC_{50} = 0.86 ppm) 6 เท่า
 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการแยกสารประกอบออกจากตัวอย่างพืชเหล่านี้ขึ้นกับสารทำละลายในการสกัด คือน้ำ
 และ ethanol (Pisutthanan, 2004; Goli *et al.*, 2005; Ghimeray, 2009; Manjula, 2011)

เมื่อผสม 2 สารสกัดซึ่งสกัดด้วยสารทำละลายชนิดเดียวกัน พิษของ NLE/w + CLE/w (LC_{50} 10.95 ppm) มากกว่าพิษของ NLE/w (LC_{50} 48.37 ppm) 4.4 เท่า และมากกว่าพิษของ CLE/w (LC_{50} 115.06 ppm) 10.5 เท่า (Figure 3.9, Table 3.3) แสดงว่ามีการเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) ให้พิษของ NLE/w และ CLE/w มากขึ้นแต่ NLE/w + MLE/w (LC_{50} 7.25 ppm) ลดพิษของ MLE/w (LC_{50} 0.86 ppm) 13 เท่า แสดงการลดพิษ (reduction effect) ของ MLE/w

การผสมระหว่างสารสกัดด้วย ethanol ก็แสดงพิษในทำนองเดียวกัน NLE/e + CLE/e (LC_{50} = 1.52 ppm) พิษมากกว่า NLE/e (LC_{50} = 27.78 ppm) 4 เท่า และมากกว่า CLE/e (LC_{50} = 27.78 ppm) 18 เท่า

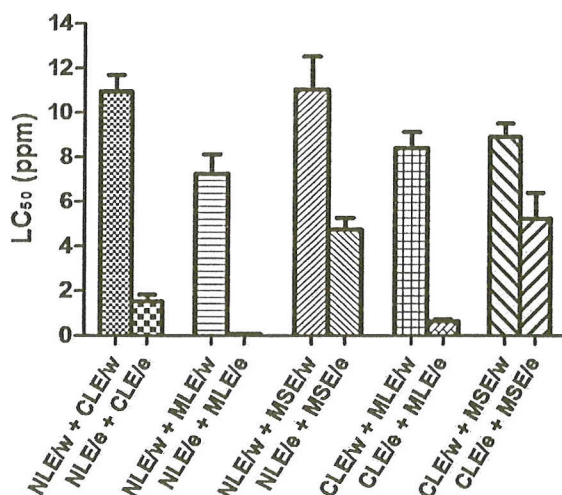


Figure 3.9 Cytotoxic effects of extract combinations between the same extract solvent. The toxicity was by brine shrimp lethality assay and expressed as 50% lethal concentration (LC_{50}) at 24 hours. N - neem, C - custard apple, M - mintweed, L - leaf, S - seed, w - water and e - ethanol. Bars were S.D. (n = 6).

การผสมสารสกัดแมงลักกับสารสกัดใบสะเดาและใบน้อยหน่า พบว่าฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดแมงลักแมงลักเองลดลง แม้โดยรวมช่วยเสริมพิษของสารคู่ผสม NLE/w + MSE/w (LC_{50} 11.04

ppm) MSE/w ซึ่งมีค่า LC_{50} 3.65 ppm พืชลดลง 3 เท่าโดย NLE/w และ CLE/e + MSE/e (LC_{50} 5.24 ppm) เพิ่มพืชของ MSE/e (LC_{50} 6.37 ppm) เพียง 1.2 เท่า

จะเห็นได้ว่า ฤทธิ์ของสารสกัดผสมระหว่างสารสกัดใบด้วย ethanol แสดงความเป็นพิษได้มากกว่า (LC_{50} น้อยกว่า) การผสมระหว่างสารสกัดใบด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) (Table 3.4) MLE/e เสริมฤทธิ์แบบ synergistic effect ให้ CLE/e และ NLE/e แต่การผสมที่มีสารสกัดเมล็ดแมงลักด้วยน้ำ (MSE/w) ทำให้พืชลดลง (LC_{50} มากกว่า) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารเดี่ยวและพืชเพิ่มขึ้น (LC_{50} มากกว่า) อย่างไม่มีนัยสำคัญ การเสริมฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดผสม จะทำให้สามารถเลือกใช้สารสกัดในปริมาณน้อยลงแต่ได้ประสิทธิภาพสูงกว่าและประหยัดค่าใช้จ่ายได้มากกว่า และค่า LC_{50} ทั้งของสารสกัดเดี่ยวหรือสารสกัดผสมจะเป็นตัวเลือกในการศึกษาทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในเงื่อนไขอื่นๆ ต่อไป

Table 3.3 Cytotoxicity of individual and combined extracts of neem, custard apple and mintweed leaves and mintweed seeds, determined by brine shrimp lethal assay (BSLA). Data are expressed as Mean $\pm$ S.D. of LC_{50} (ppm) at 24 hours.

LC ₅₀ (ppm), 24 h.			
Mean $\pm$ S.D. (n = 6)			
Plant extract	Water extract	Ethanol extract	P-value
Individual			
NLE	48.37 $\pm$ 5.13	6.33 $\pm$ 1.12	0.000**
CLE	115.06 $\pm$ 8.97	27.78 $\pm$ 3.27	0.000**
MLE	0.86 $\pm$ 0.07	0.14 $\pm$ 0.02	0.000**
MSE	3.65 $\pm$ 0.41	6.37 $\pm$ 0.60	0.004**
Combination			
NLE + CLE	10.95 $\pm$ 0.74	1.52 $\pm$ 0.31	0.000**
NLE + MLE	7.25 $\pm$ 0.88	0.07 $\pm$ 0.01	0.000**
NLE + MSE	11.04 $\pm$ 1.49	4.73 $\pm$ 0.54	0.000**
CLE + MLE	8.42 $\pm$ 0.72	0.65 $\pm$ 0.08	0.000**
CLE + MSE	8.93 $\pm$ 0.60	5.24 $\pm$ 1.16	0.002**

Note: NLE - neem, leaf extract, CLE - custard apple extract, MLE - mintweed leaf extract, and MSE - mintweed seed extract. ** significant difference at $P < 0.01$ and * significant difference at $P < 0.05$, analyzed by t-Test of variance

3.5 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของพฤษยาเคมีของสารสกัดใบสะเดา น้อยหน่า แมงลักคา และเมล็ดแมงลักซึ่งได้จากการสกัดด้วยน้ำและ 95% ethanol ในเครื่องสกัดอัตโนมัติที่อุณหภูมิสูงกว่า 100°C สรุปข้อมูลเชิงเปรียบเทียบปริมาณ total phenolic compounds (TPC), free radical scavenging (FRS) และ cytotoxicity จะเห็นได้ว่าน้ำสามารถสกัดสาร phenolics จากใบของพืชได้ปริมาณใกล้เคียงกับสกัดด้วย ethanol ยกเว้นสารสกัดเมล็ดแมงลักที่สกัดด้วยน้ำ (MSE/w) ได้ TPC มาก ซึ่งอาจมีสารประกอบที่มี polarity มากกว่าในใบ สารสกัดด้วยน้ำของใบสะเดา (NLE/w) และใบน้อยหน่า (CLE/w) แสดงประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging - FRS) DPPH[•] ได้ดีกว่าสกัดด้วย ethanol NLE/e และ CLE/e ส่วนสารสกัดใบและเมล็ดของแมงลักที่มีประสิทธิภาพ FRS ใกล้เคียงกัน

รูปแบบการแยกของสารพฤษยาเคมี (fingerprint profile) ซึ่งได้จากการแยกด้วย Thin layer chromatography (TLC) ในสาร mobile phase 3 ระบบ คือ System A ประกอบด้วย ethyl acetate : methanol : water ในอัตราส่วน 81:11:8 (v/v/v) System B ประกอบด้วย n-butanol : glacial acetic acid : water ในอัตราส่วน 40:10:50 (v/v/v) และ System C ประกอบด้วย chloroform : methanol : glacial acetic acid ในอัตราส่วน 47.5:47.5:5 (v/v/v) สามารถแยก fingerprint และระยะเคลื่อนที่สัมพัทธ์ R_f ของสารเคมีในสารสกัดด้วยน้ำและ ethanol ของใบสะเดา ใบน้อยหน่า ใบแมงลักคา และ เมล็ดแมงลักคาได้ต่างกัน และพบว่าความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์มีชีวิต (cytotoxicity) ของใบพืชทั้ง 3 ชนิดที่สกัดด้วย ethanol NLE/e, CLE/e และ MLE/e มีความเป็นพิษสูงกว่าสกัดด้วยน้ำ ส่วนสารสกัดเมล็ดของแมงลักด้วยน้ำ, MSE/w กลับมีพิษมากกว่าสกัดด้วย ethanol, MSE/e สารสกัดผสมระหว่างสารละลายชนิดเดียวกับ พบว่าทั้ง 3 พืช สามารถเสริมพิษต่อกันแบบ synergistic effects ได้สูงมาก พิษของสารสกัดกลุ่มผสมที่มีฤทธิ์สูงสุดคือ NLE/e + MLE/e มีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.07 ± 0.01 ppm และกลุ่มผสมที่มีฤทธิ์น้อยที่สุดคือ NLE/w + CLE/w มีค่า LC_{50} เท่ากับ 10.95 ± 0.74 ppm และ พบว่า CLE เสริมฤทธิ์ให้กับ NLE ในขณะที่ MLE และ MSE เสริมฤทธิ์ให้กับ CLE เพราะความหลากหลายของพฤษยาเคมีในสารสกัดหยาบ อย่างไรก็ตาม การเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดผสมจึงน่าจะเป็นทางเลือกในการใช้ประโยชน์จากพืชให้ได้สูงสุด เช่นใช้สารปริมาณน้อยลงแต่ให้ประสิทธิผลสูงกว่า และ เป็นผลดีต่อสิ่งแวดล้อมและผู้ใช้ เพราะเป็นสารจากธรรมชาติที่ไม่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางในการศึกษาหาการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดพืชอื่นๆต่อไป อย่างไรก็ตาม สังเกตเห็นได้ว่า cytotoxicity สอดคล้องกับปริมาณ total phenolic compounds ของสารสกัด แต่ผกผันกับ free radical scavenging

Table 3.4 Summary of total phenolic compound content, free radical scavenging activity and cytotoxicity activity of the leaf extracts of neem, custard apple, and mintweed and the seed extracts of mintweed.

Extract	Total phenolic cpd (mgGAE/L) Mean $\pm$ S.D., n =5	Inhibition of DPPH [•] (IC ₅₀) (ppm) Mean $\pm$ S.D, n = 5	Cytotoxicity, BSLA LC ₅₀ (ppm), 24 h. Mean $\pm$ S.D., n = 6
NLE/w	297 $\pm$ 31.67*	172.99 $\pm$ 4.53*	48.37 $\pm$ 5.13**
NLE/e	338 $\pm$ 41.83*	211.53 $\pm$ 8.61*	6.33 $\pm$ 1.12**
CLE/w	309 $\pm$ 44.45*	163.55 $\pm$ 8.99*	115.06 $\pm$ 8.97**
CLE/e	261 $\pm$ 30.74*	218.62 $\pm$ 3.64*	27.78 $\pm$ 3.27**
MLE/w	251 $\pm$ 31.55	288.92 $\pm$ 13.91	0.86 $\pm$ 0.07**
MLE/e	245 $\pm$ 26.48	226.39 $\pm$ 6.22	0.14 $\pm$ 0.02**
MSE/w	254 $\pm$ 30.51*	156.44 $\pm$ 3.99	3.65 $\pm$ 0.41*
MSE/e	179 $\pm$ 13.28*	155.48 $\pm$ 7.06	6.37 $\pm$ 0.60*

N - neem, C - custard apple, M - mintweed, L - leaf, S - seed, w - water and e - ethanol

เอกสารอ้างอิง

- Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18:265-267.
- Agarwal, A. (1996). What's in a neem? Down to Earth. 14 (20):27-38.
- Al-Lawati, H.T., Azam, K.M., and Deadman, M.L. (2002). Insecticidal and repellent properties of subtropical plant extracts against pulse beetle, *Callosobruchus chinensis*. Agri Sci. 7(1):37-45.
- Alam, M. M. 1996. Bioactivity against phytonematodes. In: Randhawa, N. S., Parmar, B.S. (Eds.), New Age Internatl. 171-191.
- Anandjiwala, S., Srinivasa, H., and Rajani, M. (2007). Isolation and TLC Densitometric Quantification of Gallicin, Gallic Acid, Lupeol and b-Sitosterol from *Bergia suffruticosa*, a Hitherto Unexplored Plant. Chromatographia. 66:725-734.
- Andrade, E.H.A., Zoghbi, M.das G.B., Maia, J.G.S., Fabricius, H., and Marx, F. (2001). Chemical characterization of the fruit of *Annona squamosa* L. occurring in the Amazon. J. Food Compos. Anal. 14:227-232.
- Asekun, O. T., Ekundayo, O., and Adevini, B. A. (1999). Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* Leaves. Fitoterapia. 70:440-442.
- Aycard, J. P, Kini, F., Kam, B., Gaydou, E. M., and Faure, R. (1993). Isolation and identification of spicigera lactone: Complete H and C assignments using two- dimensional NMR experiments. J. Natl. Products. 56:1171-1173.
- Baskar, R., Rajeswari, V, and Kumar, T.S. (2007). *In vitro* antioxidant studies I leaves of *Annona* specie. Indian J. Experitl. Biol. 45:480-485.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. 28:25-30.
- Büyükkuroglu, M. E., Gülcin, I., Oktay, M., & Kufrevioglu, O. I. (2001). In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. Pharmacological Research. 44(6):491-495.
- Chui, S., Fu, B., Sen-Chun Lee, F., and Wang, X. (2005). Application of microemulsion thin layer chromatography for the fingerprinting of licorice (*Glycyrrhiza* spp.). J Chromatography B. 828:33-40.
- Daniel, J. N. (2000). Studies on EM based farming practices for small farmers in India. In: Proceedings of the International Conference on Kyusre farming, Pyongyang, Democratic People's Republic on Korea, BAIF Development Research Foundation.
- Finney, D.J. (1971). Probit analysis, Cambridge,U.K.:Cambridge University Press. 55 pp.

- Geraldo, M.R.F., Arroiteia, C.C., and Kemmelmeier, C. (2010). The effects of neem [*Azadirachta indica* A. Juss (meliaceae)] oil on *Fusarium oxysporum* f. sp. *Medicagenis* and *Fusarium subglutinans* and the production of fusaric acid toxin. *Adv. Biosci Biotechnol.* 1:1-6.
- Ghimeray, A.K., Jin, C-W., Ghimire, B.K., and Cho, D.H. (2009). Antioxidant activity and quantitative estimation of azadirachtin and nimbin in *Azadirachta Indica* A. Juss grown in foothills of Nepal. *Afr. J. Biotechnol.* 8 (13):3084-3091.
- Goli, A.H., Barzegar, M., and Sahari, M.A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chem.* 92:521-525.
- Guerrini, V.H. and Kriticos, C.M. (1998) Effects of azadirachtin on *Ctenocephalides felis* in the dog and the cat. *Veterinary Parasitol.* 74:289-297.
- Halliwell, B., Aeschbacher, R., Loliger J., and Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxic.* 33:601-617.
- Joshi, P. C., Lockwood, J. A. (2000). Antifeedent effect of aqueous extract of neem (*Azadirachta indica* A.Juss) Leaves on *Oxya velox* F. (Orthoptera:Arididae). *J. Agric. Urban Ento.* 17 (1):21-26.
- Kaethner, M. (1991). Potential of neem seed kernel products for the control of the cockchafer *Melolontha hippocastani* F. and *M. melolontha* L. (Col., Scarabaeidae). *J. Appl. Entomol.* 112:345-352.
- Khomdram, S.D. and Singh, P.L. (2011) Polyphenolic compounds and free radical scavenging activity in eight *Lamiaceae* herbs of Manipur. *Not. Sci. Biol.* 3:109-115.
- Kothari, V. and Seshadri, S. (2010). Antioxidant activity of seed extracts of *Annona squamosa* and *Carica papaya*. *Nutri. Food Sci.* 40:403-408.
- Kumar, U., (2002). Neem as a potential biopesticide and soil conditioner. *Agrobios Newsletter.* 1(6):8-16.
- Lavhale, M.S. and Mishra, S.H. (2007). Evaluation of free radical scavenging activity of *Butea monosperma* Lam. *Indian J. Exptl. Biol.* 45:376-384.
- Manjula, M., Anitha, S., and Shashidhara, S. (2011). Comparative evaluation of antioxidant potential and total phenolic content in selected medicinal plants. *J. Pharma. Res.* 4(4):1065-1066.
- Mann, J. 1987. Secondary Metabolism. Clarendon Press, Oxford: In Bratt, K. (2000). Secondary plant metabolites as defense against herbivores and oxidative stress. Synthesis, isolation and biological evaluation. *Comprehensive summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology.* 567, 51 pp.
- Mansour, F.A., Ascher, K.R.S., and Abo-Moch, F. (1997). Effects of neemgard of phytophagous and predacious mites and on spider. *Phytoparasitica.* 25(4):333-336.

- Matthaus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J. Agri. Food Chem.* 50:3444-3452.
- McLaughlin, J.L. and Rogers, L.L. (1998) the use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Info J.* 32:513-524.
- Mishra, A.K. and Dubey, N.K. (1994). Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl. Envir. Microbiol.* 60:1101-1105.
- Mulla, M. S., and Su, T., (1999). Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *J. Am. Mosquito Control Association.* 15:33-152.
- Musabyimana, T., Saxena, R.C., Kairu, E.W., Ogo, C.P.K. and Khan, Z.R. (2001) Effects of neem seed derivatives on behavioral and physiological responses of the *Cosmopolites sordidus* (Coleopter: Curculionidae). *J. Economic Entomol.* 94:449-454.
- Narayanaswamy, N. and Balakrishnan, K.P. (2011). Evaluation of some medicinal plants for their antioxidant properties. *Internat'l. J. Pharm. Tech. Res.* 3:381-385.
- Nantitanon, W., Chowwanapoonpohn, S, and Okonogi, S. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Hyptis suaveolens* essential oil. *Sci. Pharm.* 75:35-46.
- Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J.C., and Camara, J.S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chem.* 105:204-214.
- Palsson, K., and Jaeson, T.G.T. (1999). Plant products used as mosquito repellents in Guinea Bissau, West Africa., *Acta Tropica.* 72:39-57.
- Pandey, D.K., Tripathi, N.N., Tripathi, R.D., and Dixit, S.N. (1982). Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *J. Plant Dis. Prot.* 89:344-349.
- Patel, J.D. and Kumar, V. (2008) *Annona squamosa* L.: Phytochemical analysis and antimicrobial screening. *J. Pharm. Res.* 1:34-38.
- Peerzada, N. (1997). Chemical composition of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Molecules.* 2:165-168.
- Pereda-Mianda, R., and Gascon-Figueroa, M. (1988). Chemistry of *Hyptis mutabilis*: New pentacyclic triterpenoids. *J. Natl. Products.* 51:996-998.
- Pisutthanan, S., Plianbangchang, P., Pisutthanan, N., Ruanruay, S., and Muanrit, O. (2004). Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family Meliaceae. *Naresuan Univ. J.* 12:13-18.
- Pundt, L. (2000). Neem based insecticides. *Home & Garden News.* July/August, pp. 6.
- Rao, N.S., Sharma, K., and Sharma, R.K. (2005). Anti-feedant and growth inhibitory effects of seed extracts of custard apple, *Annona squamosa* against Khapra beetle, *Trogoderma granarium*. *J. Agri. Technol.* 1(1):43-54.

- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci.* 2(4):152-159.
- Sanches-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Res. Interl.* 32:407-412.
- Schmutterer, H., (1995). The neem tree *Azadirachta indica* (Juss) and other meliaceous plants: sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, pp. 696.
- Sengbusch, P.V. (2003). The secondary metabolism of plants: Secondary defence compounds. Available online at <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e20/20.htm>
- Sithisarn, P. and Gritsanapan, W. (2005). Free radical scavenging activity and total flavonoid content of Siamese neem tree leaf aqueous extract from different locations. *Mahidol Univ. J. Pharm. Sci.* 32:31-35.
- Sithisarn, P., Carlsen, C.U., Andersen, M.K., Gritsanapan, W., and Skibsted, L.H. (2007). Antioxidative effects of leaves from *Azadirachta* species of different provenience. *Food Chem.* 104:1539-1549.
- Stafford, G.I., Jager, A.K., and van Staden, J. (2005). Effect of storage on the chemical composition and biological activity of several popular South African medicinal plants. *J. Ethnopharm.* 97:107-115.
- Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., and Phillipson, J.D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Medica.* 59:250-252.
- Swain, T., and Hills, W.E. (1959). The phenolics contents of *Prunus domestica* L.-The quantitative analysis of phenolics constituents. *J Sci Food Agric*, 10:63-8.
- Tanprasit, P. (2005). Biological control of Dengue fever mosquitoes (*Aedes aegypti* Linn.) using leaf extracts of chan (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) and hedge flower (*Lantan camara* Linn.) Master of Science Thesis, Environmental Biology, Suranaree University of Technology. 77 pp. ISBN 974-533-548-7
- Torssell, K.B.G. (1997). Natural product chemistry. A mechanistic, biosynthesis and ecological approach. Apotekarsocieteten-Swedish Pharmaceutical Press: In Bratt, K. 2000. Secondary plant metabolites as defense against herbivores and oxidative stress. Synthesis, isolation and biological evaluation. Comprehensive summaries of Uppsala Disserations from the Faculty of Science and Technology. 567, 51pp.
- Vanitha V., Umadevi, K.J., and Vijayalakshmi, K. (2010). In vitro assessment of alcoholic leaf extracts of *Annona squamosa* and *Aegle marmekos*. *Bioscan*, 5:225-229.
- Wulff, R. (1987). Effect of irradiance, temperature, and water status on growth and photosynthetic capacity in *Hyptis suaveolens*. *Can. J. Bot.* 65: pp. 2501-2506.

- Xuan, T.D., Eiji, T., Hiroyuki, T., Mitsuhiro, M., Khanh, T.D., and Chung, I.-M. (2004). Evaluation on phytotoxicity of neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) to crop and weeds. *Crop Protection*. 23:335-345.
- Yadav, D.K., Singh, N., Dev, K., Sharma, R., Sahai, M., Palit, G., and Maurya, R. (2011). Anti-ulcer constituents of *Annona squamosa* twigs. *Fitoterapia*. 82:666-675.
- Zschocke, S., Rabe, T., Taylor, J.L.S., Jaeger, A.K., and van Staden, J. (2000). Plant part substitution – a way to conserve endangered medicinal plants? *J. Ethnopharm.* 71:281–292.
- กนก อุไรสกุล. (2540). การทดสอบสารสกัดแมลงลัคคาบกับเพลี้ยอ่อนพริก (*Aphis gossypii* Glov) และ หนอนรังห่อใบมะม่วง (*Orthaga* sp.). โครงการการศึกษาองค์ประกอบและทดสอบสารสกัดแมลงลัคคาบกับเพลี้ยอ่อน (*Aphis gossypii* Glov). สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตพระนครศรีอยุธยา หันตรา: 1-15.
- รัชดาภรณ์ พิทักษ์ธรรม. (2544). ศึกษาความทนเค็ม ทนแล้ง และความเป็นพิษของต้นแมลงลัคคา (*Hyptis suaveolens* Linn.) ต่อหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (*Heliothis armigera* Hubn.) ดุษฎีนิพนธ์ สาขาวิชาชีววิทยาสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ISBN 974-533-027-2.
- www.oisat.org: Custard apple. Available online at
http://www.oisat.org/control_methods/plants_in_pest_control/custard_apple.html
- <http://www.phytochemicals.info/>: What are phytochemicals?. Available online at
<http://www.phytochemicals.info/>