

โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน และความเป็นพิษต่อเซลล์ของพืชสมุนไพรที่พบทั่วไปในประเทศไทย นอกจากนั้นยังเป็นการเสาะหาสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ด้านออกซิเดชันสูงสุดและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปรกติน้อยที่สุด พร้อมทั้งศึกษาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์นั้นด้วย

งานวิจัยของโครงการจึงเริ่มต้นด้วยการรวบรวมพืชสมุนไพรในประเทศ โดยมีหลักเกณฑ์ว่าต้องเป็นพืชสมุนไพรที่หาได้ง่าย มีปริมาณมาก หรือเป็นของเหลือใช้ หรือเป็นพืชที่มีรายงานทั้งทางวิทยาศาสตร์หรือทางภูมิปัญญาพื้นบ้านว่าใช้เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน ด้วยเหตุนี้จึงรวบรวมพืชสมุนไพรได้ 26 ชนิด บางชนิดใช้เพียงส่วนเดียว เช่น ส่วนของใบ หรือส่วนลำต้น หรือส่วนราก บางชนิดใช้หลาย ๆ ส่วน ดังนั้นจึงรวบรวมได้ทั้งหมด 43 ตัวอย่าง ได้นำมาเตรียมสารสกัดหยาบจากเอธานอล ได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 43 ชนิด แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านออกซิเดชันโดยใช้วิธี ABTS, DPPH, FRAP, และ Lipid peroxidation อีกทั้งได้นำไปศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้ Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) เป็นตัวแทนเซลล์ปรกติ และใช้ Caco-2 cell เป็นตัวแทนเซลล์มะเร็ง ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันในระดับที่แตกต่างกัน สารสกัดส่วนใหญ่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปรกติ ยกเว้นสารสกัดจากเปลือกมังคุด ใบรางจืด และใบฟ้าทะลายโจร ที่แสดงค่า IC_{50} ต่อเซลล์ปรกติเท่ากับ 4.9, 5.3 และ 8.6 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดหยาบจากเปลือกผลมังคุดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 32 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

จากฤทธิ์ด้านออกซิเดชันที่ได้ ทำให้พิจารณาเลือกตัวอย่างพืช 5 ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง ใบสาระแน เปลือกผลทับทิม ใบทับทิม และใบรางจืด ไปทำการสกัดแยกส่วน โดยใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต บิวทานอล และเมธานอล ทำให้ได้สารสกัดแยกส่วน 20 ชนิด เมื่อนำสารสกัดแยกส่วนทั้ง 20 ชนิดนี้ ไปศึกษาสมบัติเคมีเบื้องต้น พบว่ามีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ และพบปริมาณของฟีนอลิกสูงในสารสกัดแยกส่วนจากเมธานอล เมื่อนำสารสกัดแยกส่วนทั้ง 20 ชนิด ไปทดสอบฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดแยกส่วนจากเมธานอลของใบฝรั่ง เปลือกผลทับทิม และใบทับทิม มีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันสูงสุด แต่เนื่องจากเปลือกผลทับทิมและใบทับทิมแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปรกติ ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดจากใบฝรั่งไปทำการแยกสกัดหาสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อไป

การแยกสารบริสุทธิ์จากใบฝรั่งได้ใช้หลักการของคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าสามารถแยกสารสำคัญได้ 3 ชนิด ตั้งชื่อว่า สาร 1 สาร 2 และสาร 3 จากการศึกษาสูตรโครงสร้างของสารทั้ง 3 ชนิด โดยอาศัยหลักการของ Spectroscopy และทางเคมี ทำให้ทราบว่า สาร 1 สาร 2 และสาร 3 คือ เควอร์ซิทิน มอริน และ เควอร์ซิทิน-3-โอ-กลูโคไพราโนไซด์ ตามลำดับ เมื่อนำสารทั้ง 3 ชนิด มาศึกษาฤทธิ์ด้านออกซิเดชันเปรียบเทียบกัน ก็พบว่า สาร 1 หรือ เควอร์ซิทิน มีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันสูงสุด โดยให้ค่า TEAC, IC_{50} และ EC เป็น 24.19 ± 0.06 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร, 1.20 ± 0.02 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร และ 35.64 ± 0.24 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำสารนี้มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMC และ KB-31 พบว่าสารนี้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทั้งสองเลย

จากการศึกษาทั้งหมดนี้พอสรุปได้ว่า ในบรรดาพืชสมุนไพรทั้ง 26 ชนิด หรือ 43 ตัวอย่างที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ใบฝรั่งเป็นแหล่งพืชสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด เนื่องจากมีสารที่มีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันสูงสุด ซึ่งสารที่ว่านี้มีชื่อว่า เควอร์ซิทิน

This research project was aimed to compare the antioxidant activity and cytotoxicity of medicinal plants commonly found in Thailand. The study was also to find out the most active principle that showed the highest antioxidant activity and the least toxicity to normal cells. Structure elucidation of the pure active compound (s) was also carried out.

The research work began with plant collection based on ethnopharmacological information, chemotaxonomic approach and random sampling. According to this, 26 kinds of medicinal plants were collected. After taking part separation; e.g. leaf, stem, root, 43 plant samples were obtained. The ethanol crude extracts of all 43 samples were prepared and evaluated for their antioxidant activities using ABTS, DPPH, FRAP and lipid peroxidation methods. The cytotoxicity of all extracts was also tested by using peripheral blood mononuclear cell (PBMC) as a model of normal cell and Caco-2 cell as a model of cancer cell. Results revealed that all of crude extracts possessed antioxidant activity but at a different level. Most extracts were not toxic to PBMC except those from *Garcinia mangostana* fruit peel, *Thunbergia laurifolia* leaves and *Andrographis paniculata* leaves that showed IC_{50} value of 4.9, 5.3 and 8.6 $\mu\text{g/ml}$ to PBMC, respectively. The crude extract of *Garcinia mangostana* fruit peel also showed inhibition of Caco-2 cancer cells.

From the antioxidant activity point of view, 5 plant samples *Psidium guajava* leaves, *Mentha cordifolia* leaves, *Punica granatum* fruit peel, *Punica granatum* leaves and *Thunbergia laurifolia* leaves were selected for fractionation process using n-hexane, ethyl acetate, n-butanol and methanol as the extracting solvents. Thus, 20 fractionated extracts were obtained. Basic chemical test indicated that these 20 fractions were composed of various kinds of flavonoids. High total phenolic content was found in methanolic fractionates of all samples. These 20 fractions were tested for antioxidant activity and cytotoxicity to PBMC and Caco-2 cells. Results indicated that methanolic fractionates of *Psidium guajava* leaves, *Punica granatum* fruit peel and *Punica granatum* leaves possessed high antioxidant activity. However, fractionates of *Punica granatum* fruit peel and *Punica granatum* leaves showed high toxicity to normal cells. Therefore, the extract of *Psidium guajava* leaves was selected for further purification by using column chromatography with various conditions of stationary and mobile phases. Finally, three active principles, compound 1, 2 and 3 were isolated. Their structures were determined on the basis of spectroscopic and chemical methods. Compound 1, was found to be quercetin, whereas compound 2 and compound 3 were identified as morin and quercetin-3-O-glucopyranoside. Among these 3 principles, compound 1 showed the most potent antioxidant activity with the TEAC, IC_{50} , EC values of 24.19 ± 0.06 mg/ml, 1.20 ± 0.02 $\mu\text{g/ml}$ and 35.64 ± 0.24 mg/ml, respectively. The cytotoxicity to PBMC and KB-31 revealed that compound 1 had no toxic to such cells. It was concluded that among 43 plant samples of 26 kinds of plants, *Psidium guajava* leaves was the most potential source for antioxidant principle. The most active substance in *Psidium guajava* leaves was found to be quercetin.