บทที่ 4
การศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและการต้านออกซิเดชัน

การทบทวนวรรณกรรม

สาเหตุของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายเกิดได้ทั้งจากอนุมูลอิสระ (free radicals) และอนุภาคว่องไวออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นโมเลกุล หรือ อะตอมที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electron) โคจรรอบวงนอกสุดของออร์บิทอล์ (orbital) จึงทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรต่ำและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ (โอภา วัชระคุปต์, 2549) การเกิดปฏิกิริยาสามารถเกิดได้หลากหลายชนิด ไม่มีความ จำเพาะอีกทั้งกระทำตัวคล้ายเป็น secondary messengers ชักนำมาซึ่งกระบวนการต่างๆ ในระดับโมเลกุล (Paeck et al., 1991) ส่วน ROS หมายถึง โมเลกุลที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทั้งที่เป็นอนุมูลอิสระและที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระของออกซิเจน ซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการเมทตาบอลิซึมต่างๆ ในร่างกาย ตัวอย่างเช่น ซุบเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical, $HO^{\cdot}$) ซิงเกลทออกซิเจน (singlet oxygen, $^1O_2$) อนุมูลลิพิดเปอร์ออกซิล (lipid peroxyl radical, $LOO^{\cdot}$) อนุมูลอัลคีลเปอร์ออกซิล (alkylperoxyl radical, $LO^{\cdot}$) (Halliwell et al., 1995) เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางชีวภาพหลายอย่างในร่างกายในภาวะปกติร่างกายจะสร้างอนุมูลอิสระในอัตราที่เป็นปกติและเป็นไปในแนวทางที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย แต่ในภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมามากเกินความสามารถของกระบวนการต้านออกซิเดชัน หรือการลดลงของสารต้านออกซิเดชันทำให้เกิดภาวะไม่สมดุลระหว่างสารต้านออกซิเดชันและสารอนุมูลอิสระก่อให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์และก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ มากมาย เช่น โรคเกี่ยวกับระบบหัวใจและหลอดเลือด มะเร็ง โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท โรคเบาหวาน การอักเสบและการแก่ชรา (โอภา วัชระคุปต์, 2549; Aruoma, 1994)

สารต้านออกซิเดชันมีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันเนื้อเยื่อจากการทำลายของอนุมูลอิสระ ซึ่งเกิดขึ้นตลอดเวลาในกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกาย (Gutteridge, Halliwell, 2000) จึงจำเป็นที่เราจะต้องได้รับสารต้านออกซิเดชันจากภายนอก เป็นที่ทราบกันดีว่าพืชเป็นแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารจำพวกฟีนอล (phenolic compounds) เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบมากในพืช ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ได้แก่ สารจำพวก flavonoids ที่มี catechol เป็นองค์ประกอบ stilbenes และ tannins ซึ่งโครงสร้างหลักประกอบด้วย aromatic ring แทนที่ด้วย hydroxy group กลไกของสารจำพวกฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือเมื่อมีอนุมูลอิสระมาดึงอิเลกตรอนไป แต่ในโครงสร้างมีอิเลกตรอนหนาแน่นจึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเลกตรอนไปทั่วโครงสร้าง (delocalization) ทำให้โครงสร้างเสถียรไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป (Pietta, 2000) โดยทำหน้าที่จับหรือฟอร์มพันธะโคออร์ดิเนตกับโลหะหนัก (chelating agent) เช่น ทองแดงและเหล็ก ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้างรวมทั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain breaking antioxidant) ในการยับยั้งหรือขจัดอนุมูลอิสระ เช่น lipid alkoxyl และ peroxyl radicals เป็นต้น โดยทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลเหล่านั้น ซึ่งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารในกลุ่มของกรดฟีนอลิกและเอสเทอร์ของกรดฟีนอลิกจะขึ้นกับจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุล (โอภา วัชระคุปต์, 2549)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิกกับความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระในพืชด้วยวิธี FRAP และ TEAC พบว่ามีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก กล่าวคือถ้ามีสารประกอบฟีนอลิกสูงก็จะมีค่าความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระสูงและถ้ามีสารประกอบฟีนอลิกต่ำก็มีค่าความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระต่ำร่วมด้วย (นันท์นภัส เติมวงศ์, 2551; Krpan et al., 2009)

1. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชสกุล *Murdannia*

M. bracteata (หญ้าปักกิ่ง) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 74.61 ± 6.36 และ 55.78 ± 2.35 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัด เทียบกับ ferulic acid เมื่อสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินตามลำดับ โดยสารสกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH$^{\cdot}$ ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ คือมีค่า EC_{50} = 246.90 ± 16.75 และ 620.97 ± 63.39 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับค่าความสามารถในการเป็น Reducing agent เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี FRAP (0.66 และ 0.48 mmole Fe^{2+} / mg extract) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS ดีกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล (EC_{50} = 1.51 ± 0.076 และ 2.00 ± 0.090 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ) (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2551) นอกจากนี้ สารแบลกทาโนไลด์เอ สารแบลกทาโนไลด์บีและไอโซไวเทกซินที่สกัดได้จากสมุนไพรหญ้าปักกิ่งสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) และสารแบลกทาโนไลด์เอสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนตริก ออกไซด์ซินเทส (inducible nitric oxide synthase, iNOS) จากเซลล์แมกโครฟาจ (macrophages) เมื่อกระตุ้นด้วยสารลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides) ซึ่ง iNOS เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตไนตริกออกไซม์ในสภาวะการอักเสบ (Wang et al., 2007)

M. loriformis (ผักลืมผัวใหญ่) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 37.95 ± 4.16 และ 56.26 ± 2.27 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัด เทียบกับ ferulic acid เมื่อสกัดด้วยเมทานอลและน้ำตามลำดับ โดยสารสกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH$^{\cdot}$ ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ คือมีค่า EC_{50} = 408.80 ± 18.01 และ 427.12 ± 89.10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับค่าความสามารถในการเป็น reducing agent เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี FRAP (0.57 และ 0.43 mmole Fe^{2+} / mg extract) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS ดีกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล (EC_{50} = 1.61 ± 0.071 และ 2.27 ± 0.149 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ) (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2550; 2551)

M. nudiflora (กินกุ้งน้อย) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 16.31 ± 1.68 และ 37.91 ± 1.80 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัด เทียบกับ ferulic acid เมื่อสกัดด้วยเมทานอลและน้ำตามลำดับ โดยสารสกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH$^{\cdot}$ ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ คือมีค่า EC_{50} = 804.16 ± 55.84 และ 1124.68 ± 42.09 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับค่าความสามารถในการเป็น reducing agent เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี FRAP (0.46 และ 0.35 mmole Fe^{2+} / mg extract) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS ดีกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล (EC_{50} = 1.09 ± 0.065 และ 2.37 ± 0.220 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2550; 2551)

2. การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง

การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านออกซิเดชันมี 2 กลไก คือการวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (electron transfer, ET หรือ SET) เป็นการวิเคราะห์หาความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไป

รีดิวซ์สารอื่น ยกตัวอย่างแบบการทดลองในกลไกนี้ ได้แก่ วิธี 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH) วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) และการหาปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิก (Folin-Ciocalteu) และการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (hydrogen atom transfer, HAT) เป็นการวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยการให้อะตอมไฮโดรเจน ยกตัวอย่างแบบการทดลองในกลไกนี้ ได้แก่ การยับยั้งลิพิดเปอร์ออกซิเดชันด้วยวิธี thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) (โอภา วัชระคุปต์, 2549) โดยหลักการของแต่ละวิธีมีรายละเอียดดังนี้

DPPH assay อนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\cdot}$) เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร เมื่อละลายในเมทานอลจะมีสีม่วงเข้มและมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร สารต้านออกซิเดชันที่มีความสามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ จะทำให้ความเข้มของสีสารละลาย DPPH ลดลงแล้วเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองอ่อนมีผลทำให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ลดลง (Bondet et al., 1997) ข้อดีของการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay คือเป็นวิธีที่ง่ายไม่ยุ่งยาก และใช้เวลาน้อยและสามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องสเปรกโทโฟโตมิเตอร์ หรือเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) ได้ ซึ่งทำให้ประหยัดสารเคมีสะดวกและรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คืออนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนกับอนุมูลที่เกิดในร่างกาย จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลอิสระที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของ $DPPH^{\cdot}$ ที่อิเล็กตรอนเดี่ยวจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วงซึ่งอยู่ภายในสุดของโครงสร้างและหมู่ไนไตรทำให้สารต้านออกซิเดชันที่มีฤทธิ์แรง แต่มีโมเลกุลขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากำจัดอนุมูลอิสระ หรือเกิดขึ้นช้ากว่าความเป็นจริงทั้งที่สารต้านออกซิเดชันมีฤทธิ์ดีในการกำจัดอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิล ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถพิสูจน์ความสามารถของสารต้านออกซิเดชันที่ดีที่สุดจำเป็นต้องมีวิธีวัดวิธีอื่นมาสนับสนุน (โอภา วัชระคุปต์, 2549)

FRAP assay เป็นการทดสอบโดยตรงเพื่อวัดความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด (total antioxidant capacity) โดยอาศัยหลักการที่ว่าสารต้านออกซิเดชันในร่างกายทำหน้าที่โดยการให้อิเล็กตรอน ซึ่งจัดเป็นสารรีดิวซ์และมีคุณสมบัติเป็นสารจับโลหะ หลักการการทดสอบของวิธีนี้ คือภายใต้สภาวะความเป็นกรดสารประกอบเชิงซ้อนของ Ferric tripyridyl triazine (Fe^{3+} – TPTZ) จะถูกรีดิวซ์ได้เป็น ferrous tripyridyl triazine (Fe^{2+} – TPTZ) ซึ่งให้สารละลายสีน้ำเงินและสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ดังนั้นสารใดให้อิเล็กตรอนเพื่อเปลี่ยน Fe^{3+} – TPTZ ไปเป็น Fe^{2+} – TPTZ ได้จะมีค่าการดูดกลืนแสงมากขึ้นแสดงว่าสารนั้นมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยการรีดิวซ์เหล็ก Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} (Benzie, Strain, 1996) สำหรับข้อดีของวิธีนี้ คือเป็นวิธีที่ง่ายใช้เวลาน้อยไม่แพงและไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษสามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ได้ ส่วนข้อเสีย คือไม่สามารถวัดสารต้านออกซิเดชันที่กำจัดอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมไฮโดรเจนได้และปฏิกิริยาเกิดที่ pH ต่ำ ซึ่งความเป็นกรดจะลดค่าความต่างศักย์ในการแตกตัวของอิออนทำให้เร่งการส่งผ่านอิเล็กตรอนและเพิ่มค่าความต่างศักย์รีดอกซ์ (โอภา วัชระคุปต์, 2549)

Folin-Ciocalteu assay การหาปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกที่มีความสามารถเป็นสารรีดิวซ์ หรือมีคุณสมบัติเป็น metal chelators ในกลไกการทดลองเป็นแบบปฏิกิริยารีดอกซ์ ซึ่งถูกพัฒนามาจากการวิเคราะห์ปริมาณสาร tyrosine (Folin, Ciocalteu, 1927) โดยใช้ molybdotungstate reagent ไปทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยามีสีน้ำเงิน ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง

745-750 นาโนเมตร (Singleton, Rossi, 1965) โดยใช้ ferulic acid เป็นสารมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิก (Velioglu et al., 1998) ข้อดี เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก มีการรบกวนของสารที่มีสีในตัวอย่างได้น้อยที่การดูดกลืนแสงของความยาวคลื่นที่ยาวและสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติหลากหลายชนิดและเป็นวิธีมาตรฐานที่ยอมรับในการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันจากอาหารทั่วไป ข้อเสีย คือมีสารบางกลุ่มที่ทำให้ค่าที่วัดได้ผิดพลาด เช่น น้ำตาล เอมีน ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ วิตามินซี สารกลุ่ม enediols และ reductones กรดอินทรีย์และ Fe (II) สามารถทำปฏิกิริยากับ folin-ciocalteu reagent ได้สีน้ำเงินทำให้ค่าที่วัดได้มากกว่าความเป็นจริงและไม่สามารถทดสอบสารต้านออกซิเดชันที่ละลายในไขมันได้ เนื่องจากวิธีนี้ถูกพัฒนาเพื่อวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันที่มีขั้ว หรือ สามารถละลายได้ในเฟสน้ำ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่จัดเป็นวิธีการวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยตรง แต่เป็นการวัดระดับสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชัน

TBARS assay หลักการ คือ ปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) เป็นกระบวนการทำลาย polyunsaturated fatty acid (PUFA) โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันเริ่มต้นโดยอนุมูลอิสระไปดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวทำให้โมเลกุลของไขมันเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระของไขมัน คือ lipid radical ($L^{\cdot}$) แล้วทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับออกซิเจนเป็น lipid peroxyl radical ($LO_2^{\cdot}$) ซึ่งจะไปดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดอื่นๆ สุดท้ายทำให้เกิด linoleic acid hydroperoxide (LOOH) ที่มีผลทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ เช่น มาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde, MDA) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) แล้วได้ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) มีสีชมพูและดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ซึ่งการตรวจวัด TBARS นั้นจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดสภาวะลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน สำหรับการประเมินสภาวะการเกิดปฏิกิริยานี้ทำได้โดยนำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาทำปฏิกิริยากับ TBA ภายใต้สภาวะกรด (pH $\leq$3) ที่อุณหภูมิสูงได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน TBARS และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Okawa et al., 1979)

วิธีดำเนินการศึกษา

1. ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา อุปกรณ์และสารเคมี

(1) ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ส่วนเหนือดินที่ไม่ใช้ในการสืบพันธุ์และส่วนใต้ดินของพืชแต่ละชนิดที่เก็บในช่วงฤดูกาลออกดอกติดผลรายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 13 แสดงรายละเอียดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและอ้างอิง

Samples	Code	Color of flower/ population	Locality	Collection date	Vouchers' no.
M. gigantea	Mg (wl1)	white / larger plant	Pha Taem forest, Ubonratchathani Province.	22/08/2009	SK, OC & TT 70
M. gigantea	Mg (wl2)	white / larger plant	Tup Phaya Suea waterfall, Khon Kaen Province.	27/06/2009	SK, OC & TT 41
M. gigantea	Mg (ws)	white / smaller plant	Ban Chom Manee, Nakhon Phanom Province.	09/08/2009	SK, OC & TT 58
M. gigantea	Mg (pwm)	purplish white / moderate	Phu Rua forest, Loei Province.	27/07/2009	SK, OC & TT 54
M. gigantea	Mg (vm)	violet / moderate	Phu Phan forest, Sakon Nakhon Province.	20/08/2009	SK, OC & TT 66
M. macrocarpa	Mm	violet	Phu Kradueng forest, Loei Province.	29/10/2009	TT, OC & SK 1205
M. simplex	Ms1	violet	Doi Suthep-Pui forest, Chiang Mai Province.	15/08/2009	SK, OC & TT 59
M. simplex	Ms2	violet	Doi Inthanon forest, Chiang Mai Province.	15/10/2009	TT, OC & SK 1194

SK = Sureerut Khaewsaart, OC = Orasa Chaichumporn and TT = Thaweesak Thitimetharoch

(2) อุปกรณ์และเครื่องมือ

Evaporator (EYELE, Japan), Lyophilizer (Flexi-Dry, USA), 96-well microtiter plate, Microplate reader (Bio-Rad, Model 680), Autopipette ขนาด 20, 100 และ1000 ไมโครลิตร, Centrifuge, Homogenizer, Eppendrof tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, Water bath (PolyScience, Switzerland)

(3) สารเคมี

Ferulic acid, DPPH (2,2 – Diphenyl-1-picrylhdrazyl) (Sigma-Aldrich, Germany), 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ) (Sigma-Aldrich, Germany), Ferric chloride, Ferrous sulfate (Aldrich, Germany), Sodium dodecyl sulfate (SDS), 2- Thiobarbituric acid (TBA), Butylated hydroxytoluene (BHT) (Fluka, Swizerland), Ethylene diaminetetra acetic (EDTA), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma-Aldrich, Germany), Ascorbic acid (AJAX CHEMICALS, Australia)

2. ขั้นตอนการศึกษา

(1) การเตรียมสารสกัด

นำส่วนเหนือดินที่ไม่ใช้ในการสืบพันธุ์และส่วนใต้ดินของพืชแต่ละชนิดที่ผ่านการอบแห้งที่อุณภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน (ตารางที่ 13) มา 5 กรัมสกัดด้วยเมทธานอลและน้ำอย่างละ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่า 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองส่วนที่เป็นของเหลวที่สกัดด้วยน้ำมาระเหยเอาน้ำออกด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer) ส่วนของเหลวที่สกัดด้วยเมทานอลนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง (Evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เก็บในหม้อดูดความชื้น

(2) การหาค่าปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิก (Folin-Ciocalteu assay)

การหาปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกที่มีความสามารถเป็นสารรีดิวซ์ หรือมีคุณสมบัติเป็น metal chelators ในกลไกการทดลองเป็นแบบปฏิกิริยารีดอกซ์ วิธีการทดลองดัดแปลงจาก Singleton, Rossi (1965) ทำการละลายสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิด ด้วยเมทานอลและน้ำเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการเตรียมสารมาตรฐานฟีนอลิก ferulic acid ในน้ำและเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ความเข้มข้นตั้งแต่ 15-250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เจือจางสารละลาย folin-ciocalteu reagent (1:10 ด้วยน้ำ)

ทำการทดลองโดยเติม 200 ไมโครลิตร ของสารสกัดและ 200 ไมโครลิตร ของสารมาตรฐาน ferulic acid แต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดเติม 1.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย folin-ciocalteu reagent เขย่าให้เข้ากันรอให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์โดยทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 1.5 มิลลิลิตร ของ sodium carbonate (60 กรัม/ลิตร) ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที ดูดสารละลายในหลอดทดลอง 200 ไมโครลิตร ใส่ 96-well plate นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ บันทึกผลทำการทดลองของการทดสอบซ้ำ 4 ครั้ง ใช้น้ำและเมทานอลเป็นตัวอย่างควบคุม สร้างกราฟมาตรฐานของ ferulic acid และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดของสารสกัดนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน ferulic acid การหาปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดเทียบกับ ferulic acid (ferulic acid equivalents, FA) หน่วย มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัด คำนวณได้จากสมการ

$$C = c * V/m$$

เมื่อ C คือ ปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด (มิลลิกรัม/กรัม ของสารสกัด)

c คือ ความเข้มข้นของ ferulic acid ที่ได้จากกราฟของสารสกัด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

V คือ ปริมาตรของสารสกัด (มิลลิลิตร)

m คือ น้ำหนักของสารสกัด (กรัม)

(3) การทดสอบฤทธิ์ในการจับกับสารอนุมูลอิสระที่เสถียร (DPPH assay)

การทดสอบฤทธิ์ในการจับกับสารอนุมูลอิสระที่เสถียร $DPPH^{\cdot}$ สารใดก็ตามที่มีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ นี้ได้จะส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ลดลง วิธีการทดสอบดัดแปลงจาก Saânchez-Moreno et al. (1999) และ Li et al. (2005) โดยทำการละลายสารสกัดของพืชแต่ละชนิดด้วยเมทานอลและน้ำเพื่อให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 78.125 ถึง 5,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย DPPH ละลายในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ดูดสารสกัด 50 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลาย DPPH ปริมาตร 150 ไมโครลิตรลงใน 96-well plate ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ สำหรับสารต้านออกซิแดนท์ที่ใช้เปรียบเทียบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระคือ trolox และรายงานค่าเป็น IC_{50} ที่คำนวณได้จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟระหว่างความเข้มข้นและ % Scavenging

$$\% \text{ Scavenging} = \{\{(D-C)-[T-(C+B)]\}/(D-C)\} * 100$$

เมื่อ B คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ + เมทานอล

C คือ ค่าดูดกลืนแสงของเมทานอล

D คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

T คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH + สารสกัด

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

(4) การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด (Ferric reducing antioxidant power, FRAP assay)

วิธีการดัดแปลงจาก Benzie, Strain et al. (1996) ทำการละลายสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิด ด้วยเมทานอลและน้ำเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ได้ทดลองทำการศึกษาเบื้องต้นแล้วพบว่ามีผลรบกวนจากสีของสารสกัดน้อย เตรียมสารละลาย FRAP reagent [acetate buffer (300 มิลลิโมลาร์) : TPTZ (10 มิลลิโมลาร์ ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl) : $FeCl_3$ (20 มิลลิโมลาร์) ในอัตราส่วน 10 : 1 : 1] ทำการทดลองโดยดูดสารละลาย FRAP reagent 150 ไมโครลิตรและดูดสารสกัด 50 ไมโครลิตร แต่ละความเข้มข้นลงใน 96-well plate ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ แล้วบันทึกผลคำนวณดูความสัมพันธ์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด โดยนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดเทียบกับสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (ความเข้มข้นตั้งแต่ 15 ถึง 250 µM) ซึ่งจะได้หน่วยเป็น µM จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณให้ได้หน่วยเป็น µmole/mg extract

(5) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (TBARS Assay)

ทำการแยกสมองหนูซึ่งสมองหนูที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จากซากหนูเมาท์ ที่ถูกกำจัดซากในโครงการทดลองทางวิทยาศาสตร์การแพทย์อื่นๆ เลือกเฉพาะซากหนูที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมโดยนำส่วนหัวมาตัดแยกเอาเฉพาะเนื้อเยื่อสมองส่วนหน้า (cerebrum) ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดล้างด้วย ice cold normal saline ซับให้แห้งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง

บดสมองหนูเป็นเนื้อเดียวกันกับ 5 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer (pH 7.4) ด้วยเครื่องปั่นบด (homogenizer) วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี lowry ในการวัดความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดจะวัดปริมาณสารประกอบเชิงซ้อน thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) วิธีทดลองดัดแปลงจาก Mahakunakorn et al. (2004) และ Buege, Aust (1978) วิธีการทดลองทำการเติม 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายสมองหนูบด 0.9 มิลลิลิตร phosphate buffer (50 มิลลิโมลาร์, pH 7.4) 0.5 มิลลิลิตร $FeSO_4$ (0.01 มิลลิโมลาร์) 0.5 มิลลิลิตร ascobic acid (0.1 มิลลิโมลาร์) และเติม 0.1 มิลลิลิตร ของสารสกัดที่ต้องการทดสอบแต่ละความเข้มข้น (ความเข้มข้นตั้งแต่ 156 ถึง 5,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ลงไปในหลอดทดลองตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 45 นาที เติม 50 ไมโครลิตร butyllated hydroxytoluene (BHT) (0.1 มิลลิโมลาร์) เพื่อหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เติม 0.5 มิลลิลิตร EDTA (5 มิลลิโมลาร์) เพื่อลดผลรบกวนจากโลหะอื่นๆ และตกตะกอนโปรตีนด้วย 0.5 มิลลิลิตร 35 % perchoric acid นำไปปั่นเหวี่ยง 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสมาเติมด้วย 0.5 มิลลิลิตร 0.6% thiobarbituric acid ละลายในกรดอะซิติก จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำสารที่ได้มาวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บันทึกผลโดยใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 1 ถึง 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ใช้น้ำและเมทานอลเป็นตัวอย่างควบคุม คำนวณหาความสามารถของสารสกัดแต่ละชนิดและสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน trolox ในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (% inhibition) จากนั้นนำค่า % inhibition และความเข้มข้นของสารสกัดไปสร้างกราฟแล้วหาค่า IC_{50} (mg/ml) จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

วิธีคำนวณการหาความสามารถของสารสกัดแต่ละชนิดในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (% inhibition) คำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(OD_{Blank} - OD_{Test})/ OD_{Blank}]* 100$$

เมื่อ OD_{Blank} คือ ค่าดูดกลืนแสงของน้ำหรือเมทานอล

OD_{Test} คือ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัด ที่นำมาศึกษา

(6) การวิเคราะห์ด้วยสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลความแปรปรวนทางเดียว (analysis of variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS (statistical package for social science, SPSS/PC+) version 10.1 โดยใช้วิธี Duncan's เปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและการต้านกระบวนการออกซิเดชันของพืชแต่ละชนิด ใช้วิธี T-Test ในการเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลและเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน และใช้วิธี Pearson's correlation coefficient ในการหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและการต้านการออกซิเดชัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (กำหนดระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$)

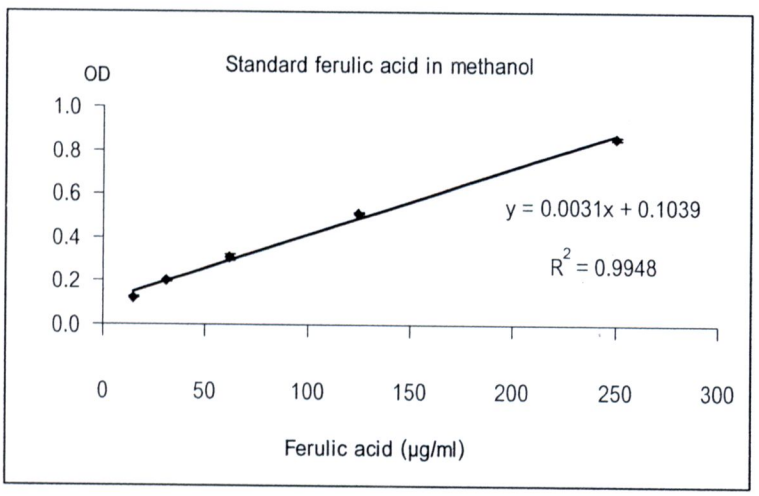
ผลการศึกษา

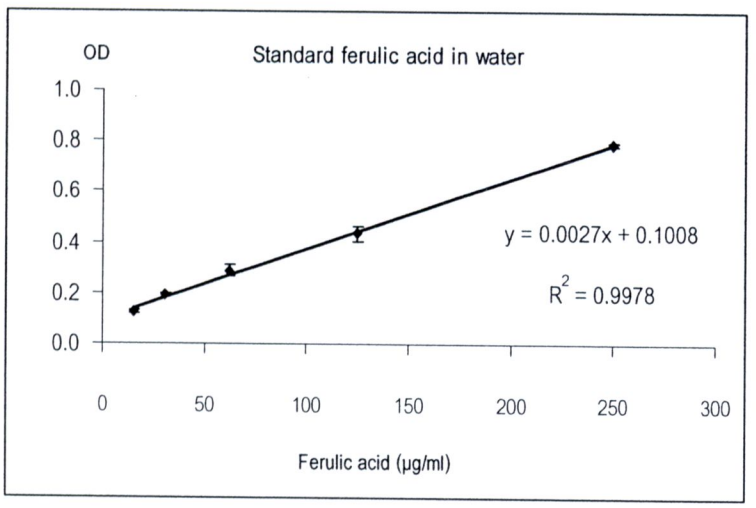
1. การหาค่าปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิก (Folin-Ciocalteu assay)

ผลการศึกษาในการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก (total phenolic contents, TPC) ในสารสกัดด้วยเมทธานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของ *Murdannia gigantea* [Mg (wl1), Mg (wl2), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm) และ *M. simplex* (Ms2 และ Ms1) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 13 และภาพที่ 1 ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้สารมาตรฐาน ferulic acid เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบและกราฟมาตรฐานของ ferulic acid แสดงในภาพที่ 20 พบว่าโดยทั่วไปแล้วสารสกัดจาก *M. gigantea* มี TPC มากที่สุดรองลงมาเป็น *M. simplex* และ *M. macrocarpa* ตามลำดับ (ตารางที่ 14 และ ภาพที่ 21-22) โดยพบว่า

- ส่วนเหนือดิน (ตารางที่ 14 และ ภาพที่ 22)
  - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีค่า TPC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีค่าตั้งแต่ 31.71 ± 0.90 ถึง 115.90 ± 1.23 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัดเทียบกับ Ferulic acid โดยสารสกัด Mg (ws) มีค่าสูงสุดรองลงมาเป็น Mg (vm) > Mg (pwm) > Ms2 > Mg (wl2) > Mg (wl1) > Ms1 > Mm ตามลำดับ
  - สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดมีค่า TPC แตกต่างกันและมีค่าตั้งแต่ 14.94 ± 0.45 ถึง 102.31 ± 0.53 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัดเทียบกับ ferulic acid โดยสารสกัด Mg (ws) มีค่าสูงสุดรองลงมาเป็น Mg (wl2) > Ms2 > Mg (pwm) > Mg (vm) > Mg (wl1) > Ms1 > Mm ตามลำดับ

- ส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 14 และ ภาพที่ 22)
  - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีค่า TPC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีค่าตั้งแต่ 57.75 ± 2.69 ถึง 145.17 ± 2.97 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัดเทียบกับ ferulic acid โดยสารสกัด Mg (wl1) ค่าสูงสุดรองลงมาเป็น Mg (vm) > Mg (wl2) > Mg (pwm) > Mg (ws) > Ms2 > Ms1 > Mm ตามลำดับ
  - สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดมีค่า TPC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีค่าตั้งแต่ 5.46 ± 0.30 ถึง 66.44 ± 3.43 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัดเทียบกับ ferulic acid โดยสารสกัด Mg (wl1) มีค่าสูงสุดรองลงมาเป็น Mg (wl2) > Ms1 > Mg (pwm) > Ms2 > Mg (ws) > Mg (vm) > Mm ตามลำดับ

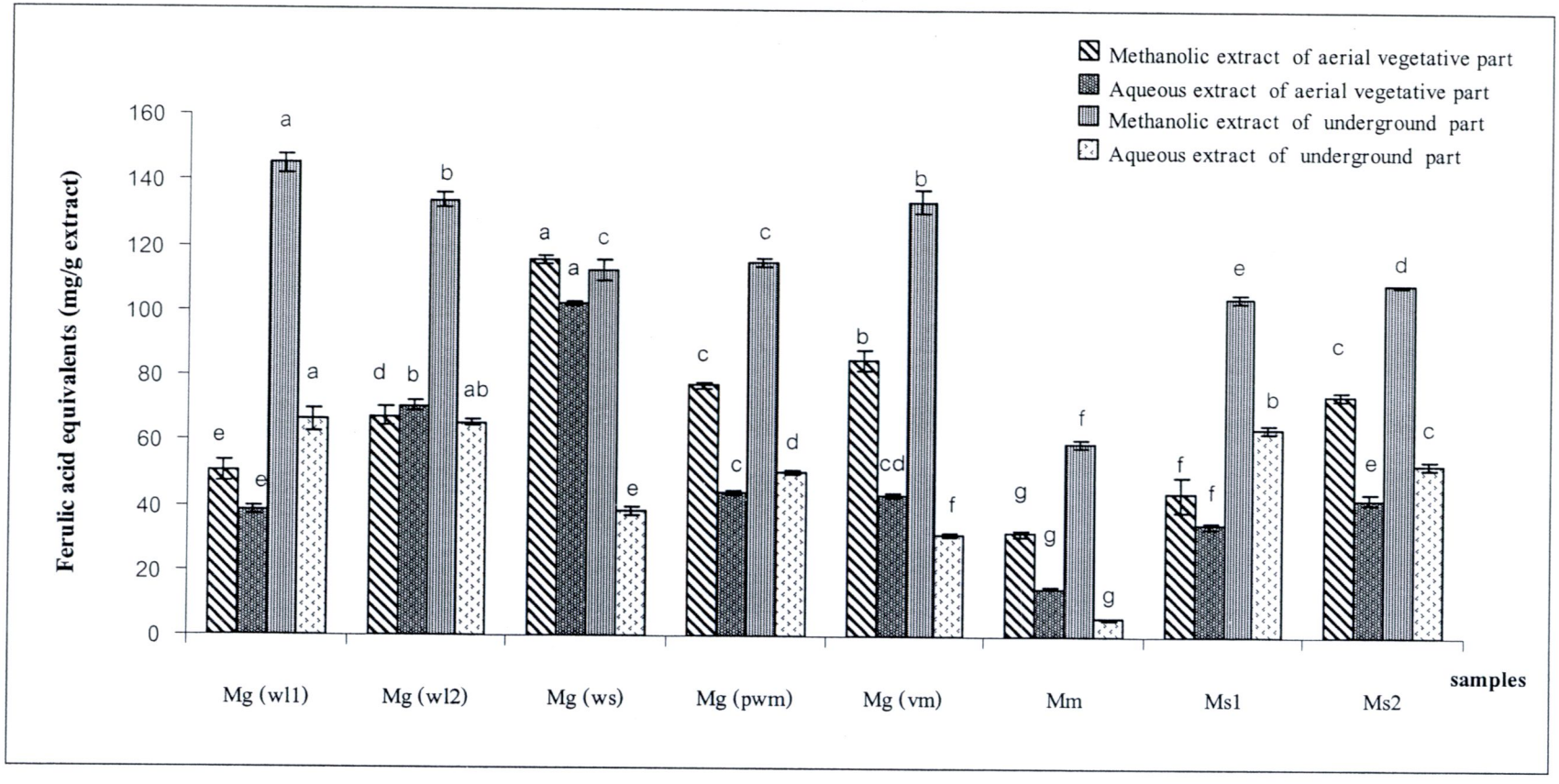




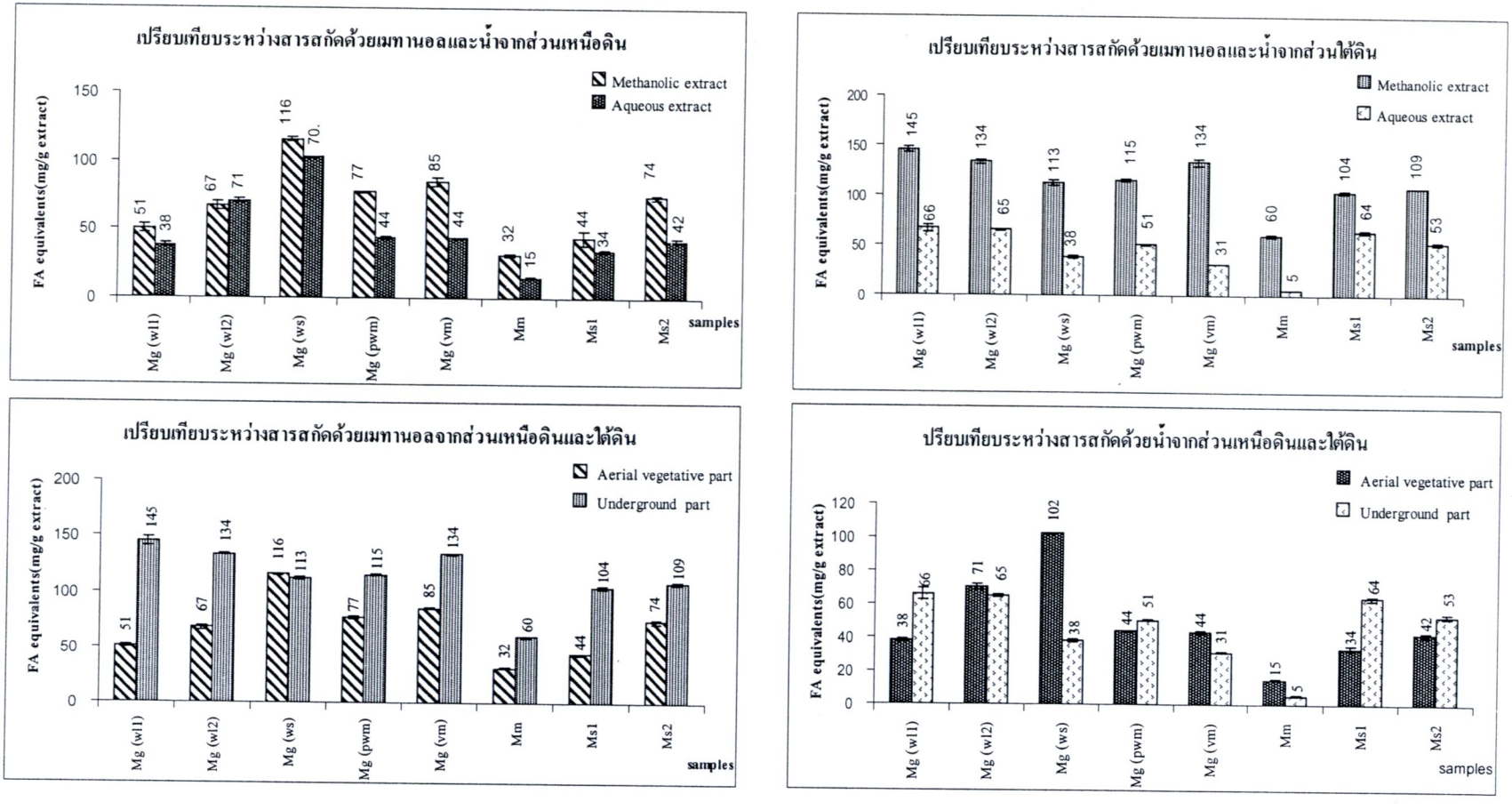
ภาพที่ 20 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของ ferulic acid (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของพืชแต่ละชนิดโดยแสดงค่า Mean ± SD (n = 4)

Samples	Aerial vegetative part		Underground part	
	Methanolic extract	**Aqueous extract**	**Methanolic extract**	**Aqueous extract**
Mg (wl1)	50.52 ± 3.34	38.28 ± 1.20	145.17 ± 2.97	66.44 ± 3.43
Mg (wl2)	67.44 ± 2.97	70.64 ± 1.66	133.90 ± 2.13	65.40 ± 0.92
Mg (ws)	115.90 ± 1.23	102.31 ± 0.53	112.75 ± 3.05	38.21 ± 1.18
Mg (pwm)	77.17 ± 0.78	44.00 ± 0.87	115.15 ± 1.46	50.81 ± 0.63
Mg (vm)	85.09 ± 3.34	43.69 ± 0.70	134.01 ± 3.31	31.33 ± 0.42
Mm	31.71 ± 0.90	14.94 ± 0.45	59.52 ± 1.29	5.46 ± 0.30
Ms1	44.00 ± 5.32	34.25 ± 1.05	104.23 ± 1.29	63.94 ± 1.10
Ms2	74.11 ± 1.30	53.17 ± 1.60	108.51 ± 0.57	42.27 ± 1.20



ภาพที่ 21 แสดงค่า Mean ± SD (n = 4) เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของ *Murdannia Gigantean* [ดอกขาวต้น ขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) และตัวอักษรบนภาพที่แตกต่างกันหมายความว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เปรียบเทียบในแต่ละตัวทำละลายที่ใช้สกัด



ภาพที่ 22 เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกระหว่างการสกัด *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], M. *macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean ± SD (n = 4) และ * หมายความว่า มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

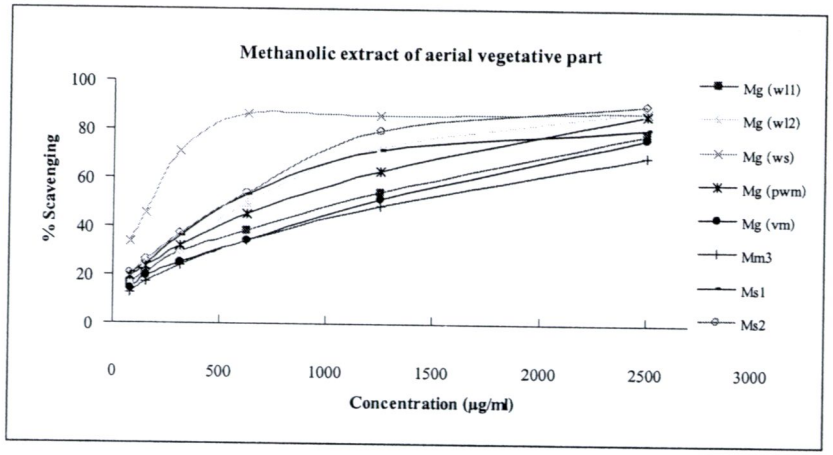
2. การทดสอบฤทธิ์ในการจับกับสารอนุมูลอิสระที่เสถียร (DPPH assay)

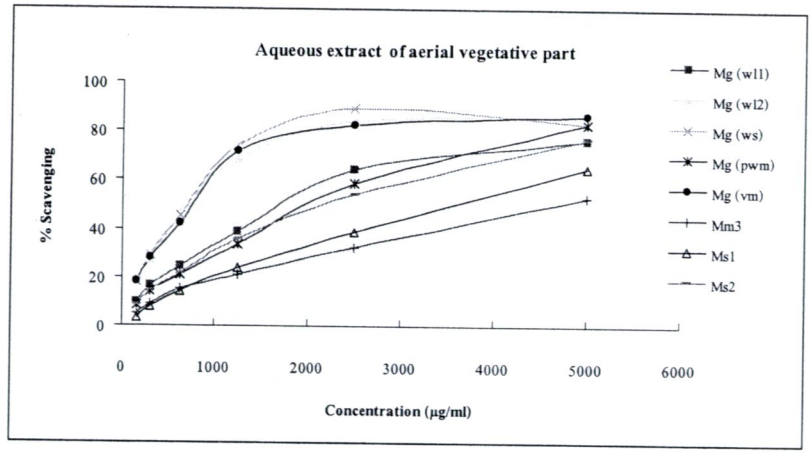
การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของพืชทั้ง 4 ชนิด และสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน คือ trolox โดยทำการทดสอบกับอนุมูลอิสระที่เสถียรคือ DPPH$^{\cdot}$ ซึ่งเป็นวิธีที่วัดความสามารถของสารทดสอบในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH$^{\cdot}$ ให้กลายเป็นสารที่เสถียรและไม่เป็นอนุมูลอิสระต่อไป กล่าวคืออนุมูลอิสระ DPPH$^{\cdot}$ เมื่อละลายในเมทานอลจะมีสีม่วงเข้ม แต่เมื่อได้รับอิเล็กตรอนแล้วจะกลายเป็นสีเหลืองอ่อนทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลง จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดด้วยเมทธานอลและน้ำของพืชดังกล่าวทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH$^{\cdot}$ เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่าสามารถลดค่าการดูดกลืนแสงลงได้ตามความเข้มข้น (ภาพที่ 23) และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวนค่า IC_{50} (ตารางที่ 15) พบว่าโดยทั่วไปแล้วสารสกัดจาก *M. gigantea* มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH$^{\cdot}$ ได้ดีสุดรองลงมาเป็น *M. simplex* และ *M. macrocarpa* ตามลำดับ (ภาพที่ 24) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) ส่วน trolox มีค่า IC_{50} = 18 ± 0.27 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH$^{\cdot}$ ของพืชดังกล่าวพบว่า

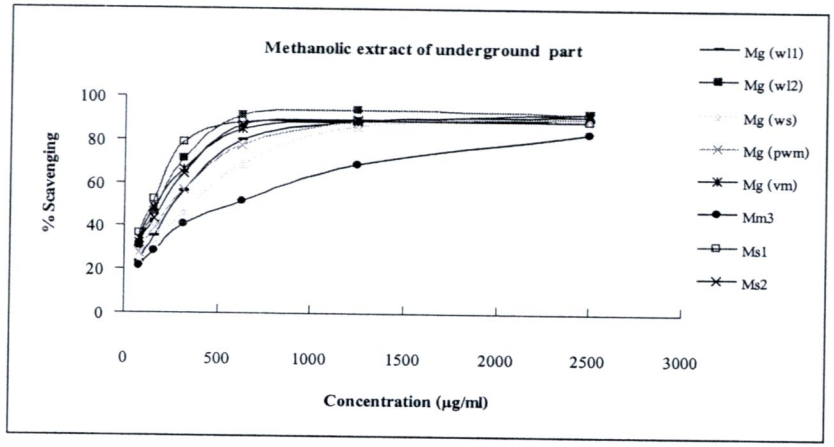
- ส่วนเหนือดิน (ตารางที่ 15 และ ภาพที่ 25)
  - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH$^{\cdot}$ แตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ 188.96 ± 8.78 ถึง 1068.40 ± 46.36 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดย Mg (ws) มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ > Mg (pwm) > Mg (vm) > Mg (wl2) > Mg (wl1) > Ms2 > Ms1 > Mm ตามลำดับ
  - สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดมีค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH$^{\cdot}$ แตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ 710.49 ± 12.77 ถึง 3623.36 ± 59.39 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดย Mg (ws) มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ > Mg (wl2) > Mg (vm) > Mg (wl1) > Mg (pwm) > Ms2 > Ms1 > Mm ตามลำดับ
- ส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 15 และ ภาพที่ 25)
  - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH$^{\cdot}$ แตกต่างกันซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ 149.72 ± 10.04 ถึง 827.2 ± 17.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยสารสกัด Ms1 มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ > Mg (vm) > Mg (wl2) > Ms2 > Mg (pwm) > Mg (wl1) > Mg (ws) > Mm ตามลำดับ
  - สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดมีค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH$^{\cdot}$ แตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ 647.34 ± 28.86 ถึง 1939.23 ± 79.73 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยสารสกัด Ms1 มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ > Mg (vm) > Mg (wl1) > Ms2 > Mg (pwm) > Mg (wl2) > Mg (ws) > Mm ตามลำดับ

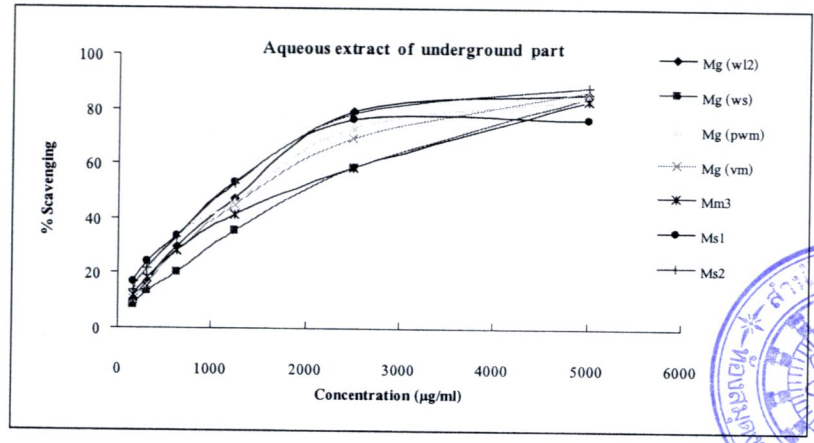
ตารางที่ 15 แสดงค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH˙ ของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและใต้ดินในพืชแต่ละชนิด โดยแสดงค่า Mean ± SD (n = 4)

Samples	Aerial vegetative part		Underground part	
	Methanolic extract	**Aqueous extract**	**Methanolic extract**	**Aqueous extract**
Mg (wl1)	706.71 ± 33.06	1608.67 ± 84.12	306.35 ± 2.13	980.51 ± 53.40
Mg (wl2)	679.19 ± 5.89	775.27 ± 44.80	214.82 ± 16.3	1151.05 ± 91.01
Mg (ws)	188.96 ± 8.78	710.49 ± 12.77	399.93 ± 26.78	1614.93 ± 22.18
Mg (pwm)	543.40 ± 9.66	1863.73 ± 64.81	282.97 ± 20.25	1095.99 ± 23.89
Mg (vm)	606.30 ± 22.36	796.33 ± 29.26	181.82 ± 4.57	703.92 ± 38.25
Mm	1068.40 ± 46.36	3623.36 ± 59.39	483.59 ± 49.8	1939.23 ± 79.73
Ms1	1024.56 ± 26.1	3044.26 ± 58.55	149.72 ± 10.04	647.34 ± 28.86
Ms2	842.00 ± 27.24	2143.51 ± 50.27	219.85 ± 8.87	1009.69 ± 30.90

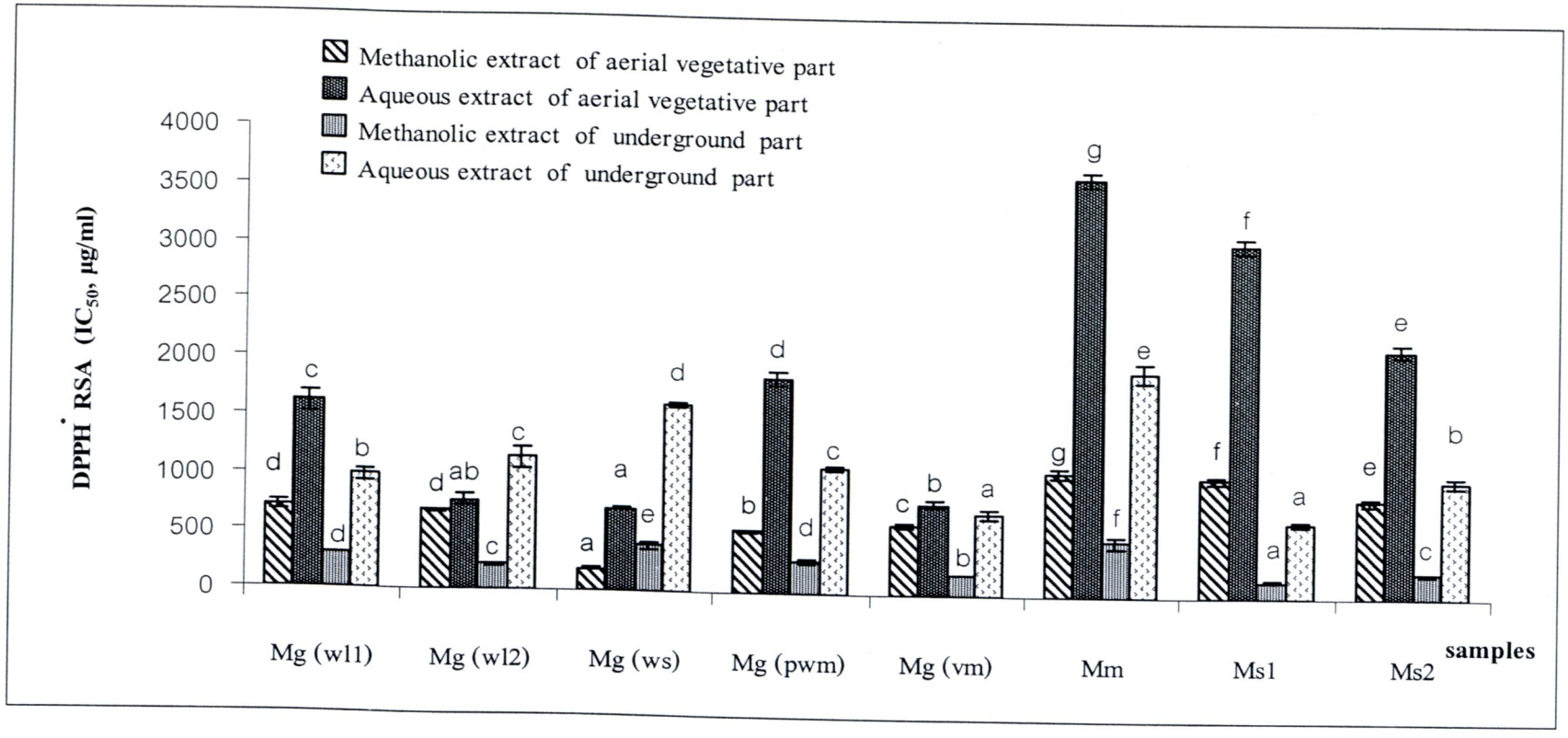




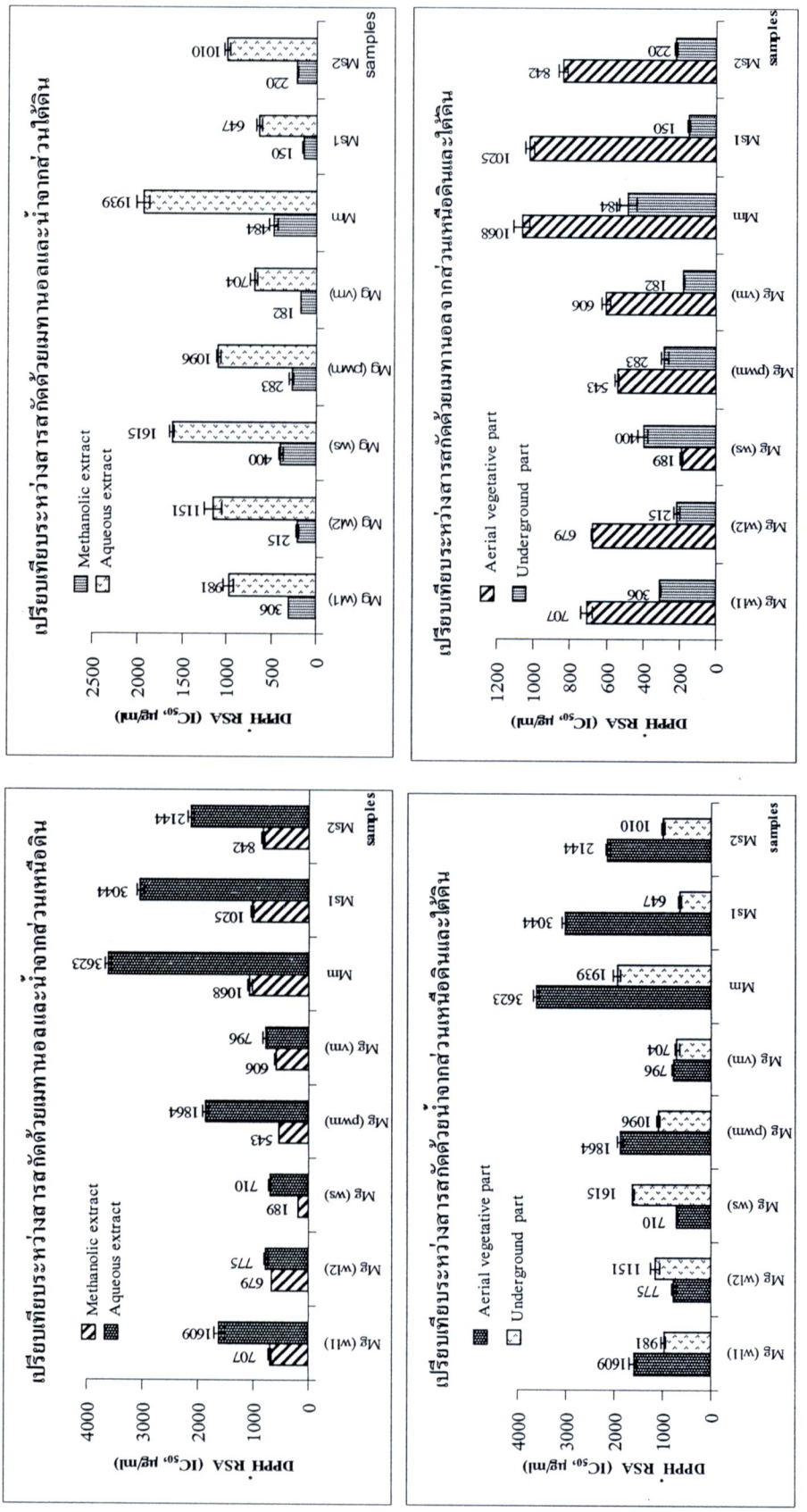




ภาพที่ 23 แสดงค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH˙ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (% scavenging) ของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและใต้ดินในพืช *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2)



ภาพที่ 24 แสดงค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH˙ ของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและใต้ดินใน *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean ± SD (n = 4) และตัวอักษรบนภาพที่แตกต่างกันหมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เปรียบเทียบในแต่ละตัวทำละลายที่ใช้สกัด

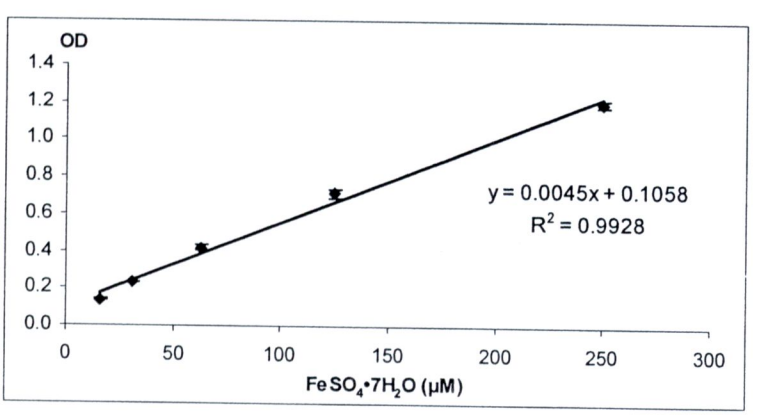


ภาพที่ 25 เปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH˙ ของสารสกัด *Murdannia bracteata* (Mb), *M. gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง : Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) Mean ± SD (n = 4)

3. การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด (FRAP assay)

วิธี FRAP assay เป็นการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด โดยดูความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนของสารทดสอบ (reducing activity) สำหรับการทดลองครั้งนี้ใช้สารประกอบเชิงซ้อน Fe^{III}-TPTZ เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชันจะเปลี่ยนเป็น Fe^{II}-TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงินเข้มและมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดเทียบกับสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (ภาพที่ 26) จากผลการทดลองสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำทั้งจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของพืชทั้ง 4 ชนิด สามารถรีดิวซ์โลหะเหล็ก Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} โดยพบว่า

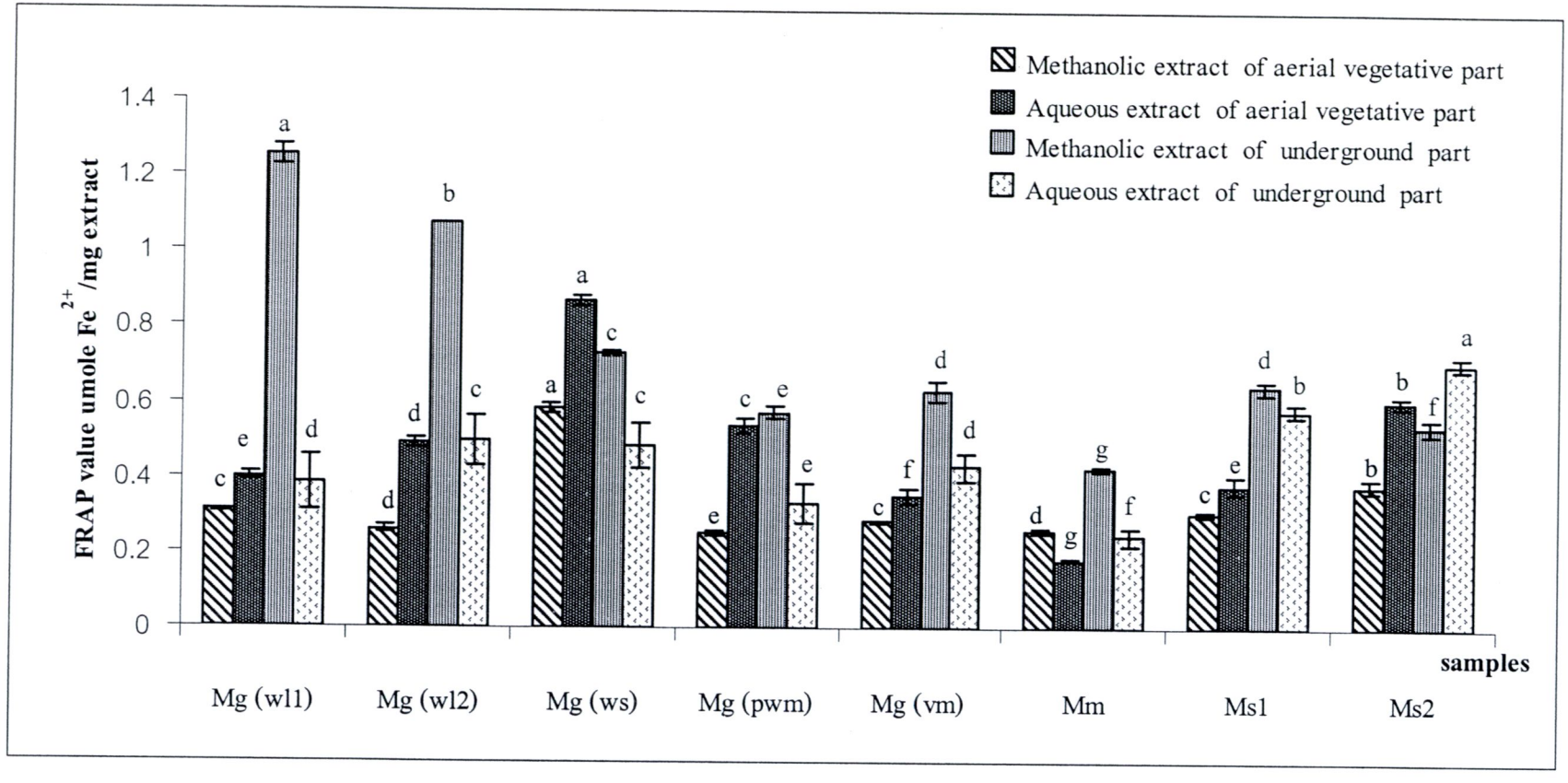
- ส่วนเหนือดิน (ตารางที่ 16 และ ภาพที่ 27 - 28)
  - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีค่าความเป็น reducing agent แตกต่างกัน ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0.253 ± 0.006 ถึง 0.752 ± 0.016 µmole Fe^{2+}/mg extract โดย Mg (ws) > Ms2 > Mg (wl1) > Ms1 > Mg (vm) > Mg (wl2) > Mm > Mg (pwm) ตามลำดับ
  - สารสกัดด้วยน้ำของของพืชแต่ละชนิดมีค่าความเป็น reducing agent แตกต่างกัน ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0.181 ± 0.005 ถึง 0.871 ± 0.012 µmole Fe^{2+}/mg extract โดย Mg (ws) > Ms2 > Mg (pwm) > Mg (wl2) > Mg (wl1) > Ms1 > Mg (vm) > Mm ตามลำดับ
- ส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 16 และ ภาพที่ 27 - 28)
  - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีค่าความเป็น reducing agent แตกต่างกัน ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0.284 ± 0.004 ถึง 1.253 ± 0.026 µmole Fe^{2+}/mg extract โดย Mg (wl1) > Mg (wl2) > Mg (ws) > Ms1 > Mg (vm) > Mg (pwm) > Ms2 > Mm ตามลำดับ
  - สารสกัดด้วยน้ำพืชแต่ละชนิดมีค่าความเป็น reducing agent แตกต่างกัน ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0.243 ± 0.025 ถึง 0.705 ± 0.015 µmole Fe^{2+}/mg extract โดย Ms2 > Ms1 > Mg (wl2) > Mg (ws) > Mg (vm) > Mg (wl1) > Mg (pwm) > Mm ตามลำดับ



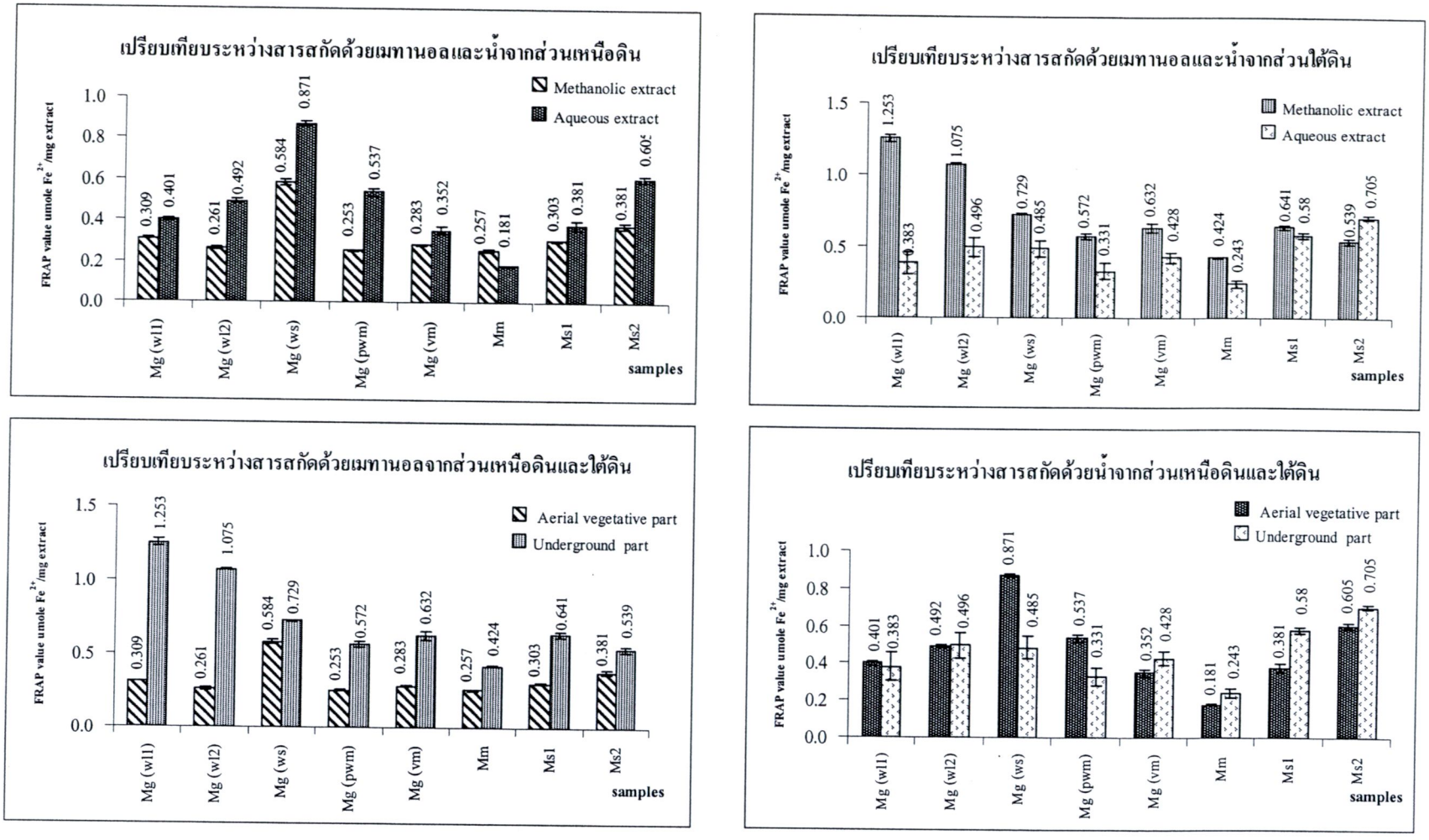
ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) สำหรับหาค่า FRAP value โดยใช้ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ เป็นสารมาตรฐาน ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ตารางที่ 16 แสดงค่า FRAP value (Fe^{2+} µmole/mg extract) ของสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินในพืชแต่ละชนิด โดยแสดงค่า Mean ± SD (n = 4)

Samples	Aerial vegetative part		Underground part	
	Methanolic extract	**Aqueous extract**	**Methanolic extract**	**Aqueous extract**
Mg (wl1)	0.309 ± 0.002	0.401 ± 0.010	1.253 ± 0.026	0.383 ± 0.073
Mg (wl2)	0.261 ± 0.009	0.492 ± 0.012	1.075 ± 0.002	0.496 ± 0.067
Mg (ws)	0.584 ± 0.014	0.871 ± 0.012	0.729 ± 0.005	0.485 ± 0.060
Mg (pwm)	0.253 ± 0.006	0.537 ± 0.020	0.572 ± 0.017	0.331 ± 0.052
Mg (vm)	0.283 ± 0.005	0.352 ± 0.018	0.632 ± 0.028	0.428 ± 0.036
Mm	0.257 ± 0.257	0.181 ± 0.005	0.424 ± 0.004	0.243 ± 0.025
Ms1	0.303 ± 0.303	0.381 ± 0.023	0.641 ± 0.017	0.580 ± 0.019
Ms2	0.381 ± 0.381	0.605 ± 0.014	0.539 ± 0.020	0.705 ± 0.015



ภาพที่ 27 แสดงค่า FRAP value (Fe^{2+} µmole/mg extract) ของสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินในพืช *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean ± SD (n = 4) และตัวอักษรบนภาพที่แตกต่างกันหมายความว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เปรียบเทียบในแต่ละตัวทำละลายที่ใช้สกัด



ภาพที่ 28 เปรียบเทียบค่า FRAP value (Fe^{2+} µmole/mg extract) ของสารสกัด *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean ± SD (n = 4)

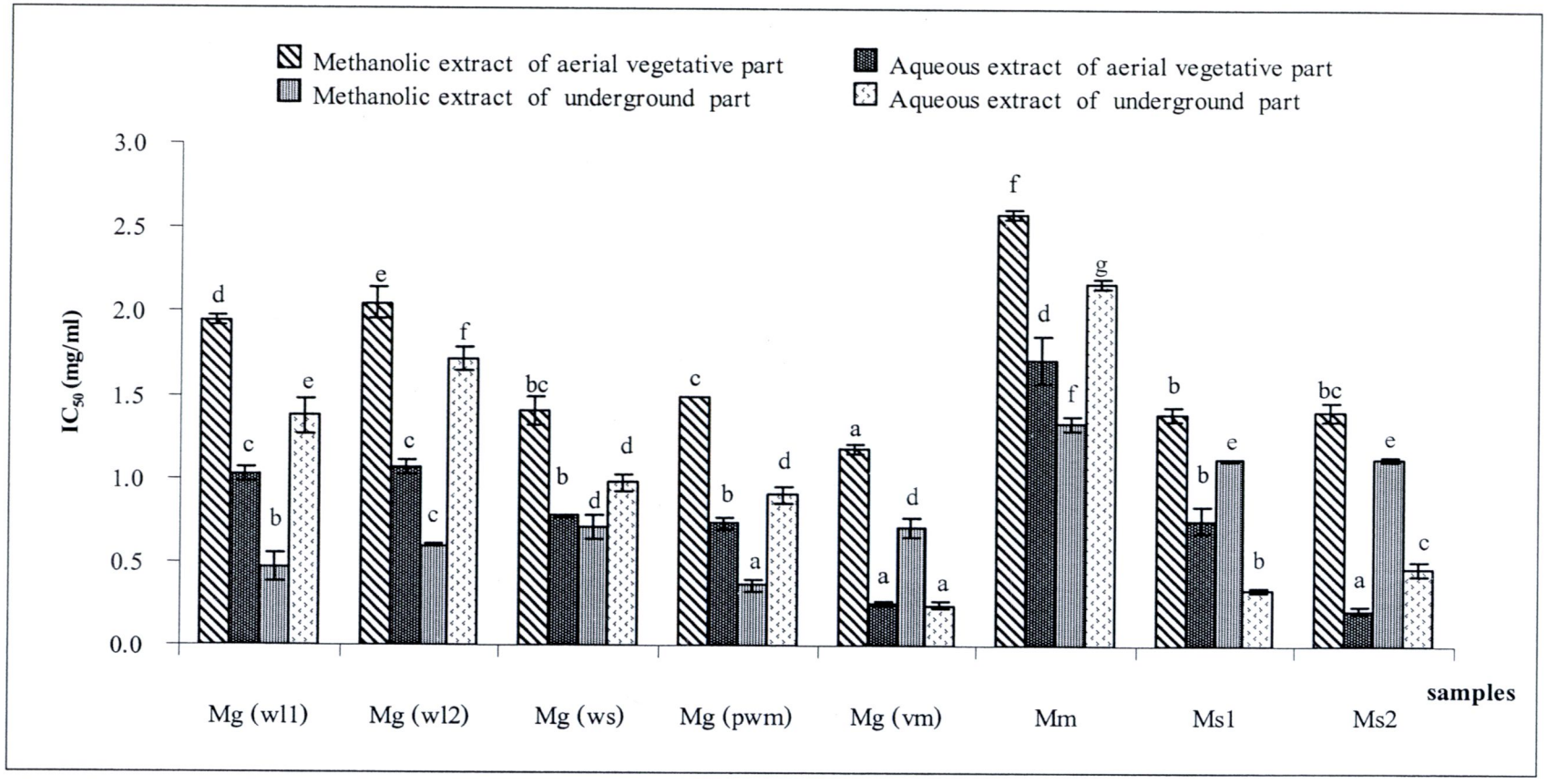
4. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน ด้วยวิธี TBARS

วิธี TBARS เป็นการวัดปริมาณ malondialdehye (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน การทดลองครั้งนี้ใช้ Fe^{2+}-ascorbate เหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนู ซึ่งสาร MDA ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ TBA ที่อุณหภูมิสูงแล้วให้สาร TBARS ที่มีสีชมพู ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสามารถยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้จะทำให้เกิด MDA ลดลงและพบค่าดูดกลืนแสงลดลง จากการทดลองพบว่าสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน trolox สามารถยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันตามความเข้มข้นมีค่า IC_{50} 0.287 ± 0.022 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารสกัดพืชแต่ละชนิด พบว่า

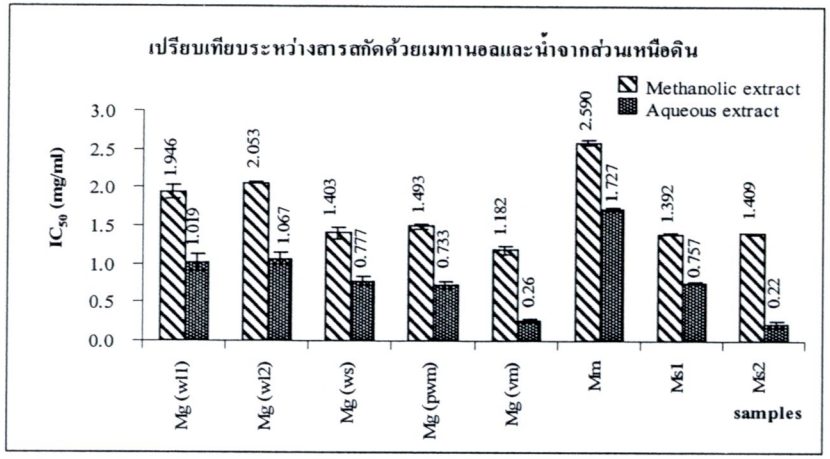
- ส่วนเหนือดิน (ตารางที่ 17 และ ภาพที่ 29-30)
  - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดสามารถยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันแตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ 1.182 ± 0.026 ถึง 2.590 ± 0.026 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย Mg (vm) > Ms1 > Mg (ws) > Ms2 > Mg (pwm) > Mg (wl1) > Mg (wl2) > Mm ตามลำดับ
  - สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดสามารถยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันแตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ 0.22 ± 0.026 ถึง 2.861 ± 0.08 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย Mm > Mg (wl2) > Mg (wl1) > Mg (ws) > Ms1 > Mg (pwm) > Mg (vm) > Ms2 ตามลำดับ
- ส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 17 และ ภาพที่ 29-30)
  - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดสามารถยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันแตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ 0.363 ± 0.037 ถึง 1.338 ± 0.039 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย Mg (pwm) > Mg (wl1) > Mg (wl2) > Mg (vm) > Mg (ws) > Ms1 > Ms2 > Mm ตามลำดับ
  - สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดสามารถยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันแตกต่างกันและมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ 0.243 ± 0.021 ถึง 2.177 ± 0.023 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย Mg (vm) > Ms1 > Ms2 > Mg (pwm) > Mg (ws) > Mg (wl1) > Mg (wl2) > Mm ตามลำดับ

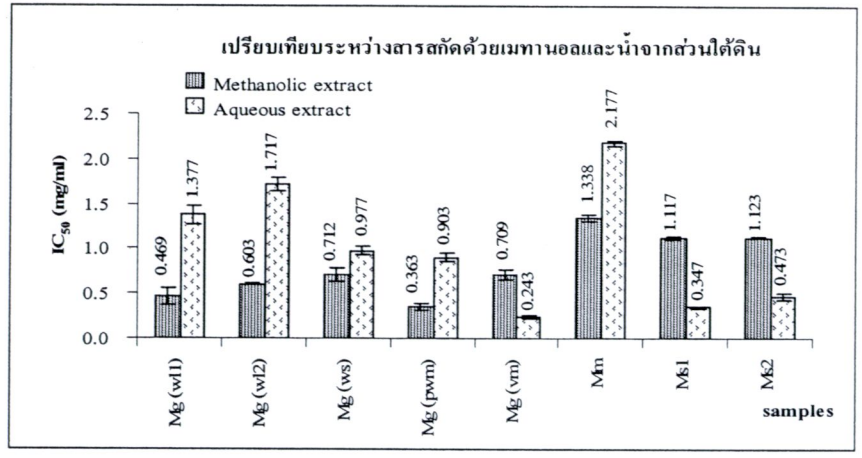
ตารางที่ 17 แสดงความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนู (IC_{50}, มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินในพืชแต่ละชนิด โดยแสดงค่า Mean ± SD (n = 3)

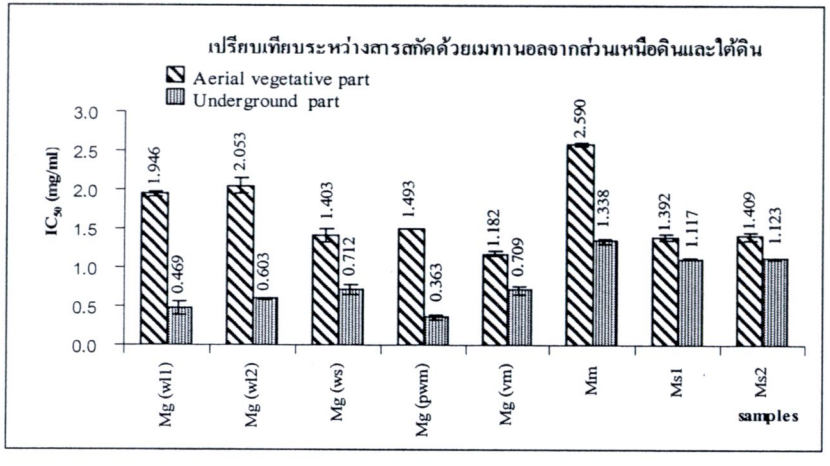
Samples	Aerial vegetative part		Underground part	
	Methanolic extract	**Aqueous extract**	**Methanolic extract**	**Aqueous extract**
Mg (wl1)	1.946 ± 0.031	1.019 ± 0.044	0.469 ± 0.087	1.377 ± 0.105
Mg (wl2)	2.053 ± 0.093	1.067 ± 0.040	0.603 ± 0.012	1.717 ± 0.074
Mg (ws)	1.403 ± 0.087	0.777 ± 0.006	0.712 ± 0.069	0.977 ± 0.051
Mg (pwm)	1.493 ± 0.002	0.733 ± 0.035	0.363 ± 0.037	0.903 ± 0.049
Mg (vm)	1.182 ± 0.026	0.260 ± 0.017	0.709 ± 0.054	0.243 ± 0.021
Mm	2.590 ± 0.026	1.727 ± 0.142	1.338 ± 0.039	2.177 ± 0.023
Ms1	1.392 ± 0.038	0.757 ± 0.081	1.117 ± 0.012	0.347 ± 0.015
Ms2	1.409 ± 0.053	0.220 ± 0.026	1.123 ± 0.011	0.473 ± 0.040

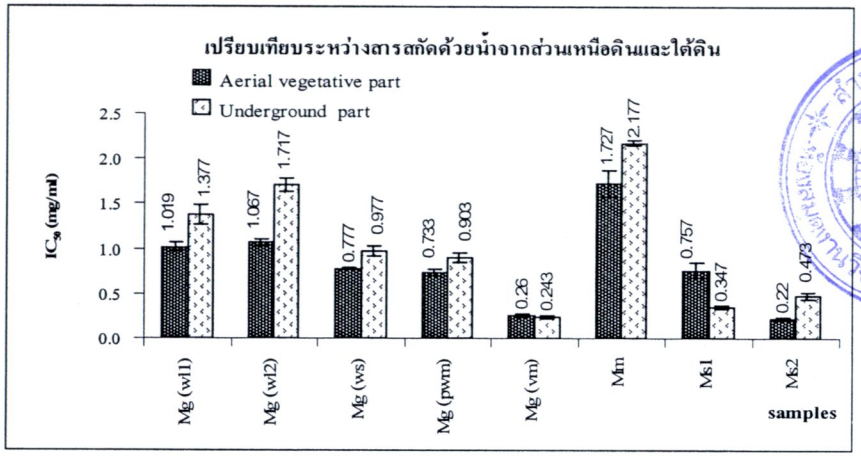


ภาพที่ 29 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนู (IC_{50}, มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของ *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean ± SD (n = 3) และตัวอักษรบนภาพที่แตกต่างกันหมายความว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เปรียบเทียบในแต่ละตัวทำละลายที่ใช้สกัด









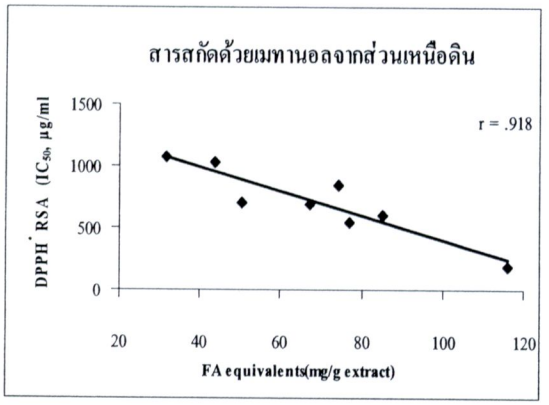
ภาพที่ 30 แสดงค่า IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนู เปรียบเทียบระหว่างสารสกัด *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean ± SD (n = 3)

5. ผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

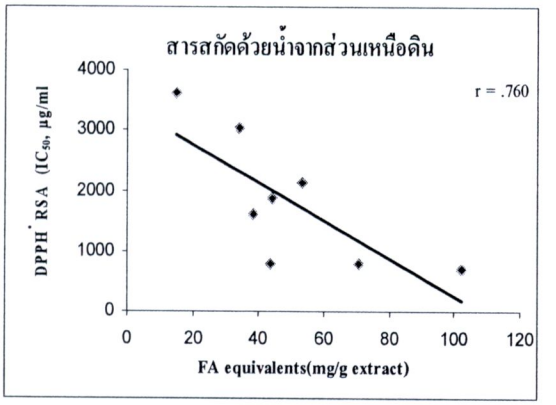
การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกกับค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันเท่ากับ 0.918 (ภาพที่ 31 ก) สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันเท่ากับ 0.760 (ภาพที่ 31 ข) สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันเท่ากับ 0.574 (ภาพที่ 32 ก) สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนใต้ดินสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันเท่ากับ 0.644 (ภาพที่ 32 ข) ซึ่งมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) คือถ้ามีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกสูงจะมีค่า IC_{50} ในการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ ต่ำ ซึ่งค่า IC_{50}ที่ต่ำหมายความว่ามีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ ที่ดี

การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และค่าความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์ทดสอบด้วยวิธี FRAP พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินและสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) และค่ามีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันเท่ากับ 0.914, 0.756 และ 0.712 ตามลำดับ (ภาพที่ 31 ง และ ภาพที่ 32 ค) คือถ้าตัวอย่างที่ใช้ศึกษามีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกสูง จะพบว่ามีค่าความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์สูงด้วยส่วนสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนใต้ดิน พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันเท่ากับ 0.414 ตามลำดับ (ภาพที่ 31 ค และ ภาพที่ 32 ง)

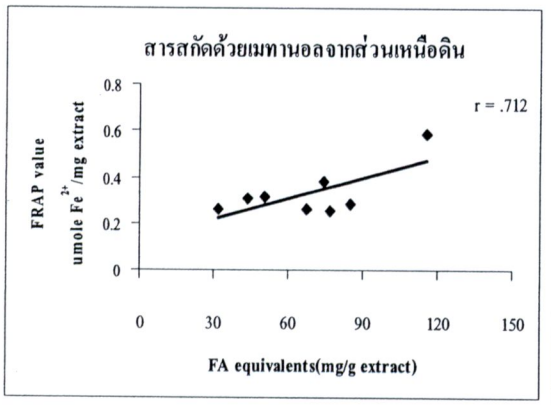
การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และค่าความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันทดสอบด้วยวิธี TBARS พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันเท่ากับ 0.643 และ 0.788 (ภาพที่ 32 จ) คือถ้ามีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกสูงจะมีค่า IC_{50} ของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันต่ำ ซึ่งค่า IC_{50} ที่ต่ำหมายความว่ามีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่ดี ส่วนสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) (ภาพที่ 31 จ-ฉ และ 32 ฉ)



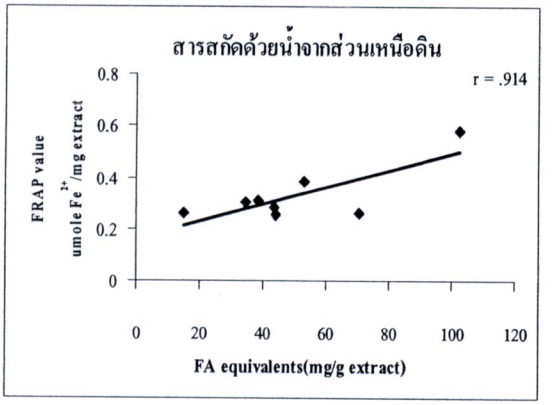
ก



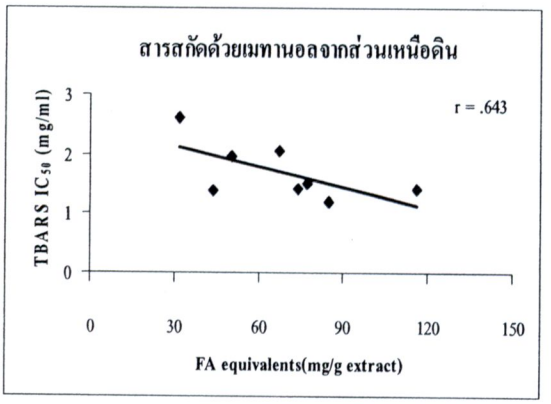
ข



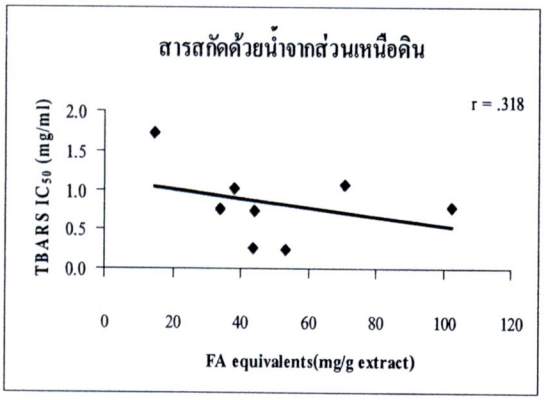
ค



ง

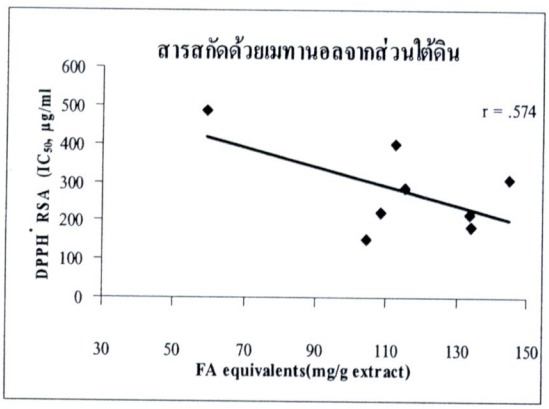


จ

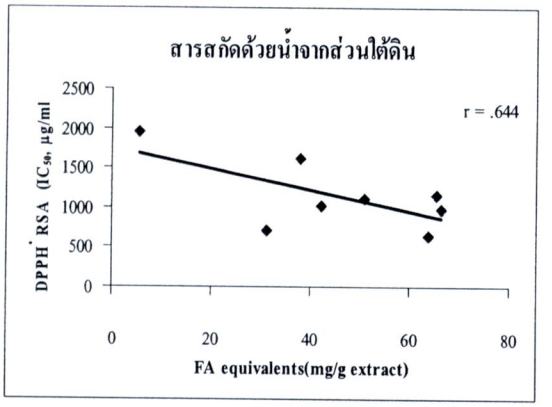


ฉ

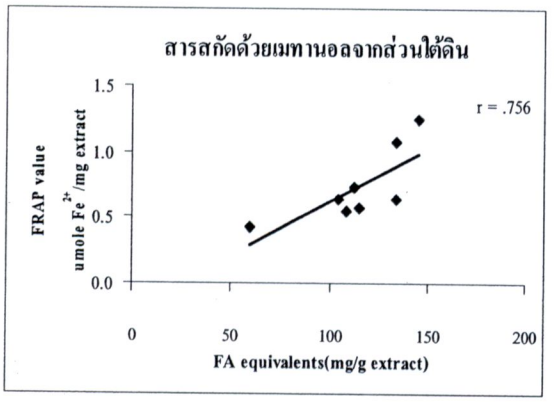
ภาพที่ 31 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง 2 ตัวแปร ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (**ก.** และ **ข.**), FRAP (**ค.** และ **ง.**) และ TBARS (**จ.** และ **ฉ.**) จากส่วนเหนือดินเมื่อทำการสกัดด้วยเมทานอล (**ก.**, **ค.** และ **จ.**) และ น้ำ (**ข.**, **ง.** และ **ฉ.**)



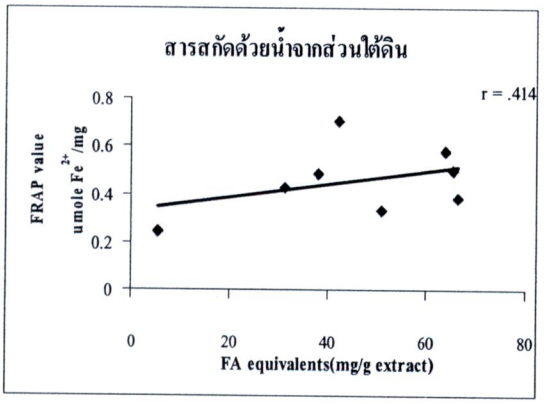
ก



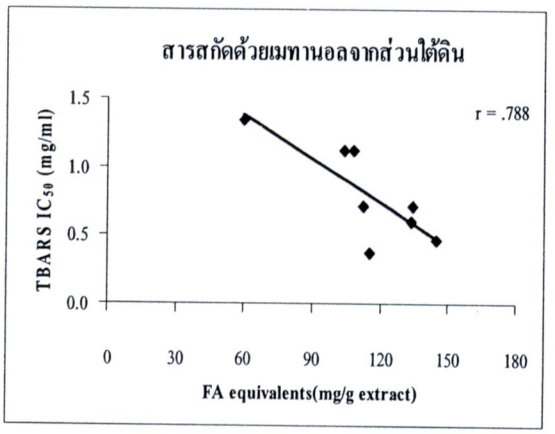
ข



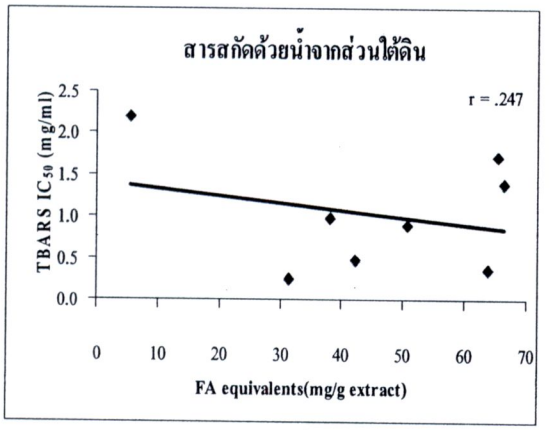
ค



ง



จ



ฉ

ภาพที่ 32 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง 2 ตัวแปร ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (**ก.** และ **ข.**), FRAP (**ค.** และ **ง.**) และ TBARS (**จ.** และ **ฉ.**) จากส่วนใต้ดินเมื่อทำการสกัดด้วยเมทานอล (**ก.**, **ค.** และ **จ.**) และ น้ำ (**ข.**, **ง.** และ **ฉ.**)

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินระหว่าง *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms2 และ Ms1) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 13 โดยศึกษาในแบบจำลองในหลอดทดลอง (*In Vitro*) ซึ่งกลไกของแบบจำลองครอบคลุมในการวิเคราะห์ทั้งในแบบการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transfer, SET) ด้วย Folin-Ciocalteu assay, DPPH assay และ FRAP assay และการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (hydrogen atom transfer, HAT) ด้วย TBARS assay โดยใช้ค่า IC_{50} ในการประเมินผลของสารสกัด

1. ผลการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างชนิด

วิธี Folin-Ciocalteu จากการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก (total phenolic contents, TPC) ระหว่างพืชแต่ละชนิด (ตารางที่ 14 และภาพที่ 21) ในภาพรวมแล้วสารสกัด *M. gigantea* จะมีค่า TPC สูงที่สุดรองลงมา คือ *M. simplex* และ *M. macrocarpa* ตามลำดับ ซึ่งมีรายงานการศึกษาว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการศึกษานั้นมีผลต่อค่า TPC จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลมีค่า TPC มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 22) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของพืชสกุลเดียวกันในก่อนหน้านี้ (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2550; 2551) อาจเป็นไปได้ว่าความมีขั้วของตัวทำละลายทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันทำให้ได้กลุ่มสารที่ละลายออกมานั้นต่างกันด้วย (Choi et al, 2007) เช่น สารจำพวก flavonoids ที่มี catechol เป็นองค์ประกอบ stilbenes และ tannins ซึ่งโครงสร้างหลักประกอบด้วย aromatic ring แทนที่ด้วย hydroxy group จะละลายในตัวทำละลายจำพวก alcohol ได้ดี (Pietta, 2000) เป็นต้น

เมื่อเปรียบเทียบส่วนของพืชที่นำมาใช้ศึกษาพบว่าในสารสกัดด้วยเมทานอลส่วนใต้ดินจะมีค่า TPC มากกว่าส่วนเหนือดินมีเพียงบางตัวอย่างของ *M. gigantea* เท่านั้นที่พบว่าส่วนเหนือดินมีค่า TPC มากกว่า ได้แก่ Mg (ws) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำพบว่าส่วนใต้ดินมีค่า TPC มากว่าส่วนเหนือดินพบในบางตัวอย่างของ *M. gigantea* ได้แก่ Mg (wl1), Mg (wpm) และ *M. simplex* ส่วน *M. macrocarpa* และบางตัวอย่างของ *M. gigantea* ได้แก่ Mg (wl2), Mg (ws) และ Mg (vm) พบว่าส่วนเหนือดินจะมีค่า TPC มากกว่าส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 14 และภาพที่ 22) ซึ่งมีรายงานการศึกษาว่าพืชแต่ละชนิดจะมีค่า TPC ที่สกัดได้จากส่วนต่างๆ แตกต่างกัน เช่น เหียง จะพบค่า TPC ในสารสกัดจากลำต้นมากกว่าสารสกัดที่ได้จากส่วนใบ ส่วนเอนอ้าและแมงลักคารากจะมีมากกว่าลำต้น เป็นต้น (ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์, 2549) แสดงให้เห็นว่าพืชแต่ละชนิดจะมีการสะสมสารกลุ่มฟีนอลิกในส่วนต่างๆ เช่น ราก ลำต้น ใบ แตกต่างกันไป

วิธี DPPH จากการประเมินค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ ($DPPH^{\cdot}$ radical scavenging activity, $DPPH^{\cdot}$ RSA) พบว่า ในภาพรวมแล้วสารสกัดจาก *M. gigantea* โดยเฉพาะ Mg (ws) มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ ได้ดีที่สุดรองลงมาเป็น *M. simplex* และ *M. macrocarpa* ตามลำดับ (ตารางที่ 15 และภาพที่ 24) และเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ Mg (ws) มีค่า $DPPH^{\cdot}$ RSA ต่ำกว่าประมาณ 10 เท่า อาจเนื่องมาจากว่าการศึกษาครั้งนี้ใช้สารสกัดหยาบซึ่งยัง

ไม่ทราบปริมาณสารที่ออกฤทธิ์แน่นอน แต่เมื่อเทียบกับรายงานผลการศึกษาของพืชต่างชนิดในสกุลเดียวกันในก่อนหน้านี้ พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีค่า DPPH˙ RSA ดีกว่าประมาณ 1.4, 2.3 และ 4.5 เท่าของ *M. bracteata*, *M. loriformis* และ *M. nudiflora* ตามลำดับ (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2550; 2551) ซึ่งมีรายงานการศึกษาว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการศึกษานั้นมีผลต่อค่า DPPH˙ RSA (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2550; 2551, Othman, et al, 2007) และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลมีค่า DPPH˙ RSA ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (ตารางที่ 15 และภาพที่ 25) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของพืชต่างชนิดในสกุลเดียวกันในก่อนหน้านี้ (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2550; 2551)

เมื่อเปรียบเทียบส่วนของพืชที่นำมาใช้ศึกษา พบว่าสารสกัดที่ได้จากส่วนใต้ดินมีค่า DPPH˙ RSA ดีกว่าส่วนเหนือดินทั้งที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อาจเป็นไปได้ว่ากลุ่มสารที่ถูกสกัดด้วยเมทานอลและกลุ่มสารที่สกัดได้จากส่วนรากมีโครงสร้างและพันธะของสาร ที่เอื้อต่อการให้อิเล็กตรอนได้ง่ายกว่า ซึ่งเมื่อพิจารณาที่โครงสร้างของอนุมูลอิสระ DPPH˙ จะเห็นว่ามีอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระนั้นถูกบดบังด้วยวงแหวนเบนซีน 3 วงและหมู่ไนไตร ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีขนาดใหญ่เข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ยากและช้ากว่าสารที่มีขนาดเล็ก (Huang et al., 2005) แต่มีบางตัวอย่างของสารสกัด *M. gigantea* ที่พบว่าส่วนเหนือดินมีค่า DPPH˙ RSA ดีกว่าส่วนใต้ดิน ได้แก่ Mg (ws) (สกัดด้วยเมทานอล ภาพที่ 25) Mg (wl2) และ Mg (ws) (สกัดด้วยน้ำ ภาพที่ 25)

วิธี FRAP สำหรับการวัดความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) โดยวัดความสามารถของสารสกัดในการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้แก่เหล็ก Fe^{3+} เป็นการเลียนแบบคุณสมบัติประการหนึ่งของสารต้านออกซิเดชันจากการทดลอง จะเห็นว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินนั้นเป็นสารรีดิวซ์ที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดชนิดอื่น (ตารางที่ 16 และภาพที่ 27) เมื่อเปรียบเทียบค่า FRAP value ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 16 และภาพที่ 28) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารสกัดที่มีความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์ได้ดีที่สุดพบว่า *M. gigantea* มีความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์สูงสุดรองลงมาเป็น *M. simplex* และ *M. macrocarpa* ตามลำดับและสอดคล้องกับผลการทดสอบด้วยวิธี DPPH อย่างไรก็ตามค่าที่วัดด้วยวิธี FRAP และวิธี DPPH มีความสอดคล้องกันเพียงบางตัวอย่างเท่านั้น ซึ่งตัวอย่างที่มีฤทธิ์สูงหรือต่ำเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH นั้นยังมีความสามารถในการออกฤทธิ์คล้ายคลึงกับเมื่อวัดด้วยวิธี FRAP (ตารางที่ 16 และภาพที่ 28) เนื่องจากวิธี FRAP เป็นวิธีทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมดของสารสกัด โดยวัดความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งแสดงถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดโดยการเป็นตัวรีดิวซ์เพื่อเปลี่ยน Fe^{3+}-TPTZ ไปเป็น Fe^{2+}-TPTZ (Benzie, Strain, 1996)

วิธี TBARS จากการประเมินความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในแบบจำลองการศึกษาใช้สมองหนูเป็นแหล่งไขมันซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวัดสาร malondialdehye ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของภาวะที่ไขมันถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล จากการทดลองสารสกัดด้วยน้ำทั้งจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของ *M. gigantea* และ *M. simplex* สามารถต้านการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่า *M. macrocarpa* (ตารางที่ 17 และภาพที่ 29) อาจเนื่องมาจากสารสกัดด้วยน้ำของพืชดังกล่าวมีกลุ่มสารที่มีความสามารถในการให้โปรตอนได้ดีแก่อนุมูล LOO˙ ที่เกิดขึ้นในระหว่างปฏิกิริยาลูกโซ่ลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Bravo, 1998) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของพืชต่างชนิดในสกุลเดียวกันในก่อนหน้านี้ โดย

พบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2550; 2551) และเมื่อเปรียบเทียบส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการสกัด พบว่าส่วนใต้ดินมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่าส่วนเหนือดิน (ตารางที่ 17 และภาพที่ 30) แต่อย่างไรก็ตามสารประกอบเชิงซ้อน TBARS ที่เกิดจาก TBA เป็นปฏิกิริยาที่ไม่เฉพาะเจาะจงกับ malondialdehye เพราะสารหลายชนิด เช่น น้ำตาลสามารถทำปฏิกิริยากับกรดชนิดนี้ได้ แต่เนื่องจากวิธีนี้ทำได้ง่ายสะดวกอีกทั้งยังเป็นผลผลิตส่วนใหญ่ของปฏิกิริยาและไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาสูง จึงยังคงเป็นวิธีที่นิยมใช้วัดภาวะลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในร่างกาย จัดเป็นวิธีที่มีความใกล้เคียงกับปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายมากกว่า 3 วิธีข้างต้น (โอภา ชัชระคุปต์ และ มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง, 2549)

เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง TPC กับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันพบว่า TPC มีความสัมพันธ์กับผลการศึกษาด้วยวิธี DPPH และ FRAP มากกว่าการศึกษาด้วยวิธี TBARS สารสกัดด้วยเมทานอลมีความสัมพันธ์กันมากกว่าสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดจากส่วนเหนือดินมีความสัมพันธ์กันมากกว่าสารสกัดจากส่วนใต้ดิน (ภาพที่ 31-32) และเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินในพืชแต่ละชนิด พบว่าส่วนใหญ่จะแปรผันตรงกับปริมาณฟีนอลิก (ทดสอบด้วยวิธี DPPH$^{\cdot}$ และ FRAP) เช่น Mg (ws), Mm เป็นต้น แต่บางตัวอย่างกลับพบว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีทั้งที่มีปริมาณสารฟีนอลิกต่ำกว่า เช่น Ms1 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีกว่า Mg (vm) (ตารางที่ 13) จึงอาจเป็นไปได้ว่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชกลุ่มนี้ ไม่ได้จำกัดอยู่ที่สารประกอบฟีนอลิกเท่านั้น ซึ่งจากการศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้นในบทที่ผ่านมาจะเห็นว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินมีสารประกอบหลักแตกต่างกันและพืชกลุ่มนี้มีสารประกอบหลัก ได้แก่ สารกลุ่มฟาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ แอลคาลอยด์ (ภาพที่ 14-19) และสารกลุ่มสารโพลีแซคคาไรด์ซึ่งสารเหล่านี้สามารถแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้เช่นกัน ดังนั้นการที่จะทราบว่าสารใดเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แน่ชัดจึงควรทำการศึกษาโดยการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์นี้ต่อไป

2. ผลการศึกษาเปรียบเทียบพืชชนิดเดียวกันเก็บได้จากสถานที่แตกต่างกันและพบว่ามีลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยา

Murdannia gigantea [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)] (ตารางที่ 13) จากการศึกษาพบว่า ในสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินสามารถแบ่งกลุ่มพืชออกได้เป็น 4 กลุ่ม ตามความสามารถในการต้านออกซิเดชันเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และ วิธี DPPH ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยาและสามารถนำไปใช้สนับสนุนการจัดจำแนกพืชกลุ่มนี้ในระดับสายพันธุ์ได้ กล่าวคือ เมื่อทำการทดสอบด้วย

วิธี Folin-Ciocalteu กลุ่มพืช (population) ที่มีดอกสีขาวต้นเล็กมีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดรองลงมา คือ กลุ่มดอกสีม่วง กลุ่มดอกสีขาวโคนกลีบดอกสีม่วงและกลุ่มดอกสีขาวต้นใหญ่ตามลำดับ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 21-22)

วิธี DPPH˙ กลุ่มดอกสีขาวต้นเล็กมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH˙ ได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นกลุ่มดอกสีขาวโคนกลีบดอกสีม่วง กลุ่มดอกสีม่วงและกลุ่มดอกสีขาวต้นใหญ่ ตามลำดับ (ตารางที่ 15 และภาพที่ 24-25)

3. ผลการศึกษาเปรียบเทียบพืชชนิดเดียวกันที่เก็บได้จากสถานที่แตกต่างกัน แต่ไม่พบลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยา

M. simplex พบว่าตัวอย่างทั้ง 2 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทำการสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินเมื่อทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (ตารางที่ 14 และภาพที่ 22) และวิธี DPPH (ตารางที่ 15 และภาพที่ 25) แต่ผลการทดสอบด้วยวิธี FRAP (ตารางที่ 16 และภาพที่ 28) และวิธี TBARS (ตารางที่ 17 และภาพที่ 30) พบว่า มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อาจเป็นไปได้ว่าสภาพการเจริญเติบโตของพืชที่อยู่ในพื้นที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารสำคัญอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทำให้ผลการศึกษาที่ได้นั้นแตกต่างกันไปในแต่ละวิธี ซึ่งมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการกระจายพันธุ์และสภาพแวดล้อมว่ามีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของพืช โดย Qiu et al. (2007) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ *Notopterygium incisum* Ting ex H.T. Chang (Qianghuo) วงศ์ Apiaceae จากส่วนรากและลำต้นใต้ดินที่ได้จากสถานที่แตกต่างกันทั้งสภาพภูมิอากาศและสภาพภูมิประเทศ ได้แก่ Sichuan, Ningxia, Inner Mongolia, Hunan และ Gansu พบว่าความแตกต่างของสถานที่สภาพภูมิอากาศและสภาพภูมิประเทศ มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ นอกจากนี้ Javanmardi et al. (2003) รายงานการศึกษาปริมาณฟีนอลิกซึ่งทำการทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteau และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) จากเมล็ด *Ocimum basilicum* L. จำนวน 23 ตัวอย่าง ที่ได้จากสวนในบ้าน ฟาร์มปลูกและตลาดในประเทศอิหร่านพบว่ามีปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแตกต่างกันในบางตัวอย่าง

ดังนั้นนอกจากตัวทำละลายที่ใช้และส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการสกัดแล้ว ลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยา การกระจายพันธุ์และสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตของพืชจึงเป็นอีกปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันต่อไปในอนาคต จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าพืชทั้ง 3 ชนิดเป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติอีกแหล่งทางเลือกโดยเฉพาะ *M. gigantea* และ *M. simplex* ที่มีการใช้ประโยชน์เป็นยาพื้นบ้านมาช้านานแต่ยังไม่ปรากฏรายงานการศึกษาวิจัยทางเภสัชวิทยา จากข้อมูลการศึกษาข้าง ต้นจะเห็นว่าพืชกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีเมื่อเทียบกับพืชในสกุลเดียวกัน เช่น *M. bracteata* เป็นพืชที่มีรายงานการศึกษาวิจัยในก่อนหน้านี้และมีการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายมีจำหน่ายในรูปแบบต่างๆ ตามท้องตลาด การศึกษานี้จึงเป็นการเพิ่มเติมข้อมูลทางเภสัชวิทยาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชกลุ่มนี้และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาความสามารถต้านออกซิเดชันแค่ในหลอดทดลองซึ่งเป็นเพียงปฏิกิริยาเคมีเท่านั้นยังคงต้องการศึกษาในสัตว์ทดลองต่อไป