

# ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของรากและใบย่านาง (*Tiliacora triandra* Diels.)

## Anti-Oxidant Activity of Root and Leaf Extract from *Tiliacora triandra* Diels.

ธีรพร กทิตาสตร์<sup>1</sup>, สุรพงศ์ รัตนะ<sup>2</sup>

Teeraporn Katisart<sup>1</sup>, Surapong Rattana<sup>2</sup>

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) โดยการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากรากและใบย่านางที่สกัดด้วยสารละลายต่างๆ คือ สารสกัด petroleum ether สารสกัด dichloromethane สารสกัด ethyl acetate สารสกัด methanol และสารสกัดน้ำ ทำการเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐาน คือ ascorbic acid เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติโดยใช้ปริมาณความเข้มข้นของสารที่ยับยั้ง DPPH ได้ 50% (50 % efficiency concentration, EC<sub>50</sub>) พบว่า ชั้นของสารสกัดที่ให้ค่าต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงที่สุด (ค่า EC<sub>50</sub> ต่ำที่สุด) ได้แก่ สารสกัดชั้น methanol (9.63 ± 0.56 µg/ml) ไม่แตกต่าง (p<0.05) จากสารมาตรฐาน ascorbic acid (2.26 ± 0.57 µg/ml) ซึ่งพบในสารสกัดจากใบย่านาง โดยชั้นของสารสกัดจากใบย่านางทุกชั้นให้ค่าต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงกว่าชั้นของสารสกัดจากรากย่านาง

**คำสำคัญ :** ย่านาง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

### Abstract

The present study was aimed to investigate the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity of root and leaf extract from *Tiliacora triandra* Diels. The plant roots and leaves were extracted by different solvents including petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, methanol and water. The anti-oxidative capacity of the extracts was compared to those of the standard (ascorbic acid) in form of 50 % efficiency concentration, EC<sub>50</sub>. The results revealed that methanol extracts (9.63 ± 0.56 µg/ml) exhibit the highest anti-oxidative capacity (the lowest EC<sub>50</sub>) which is not different from those of ascorbic acid (2.26 ± 0.57 µg/ml). This highest anti-oxidative activity is found in leaf extract. The leaf extracts from all solvents show the higher anti-oxidative activity than those of root extract.

**Keywords :** *Tiliacora triandra* Diels, anti-oxidant activity

### บทนำ

สารอนุมูลอิสระ (Free radicals) หรือ reactive oxygen species (ROS) เป็นโมเลกุล หรือ อีออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก และมีอายุสั้นมาก จัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร แต่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆ ภายในร่างกาย เพื่อให้ตัวมันเสถียร แหล่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระในมนุษย์มี 2 แหล่งคือ จากภายในร่างกาย เช่น การเผาผลาญอาหาร การหายใจ การออกกำลังกาย และจาก

แหล่งภายนอกร่างกาย ได้แก่ ความเครียด การติดเชื้อ มลพิษในอากาศ เป็นต้น อนุมูลอิสระมีหลายชนิด ชนิดที่สำคัญได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (Superoxide anion) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) ไฮดรอกซิลแรดิคัล (Hydroxyl radical)<sup>1</sup>

อนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถเกิดขึ้นเองภายในร่างกาย เช่น ในระหว่างกระบวนการสร้างพลังงาน การเจริญเติบโตของเซลล์ ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการฆ่าเชื้อโรคของเม็ด

<sup>1</sup> อาจารย์, <sup>2</sup> นิสิตระดับปริญญาเอก, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต.ขามเรียง อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150  
E-mail address: tkatisart@yahoo.com

<sup>1</sup> Lecturer, <sup>2</sup> Ph.D student, Biology department, Science faculty, Mahasarakham University, Khamriang, Kantharawichai Maha Sarakham 44150 E-mail address: tkatisart@yahoo.com



เลือดขาว และระบบส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (Signal transduction) นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเกิดขึ้นได้จากการได้รับสารพิษจากสิ่งแวดล้อม สารเคมี รังสี และยาบางชนิด อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่คงตัว จึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ของร่างกาย เช่น ไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งโคเลสเตอรอล กรดไขมันไม่อิ่มตัว โปรตีน และสารพันธุกรรมของร่างกาย จึงทำให้โครงสร้างและบทบาทการทำงานของสารชีวโมเลกุลนั้นมีความผิดปกติไป

เมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น จึงเกิดการทำลายโมเลกุลอื่นๆ ต่อเนื่องกันเป็นลูกโซ่ ส่งผลให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อร่างกาย เกิดริ้วรอยเหี่ยวย่นบนใบหน้า รอบดวงตา และผิวพรรณ รวมทั้งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคหัวใจขาดเลือด ต้อกระจก ความดันโลหิตสูง อัลไซเมอร์ เบาหวาน มะเร็ง เป็นต้น ปกติในร่างกายของเรา มีกลไกการโจมตีจากอนุมูลอิสระ โดยอาศัยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นในร่างกาย เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส (Superoxide dismutase) คาตาเลส (Catalase) กลูตาไทโอน เปอร์ออกซิเดส (GPX) เป็นต้น แต่การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระยังไม่เพียงพอและมีขีดจำกัด ประกอบกับเมื่ออายุมากขึ้น ร่างกายสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้น้อยลง ดังนั้นร่างกายจึงควรรับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก โดยการรับประทานอาหารที่อุดมด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ

ย่านาง จัดเป็นพืชในวงศ์ Menispermaceae มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Tiliacora triandra* Diels. เป็นไม้เถาเลื้อยพันต้นไม้อื่น เป็นพรรณไม้กลางแจ้ง ที่ชอบขึ้นอยู่ทั่วไป เจริญเติบโตในดินทุกชนิดและปลูกได้ทุกฤดู ขยายพันธุ์ด้วยการใช้เมล็ด นอกจากนี้ย่านางจะใช้ในการประกอบอาหารแล้ว ยังมีสรรพคุณทางยาหลายอย่าง เช่น ลำต้นใช้เป็นยาลดไข้ แก้ร้อนในกระหายน้ำ เป็นยาระบายและแก้ริดสีดวงทวาร ส่วน รากใช้เป็นยาแก้ไข้จับสั่น เป็นต้น<sup>2</sup> เนื่องจาก ปัจจุบันมีการใช้หาคันย่านาง มาต้มกินโดยอ้างว่า แก้อาการปวดโรคเช่น โรคเก๊าต์ โรคกระดูก เสริมภูมิคุ้มกัน แก้ไข้ทุกชนิด โรคเบาหวาน เป็นต้น โดยการศึกษาค้นคว้าในปัจจุบันไม่เพียงพอในการยืนยันสรรพคุณดังกล่าว และประกอบกับจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า ย่านาง มีส่วนประกอบของสารสำคัญ กลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ได้แก่ tiliacorine, tiliacorinine, nortiliacorinine A, tiliacotinine 2-N-oxide และ tiliarine เป็นต้น ซึ่งเป็นกลุ่มสารพฤกษเคมี ที่ให้ผลทางเภสัชวิทยาที่สำคัญอีกกลุ่มหนึ่ง

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดจากย่านางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูง<sup>3</sup> แต่ยังไม่มียางานการศึกษาในสารสกัดจากรากของพืชชนิดดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราก

และใบย่านาง ซึ่งองค์ความรู้จะเป็นประโยชน์ต่อการแพทย์รวมทั้งอาจนำไปใช้ชดเชยเป็นอาหารเสริมต้านอนุมูลอิสระในอนาคต

## วิธีการศึกษา

### การเตรียมสารสกัดในแต่ละชั้น (fraction) โดยเครื่อง soxhlet

เก็บตัวอย่างสมุนไพรย่านาง (*T. triandra*) จาก อ. เมือง จ. มหาสารคาม โดยเลือกจากลักษณะรากและใบจากต้นแก่จัด ระหว่างกรกฎาคม - ธันวาคม พ.ศ. 2557 การเตรียมสารสกัดมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำรากและใบสดของสมุนไพรย่านางมาล้างและบดหั่นหยาบๆ ล้างให้สะอาด กำจัดสิ่งปนเปื้อนออกให้หมด ผึ่งลมให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปอบด้วยตู้อบ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนใบแห้งซึ่งน้ำหนักของใบแห้งและจذبบันทึก
2. นำใบแห้งที่ได้บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด ผ่านร่อนเบอร์ 16 (ขนาดรูร่อน 1.18 มิลลิเมตร)
3. ชั่งสารสกัดใบย่านาง น้ำหนัก 500 กรัม บรรจุลงถุงผ้าดิบ ประกอบลงเครื่อง Soxhlet apparatus โดยใช้ตัวทำละลาย ชนิดละ 1,000 มิลลิลิตร โดยเริ่มจาก petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate และ methanol ใช้เวลา 3 ชั่วโมง ในแต่ละ fraction แล้วนำสารละลายในแต่ละชั้น ไปทำให้เข้มข้นด้วย rotary evaporator ซึ่งน้ำหนักสารนำไปคำนวณหา %yield
4. การสกัดสารสกัดชั้นน้ำ ทำได้โดยการนำกากที่ได้จากการสกัดชั้นสารละลายอินทรีย์ในข้อที่ 3 มาหมัก (maceration) ด้วยน้ำกลั่น (distilled water) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองผ่านเครื่อง Buchner funnel apparatus จากนั้นนำละลายที่ได้ไปทำให้เข้มข้นด้วย rotary evaporator และ freeze dryer เพื่อใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป

### การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน DPPH ความเข้มข้น 60 ppm ใน Methanol
2. เตรียมสารสกัดย่านาง ความเข้มข้น 500, 250, 125, 62, 31.2, 15.6 และ 7.8 ppm
3. นำสารสกัดในข้อ 2 จำนวน 750 µl. และ DPPH 750 µl ในอัตราส่วน 1 : 1 ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่า Absorbance ด้วย UV spectrophotometer



ที่ความยาวคลื่น 516-518 นาโนเมตร วัดค่า Absorbance และมี Vitamin C เป็นสารมาตรฐาน  
หาค่า % radical scavenging จากสูตร

$$\% \text{ radical scavenging} = \frac{\text{Act}-\text{Asample} \times 100}{\text{Actr}}$$

Actr = Absorbance control

Asample = Absorbance ของสารสกัด

4. สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับ % radical scavenging แล้วหาค่า  $EC_{50}$

### สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน Standard Error Means (SEM)

สถิติทดสอบข้อตกลงเบื้องต้น ได้แก่ Outlier, Randomness, Normality, Homogeneity of Variance

สถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมุติฐาน ได้แก่ One –Way ANOVA (One-way analysis of variance) และ Two –Way ANOVA (Two-way analysis of variance) เมื่อพบว่าผลการตรวจสอบสมมุติฐานมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ตามวิธีของ Scheffe's test คำนวณค่าสถิติ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

### ผลการศึกษา

การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH โดยการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาต้านออกซิเดชันของสารสกัดใบย่านางที่สกัดด้วยสารละลายต่างๆ คือ สารสกัด petroleum ether สารสกัดdichloromethane สารสกัด ethyl acetate สารสกัด methanol และสารสกัดน้ำ ทำการเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐาน คือ ascorbic acid ซึ่งในการเปรียบเทียบครั้งนี้ ใช้ปริมาณความเข้มข้นของสารที่ยับยั้ง DPPH ได้ 50% ( 50 % efficiency concentration,  $EC_{50}$  ) เป็นตัวที่บ่งบอกถึงความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยชั้นของสารสกัดที่ให้ค่าต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงที่สุด (ค่า  $EC_{50}$  ต่ำที่สุด) ได้แก่สารสกัดชั้น methanol ไม่แตกต่างกัน ( $p < 0.05$ ) กับ สารมาตรฐาน ascorbic acid ซึ่งพบในสารสกัดจากใบย่านาง โดยชั้นของสารสกัดจากใบย่านางทุกชั้นให้ค่าต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงกว่าชั้นของสารสกัดจากรากย่านาง (ตารางที่ 1)

### อภิปรายผลการศึกษา

การทดสอบฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดใบย่านางโดยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดที่ให้ฤทธิ์ดีที่สุดคือ สารสกัดชั้น methanol รองลงมาคือชั้น ethyl acetate ซึ่งสอดคล้องรายงานการวิจัยที่ผ่านมา<sup>4,5</sup> การที่สารสกัดชั้น methanol ให้ค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ดีที่สุดโดยวิธี DPPH นั้น เนื่องมาจากองค์ประกอบทางเคมี ประกอบด้วยสารกลุ่ม flavonoid, polyphenol เป็นสารที่มีโครงสร้างของโมเลกุลที่มีหมู่ hydroxyl(-OH) ซึ่งเป็น functional group ที่มีความเป็นขั้วมาก สารเหล่านี้จึงละลายออกมาได้ดีในสารละลายมีขั้วมาก ดังนั้นจึงทำให้สารสกัดชั้น MeOH ให้ฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันดีตามไปด้วย

**Table 1** DPPH free radical scavenging capacity of root and leaf extract from *Tiliacora triandra* Diels.

fraction	$EC_{50}$ of root extract ( $\mu\text{g/ml}$ )	$EC_{50}$ of leaf extract ( $\mu\text{g/ml}$ )
Petroleum ether	391.39 $\pm$ 0.18 <sup>F</sup>	113.81 $\pm$ 0.85 <sup>D</sup>
Dichloromethane	270.9 $\pm$ 0.23 <sup>E</sup>	75.57 $\pm$ 1.67 <sup>C</sup>
Ethyl acetate	57.62 $\pm$ 0.08 <sup>C</sup>	15.02 $\pm$ 0.46 <sup>B</sup>
Methanol	53.43 $\pm$ 0.53 <sup>C</sup>	9.63 $\pm$ 0.56 <sup>A</sup>
Water	51.78 $\pm$ 0.16 <sup>C</sup>	16.19 $\pm$ 0.45 <sup>B</sup>
Ascorbic acid	2.26 $\pm$ 0.57 <sup>A</sup>	

Mean values within each column with different superscripts are significantly different, Scheffe's test  $p < 0.05$ .



จากข้อมูลข้างต้นทำให้ทราบว่า สมุนไพรและใบย่านางมีต้านปฏิบัติการออกซิเดชันในระดับสูง นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาศึกษาคุณภาพสมุนไพรใบย่านางหลังจากประกอบอาหารแล้ว โดยพบว่าแกงหน่อไม้ใส่ใบย่านางมีสารกลุ่ม polyphenol ประมาณ  $979 \pm 28.2$  มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง<sup>6</sup> และนอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่พบว่า แกงหน่อไม้ใส่ใบย่านาง มีศักยภาพในการต้านการก่อกลายในเชื้อแบคทีเรียชนิด *Samonella typhimurium* ทั้งสายพันธุ์ TA98 และสายพันธุ์ TA100 โดยมีค่า IC<sub>50</sub> ประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อเพลต<sup>7</sup> ทำให้เห็นว่านอกจากสมุนไพรใบย่านางใช้เป็นสมุนไพรเดี่ยวแล้วเมื่อผ่านการปรุงสุกยังคง

มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ คงประสิทธิภาพในทางโภชนาการได้

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจาก ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน (วช.) ปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

### บรรณานุกรม

1. นันทน์ภัส เต็มวงศ์. (2551) ความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิกส์ กับความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระในพืช. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์. 8 (2), 114 – 124.
2. ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (2532) ก้าวไปกับสมุนไพร เล่ม3. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ, มหาวิทยาลัยมหิดล.
3. Rattana S, Phadungkit M, Cushnie B. (2010). Phytochemical Screening, Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Tiliacora Triandra Leaf Extracts. The 2<sup>th</sup> Annual International Conference of Northeast Pharmacy Research. 60-63.
4. ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปริชา และ กฤตติญารัตน์ สมวงศ์ (2554) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยบางชนิดที่รักษาผมหงอกก่อนวัย. The 3<sup>th</sup> Annual International Conference of Northeast Pharmacy Research 2011. 57-61.
5. Naraporn Phomkaivon and Varipat Areekul. (2009). Screening for antioxidant activity in selected Thai wild plants. As. J. Food Ag-Ind. 2009, 2(04), 433-440.
6. ธิติรัตน์ สมดี จินดาวัลย์ วิบูลย์อุทัย จิรภา เพชรสม และ อุดมศักดิ์ มหาวิทยาลัย (2553) การศึกษาการก่อกลายพันธุ์และการต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดไม่มีชีวิต

จากตำรับอาหารพืชผักพื้นบ้านที่ปรุงสำเร็จด้วยวิธีเอมส์. วารสารวิจัย มช. 15(11), 1015-1022.

7. Tantipopipat S Jr, Boonpradern A, Charoenkiatkul S, Wasantwisut E, Winichagoon P. (2010). Dietary intake of spices and herbs in habitual northeast Thai diets. Malays J Nutr. 16(1):137-48.