การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณของฟีนอลิคกับฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากต้นเฉาก๊วยและต้นหมาน้อย

Antioxidant activities, and phenolic and flavonoid contents of extracts from *Mesona chinensis* and *Cissampelos pareira* L.

อนันต์ โพธิ์ลังกา[1], วรวิทย์ รัตนพิเศษ[2], เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์[3*]

Anan Polangga[1], Worawit Rattanapiset[2], Kriangsak Songsrirote[3*]

Received: 5 May 2013; Accepted: 15 August 2013

บทคัดย่อ

เฉาก๊วยและหมาน้อยเป็นพืชที่ให้สารเมือกซึ่งมีการนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาประกอบเป็นอาหาร จากการศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยด้วยวิธี DPPH assay เมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำ (อุณหภูมิห้อง และ 100 °C) เอทานอล เฮกเซน อะซิโตน และเอทิลอะซิเตท พบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดจากใบเฉาก๊วยมีค่าระหว่าง 1.0 ± 0.1 - 4.4 ± 0.3 mg/mL ในขณะที่ใบหมาน้อยมีค่าระหว่าง 0.2 ± 0.0 - 9.0 ± 0.8 mg/mL ซึ่งตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดคือน้ำร้อน นอกจากนี้ปริมาณฟีนอลิครวมของใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยที่ถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายต่างๆมีค่าในช่วง 0.54 ± 0.06 - 7.89 ± 0.24 และ 1.17 ± 0.08 - 9.34 ± 0.33 mg gallic acid equivalent/น้ำหนักของใบพืชแห้ง (g) ตามลำดับ ส่วนปริมาณฟลาโวนอยด์มีค่า 0.01 ± 0.00 - 0.59 ± 0.07 และ 0.05 ± 0.01 - 0.40 ± 0.06 mg quercetin equivalent/น้ำหนักของใบพืชแห้ง (g) ตามลำดับ โดยพบว่าความสามารถในการสกัดสารต่างๆจากใบพืชของตัวทำละลายที่ศึกษานั้นมีความแตกต่างกัน และไม่แปรตามสภาพขั้วของตัวทำละลาย และเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับปริมาณฟีนอลิครวมและฟลาโวนอยด์ของพืชทั้งสองชนิดจากการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่าไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

คำสำคัญ: ต้นเฉาก๊วย ต้นหมาน้อย สารเมือก สารต้านอนุมูลอิสระ ฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์

Abstract

Mesona chinensis and *Cissampelos pareira* L. are mucilage plants. They are widely used for many purposes especially as an ingredient in food. Different solvents including water (room temperature and 100 °C), ethanol, hexane, acetone, and ethyl acetate were used to extract phytochemicals from the plant leaves. The extracts of each solvent were investigated for their antioxidant activity by DPPH assay. IC_{50} of *M. chinensis* extracts ranged from 1.0±0.1 - 4.4±0.3 mg/mL, while that of *C. pareira* L. ranged from 0.2±0.0 - 9.0±0.8 mg/mL. In both cases, using hot water as extractant provided the best antioxidant efficiency. Total phenolic contents of *M. chinensis* and *C. pareira* L. varied from 0.54±0.06 - 7.89±0.24 and 1.17±0.08 - 9.34±0.33 mg gallic acid equivalent/g (dry weight of plant), respectively. In addition, flavonoid contents varied from 0.01±0.00 - 0.59±0.07 and 0.05±0.01 - 0.40±0.06 mg quercetin equivalent/g (dry weight of plant), respectively. However, there was no correlation between the total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity in these plant leaves.

Keywords: *Mesona chinensis*, *Cissampelos pareira* L., mucilage, antioxidant, polyphenol, flavonoid

---

[1] *นักศึกษา* [2,3]*อาจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*

[1] *Student* [2,3]*Lecturer Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand.*

** Corresponding author. E-mail: kriangsaks@swu.ac.th*

บทนำ

มนุษย์มีการนำพืชหลายชนิดมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เป็นอาหารและยารักษาโรค เนื่องจากสารเคมีในพืชหลายชนิดเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของผู้บริโภค พืชที่ให้สารเมือกเป็นพืชกลุ่มหนึ่งที่ได้รับความสนใจในการศึกษาถึงคุณค่าและการนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ เช่น การนำว่านหางจระเข้มาใช้ในการรักษาและเครื่องสำอาง[1] การศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์เนื้อเยื่อในกระเพาะอาหารของสารเมือกจากผลกระเจี๊ยบเขียว[2] การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการผลิตเป็นเจลเพื่อพัฒนาเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางและยาภายนอกของผักปลังซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นของไทย[3] และการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกชบา[4] เป็นต้น สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาสารสกัดจากใบเฉาก๊วย (*Mesona chinesis*) และใบหมาน้อย (*Cissampelos pareira* L.) ซึ่งเป็นพืชที่ให้สารเมือกและมีการนำสารเมือกนี้มาประกอบเป็นอาหารอย่างแพร่หลาย โดยต้นหมาน้อยเป็นพืชตระกูลไม้เถาเลื้อยในวงศ์ Menispermaceae สามารถพบได้ทั่วไปทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ใบของต้นหมาน้อยสามารถนำมาประกอบเป็นอาหารได้ และมีสรรพคุณทางยาหลายอย่าง เช่น ช่วยลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเส้นเลือด เนื่องจากในใบของต้นหมาน้อยจะมีสารเพคตินที่ช่วยในการดูดซับคอเลสเตอรอลได้ นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณในการเป็นยาบำรุง ยาแก้ร้อนใน และยาแก้ปวดท้อง นอกจากนี้ในต้นหมาน้อยยังพบสารเคมีที่สำคัญอื่นๆ ด้วย เช่น สารจำพวกอัลคาลอยด์ ที่พบมากในส่วนของราก โดยรากของต้นหมาน้อยมีการนำไปใช้ในทางยาหลายขนาน เช่น โรคหัวใจ ป้องกันการแท้งบุตร ช่วยในการคลายกล้ามเนื้อ[5] และยังมีคุณสมบัติในการต้านสารก่อมะเร็งอีกด้วย[6] สารอื่นๆ ที่พบในรากต้นหมาน้อยได้แก่ quercitol และ sterol[7] สำหรับใบและลำต้นของต้นหมาน้อยก็มีสรรพคุณทางยาหลายอย่างเช่นกัน โดยส่วนของลำต้นใช้ในการลดไข้ และบำรุงโลหิต ส่วนของใบใช้สำหรับแก้หิด และพอกแผลที่เกิดจากฝี เป็นต้น ส่วนเฉาก๊วย เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการแก้ร้อนใน กระหายน้ำ และช่วยลดความดันโลหิตสูงได้ Lai และคณะได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมลอิสระของใบเฉาก๊วยเมื่อใช้สารละลายเกลือโซเดียมไบคาร์บอเนตเป็นตัวทำละลาย โดยเปรียบเทียบผลของการต้านอนุมูลอิสระใน antioxidative reaction ต่างๆ[8] นอกจากนี้ Hung และ Yen ได้ทำการแยกสารกลุ่มฟีนอลิคในใบเฉาก๊วย เมื่อสกัดด้วย 75% เมทานอล โดยพบว่ามี caffeic acid เป็นองค์ประกอบหลัก[9]

ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาถึงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชทั้งสองชนิดนี้ซึ่งเป็นที่นิยมมาบริโภค โดยใช้วิธี DPPH assay จากการสกัดโดยใช้น้ำตามกระบวนการของการสกัดเพื่อนำไปใช้ในการประกอบอาหาร และเปรียบเทียบปริมาณที่ได้กับการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้วที่แตกต่างกันเป็นตัวสกัด เนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาเปรียบเทียบกันอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระต่อปริมาณของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วย โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่จะทำการศึกษาในงานวิจัยนี้คือสารประกอบฟีนอลิครวม และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารเคมีที่พบในอัตราส่วนที่มากในพืชโดยทั่วไป โดยทำการทดสอบสารทั้งสองกลุ่มด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และ colorimetric aluminum chloride ตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เครื่องมือและสารเคมี

สารเคมีต่างๆ จากบริษัท Sigma Aldrich ได้แก่ DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), Folin-Ciocalteau reagent, gallic acid, quercetin, และ aluminum chloride น้ำกลั่น ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ จากบริษัท MERCK ได้แก่ เอทานอล เฮกเซน อะซิโตน และเอทิลอะซิเตท เครื่อง UV-VIS Spectrometer รุ่น UV-2450PC (Shimadzu, Japan)

พืชที่ศึกษา

ส่วนใบของต้นเฉาก๊วยและต้นหมาน้อยซึ่งจำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานคร

วิธีการทดลอง

การเตรียมสารสกัดจากต้นเฉาก๊วยและต้นหมาน้อย

อบใบพืชที่ล้างสะอาดที่อุณหภูมิ 50 °C จนแห้งสนิท โดยใช้เวลาประมาณ 48-72 ชั่วโมง แล้วนำใบพืชที่ได้ไปบดให้ละเอียดก่อนทำการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ น้ำ(ที่อุณหภูมิห้อง และ 100 °C) เอทานอล (95%) เฮกเซน (99.0%) อะซิโตน (99.8%) และ เอทิลอะซิเตท (99.8%) โดยใช้ใบพืช 1 กรัม ต่อตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และปรับปริมาตรสารละลายด้วยตัวทำละลายนั้นๆให้เป็น 50 มิลลิลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay วิธีการทดลองนี้ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Cam และคณะ[10] เริ่มจากนำสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆมาผสมกับ 0.1 mM DPPH (ในเอทานอล) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 4.0 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้ง (%inhibition) จากสมการ

$$\%\text{inhibition} = (A_{control} - A_{sample}) \times 100/A_{control}$$ [1]

เมื่อ A_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหลังทำปฏิกิริยากับ 0.1 mM DPPH

$A_{control}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบลงค์ที่ไม่ได้เติมสารสกัด

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า %inhibition กับปริมาตรของสารสกัด เพื่อหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ โดยค่า IC_{50} หมายถึงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ (DPPH) เหลืออยู่ 50% ดังนั้นสารสกัดที่ให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่าแสดงว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมในใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย

นำสารสกัดจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร มาผสมกับ 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 7.5% sodium carbonate ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เพื่อคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมเป็น gallic acid equivalents เทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid ที่ช่วงความเข้มข้น 0.5-50 mg/mL

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย

นำสารสกัดจากใบพืชมา 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร แล้วเติม 5% (w/w) $NaNO_2$ ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร และ 30% (v/v) ethanol ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 10% (w/w) $AlCl_3$ ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 1 M NaOH ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ลงไป แล้วปรับปริมาตรเป็น 25.0 มิลลิลิตร ด้วย absolute ethanol ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาทีก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 430 nm วิธีในการทดลองนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Ghasemzadeh และคณะ[11] คำนวณปริมาณของฟลาโวนอยด์เป็น quercetin equivalents เทียบกับกราฟมาตรฐานของ quercetin ที่ช่วงความเข้มข้น 0.1-2.0 mg/mL

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวม และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยจากการทดลอง 3 ซ้ำ จะถูกนำไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี one-way ANOVA ด้วย SPSS version 18 เพื่อบอกความแตกต่างของปริมาณสารสกัดเมื่อมีการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยจะถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อผลทางสถิติให้ค่า *p*-value น้อยกว่า 0.05

ผลการทดลอง

1. การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

จากการศึกษาประสิทธิภาพการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยด้วยวิธี DPPH assay เมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำ(อุณหภูมิห้องและ 100 °C) เอทานอล อะซิโตน เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ซึ่งมีสภาพขั้วจากมากไปน้อยตามลำดับ พบว่าค่า %inhibition ของสารสกัดจากใบพืชทั้ง 2 ชนิดสำหรับตัวทำละลายทุกชนิดที่ทำการศึกษา จะแปรผันตรงตามความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ จนถึงความเข้มข้นค่าหนึ่งจากนั้นค่า %inhibition จะคงที่ และพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้ตัวทำละลายต่าง ๆสำหรับใบเฉาก๊วยกับใบหมาน้อยแตกต่างกัน และไม่แปรตามสภาพขั้วของสารสกัด (Table 1)

จาก Table 1 สามารถสรุปได้ว่าเมื่อใช้ใบพืชในปริมาณที่เท่ากัน การใช้น้ำร้อนสามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระออกมาได้มากที่สุดทั้งในกรณีของใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย โดยในกรณีของใบเฉาก๊วย การสกัดด้วยน้ำร้อนไม่ได้ให้ผลที่แตกต่างจากการใช้ตัวทำละลายอื่นอย่างชัดเจน ยกเว้นเอทิลอะซิเตท สามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระออกมาได้น้อยกว่าตัวทำละลายอื่น ๆ ($p < 0.05$) ในขณะที่การสกัดใบหมาน้อยด้วยน้ำร้อนสามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าตัวทำละลายอื่นอย่างชัดเจน ($p < 0.05$) และปริมาณสารสกัดจากตัวทำละลายอื่น ๆก็มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยที่เอทานอลสามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากใบหมาน้อยออกมาได้ปริมาณน้อยที่สุด

Table 1 Antioxidant activities (IC_{50}) of M.chinensis and C.pareira L. extracts using DPPH assay

Solvent	IC_{50} (mg/mL)*	
	M.chinersis	C.pareira L.
Distilled wafer (100 °c)	1.0 ± 0.1	0.2 ± 0.0
Distilled wafer (room temp)	1.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1
Ethanol	1.4 ± 0.1	9.0 ± 0.8
Acetone	1.2 ± 0.1	2.8 ± 0.3
Ethyl acetate	4.4 ± 0.3	4.0 ± 0.3
Hexane	1.2 ± 0.1	3.9 ± 0.3

*หน่วยความเข้มข้นของ IC_{50} เป็นปริมาณของใบพืชแห้งต่อปริมาตรของสารสกัด

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมในใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยในการตรวจวัดปริมาณของสารประกอบฟีนอลิครวมของสารสกัดจากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยด้วยวิธี Folin-Ciocalteu เมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid ให้ผลการตรวจวัดดังแสดงใน Table 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณของฟีนอลิครวมในสารสกัดขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ไม่ได้แปรผันกับสภาพขั้วของตัวทำละลาย โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมที่สกัดได้จากพืชทั้งสองชนิดมีแนวโน้มในทางเดียวกันคือ พบปริมาณน้อยที่สุดเมื่อใช้เอทิลอะซีเตทในการสกัด ในกรณีของสารสกัดจากใบเฉาก๊วยพบว่าปริมาณฟีนอลลิครวมน้อยกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นอย่างชัดเจน ($p < 0.05$) ในขณะที่สารสกัดจากใบหมาน้อยพบปริมาณของฟีนอลลิครวมใกล้เคียงกันเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท เอทานอล เฮกเซน และอะซีโตน ส่วนการสกัดด้วยน้ำร้อนพบฟีนอลิครวมในปริมาณที่สูงกว่าอย่างชัดเจน ($p < 0.05$) โดยน้ำร้อนสามารถสกัดสารฟีนอลิคจากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยออกมาได้มากที่สุด คือ 7.89 และ 9.34 mg/g ตามลำดับ

Table 2 Table phenolic contents in *M.chinensis* and *C.pareira* L. extracts expressed in terms of gallic acid eguivalent

Solvent	Tolal phenolic content	
	M.chinersis	***C.pareira L.***
Distilled wafer (100 °c)	7.89 ± 0.24	9.34 ± 0.33
Distilled wafer (room temp)	3.83 ± 0.16	5.99 ± 0.25
Ethanol	1.54 ± 0.11	1.39 ± 0.10
Acetone	0.96 ± 0.10	1.34 ± 0.10
Ethyl acetate	0.54 ± 0.06	1.17 ± 0.08
Hexane	1.23 ± 0.10	1.60 ± 0.11

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย

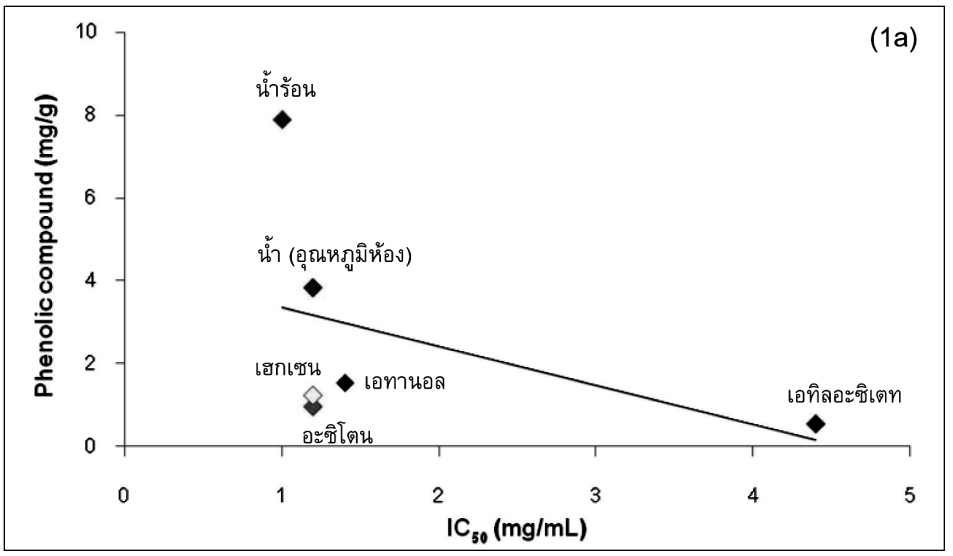
ในการตรวจวัดปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Colorimetric aluminum chloride โดยใช้ quercetin เป็นฟลาโวนอยด์มาตรฐาน ให้ผลการตรวจวัดดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งพบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายในการสกัด และมีลักษณะแนวโน้มในทิศทางเดียวกันคือ การใช้น้ำที่อุณหภูมิห้อง น้ำร้อน และเฮกเซน สามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์ออกมาได้ปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ($p > 0.05$) โดยในกรณีของใบเฉาก๊วยพบว่าเฮกเซนสามารถสกัดฟลาโวนอยด์ออกมาได้มากที่สุด ส่วนเอทานอล อะซีโตน และเอทิลอะซิเตท มีประสิทธิภาพในการสกัดสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ต่ำ และให้ค่าที่ใกล้เคียงกัน

Table 3 Flavonoid contents in *M. chinensis* and *C. pareira* L. extract expressed in terms of guercetin equivalent

Solvent	Flavonoid content	
	M.chinersis	***C.pareira L.***
Distilled wafer (100 °c)	0.55 ± 0.07	0.40 ± 0.06
Distilled wafer (room temp)	0.53 ± 0.06	0.33 ± 0.04
Ethanol	0.01 ± 0.00	0.08 ± 0.01
Acetone	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.03
Ethyl acetate	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Hexane	0.59 ± 0.07	0.26 ± 0.04

4. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระต่อปริมาณของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

เนื่องจากสารเคมีในพืชหลายชนิดมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งสารประกอบฟีนอลิคและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารเคมีหลักที่พบมากในพืชโดยทั่วไป ดังนั้นจากข้อมูลการหาค่า IC_{50} และการตรวจวัดปริมาณของสารประกอบฟีนอลิครวมกับปริมาณของฟลาโวนอยด์ (หัวข้อ 1-3) จึงนำมาสร้างกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} กับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิครวมและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จากสารสกัดใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยเมื่อใช้ตัวสกัดต่างชนิดกัน ดังแสดงใน Figure 1 Figure 2



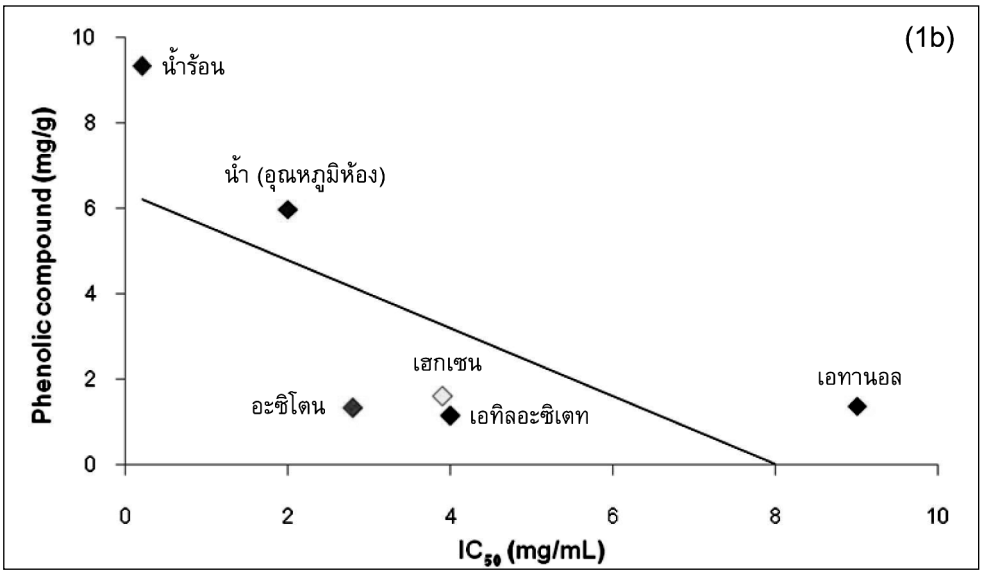


Figure 1 Correlations between the IC_{50} values of antioxidant activities and total phenolic contents of *M. chinensis* (1a) and *C. pareira* L. (1b)

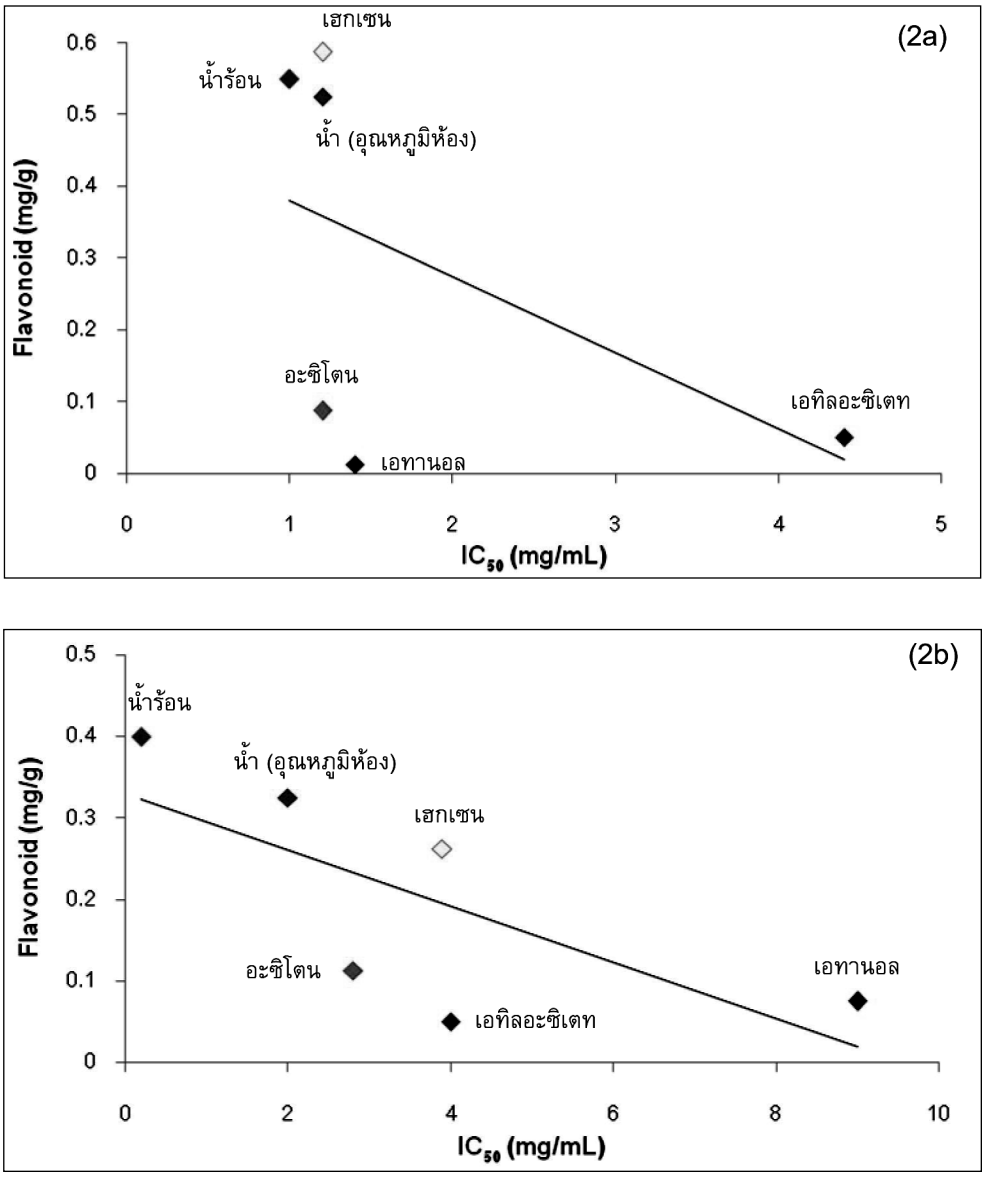


Figure 2 Correlations between the IC_{50} values of antioxident activities and flavonoid contents of *M. chinensin* (2aX and *C. pareira* L. (2b)

จาก figure 1 and 2 พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมและฟลาโวนอยด์ไม่ได้มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งจากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย เนื่องจากตัวทำละลายที่สามารถสกัดเอาสารประกอบฟีนอลิคหรือฟลาโวนอยด์ออกมาจากใบพืชได้มากกว่า ไม่ได้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay เมื่อใช้ตัวสกัดแต่ละชนิด และรายงานผลเป็นค่า IC_{50} พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆสำหรับใบเฉาก๊วยกับใบหมาน้อยแตกต่างกัน และไม่แปรตามสภาพขั้วของสารสกัด ทั้งนี้เนื่องจากในพืชมีสารเคมีที่หลากหลายที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารเคมีต่าง ๆเหล่านี้จะถูกสกัดออกมาจากพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารนั้นๆ โดยในการสกัดแยกสารจากพืชสามารถทำได้ด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น โดยทั่วไปจะเริ่มจากตัวทำละลายที่มีขั้วมากไปน้อย เช่น สารต้าน

อนุมูลอิสระในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลลิค ได้แก่ phenolic acids, hydroxycinnamic acids, flavonoids และ carotenoids เป็นต้น จะถูกสกัดออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วจากมากไปน้อยตามลำดับ[12,13] โดยในงานวิจัยนี้พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในใบเฉาก๊วยมีค่าต่ำที่สุดเมื่อใช้เอทานอลในการสกัด ส่วนในใบหมาน้อยมีค่าต่ำที่สุดเมื่อใช้เอทิลอะซิเตทในการสกัด แต่สารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อใช้น้ำร้อนในการสกัดคือ ใบเฉาก๊วย ให้ค่า IC_{50} ที่ 1.0 ± 0.1 mg/mL และใบหมาน้อย ให้ค่า IC_{50} 0.2 ± 0.0 mg/mL โดย Lai และคณะได้รายงานฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากใบเฉาก๊วยว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.51 ± 0.19 mg/mL[8] ซึ่งต่ำกว่าผลจากการศึกษาในงานวิจัยนี้ประมาณ 2 เท่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดและแหล่งที่มาของตัวอย่างที่แตกต่างกัน

ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมในสารสกัดใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย พบว่าปริมาณของฟีนอลิครวมในสารสกัดขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ไม่ได้แปรผันกับสภาพขั้วของตัวทำละลาย โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิครวมที่สกัดได้จากพืชทั้งสองชนิดมีแนวโน้มในทางเดียวกันคือ การสกัดด้วยน้ำร้อนพบปริมาณฟีนอลิครวมสูงที่สุด รองลงมาคือน้ำ ส่วนการสกัดด้วยเอทานอล เฮกเซน อะซีโตน และเอทิลอะซีเตทพบปริมาณฟีนอลิครวมที่น้อยกว่าอย่างชัดเจน โดยเอทิลอะซิเตทเป็นตัวสกัดฟีนอลิครวมที่แย่ที่สุด

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับปริมาณฟีนอลิครวมของพืชทั้งสองชนิด พบว่าไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ชัดเจน ทั้งนี้โดยทั่วไปแล้วสารสกัดที่พบปริมาณฟีนอลิครวมสูง ควรที่จะมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีด้วย แต่จากผลที่ได้ไม่เป็นไปตามที่คาดหมาย นั่นแสดงว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของพืชทั้งสองชนิดอาจเป็นผลมาจากสารประกอบชนิดอื่นเป็นหลัก นอกเหนือจากสารประกอบจำพวกฟีนอลิค ดังที่มีการรายงานในงานวิจัยอื่นๆก็พบเช่นเดียวกันว่าฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของฟีนอลิครวม[14,15,16]

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาปริมาณของสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกันกับสารประกอบฟีนอลิค พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากทั้งใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายในการสกัด และมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน โดยพบว่าการใช้น้ำ น้ำร้อน และเฮกเซน จะสามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์ออกมาได้ปริมาณสูงกว่าการใช้เอทานอล อะซีโตน และเอทิลอะซีเตท

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัด พบว่าไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นต่อกันเช่นเดียวกับกรณีของฟีนอ-ลิครวม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดมีความซับซ้อนประกอบด้วยสารหลายชนิด รวมทั้งสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีโครงสร้างหลากหลาย แต่เป็นที่ทราบกันดีว่ามีสารประกอบฟลาโวนอยด์บางชนิดที่มีโครงสร้างเฉพาะเท่านั้นที่จะสามารถให้โปรตอน และแสดงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้[17,18]

จากการศึกษาสรุปได้ว่าน้ำร้อนเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารออกฤทธิ์ทั้งสารประกอบฟีนอลิครวมและฟลาโวนอยด์จากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย อีกทั้งสารสกัดจากการใช้น้ำร้อนยังให้ค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น นั่นคือการสกัดด้วยน้ำร้อนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี และสอดคล้องกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลลิคและฟลาโวนอยด์ที่ถูกสกัดออกมาได้มาก ในขณะที่การสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นไม่พบความสอดคล้องที่ชัดเจน ซึ่งการที่น้ำร้อนมีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดสารเคมีเหล่านี้จากพืชก็ถือเป็นข้อดีกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เนื่องจากไม่เป็นพิษต่อร่างกายผู้บริโภค

ในงานวิจัยนี้ไม่ได้วิเคราะห์โครงสร้างของสารเคมีที่พบในพืชทั้งสองชนิดนี้ และไม่ได้ระบุชนิดของสารเคมีในสารสกัดเมื่อใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิด ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าตัวทำละลายแต่ละชนิดสามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระชนิดใดออกมาได้บ้าง ซึ่งสามารถทำการศึกษาต่อได้ในอนาคตโดยการแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี และตรวจวัดด้วยแมสสเปคโทรเมตรีหรือ NMR รวมทั้งอาจทำการทดสอบฤทธิ์ทางยาของสารแต่ละชนิดที่แยกได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2555 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ และขอขอบคุณ ดร.พร้อมสิน มาศรีนวล และ ดร.สุเชาวน์ ดรพุดทรา สำหรับความช่วยเหลือตลอดงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Foster M, Hunter D, Samman S. Evaluation of the nutritional and metabolic effects of *Aloe vera*. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; Chapter 3, 2011.

2. Jadhav RB, Sonawane DS, Surana SJ. Cytoprotective effects of crude polysaccharide fraction of *Abelmoschus esculentus* fruits in rats. Pharmacogn Mag 2008; 4: 130-132.
3. Chatchawal C, Nualkaew N, Preeprame S, Porasuphatana S, Priprame A. Physical and biological properties of mucilage from *Basella alba* L. stem and its gel formulation. IJPS 2010; 6: 104-112.
4. Mandade R, Sreenivas SA, Sakarkar DM, Choudhury A. Radical scavenging and antioxidant activity of *Hibiscus rosasinensis* extract. Afr J Pharm Pharacol 2011; 5: 2027-2034.
5. Bafna A, Mishre S. Antioxidant and immunomodulatory activity of the alkaloidal fraction of *Cissampelos pareira* Linn. Sci Pharm 2010; 78: 21-31.
6. Kupachan SM, Patel AC, Fujita E. Cissampareine, new cytotoxic alkaloid from *Cissampelos pareira*. Cytotoxicity of bisbenzylisoquinoline alkaloids. J Pharm Sci 1965; 54: 580-583.
7. จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก. สมุนไพรบำบัดเบาหวาน. โรงพิมพ์ เซเว่น พริ้นติ้ง กรุ๊ป จำกัด. กรุงเทพมหานคร. 2548.
8. Lai LS, Chou ST, Chao WW. Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl) Leaf Gum. J Agric Food Chem 2001; 49: 963-968.
9. Hung CY, Yen GC. Antioxidant activity of phenolic compounds isolated from *Mesona procumbers* Hemsl. J Agric Food Chem 2002; 50: 2993-2997.
10. Cam M, Hisil H, Durmaz G. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. Food Chem 2009; 112: 668-673.
11. Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Rahmat A. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Molecules 2010; 15: 4324-4333.
12. Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik SE, Bektasoglu B, Berker KI, Özyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules 2007; 12: 1496-1547.
13. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem 2005; 53: 4290-4302.
14. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh ML. Antioxidant Activity, phenol and flavonoid content of 13 citrus species peels and tissues. Pak J Pharm Sci 2009, 22: 277-281.
15. Heinonen IM, Lehtonen PJ, Hopia AI. Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. J Agric Food Chem 1998; 46: 25-31.
16. Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Boskou D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). Food Chem 2006; 94: 19-25.
17. Mensor LL, Menezes FS, Leitao GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS, Leitao SG. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. Phytother Res 2001; 15: 127-130.
18. Hou WC, Lin RD, Cheng KT, Hung YT, Cho CH, Chen CH, Hwang SY, Lee MH. Free radical scavenging activity of Taiwanese native plants. Phytomedicine 2003; 10: 170-175.