การตรวจสอบสมบัติของการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร

(Detection of the Antioxidant Properties of Herb Extracts)

สุชาดา มานอก*

*สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา 1061 ซอยอิสรภาพ 15 ถนนอิสรภาพ แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกและตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 18 ชนิด โดยนำพืชตัวอย่าง น้ำหนัก 100 กรัม มาสกัดด้วยเอทานอลและนำสารสกัดหยาบที่ได้มาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน จากนั้นทำการสกัดด้วยวิธีการแบ่งละลาย (partition) โดยทำการแยกสารด้วยน้ำกลั่นแล้วนำส่วนแรกมาสกัดด้วยเอทิลแอซิเตตและส่วนที่สองสกัดโดยใช้บิวทา-นอล จากนั้นทำสารสกัดให้แห้งด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศนำไปตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay และตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu จากการศึกษาพบว่าสมุนไพรที่แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด คือ ใบมะม่วงหิมพานต์ ดอกกระเจี๊ยบ และใบยอ ที่ IC_{50} = 10.175, 77.625 และ 457.088 ppm ตามลำดับ และสมุนไพรที่แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด คือ ใบมะม่วงหิมพานต์ ใบยอ และ ฝักเพกา ที่ปริมาณ 747.667, 580.000 และ 84.333 ppm ตามลำดับ จากผลการวิจัยสรุปได้ว่าใบมะม่วงหิมพานต์มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงพอที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้

คำสำคัญ: อนุมูลอิสระ/ สารต้านอนุมูลอิสระ/ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

Abstract

The aims of this study were to screen and determine antioxidant property of the extraction from 18 herbal species. Each 100 grams sample was extracted by ethanol and then crude extracts divided into 2 groups. Both groups used partition method, the first group used ethyl acetate and second group used butanol as solvent. To separate active ingredient leaving, distilled water was used. The last extraction was dried by rotary evaporator and then screen antioxidant by DPPH assay and tested amount of phenolic compound by Folin-Ciocalteu method. This study found good antioxidant herbs, which were leaf of *Anacardium occidentale* L., flower of *Hibiscus sabdariffa* L. and leaf of *Morinda citrfolia* L. with IC_{50} = 10.715, 77.625 and 457.088, respectively. The high amounts of total phenolic compounds were leaf of *Anacardirm occidentale* L., leaf of *Morinda citrfolia* L. and fruit peel of *Oroxylum indicum* (L.) Kurz. with 747.667, 580.000 and 84.333 ppm, respectively. In conclusion, leaf of *Anacardium occidentale* Linn. has the highest antioxidant activity, even phenolic compound may not represent antioxidant activity.

Keywords: Free Radical/ Antioxidant/ Total Phenolic Compound

บทนำ

ปัจจุบันองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) สนับสนุนให้ประชากรโลกมุ่งสร้างสุขภาวะ คือ การมีสุขภาพที่สมดุลทั้ง 5 ด้าน คือ ด้านกาย ด้านใจ ด้านสังคม ด้านปัญญา และด้านจิตวิญญาณ โดยเน้นใช้ภูมิปัญญาการดูแลสุขภาวะระดับท้องถิ่นนั้นๆ ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลกพบว่า อัตราผู้เสียชีวิตทั่วโลก ร้อยละ 70 ของคนเหล่านี้ มีสาเหตุมาจากโรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคเบาหวาน โรคเกี่ยวกับหลอดเลือด และโรคอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น โรคพาร์กินสัน โรคอัลไซเมอร์ และโรคชรา ซึ่งล้วนแต่มีสาเหตุมาจากการที่อนุมูลอิสระ (free radical) ที่เกิดขึ้นภายในร่างกายเข้าไปทำลายสารชีวโมเลกุลที่สำคัญ เป็นผลทำให้เกิดพยาธิสภาพในร่างกายและนำมาซึ่งโรคต่างๆ ขึ้น โดยปกติร่างกายจะมีกลไกควบคุมอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับที่พอเหมาะ ด้วยเอนไซม์ซูเพอร์-ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase, SOD)และเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) เป็นต้น ปัจจุบันพบว่าอนุมูลอิสระภายในร่างกายเกิดในระดับสูงขึ้น เนื่องจากการเปลี่ยนไปของสภาวะแวดล้อม ความเครียดที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ร่างกายไม่สามารถควบคุมอนุมูลอิสระเหล่านี้ให้อยู่ในระดับที่พอเหมาะได้ ดังนั้นการหาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติในท้องถิ่นซึ่งสามารถนำไปชะลอหรือป้องกันการเกิดโรคร้ายต่างๆ ดังที่

กล่าวมาแล้วจึงได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน

ประเทศไทยเป็นอีกประเทศหนึ่งที่ให้ความสำคัญกับการมีชีวิตอยู่โดยการมีสุขภาพร่างกายที่สมบูรณ์ เนื่องจากอุดมไปด้วยพืชพรรณนานาชนิด และมีสมุนไพรที่หลากหลายแตกต่างกันออกไป ในปัจจุบันพืชสมุนไพรกำลังได้รับความนิยมในการนำมาใช้เป็นส่วนผสมสำหรับอุปโภคและบริโภคเพื่อสุขภาพเพิ่มมากขึ้น อาทิเช่น ไอศกรีม ขนม ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว เป็นต้น อีกทั้งยังเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งอาจทำให้อนาคตของตลาดสินค้าด้านเครื่องเทศและสมุนไพรในแถบทวีปเอเชียมีแนวโน้มจะขยายตัวอย่างต่อเนื่อง วิถีชีวิตของคนไทยนิยมใช้สมุนไพรในรูปแบบของสรรพคุณแผนโบราณ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสมุนไพรที่อยู่ในท้องถิ่นทั่วๆ ไป แต่เดิมได้นำมาใช้ในรูปของสมุนไพรสดและสมุนไพรแห้ง แล้วพัฒนาขึ้นเป็นยาเตรียมแบบง่ายชนิดต่างๆ ขึ้น ปัจจุบันได้มีการผลิตยาที่มีรูปแบบน่าใช้และให้ผลการรักษาที่แน่นอน จึงได้มีการสกัดสารสำคัญในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามาใช้เป็นยาในรูปของสารบริสุทธิ์ งานวิจัยนี้ได้ตระหนักถึงการพิสูจน์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ของสมุนไพรที่นิยมใช้กันทั่วไปในท้องถิ่น ซึ่งสมุนไพรที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นหรือที่ใช้กันเป็นประจำในบางชนิดก็ยังไม่ได้รับการพิสูจน์ฤทธิ์ของสมุนไพรโดยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในร่างกายนั้นไม่เพียงพอ และเนื่องจากปัจจัยที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้หลายทางทั้งภายในร่างกายจากกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolism) อนุมูลอิสระที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกาย เช่น ควันบุหรี่ รังสี โอโซน ควันจากโรงงานอุตสาหกรรมหรือรถยนต์ รวมไปถึงสภาวะความเครียดหรือพยาธิสภาพของการมีไข้เป็นผลให้ร่างกายผลิตอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น และส่งผลให้กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระในร่างกายไม่สามารถควบคุมอนุมูลอิสระเหล่านี้ให้อยู่ในระดับที่พอเหมาะหรือระดับปกติได้ ผลลัพธ์คือจะเกิดภาวะที่เรียกว่า ภาวะถูกออกซิไดส์เกินสมดุล (oxidative stress) ขึ้นมาซึ่งจะส่งผลกระทบต่างๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตและทำให้เกิดโรคต่างๆ ตามมา ดังนั้นจึงมีการแสวงหาสารที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระใหม่ๆ จากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ และสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งสามารถนำไปชะลอหรือป้องกันการเกิดโรคต่างๆ

เนื่องจากพืชสมุนไพรในท้องถิ่นแต่ละชนิดมีสมบัติเฉพาะตัวและมีสารสำคัญต่างๆ มากมายที่ให้คุณประโยชน์ที่แตกต่างกันออกไป โดยเฉพาะสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งส่วนใหญ่กลุ่มสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะเป็นกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) เป็นส่วนใหญ่ เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) กรดคาเฟอิก (cafeic acid) และแทนนิน (tannin) เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกโดย

วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีจากสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 20 ตัวอย่าง และทำการคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรจากออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเพื่อนำมาตรวจสอบปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดในรูปของสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic) โดยใช้วิธี DPPH assay เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำสารสกัดสมุนไพรเหล่านี้ไปศึกษาต่อในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น เภสัชกรรม อาหารเสริมสุขภาพ และเครื่องสำอาง ซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร 18 ชนิด จากจังหวัดกรุงเทพมหานคร (ตารางที่ 1) แล้วเตรียมเป็นตัวอย่างทดสอบจำนวน 20 ตัวอย่าง นำมาบด และชั่งแต่ละตัวอย่างปริมาณ 100 กรัม ไปแช่เอทานอล 300 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน กรอง และระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศ นำสารสกัดจากแต่ละชนิดที่ได้จำนวน 1 กรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง และบิวทานอล 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ตามลำดับ เก็บสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศ และคำนวณหาค่าร้อยละผลผลิต (% yield) ของสารที่สกัดได้ต่อน้ำหนักของพืชสมุนไพร ดังแสดงในตารางที่ 1

2. ศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีและทำการตรวจสอบด้วย DPPH

นำสารสกัดจากเอทิลแอซิเตตและบิวทานอล ทั้งหมด 20 ตัวอย่างมาเจือจางด้วยไดคลอโรมีเทน แล้วนำมาหยดลงบนแผ่น TLC ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร นำไปแช่ลงในระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของแต่ละตัวอย่าง จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำแผ่น TLC ที่เตรียมได้ไปตรวจด้วยแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร บันทึกผลที่สังเกตเห็นได้ จากนั้นนำไปทดสอบ DPPH โดยพ่นสารละลายของ 2, 2 – Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งมีสีม่วงเข้ม ลงบนแผ่น TLC ให้ทั่ว ทิ้งไว้ให้แห้ง บันทึกการฟอกจางสี ซึ่ง ณ ตำแหน่งของสารใดก็ตามที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจะปรากฏการฟอกจางสีบนพื้นสีม่วง ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 แล้วคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่ฟอกจางสีของ DPPH ได้ค่อนข้างดีถึงดีมากไปทำการทดสอบเชิงปริมาณวิเคราะห์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระต่อไป

3. การทดสอบเชิงปริมาณวิเคราะห์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี DPPH Assay

นำสารสกัดสมุนไพรที่คัดเลือกแล้วมาเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นต่างกัน โดยให้มีความเข้มข้นในช่วง 10 - 1000 ppm จากนั้นเติมสารละลาย Methanolic DPPH radical เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ จำนวน 9

มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ (ใช้สารละลายแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร) เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่องยูวี-สเปกโตรโฟโทมิเตอร์ (UV-spectrophotometer)จากนั้นทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น หาค่าเฉลี่ย และนำมาคำนวณหา % Radical scavenging จากผลที่ได้นำมาหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระในหลอดทดลองได้ร้อยละ 50 (50% Inhibitory concentration, IC_{50}) ดังแสดงในตารางที่ 4

4. การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's reagent

นำสารสกัดสมุนไพรที่คัดเลือกแล้วมาเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้น 1,000 ppm ปิเปตสารละลายที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมร้อยละ 7 ของโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และ Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ยูวี-สเปกโตรโฟโทมิเตอร์ จากนั้นทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น แล้วหาค่าเฉลี่ย คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดพืชสมุนไพร

จากผลการศึกษาปริมาณร้อยละของสารสกัดเอทิลแอซิเตตและบิวทานอลในสมุนไพรแต่ละชนิด พบว่าเมื่อทำการสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดด้วยวิธีการสกัดโดยการแบ่งส่วนการละลายโดยใช้ของเหลวละลายในของเหลว (liquid-liquid partition) พบว่าสารสกัดตะไคร้หอมในตัวทำละลายเอทิลแอซิเตตให้สารสกัดร้อยละ 38.998 ซึ่งมากที่สุด และสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบในตัวทำละลายบิวทานอลให้ร้อยละของสารสกัดร้อยละ 44.771 ซึ่งมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาปริมาณของสารสกัดเอทิลแอซิเตตและบิวทานอล ในสมุนไพรแต่ละชนิด

ลำดับที่	สมุนไพร	วงศ์	ร้อยละของสารสกัด		สี
			เอทิล แอซิเตต	บิวทานอล	
1	กระเจี๊ยบ (ดอก)	MALVACEAE	33.721	44.771	สีแดง
2	กระเจี๊ยบ (ใบ)	MALVACEAE	13.832	27.944	สีเขียว
3	ตะไคร้หอม	GRAMINEAE	38.998	14.735	สีเขียวอมเหลือง
4	เตยหอม	PANDANACEAE	20.200	8.300	สีเขียว
5	ฝรั่ง (ใบ)	MYRTACEAE	30.222	33.456	สีโอรส
6	ฝรั่ง (ผล)	MYRTACEAE	3.906	13.533	สีน้ำตาลเข้ม
7	เพกา	BIGNONIACEAE	6.422	20.459	สีน้ำตาล
8	มะม่วงหิมพานต์	ANACARDIACEAE	34.853	29.440	สีน้ำตาลแดง
9	ตะลิงปลิง	OXALIDACEAE	11.200	16.900	สีขาวขุ่น
10	ยอ	RUBIACEAE	15.784	24.276	สีเขียว
11	บัวหลวง	NELUMBONACEAE	19.186	34.842	สีเหลืองแกมน้ำตาล
12	บัวบก	UMBELLIFERAE	10.488	10.307	สีเขียวเข้ม
13	ตำลึง	CUCURBITACEAE	16.184	11.844	สีเขียวเข้ม
14	ผักหวาน	EUPHORBIACEAE	17.861	6.379	สีเขียวเข้ม
15	สะระแหน่	LABIATAE	15.185	14.685	สีเขียว
16	แมงลัก	LABIATAE	18.100	11.800	สีเขียวเข้ม
17	สะเดา	MELIACEAE	18.600	5.900	สีเขียวเข้ม
18	ขจร	ASCLEPIADACEAE	11.162	5.855	สีเขียว
19	พริกหวาน	SOLANACEAE	4.806	9.889	สีแดง
20	เสม็ดแดง	MYRTACEAE	25.143	22.857	สีน้ำตาลเข้มแกมแดง

2. สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบเคมีที่แยกโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีและทำการตรวจสอบด้วย DPPH

เมื่อนำสารสกัดเอทิลแอซิเตตและบิวทานอลในสมุนไพรแต่ละชนิดมาศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารเคมีที่แยกโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และทำการตรวจสอบด้วย DPPH จากนั้นบันทึกผลที่ได้ด้วยคลื่นแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร รวมทั้งทำการตรวจสอบด้วย DPPH และ R_f ของแต่ละส่วนที่แยกได้โดยสังเกตความเข้มของสีเหลืองที่ปรากฏบนทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ให้ความเข้มของสีเหลืองที่มากที่สุดมีค่าเท่ากับ +++++ ความเข้มของสีเหลืองที่มากมีค่าเท่ากับ ++++ ความเข้มของสีเหลืองที่ปานกลางมีค่าเท่ากับ +++ ความเข้มของสีเหลืองน้อยมีค่าเท่ากับ ++ ความเข้มของสีเหลืองที่น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ + และไม่ปรากฏสีเหลืองมีค่าเท่ากับ – ให้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 2 และ 3 โดยในตารางจะแสดงเฉพาะลำดับของจุดที่ปรากฏบนว่ามีการแสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเท่านั้น

ตารางที่ 2 ผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทิลแอซิเตตของสมุนไพร

ลำดับที่	สมุนไพร	การตรวจสอบด้วยแสง UV ที่ 254 nm		การตรวจสอบด้วยแสง UV ที่ 365 nm	การต้านอนุมูลอิสระ DPPH
		ลำดับส่วนที่แยกได้ (Fraction)	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้ (R_f)		
1	สะระแหน่	8	0.1250	สีแดง	+
		9	0.0750	สีแดง	++
2	ผลฝรั่ง	-	-	-	-
3	ใบฝรั่ง	6	0.3125	สีแดง	+
		9	0.0750	สีแดง	+
4	เพกา	6	0.1500	-	+++++
5	ตะไคร้หอม	2	0.7500	สีแดง	+++
		7	0.2250	สีแดง	+
		9	0.1000	สีฟ้า	+
6	ใบกระเจี๊ยบ	5	0.1000	สีแดง	++
		6	0.3750	-	++
7	ขจร	4	0.3750	-	+
		7	0.0625	-	+
		8	0.0375	-	+
8	ตำลึง	5	0.3750	สีแดง	+
9	เสม็ดแดง	-	-	-	-
10	สะเดา	4	0.1000	-	+
11	ยอ	2	0.5000	สีฟ้า	+++
		4	0.1125	-	++
		5	0.0375	-	+++++
12	บัวหลวง	-	-	-	-
13	ผักหวานบ้าน	-	-	-	-
14	มะม่วงหิมพานต์	4	0.5000	-	+++++
15	แมงลัก	6	0.3250	-	+++
		9	0.1000	สีแดง	+
16	พริกหวาน	1	0.8750	สีฟ้า	+++++
17	ตะลิงปลิง	-	-	-	-
18	บัวบก	-	-	-	-
19	เตย	-	-	-	-
20	ดอกกระเจี๊ยบ	6	0.1250	-	++++
		7	0.0875	-	++++

ตารางที่ 3 ผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดบิวทานอลของสมุนไพร

ลำดับที่	สมุนไพร	การตรวจสอบด้วยแสง UV ที่ 254 nm		การตรวจสอบด้วยแสง UV ที่ 365 nm	การต้านอนุมูลอิสระ DPPH
		ลำดับส่วนที่แยกได้ (Fraction)	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้ (R_f)		
1	สะระแหน่	-	-	-	-
2	ผลฝรั่ง	-	-	-	-
3	ใบฝรั่ง	-	-	-	-
4	เพกา	2	0.1000	-	+
5	ตะไคร้หอม	-	-	-	-
6	ใบกระเจี๊ยบ	-	-	-	-
7	ขจร	-	-	-	-
8	ตำลึง	-	-	-	-
9	เสม็ดแดง	-	-	-	-
10	สะเดา	-	-	-	-
11	ยอ	-	-	-	-
12	บัวหลวง	-	-	-	-
13	ผักหวานบ้าน	-	-	-	-
14	แมงลัก	-	-	-	-
15	มะม่วงหิมพานต์	3	0.5625	-	+
16	พริกหวาน	-	-	-	-
17	ตะลิงปลิง	-	-	-	-
18	บัวบก	3	0.0375	สีเขียว	+
19	เตย	-	-	-	-
20	ดอกกระเจี๊ยบ	-	-	-	-

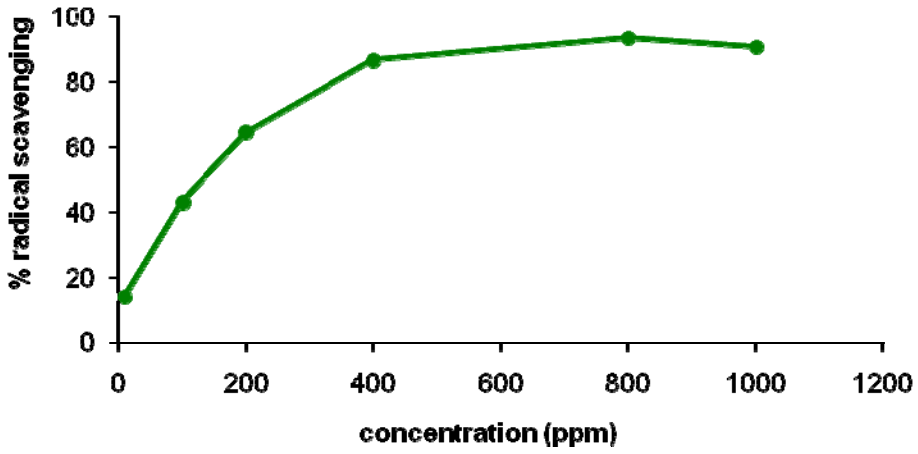
จากผลการทดลอง พบว่ามีสารสกัดเอทิลแอซิเตตจากสมุนไพรทั้งหมด 5 ชนิดที่ให้ผลการต้านอนุมูลอิสระมากและมากที่สุดเมื่อตรวจสอบด้วย DPPH ได้แก่ เพกา ยอ มะม่วงหิมพานต์ พริกหวาน และ ดอกกระเจี๊ยบ ส่วนสารสกัดบิวทานอลจากสมุนไพรทั้ง 20 ตัวอย่างนั้นไม่ปรากฏการต้านอนุมูลอิสระเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นเราจึงคัดเลือกสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดนี้ไปทำการทดสอบเชิงปริมาณวิเคราะห์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระต่อไป

3. ผลการทดสอบเชิงปริมาณวิเคราะห์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี DPPH Assay

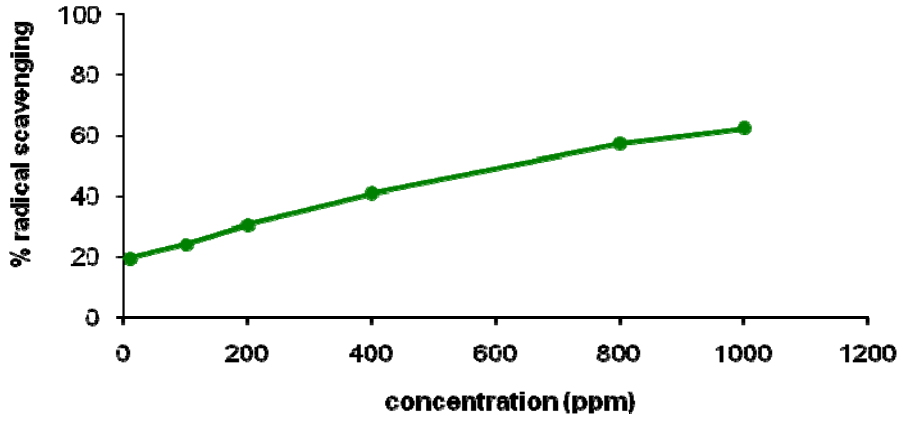
จากผลการตรวจสอบปริมาณวิเคราะห์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด พบว่าสารสกัดสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด คือ มะม่วงหิมพานต์, ดอกกระเจี๊ยบ ยอ เพกา และพริกหวาน โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถทำให้อนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) อยู่ที่ 10.715, 77.625, 457.088, 537.032 และ 1,230.269 ppm ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพร และ สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

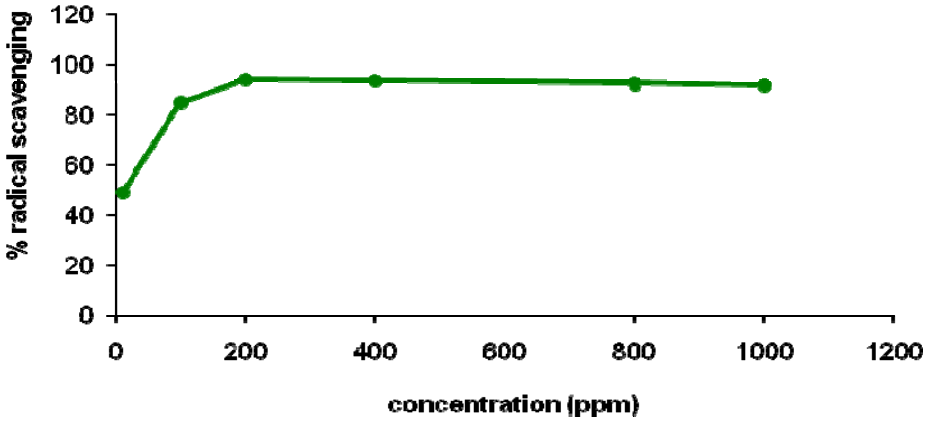
ตัวอย่าง	ค่าความเข้มข้นที่สามารถทำให้ความเข้มของ DPPH ลดลง ร้อยละ 50 (IC_{50} ; ppm)
กรดแอสคอร์บิก	9.772
ดอกกระเจี๊ยบ	77.625
เพกา	537.032
มะม่วงหิมพานต์	10.715
ยอ	457.088
พริกหวาน	1,230.269



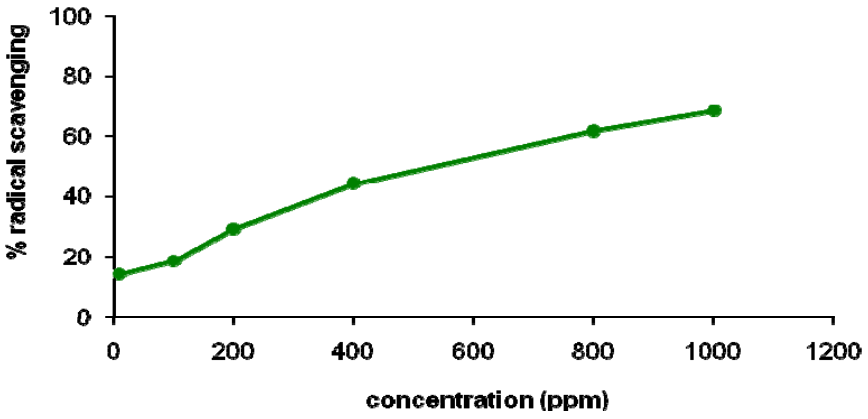
ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดดอกกระเจี๊ยบกับร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



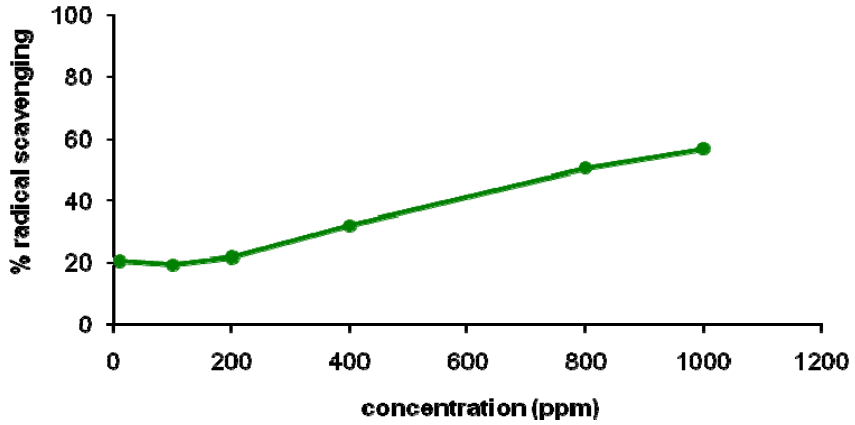
ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเพกา
กับร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดมะม่วงหิมพานต์
กับร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



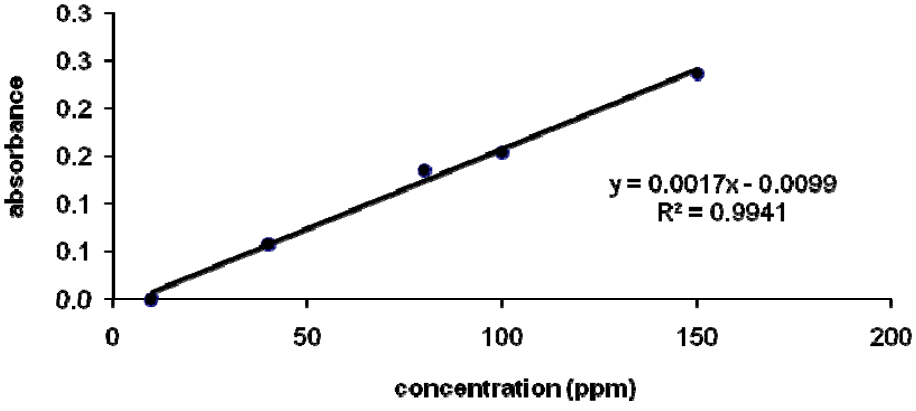
ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดยอ
กับร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดพริกหวาน กับร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4. ผลการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's reagent

เมื่อนำสารสกัดของสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ทั้ง 5 ชนิด ไปตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณกรดฟีนอลิกมากที่สุด คือ มะม่วงหิมพานต์ ยอ เพกา ดอกกระเจี๊ยบ และพริกหวาน โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดแต่ละชนิดมีค่าเท่ากับ 747.667, 580.000, 84.333, 74.000 และ 45.333 ppm ตามลำดับ



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นต่างๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาการสกัดพืชสมุนไพร พบว่าปริมาณร้อยละของสารสกัดเอทิลแอซิเตตของตะไคร้หอม มีปริมาณของสารสกัดมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 38.998 สำหรับปริมาณของสารสกัดบิวทานอลของดอกกระเจี๊ยบ มีปริมาณของสารสกัดมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 44.771 จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดจากพืชสมุนไพรส่วนใหญ่จะละลายได้ดีในตัวทำละลายจำพวกเอทิลแอซิเตต ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วค่อนข้างปานกลาง ทำให้ทราบเบื้องต้นได้ว่าสารสำคัญในพืชสมุนไพรนั้นส่วนใหญ่เป็นสารที่มีขั้ว

สำหรับการศึกษา TLC Screening for Radical Scavengers ของพืชสมุนไพร พบว่า สารสกัดเอทิลแอซิเตตของดอกกระเจี๊ยบ เพกา มะม่วงหิมพานต์ ยอ และพริกหวาน แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ส่วนสารสกัดเอทิลแอซิเตตของตะไคร้หอม ใบกระเจี๊ยบ แมงลัก สะระแหน่ ใบฝรั่ง ขจร ตำลึง และสะเดา แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระได้น้อย ส่วนสารสกัดเอทิลแอซิเตตจากพืชสมุนไพรที่เหลือไม่แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเลย สำหรับสารสกัดบิวทานอลของเพกา มะม่วงหิมพานต์ และบัวบก แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระได้เพียงเล็กน้อย และสารสกัดบิวทานอลจากพืชสมุนไพรที่เหลือไม่แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สารสกัดเอทิลแอซิเตตของดอกกระเจี๊ยบ เพกา มะม่วง หิมพานต์ ยอ และพริกหวาน มีสารสำคัญที่แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด เพราะทำปฏิกิริยากับ DPPH radical โดยปรากฏการฟอกจางสีบนแผ่น TLC

เมื่อตรวจสอบปริมาณวิเคราะห์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดมะม่วงหิมพานต์ ดอกกระเจี๊ยบ ยอ เพกา และพริกหวาน พบว่าค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถทำให้ความเข้มของ DPPH ลดลง ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มีค่าเท่ากับ 10.715, 77.625, 457.088, 537.032 และ 1,230.269 ppm ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดมะม่วงหิมพานต์ แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณมากที่สุด สำหรับสารสกัดพริกหวานจะแสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณน้อยที่สุด แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิกแล้วสารสกัดของสมุนไพรทั้งหมดนั้นยังคงแสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่า จากการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ของสารสกัดทั้ง 5 ชนิด คือ มะม่วงหิมพานต์ ยอ เพกา ดอกกระเจี๊ยบ และพริกหวาน พบว่ามะม่วงหิมพานต์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด และพริกหวานมีสารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุด

ตารางที่ 5 สรุปผลของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดที่แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

ลำดับที่	สารสกัด	IC_{50} (ppm)	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (ppm)
1	มะม่วงหิมพานต์	10.715	747.667
2	ดอกกระเจี๊ยบ	77.625	74.000
3	ยอ	457.088	580.000
4	เพกา	537.032	84.333
5	พริกหวาน	1,230.269	45.333

จากผลการวิจัยสามารถสรุปได้ว่า เมื่อทดสอบสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรทั้งหมด 20 ตัวอย่าง (18 ชนิด) พบว่าสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดจาก 20 ตัวอย่าง มี 5 ตัวอย่าง ดังนี้คือ มะม่วงหิมพานต์ ดอกกระเจี๊ยบ ยอ เพกา และพริกหวาน โดยสมุนไพรทั้ง 5 ตัวอย่างนี้ให้ปริมาณสาร-ประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สอดคล้องกับค่าการออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) ยกเว้นดอกกระเจี๊ยบ ซึ่งจากผลการทดลองนี้จึงสามารถบอกได้ว่ากลุ่มสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะม่วง หิมพานต์ ยอ เพกา และพริกหวาน นั้นส่วนใหญ่จะเป็นสารในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก สำหรับสารสกัดดอกกระเจี๊ยบที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกน้อยแต่ให้ผลการต้านอนุมูลอิสระที่มาก แสดงว่าอาจจะเป็นสารในกลุ่มอื่นๆ ที่ไม่ใช่สาร-ประกอบฟีนอลิกที่แสดงผลในการต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารอ้างอิง

Melo, E.A., Lúcia, V., Lima, A.G. and Maciel, M.I.S. (2006). Polyphenol, Ascorbic Acid and Total Carotenoid Contents in Common Fruits and Vegetables. **Braz. J. Food Technol.** 9(2): 89-94.

Habila, J. D., Bello, I. A., Dzikwi, A. A., Musa, H. and Abubakar, N. (2010). Total phenolics and antioxidant activity of *Tridax procumbens* Linn. **Afr. J. Pharm. Pharmacol.** 4(3): 123-126.

Veeru1, P., Kishor, M.P. and Meenakshi, M. (2009). Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. **J. Med. Plant. Res.** 3(8): 608-612.

Ramli, S., Bunrathep, S., Tansaringkarn, T. and Ruangrungsi, N. (2008). Screening for Free Radical Scavenging Activity from Ethanolic Extract of Mimosaceous Plants Endemic to Thailand. **J. Health Res.** 22(2): 55-59.