



มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร
Kasetsart University
Chalermphrakiat Sakon Nakhon Province

"INNOVATION AND TECHNOLOGY FOR QUALITY
OF LIFE AND SUSTAINABLE SOCIETY"

KU KASETSART
UNIVERSITY

การประชุมวิชาการระดับชาติ
งานเกษตรแฟร์บนทรีอีสาน ครั้งที่ 5
26 พฤศจิกายน 2560

■ เรื่องเต็ม Proceeding

“นวัตกรรมและเทคโนโลยีเพื่อคุณภาพชีวิตและสังคมที่ยั่งยืน”

“INNOVATION AND TECHNOLOGY FOR QUALITY
OF LIFE AND SUSTAINABLE SOCIETY”

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร
KASETSART UNIVERSITY CHALERMPHRAKIAT SAKON NAKHON PROVINCE CAMPUS

ISBN: 978-616-278-421-7



www.csc.ku.ac.th

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดควายแก้วแม่ (*Hiptagecandicans* Hook.f.)

Antioxidant Activity of *Hiptagecandicans* Hook.f. Extract

สุรางค์รัตน์ พันแสง^{1*}, พวงผกา แก้วกรม¹, ปอแก้ว พรหมเพชร¹,

สมเพียร พักทอง¹ และแสงจันทร์ สอนสว่าง¹

Surangrat Punsang^{1*}, Puangpaka Kaewkrom¹, Pokaew Promphet¹,

Sompian Fagtong¹ and Sangjan Sonswang¹

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากส่วนใบ ราก และลำต้นของควายแก้วแม่ โดยสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 50% การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical โดยใช้ Butylatedhydroxytoluene (BHT) เป็นสารมาตรฐาน ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดจากส่วนของรากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด (IC_{50} เท่ากับ 0.1427 ± 0.0015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใช้วิธี Folin-Ciocalteu's วัดปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมด และใช้วิธี Colorimetric assay วัดปริมาณฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ของสารสกัดจากส่วนของรากมีปริมาณมากที่สุด ปริมาณสารฟีนอลิก เท่ากับ 20.08 ± 0.75 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 13.72 ± 0.44 มิลลิกรัมสมมูลของเคเทเคตินต่อกรัมของสารสกัด ผลการวิจัยบ่งชี้ถึงสารสกัดที่มีปริมาณ ฟีนอลิกสูงจะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี สรุปผลการวิจัยพบว่าสารสกัดจากส่วนของรากของควายแก้วแม่ จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติและอาจใช้ในการรักษาโรคอันเกิดจากอนุมูลอิสระที่ถูกทำลายได้

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ควายแก้วแม่

¹หลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

¹Biology Program, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University

* Corresponding author; e-mail address: surangrat_aejung@hotmail.com

Abstract

The objective of research was to study an antioxidant activities and Chemical composition of extracts from leave, root and stem of *Hiptagecandicans* Hook.f.. It was extract of 50% ethanol. The study an antioxidant properties using Butylatedhydroxytoluene (BHT) as standard compound. The result revealed that ethanolic extract of root exhibited the most potent activity (IC_{50} value was 0.1427 ± 0.0015 mg/ml). The Folin-Ciocalteu's method was used for the total phenolics determination and the Colorimetric assay was used for the flavonoids. Total phenolic compound and flavonoids of ethanolic extract of root was the strongest, which was 20.08 ± 0.75 mg GAE/g crude extract for total phenolics and 13.72 ± 0.44 mg CE/g crude extract for flavonoids. The results indicated that the extract was the high total phenolic compound, its was good antioxidant activity. The conclusion of results indicated that *Hiptagecandicans* Hook.f. Extract especially the ethanolic extract from root, could be considered as natural antioxidant and may be useful for curing diseases arising from oxidative damage.

Keywords: Antioxidant Activity, *Hiptagecandicans* Hook.f.

บทนำ

จากสภาพเศรษฐกิจสังคมและสิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน ส่งผลให้ประชากรมีพฤติกรรมเลียนแบบการบริโภคและวิถีการดำรงชีวิตที่คล้ายคลึงกับสังคมตะวันตกมากขึ้น ก่อให้เกิดปัญหาที่ตามมา เช่น ผนังหลอดเลือดแข็งตัว เกิดการอักเสบ การทำลายเนื้อเยื่อ ความเสื่อมชราของร่างกาย และก่อให้เกิดการกลายของเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคอ้วน โรคหัวใจ หลอดเลือด โรคข้ออักเสบ และโรคมะเร็ง เป็นต้น ร่างกายมนุษย์ใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึม ถือเป็นกระบวนการเผาผลาญสารอาหารในร่างกายของสิ่งมีชีวิตและเป็นผลให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจน ในสภาพปกติร่างกายจะมีระบบควบคุมป้องกันอนุมูลอิสระที่เรียกว่า “ระบบแอนติออกซิแดนซ์ (Antioxidant defense system)” แต่ถ้าร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติได้ เรียกว่า “เกิดภาวะความเครียดของออกซิเจน (Oxidative stress)” โดยอนุมูลอิสระที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ก่อให้เกิดความเสียหายและเป็นอันตรายต่อร่างกาย และนำไปสู่การก่อการกลาย ดังนั้นการใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกซิแดนซ์จะช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ได้ สารต้านอนุมูลอิสระมีอยู่เป็นจำนวนมากทั้งที่มีอยู่ในธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ขึ้น จากการศึกษาพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) สารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) (Rice-Evans *et al.*, 1996) ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่เป็น secondary metabolize ที่พบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดควายเก่าแม่ ซึ่งพืชชนิดนี้เป็นพืชที่หาได้ในท้องถิ่น และเป็นหนึ่งในตำรายาของท้องถิ่น

ชื่อท้องถิ่น ควายเก่าแม่ ชื่อสามัญ กำลังช้างเผือก ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hiptagecandicans* Hook.f. จัดอยู่ในวงศ์ Malpighiaceae จัดเป็นไม้กึ่งพุ่ม เนื้อแข็ง ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปรี ขอบขนาน ผลแห้ง เมื่อแก่ไม่แตก พบได้ทุกภาคของประเทศไทย ประโยชน์ ใช้แก่นเป็นยาบำรุงกำลัง เปลือกตำพอกรักษาแผลสด ใบแก้โรคผิวหนัง (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2013) ใช้บรรเทาอาการปวดท้อง (Benthany et al., 2014) สรรพคุณท้องถิ่น นำใบตากแห้ง ต้มดื่มบำรุงน้ำนม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสกัดสาร

1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างพืชสมุนไพร

โดยการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ อำเภอลำลูกเกด จังหวัดเพชรบูรณ์

1.2 วิธีการสกัดสารจากสมุนไพร

1.3 เตรียมสารสกัดเอทานอลจากส่วนใบ ราก และลำต้นของควายเก่าแม่ มาทำการสกัดเย็น โดยใช้ตัวทำละลาย 50% เอทานอลการสกัดทำโดยนำสมุนไพรแห้งใส่ลงใน flask ตัวอย่างละ 100 กรัม ใช้ตัวทำละลายเอทานอล 1,000 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 ต่อ 10) ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน แยกสารละลายที่สกัดได้มากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมด มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบด้วยเอทานอล (ethanolic crude extract) นำมาทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่อง Vacuum Dryer ซึ่งน้ำหนักของสารสกัด นำสารสกัดที่ได้เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4 การคำนวณค่า %Yield นำสารสกัดที่เลือกกันมาซึ่งและเทียบกับตัวอย่างพืชที่ใช้ก่อนสกัด

โดยการคำนวณ %yield ดังสมการ

$$\%yield (w/w) = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดในภาชนะ} - \text{น้ำหนักของภาชนะ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืชเริ่มต้นที่ใช้}} \times 100$$

2. การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content)

ทำการวิเคราะห์โดยดัดแปลงวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ตามวิธีของ Wolfe et al. (2003) ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานและรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/g of crude extract)

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid content)

โดยวิธี Colorimetric assay ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Wolfe et al. (2003) โดยใช้เคเทคินเป็นสารมาตรฐานและรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของเคเทคินต่อสารสกัด 1 กรัม (mg CE/g of crude extract)

3. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.1 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical scavenging activity) โดยวิธีของ Karagozler *et al.* (2008) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer รุ่น UV-9200 (Rayleigh, China) คำนวณค่า % radical scavenging activity ดังสมการ

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

โดยที่ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงควบคุม

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

นำค่า % radical scavenging activity ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหา IC_{50} เมื่อค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ค่า % radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50

3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2, 2'-azobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS radical scavenging activity) โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Re *et al.* (1999) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer รุ่น UV-9200 (Rayleigh, China) คำนวณค่า % Inhibition ABTS ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition ABTS} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

โดยที่ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงควบคุม

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

นำค่า % Inhibition ABTS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหา IC_{50} เมื่อค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ค่า % Inhibition ABTS ลดลงร้อยละ 50

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสกัดสารสกัดจากสมุนไพร

การสกัดสมุนไพรจากชิ้นส่วนใบ ราก และลำต้นของควายแก้วแม่ ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 50% โดยวิธีการสกัดเย็น พบว่า ปริมาณสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิดมีลักษณะเป็นสารเหนียวสีและความเข้มข้นของสารสกัดตามชิ้นส่วนของสมุนไพร ปริมาณของสารสกัดที่ได้แต่ละชิ้นส่วนมีปริมาณที่แตกต่างกันโดยชิ้นส่วนรากให้ปริมาณสารสกัดสูงสุด รองลงมาได้แก่ ลำต้นและใบให้ปริมาณสารสกัดน้อยที่สุด ดังแสดงใน Table 1

2. การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content)

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดชิ้นส่วน ราก ลำต้นและใบ ของควายแก้วแม่ คำนวณจากค่า linear regression equation ของกราฟสารมาตรฐานกรดแกลลิก ($Y = 0.0581x - 0.0293$, $R^2 = 0.9977$)

พบว่า ขึ้นส่วนของสมุนไพรแต่ละส่วนมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดแตกต่างกันดังแสดงใน Table 1 โดยสารสกัดจาก ขึ้นส่วนรากมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูง คือ 20.0848 ± 0.7524 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 1 กรัมของสารสกัด รongลงมาได้แก่ ขึ้นส่วนลำต้น และขึ้นส่วนใบ ตามลำดับ

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid content)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดขึ้นส่วนราก ลำต้น และใบ ของควายแก้วแม่ คำนวนจากค่า Linear regression equation ของกราฟสารมาตรฐานเคเทคิน ($Y=0.1411x-0.1375$, $R^2=0.9999$) พบว่า ขึ้นส่วนของสมุนไพรแต่ละส่วนมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่แตกต่างกัน โดยสารสกัดจากขึ้นส่วนรากมีปริมาณ สารฟลาโวนอยด์สูงที่สุด รongลงมาได้แก่ ขึ้นส่วนลำต้น และขึ้นส่วนใบตามลำดับดังแสดงใน Table 1

Table 1 Percentage of yield crude extract, total phenolic content and total flavonoid content of *Hiptagecandicans*.

Parts of plant	%Yield	Total phenolic content (mg GAE/g of crude extract)	Total flavonoid content (mg CE/g of crude extract)
Root	9.88 ± 0.39	20.08 ± 0.75	13.72 ± 0.44
Stem	5.94 ± 0.22	11.47 ± 0.22	8.05 ± 0.02
Leaf	5.15 ± 0.53	8.32 ± 0.21	4.73 ± 0.00

3. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS (DPPH and ABTS radical scavenging activities)

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH assay และ ABTS assay โดยรายงานผลเป็นค่า IC_{50} หมายถึง ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระลดลง 50% พิจารณาจากค่าที่มีค่าน้อยจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากผลการศึกษาสารสกัดขึ้นส่วน ราก ลำต้น และใบ ของควายแก้ว แม่ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แตกต่างกัน โดยพบว่าสารสกัดจากขึ้นส่วนของราก และลำต้นมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS จากผลการทดลองสารสกัดขึ้นส่วน ราก ลำต้น และใบ ของควายแก้วแม่ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS แตกต่างกัน และพบว่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS มีความสอดคล้องกับการทดลองการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดังแสดงใน Table 2

ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจะสอดคล้องกับปริมาณของ Total phenolic ที่มีในตัวอย่าง สารสกัดใดมีปริมาณ Total phenolic มากจะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jacobo-Velazquez *et al.* (2009) ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกกับความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็น free radical terminators ที่มีโครงสร้าง

ประกอบด้วย aromatic ring แทนที่ด้วย hydroxyl group ที่ใช้จับกับอนุมูลอิสระได้ (Abdel-Hameed, 2009) ดังนั้นเมื่อสารสกัดใดที่มีปริมาณฟีนอลิกสูง ส่งผลให้สารสกัดนั้น ๆ มีแนวโน้มในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงด้วย

Table 2 DPPH and ABTS radical scavenging activities of *Hiptagecandicans*.

Parts of plant	DPPH assay IC ₅₀ (mg/ml)	ABTS assay IC ₅₀ (mg/ml)
Root	0.1427±0.0015	0.0911±0.0120
Stem	0.2489±0.0005	0.1201±0.0263
Leaf	0.3322±0.0023	0.2115±0.0340
BHT	0.3229±0.0173	0.0226±0.0070

สรุป

จากการศึกษาเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดหยาบของชิ้นส่วนราก ชิ้นส่วนลำต้นและชิ้นส่วนใบของสมุนไพรควายแก้วแม่ ด้วยตัวทำละลายเอทานอล50% โดยวิธีการสกัดเย็น พบว่า ชิ้นส่วนรากให้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ ชิ้นส่วนลำต้นและชิ้นส่วนใบให้ปริมาณสารสกัดหยาบน้อยที่สุด เมื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดจากชิ้นส่วนของราก มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุด และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้ดีเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน BHT

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนโดยงบประมาณแผ่นดินที่พิจารณาผ่านความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ พ.ศ.2560(รหัสโครงการสัญญา PCRU_2560_N013)

เอกสารอ้างอิง

- องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2013, 25 พฤศจิกายน.ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์. สืบค้นวันที่ 9 เมษายน 2560, จาก <http://www.gsbg.org>.
- Abdel-Hameed, E.S. 2009. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. **Food Chemistry** 114: 1271-1277.
- Benthany, G.E., Phaivanh, P., Kongmany, S., Vongtakoune, S., Nichole, I.G. and D. Doel, S., 2014. Assessment of the importance of medicinal plants among communities around KhatNgong of Southern Laos.**Journal of Environmental Biology** 35: 607-615.
- Jacobo-Velazquez, D.A. and Cisneros-Zevallos, L. 2009. Correlations of Antioxidant Activity against Phenolic Content Revisited: A New Approach in Data analysis for Food and Medicinal Plants. **Journal of Food Science**.74: 9.

- Karagozler, A.A., B. Erdag, Y.C. Emek and D.A. Uygun, 2008. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechashastata*. **Food Chemistry** 111: 400-407.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine** 26: 1231-1237.
- Rice-Evants, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1996. Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Journal of Free Radicals in Biology**
- Wolfe, K., X. Wu and R. H. Liu. 2003. Antioxidant activity of apple peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51: 609-614.