ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของส่วนแยกย่อยจากเปลือกลำต้นของกรวยป่า

TOTAL PHENOLIC CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF SUB-FRACTIONS FROM STEM BARKS OF *Casearia grewiifolia*

ธเนศวร นวลใย เบญจมาส ไชยลาภ*

Thanesuan Nuanyai*, *Benjamat Chailap*

สาขาวิชาศึกษาทั่วไป คณะศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล

Department of General Education, Faculty of Liberal Arts, Rajamangala University of Technology Rattanakosin Wang Klai Kangwon Campus.

**Corresponding author, e-mail: Thanesuan.Nua@rmutr.ac.th*

Received: *17 July 2020;* ***Revised:*** *11 February 2021;* ***Accepted:*** *16 September 2021*

บทคัดย่อ

ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทของเปลือกลำต้นของกรวยป่าเมื่อแยกโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี สามารถแยกส่วนแยกย่อยได้ทั้งหมด 13 ส่วนแยกย่อย โดยการเพิ่มความมีขั้วของตัวชะ จากการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH พบว่าส่วนแยกย่อยที่ 1-9 (5-30 % เอทิลอะซิเตท/เฮกเซน) มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ระดับ IC_{50} มากกว่า 100 µg/mL ส่วนแยกย่อยที่ 10-13 (35-50 % เอทิลอะซิเตท/เฮกเซน) มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ IC_{50} อยู่ในช่วง 37.25-27.23 µg/mL ในขณะที่สารมาตรฐาน Trolox มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ระดับ 5.28 ± 0.83 µg/mL ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค ABTS พบว่าส่วนแยกย่อยที่ 1-10 มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 µg/mL ส่วนแยกย่อย ที่ 11-13 มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ IC_{50} อยู่ในช่วง 26.13-48.03 ug/mL ในขณะที่สารมาตรฐาน Trolox มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ระดับ 18.44 ± 1.06 µg/mL ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของส่วนแยกย่อยที่ 1 - 13 อยู่ในช่วง 15.56 – 367.96 mg GAE/g โดยส่วนแยกย่อยที่ 13 มีค่าปริมาณสารฟีนอลิกสูงที่สุด จากงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าพบว่าปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS และความมีขั้วส่งผลต่อปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

คำสำคัญ: อนุมูลอิสระ ส่วนแยกย่อย กรวยป่า

Abstract

The ethyl acetate extracts of the stem bark of *Casearia grewiifolia* were separated by column chromatography technique. The 13 sub-fractions extracts were isolated by increasing polarity of the eluent. Based on the antioxidant activity analysis using DPPH technique, the sub-fractions 1-9 (5-30% Ethyl acetate/Hexane) displayed antioxidant values at the level of IC_{50} greater than 100 µg / mL and sub-fractions 10 -13 (35-50% Ethyl acetate/Hexane) showed an antioxidant at IC_{50} values in the range of 37.25

- 27.23 µg/mL. While, the Trolox standard substance exhibited an antioxidant level of IC_{50} at 5.28 ± 0.83 µg/mL. In addition, the antioxidant activity by ABTS technique, the sub-fractions 1 – 10 (5-35% Ethyl acetate/Hexane) showed the IC_{50} value more than 100 µg/mL, and the sub-fractions 11-13 (40-50% Ethyl acetate/Hexane) displayed the antioxidant value at IC_{50} in the range of 26.13 - 48.03 µg/mL, while Trolox standard substance had an antioxidant activity at IC_{50} value at 18.44 ± 1.06 µg/mL. Moreover, the total phenolic content of the sub-fractions 1 - 13 were in the range of 15.56 - 367.96 mgGAE/g. The sub-fraction 13 displayed the highest total phenolic content value. It was found that the total phenolic content correlated with the antioxidant activity using DPPH and ABTS assay. In conclusion, the polarity of extract was play an important role in the phenolic content and antioxidant activities.

Keywords: Antioxidant, sub-fraction, *Casearia grewiifolia*

บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล เกิดได้จากปัจจัยภายในร่างกาย เช่น กระบวนการเผาผลาญอาหารในร่างกาย และปัจจัยภายนอก [1] อนุมูลอิสระมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ภายในเซลล์ ก่อให้เกิดอันตรายแก่เซลล์โดยอนุมูลอิสระจะทำลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์หลายประเภท [1] สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) หมายถึง สารใด ๆ ที่อยู่ในระดับความเข้มข้นต่ำแต่มีความสามารถชะลอหรือยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันของสารที่สามารถเกิดการออกซิเดชันได้ [1,2] สารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติได้รับความสนใจเป็นอย่างมากจากผู้บริโภค [2-5] งานวิจัยมากมายได้รายงานการหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารธรรมชาติหลากหลายวิธีซึ่งมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันไป [4] การวิเคราะห์หาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต้องเปรียบเทียบด้วยวิธีที่หลากหลาย เนื่องจากกลไกในการต้านอนุมูลอิสระในแต่ละรูปแบบมีความแตกต่างกัน [1-5] การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Capacity Assay) หรือเรียกสั้น ๆ ว่าเทคนิค DPPH เป็นวิธีการหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ง่ายและแม่นยำ โดยส่วนใหญ่ใช้กับสารสกัดจากพืชและผลไม้ อนุมูลอิสระ DPPH (DPPH•, diphenyl picryhydrazyl radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว โดยมีอิเล็กตรอนเดี่ยวบนอะตอมของไนโตรเจน (N) สารละลายในเอทานอลจะมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ การดูดกลืนแสงจะลดลงพร้อมกับสีของสารละลายที่จางลง เนื่องจากอนุมูลอิสระของ DPPH มีความเสถียรอาจเทียบไม่ได้กับอนุมูลอิสระในร่างกายที่มีความว่องไวในกระบวนการออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation) และสารต้านอนุมูลอิสระบางตัวอาจทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ช้า เนื่องมาจากโครงสร้างที่เกะกะของ DPPH [4] การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radicalcation decolorization assay) ในการวิเคราะห์สาร ABTS จะถูกออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ($ABTS^{\bullet+}$, 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีความว่องไวกว่าอนุมูลอิสระ DPPH มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เมื่ออนุมูลอิสระ ABTS ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ การดูดกลืนแสงจะลดลงพร้อมกับสีของสารละลายที่จางลง [4] สารประกอบฟีนอลิกมักมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ในงานวิจัยครั้งนี้จึงวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดอีกด้วย (Folin-Ciocalteu (F-C) AOC หรือ Total Phenolics Assay)

[4-7] นอกจากนี้จากงานวิจัยยังพบว่าสารแยกย่อยที่ได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของส่วนแยกย่อยที่มีความมีขั้วแตกต่างกันประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระจะแตกต่างกัน โดยส่วนแยกย่อยที่ได้จากตัวทำละลายที่มีขั้วสูงจะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าส่วนแยกย่อยที่ได้จากตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วหรือความมีขั้วต่ำกว่า [8-10]

กรวยป่า (*Casearia grewiifolia* Vent.) เป็นพรรณไม้ในวงศ์ Salicaceae เป็นไม้ต้นขนาดเล็ก ผลัดใบสูง 5-15 เมตร เปลือกเรียบถึงแตกเป็นสะเก็ดเล็ก ๆ สีเทาปนน้ำตาล กิ่งอ่อนมีช่ออากาศและขนสีน้ำตาลแดงทั่วไป ดอกแยกเพศร่วมต้น หูใบขนาดเล็ก ร่วงง่าย ใบเรียงเวียน รูปขอบขนานหรือ แกมไข่ ยาว 8-13 เซนติเมตร ช่อดอกแบบช่อกระจุกออกตามซอกใบ กลีบเลี้ยง 5 กลีบ แยกเป็นอิสระสีเขียว อ่อนถึงเขียวอมเหลือง ด้านนอกมีขน ไม่มีกลีบดอก จานฐานดอกรูปถ้วย ขอบจักเป็นพู เกสรเพศผู้ 8 อัน ติดขอบ บนจานฐานดอก ผลสด รูปรีหรือรูปไข่ ยาว 2.5-5 เซนติเมตร สุกสีเหลือง แตกเป็น 3 ซีก เมล็ดมี 3 เมล็ด มีเยื่อหุ้มสดสีส้ม มีการกระจายพันธุ์ในไทย ภูมิภาคอินโดจีนและมาเลเซีย ในประเทศไทยมีการกระจายตัวพบได้ในทุกภาค ขึ้นในป่าเต็งรัง ป่าเบญจพรรณ ป่าดิบแล้ง และป่าดิบชื้น พบมากในป่าเบญจพรรณ ระดับความสูงจนถึง ประมาณ 800 เมตร ติดผลเดือน มกราคม-ตุลาคม มีการใช้รากแก้ท้องร่วง บำรุงตับ เปลือกต้นใช้บำรุงธาตุ สมานแผล ใบและดอก แก้พิษกาฬ แก้โรคผิวหนัง ผลผื่นคัน ผลใช้ฟอกโลหิต แก้เลือดออกตามไรฟัน เมล็ดใช้เบื่อปลา น้ำมันจากเมล็ดใช้รักษาโรคผิวหนัง [11] สารสำคัญจากกรวยป่าคือสารกลุ่มเซอโรเดนไดเทอร์พีนนอยด์และพบสารกลุ่มนี้ในเกือบทุกส่วนของกรวยป่าแต่จะมีความแตกต่างกันที่หมู่แทนที่ มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง การต้านอนุมูลอิสระการต้านเชื้อแบคทีเรีย[12-18]

การสกัดใบและเปลือกของกรวยป่าด้วยเมทานอลที่เก็บในพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออก มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (P388) ที่ระดับ LD_{50} 11.3, 4.2 และ 1.6 µg/mL ตามลำดับ สำหรับการต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} ที่ระดับ 24.9, 22.1 และ 55.7 µg/mL ตามลำดับ การต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบแสดงการต้านเชื้อแบคทีเรียโดยมีค่า MIC ของส่วนสกัดใบมากกว่า 5 mg/ml ของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ [12] ต่อมามีการรายงานองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นกรวยป่า พบสารกลุ่มเซอโรเดนไดเทอร์พีนอยด์ชนิดใหม่ทั้งหมด 4 ชนิดคือ caseargrewiins A-D เมื่อนำสารบริสุทธิ์ทั้ง 4 ชนิดทดสอบการต้านเชื้อมาลาเรีย การต้านเชื้อแบคทีเรีย และการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารทั้ง 4 ชนิดมีการต้านเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* ที่ระดับ IC_{50} เท่ากับ 2.9, 2.4, 3.0 และ 3.3 µg/mL ตามลำดับ และการต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ที่ระดับ MIC (minimum inhibitory concentration) 12.5, 12.5, 25.0 และ 12.5 µg/mL ตามลำดับ และการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งผิวหนัง (KB) มะเร็งเต้านม (BC1) และ มะเร็งปอด (NCI-H187) โดยสารทั้ง 4 ชนิดมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.1-8.7 µg/mL โดยเฉพาะสาร caseargrewiins C และ D มีค่า IC_{50} กับเซลล์มะเร็งชนิด NCI-H187 ที่ดีที่สุดที่ค่า IC_{50} 0.3 และ 0.1 ug/mL ตามลำดับ [13] ในปี 2007 Kanokmedhakul และคณะได้ศึกษาสารกลุ่มเซอโรเดนไดเทอร์พีนอยด์จากผลของกรวยป่า จากการศึกษาพบสารกลุ่มเซอโรเดนไดเทอร์พีนอยด์ชนิดใหม่ทั้งหมด 8 ชนิด คือ caseargrewiins E-L สารทั้งหมดทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งผิวหนัง (KB) มะเร็งเต้านม (BC1) และ มะเร็งปอด (NCI-H187) โดยสารทั้ง 8 ชนิดมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.20-6.00 µg/mL โดยเฉพาะสาร caseargrewiins E และ G มีค่า IC_{50} กับเซลล์มะเร็งชนิด KB ที่ดีที่สุดที่ค่า IC_{50} 0.66 และ 0.67 µg/mL ตามลำดับ สาร caseargrewiins E และ L แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด BC1 ที่ดีที่สุดที่ระดับ IC_{50} เท่ากับ 0.2 และ 0.21 µg/mL ตามลำดับ [14] ในปี 2007 Mosaddik และคณะ ศึกษาสารกลุ่มเซอโรเดนไดเทอร์พีนอยด์จากกิ่งของกรวยป่าพบสารชนิดใหม่ 3 ชนิด โดยสารทั้งหมดไม่มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ [15]

Rayanil และคณะได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเนื้อไม้ของกรวยป่า พบสารกลุ่มฟีนอลิกชนิดใหม่ 2 ชนิด ที่ยังไม่มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ [16] และ เมื่อไม่นานมานี้ Nuanyai และคณะได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของผลสุกของกรวยป่า พบสารชนิดใหม่ 1 ชนิดคือ Caseargrewiin M และสาร Caseargrewiin G ซึ่งเป็นสารกลุ่มเซอโรเดนไดเทอร์พีนอยด์ สารทั้งหมดถูกทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 5 ชนิด คือ Hep-G2 (เซลล์มะเร็งปอด), SW620 (เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่), Chago-K1 (เซลล์มะเร็งปอด), KATO-III (เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร) และ BT474 (เซลล์มะเร็งเต้านม) สารทั้งหมดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.90–6.30 µg/mL [17]

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากรวยป่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย และสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติจะมีความปลอดภัยและมีผลข้างเคียงน้อยกว่าสารสังเคราะห์ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการศึกษาค้นคว้าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ซึ่งกรวยป่า (*C. Grewiifolia*) เป็นพืชท้องถิ่นในเขตจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และใกล้เคียง มีการกระจายตัวและความหนาแน่นค่อนข้างสูง ในงานวิจัยนี้เลือกศึกษาสารสกัดจากเปลือกลำต้นของกรวยป่า โดยแบ่งส่วนแยกย่อยที่ได้จากการเพิ่มความมีขั้วของตัวชะ คณะผู้วิจัยคาดว่าจะสามารถคัดกรองสารกลุ่มที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในส่วนแยกย่อยได้ และหวังว่าการค้นพบส่วนแยกย่อยที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้จะสามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางหรืออาหารต่อไปได้เนื่องด้วยสารที่ได้และเป็นแนวทางในการศึกษาโครงสร้างทางเคมีเพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ในลำดับต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เทคนิค DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของส่วนแยกย่อยที่ได้จากการเพิ่มความมีขั้วของตัวชะจากเปลือกลำต้นของกรวยป่า

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างเปลือกลำต้นกรวยป่า (*C. grewiifolia*)

เก็บตัวอย่างเปลือกลำต้นกรวยป่า (*C. grewiifolia*) ในเดือนตุลาคม 2559 เนื่องจากเป็นช่วงที่กรวยป่าออกผลแล้ว บริเวณเขาหินปูนมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ การเปรียบเทียบและพิสูจน์พันธุ์ไม้เปรียบเทียบที่สำนักหอพรรณไม้ ตัวอย่างพรรณไม้อัดแห้งเก็บรักษาที่สำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ (BKF No. 190331)

การแยกสารจากส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท

นำส่วนเปลือกต้นของกรวยป่าจำนวน 2.5 กิโลกรัม ตากแห้งเป็นเวลา 5 วัน และอบด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิทบดให้เป็นผง ร่อนด้วยตะแกรงร่อนขนาด 200 mesh ได้ผงเปลือกลำต้นกรวยป่าจำนวน 1.8 กิโลกรัม นำไปแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน (Hexane) ปริมาตร 15.0 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน กรอง นำตัวทำละลายออกและนำส่วนกากแช่ด้วยตัวทำละลายเมทานอล (MeOH) ปริมาตร 15.0 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน กรอง นำตัวทำละลายออกและแช่ด้วย เมทานอล อีก 2 ครั้ง นำสารละลายเมทานอลที่สกัดได้มารวมกันและระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เทคนิคการลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบ (crude) ในส่วนเมทานอลนำสารสกัดหยาบที่ได้มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EtOAc) และน้ำ ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาตรอย่างละ 1.0 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง ด้วยกรวยแยก นำส่วนสกัดเอทิลอะซิเตททั้งหมดรวมกันและระเหยแห้งโดยใช้เทคนิคการลดความดัน จะได้ส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทจำนวน 12.55 กรัม

นำส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทละลายในตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอล และคลุกกับซิลิกาเจลจนแห้ง บรรจุซิลิกาเจลที่ผสมตัวทำละลายเฮกเซนจนอิ่มตัวลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 มิลลิเมตร ความยาว 400 มิลลิเมตร เทซิลิกาเจลที่คลุกสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทไว้ลงบน silica gel ที่อิ่มตัวด้วยเฮกเซนและเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายโดยเริ่มจาก 5-50 % EtOAc/Hexanes โดยใช้ปริมาณตัวชะในความเข้มข้นละ 1.0 ลิตร เก็บตัวอย่างหลอดละ 30 มิลลิลิตร และใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเพื่อรวมส่วนแยกย่อยที่เหมือนกัน ได้ส่วนแยกย่อยทั้งหมด 13 ส่วนแยกย่อย (FR1-FR13)

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH

นำสารตัวอย่างละลายด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10, 30, 50, 70 และ 90 µg/mL หรือสารละลายมาตรฐาน Trolox นำสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน Trolox จำนวน 50 µL ผสมกับสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 mM ปริมาตร 150 µL ในเอทานอล ใน 96 well plate เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 517 นาโนเมตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ที่ลดลง [18] ตามสมการ (1)

$$\text{Inhibition (\%)} = \{[A_{control} - (A_{test\ sample} - A_{blank})]/A_{control}\} \times 100\% \qquad (1)$$

โดยที่

$A_{control}$ = DPPH 150 µL + Ethanol 50 µL

$A_{test\ sample}$ = DPPH 150 µL + Sample/standard 50 µL

A_{blank} = Ethanol 150 µL + Sample/standard 50 µL

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS

นำสารละลาย ABTS (2,2´-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ความเข้มข้น 7 mM ปริมาตร 5 mL ผสมกับ สารละลาย 2.45 mM $K_2S_2O_8$ ปริมาตร 88 uL ทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เจือจางสารละลาย ABTS ที่ถูกกระตุ้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.70 ± 0.05 ละลายสารละลายตัวอย่างด้วย 50%(v/v) DMSO ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10, 30, 50, 70 และ 90 µg/mL หรือสารละลายมาตรฐาน Trolox นำสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน Trolox จำนวน 50 µL ผสมกับ สารละลาย ABTS ปริมาตร 150 µL ใน 96 well plate เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 734 นาโนเมตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS ที่ลดลง [18] ตามสมการ (2)

$$\text{Inhibition (\%)} = \{[A_{control} - (A_{test\ sample} - A_{blank})]/A_{control}\} \times 100\% \qquad (2)$$

โดยที่

$A_{control}$ = 150 µL ABTS + 50 µL 50%DMSO

$A_{test\ sample}$ = 150 µL ABTS + 50 µL Sample/standard

A_{blank} = 150 µL Water + 50 µL Sample/standard

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

นำสารสกัดละลายใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 1.0 mg/mL เติมสารตัวอย่างปริมาตร 20 µL และสารละลาย 10% (v/v) Folin Ciocalteu ปริมาตร 100 µL เติมสารละลาย 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 80 µL เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm จากนั้นนำไปคำนวนหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากกราฟมาตรฐานปริมาณกรดแกลลิก ในช่วง 10 – 300 µg/mL [19]

ผลการวิจัย

ปริมาณของสารสกัดจากเปลือกลำต้นของกรวยป่า

จากการนำส่วนเปลือกลำต้นของกรวยป่า สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล และระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เทคนิคการลดความดัน นำส่วนสกัดเมทานอลสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตทและน้ำด้วยกรวยแยก นำส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทรวมกันและระเหยตัวทำละลายออกโดยเทคนิคการลดความดัน ได้สารสกัดหยาบส่วนเอทิลอะซีเตททั้งหมด 12.55 กรัม คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้งพืช 0.70 เมื่อนำส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตทแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้การเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย (Gradient) และตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี รวมส่วนแยกย่อยที่มีลักษณะองค์ประกอบทางเคมีบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟีที่คล้ายกันสามารถแบ่งเป็นส่วนแยกย่อย (sub-fractions) ได้ทั้งหมด 13 ส่วนแยกย่อย (FR1 – FR13) น้ำหนักและร้อยละของน้ำหนักแห้งพืชของสารแยกย่อยแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักและร้อยละของส่วนแยกย่อยของเปลือกลำต้นกรวยป่า

ส่วนแยกย่อย	ตัวทำละลาย	น้ำหนัก (กรัม)	% yield
FR1	5% EtOAc/Hexane	0.50	0.03
FR2	10% EtOAc/Hexane	1.75	0.10
FR3	10% EtOAc/Hexane	0.84	0.05
FR4	15% EtOAc/Hexane	0.25	0.01
FR5	20% EtOAc/Hexane	0.26	0.01
FR6	20% EtOAc/Hexane	0.46	0.03
FR7	25% EtOAc/Hexane	1.12	0.06
FR8	25% EtOAc/Hexane	1.23	0.07
FR9	30% EtOAc/Hexane	1.04	0.06
FR10	35% EtOAc/Hexane	0.25	0.01
FR11	40% EtOAc/Hexane	0.71	0.04
FR12	45% EtOAc/Hexane	0.50	0.03
FR13	50% EtOAc/Hexane	1.56	0.09

จากตารางที่ 1 ส่วนแยกย่อย FR4, FR5 และ FR10 ให้น้ำหนักของสารสกัดที่น้อยที่สุด ในขณะที่ส่วนแยกย่อย FR2 ให้น้ำหนักของสารแยกย่อย มากที่สุด จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า กลุ่มสารที่มักพบในกรวยป่าเป็นสารกลุ่มที่มีขั้วต่ำ เช่น ไดเทอร์พีนอยด์ [10 – 12] จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ส่วนแยกย่อย ในช่วงแรกมีปริมาณที่ค่อนข้างสูง และน้อยลงตามลำดับ เมื่อถึงส่วนแยกย่อย FR6 เมื่อเพิ่มความมีขั้วสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีขั้ว

ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในเปลือกลำต้นของพืชน่าจะถูกชะออกมาในส่วนแยกย่อย FR7 – FR13

การต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH ของสารสกัดจากเปลือกลำต้นของกรวยป่า

จากการนำส่วนแยกย่อย จากเปลือกลำต้นของกรวยป่าทั้งหมด 13 ส่วนแยกย่อย ทดสอบการยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิค DPPH ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของส่วนแยกย่อย ในส่วนแยกย่อย FR1 – FR9 มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 µg/mL ซึ่งน่าจะเป็นส่วนของสารที่มีขั้วต่ำและเป็นสารกลุ่มไดเทอร์พีนอยด์เป็นหลัก สารกลุ่มนี้แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำ ในขณะที่ส่วนแยกย่อย FR10 – FR13 แสดงค่า IC_{50} ที่ระดับความเข้มข้น 37.25, 30.46, 27.23 และ 28.88 µg/mL ตามลำดับและค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Trolox อยู่ที่ระดับ 5.28 µg/mL ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้า [18] จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความมีขั้วของส่วนแยกย่อย มีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH โดยสารที่มีขั้วมากจะแสดงการต้านอนุมูลอิสระที่สูงเช่นเดียวกัน

การต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS ของสารสกัดจากเปลือกลำต้นของกรวยป่า

จากการนำส่วนแยกย่อย จากเปลือกลำต้นของกรวยป่าทั้งหมด 13 ส่วนแยกย่อย ทดสอบการยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิค ABTS ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 2 ผลการทดสอบสอดคล้องกับการต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH โดยค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของส่วนแยกย่อย ในส่วนแยกย่อย ที่ FR1 – FR10 มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 µg/mL ในขณะที่ส่วนแยกย่อย FR11 – FR13 แสดงค่า IC_{50} ที่ระดับความเข้มข้น 48.03, 40.47 และ 26.13 µg/mL ตามลำดับและค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Trolox อยู่ที่ระดับ 18.44 µg/mL จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความมีขั้วของส่วนแยกย่อย มีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS โดยสารที่มีขั้วมากจะแสดงการต้านอนุมูลอิสระที่สูงเช่นเดียวกัน

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี DPPH และ ABTS เป็นที่นิยมเนื่องจากทำได้สะดวกและรวดเร็ว เนื่องจาก DPPH และ ABTS เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร โดยอนุมูลอิสระของ DPPH เป็นอนุมูลอิสระชนิดไนโตรเจน ที่มีสีม่วงและมีความคงตัวสูง เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซึ่งตรวจวัดได้ง่าย แต่วิธี DPPH มีข้อเสียคือหากสารตัวอย่างมีสีเหลืองอาจรบกวนในการแปรผลข้อมูลได้ สำหรับการวัดการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS เป็นการวัดความสามารถของสารตัวอย่างในการกำจัดอนุมูลอิสระชนิดเปอร์ออกซี ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มักพบในเซลล์และจะมีการเปลี่ยนสีจากสีฟ้าเป็นไม่มีสี ซึ่งสารตัวอย่างในธรรมชาติที่มีสีฟ้าจะพบได้น้อยดังนั้นการรบการของสีในสารตัวอย่างจึงค่อนข้างมีอิทธิพลต่ำ แต่ในวิธี ABTS มีข้อเสียคือตัวทำละลายเป็นน้ำซึ่งสารตัวอย่างการละลายน้ำต่ำอาจทดสอบได้ลำบาก

ตารางที่ 2 แสดงค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยเทคนิค DPPH และเทคนิค ABTS ของส่วนแยกย่อย ของเปลือกลำต้นกรวยป่า

ส่วนแยกย่อย	DPPH	ABTS
	IC_{50} (µg/mL)	IC_{50} (µg/mL)
FR1	>100	> 100
FR2	>100	> 100
FR3	>100	> 100
FR4	>100	> 100
FR5	>100	> 100
FR6	>100	> 100
FR7	>100	> 100

FR8	>100	> 100
FR9	>100	> 100
FR10	37.25 ± 1.20	> 100
FR11	30.46 ± 2.24	48.03 ± 1.18
FR12	27.23 ± 1.08	40.70 ± 2.29
FR13	28.88 ± 4.46	26.13 ± 2.15
Trolox	5.28 ± 0.83	18.44 ± 1.06

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเปลือกลำต้นของกรวยป่า

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของส่วนแยกย่อย FR1 – FR13 แสดงในตารางที่ 3 โดยมีค่าของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ระหว่าง 15.56 – 367.96 mg GAE/g ของสารสกัด ซึ่งแนวโน้มของค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะสอดคล้องกับความมีขั้วของสารสกัดโดยส่วนแยกย่อย ที่มีค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดน้อยที่สุดคือ ส่วนแยกย่อย FR1 ที่ระดับ 15.56 mg GAE/g และส่วนแยกย่อย ที่มีค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดคือส่วนแยกย่อย FR13 ที่ระดับ 367.96 mg GAE/g ซึ่งสอดคล้องกับค่าการต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH และ ABTS ที่มีประสิทธิภาพสูง

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของส่วนแยกย่อยของเปลือกลำต้นกรวยป่า

ส่วนแยกย่อย	**ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g)**
FR1	15.56 ± 2.34
FR2	26.95 ± 2.10
FR3	27.38 ± 1.31
FR4	38.27 ± 1.73
FR5	90.61 ± 1.10
FR6	63.91 ± 2.18
FR7	57.93 ± 2.30
FR8	74.73 ± 1.62
FR9	149.21 ± 1.70
FR10	212.80 ± 16.62
FR11	306.01 ± 15.36
FR12	301.45 ± 11.43
FR13	367.96 ± 11.33

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในส่วนแยกย่อยของเปลือกลำต้นของกรวยป่า พบว่าปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้จะมีความเกี่ยวเนื่องกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS และความมีขั้วส่งผลต่อปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระส่วนแยกย่อยที่มีขั้วสูงจะทำให้ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและการต้านอนุมูลอิสระสูงไปด้วย จากผลการทดลองดังกล่าวสารสกัดจากเปลือกลำต้นของกรวยป่าที่มีขั้วสูงมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่สูง ซึ่งน่าจะสามารถนำสารสกัดส่วนที่มีขั้วตั้งแต่ส่วนแยกย่อย ที่ 10 – 13 ซึ่งมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่สูงจึงน่าจะใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2560 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ รหัสโครงการ A2/2560 (2560A16902003)

เอกสารอ้างอิง

[1] Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patslides, E., McDonald, S., and Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst. 127*, 183-198. DOI: 10.1039/b009171p

[2] Moon, J.-K., and Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Argricultural and Food Chemistry. 57(5)*, 1655-1666. DOI: 10.1021/jf803537k

[3] Frankel, E. N., and Finley, J. W. (2008). How To Standardize the Multiplicity of Methods To Evaluate Natural Antioxidants. *Journal of Argricultural and Food Chemistry. 56(13),* 4901-4908. DOI:10.1021/jf800336p

[4] Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacityand phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *53(10)*, 4290-4302. DOI: 10.1021/jf0502698

[5] Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *53(6),* 1841-1856. DOI: 0.1021/jf030723c

[6] Mesek, A., Zaborski, M., and Chrzescijanska, E. (2011). Electrooxidation of flavonoids at platinum electrode studied by cyclic voltammetry. *Food Chemistry. 127*, 699-704. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.12.127

[7] Samra, M. A., Chedea, V. S., Economou, A., Calokerinos, A., and Kefalas, P. (2011). Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry. *Food Chemistry. 125,* 622-629. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.08.076

[8] Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., Pagan, R, and Laglaoui, A. (2014). The effects of solvents polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three Mentha species extracts. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3(11),* 399-412.

[9] Widyawati, P.S., Budianta, D.W., Kusuma, F.A., and Wijaya, E.L. (2014-15) Difference of solvent polarity To phytochemical content and antioxidant activity of *Pluchea indicia Less* leaves extracts. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. 6(4).* 850-855.

[10] Waleel, A., Jan, S.A., Ullah, I., Shinwari, Z.K., and Xu, M. (2019) Solvent polarity mediates phytochemical yield and antioxidant capacity of *Isatis tinctoria. Peer J.* DOI: 10.7717/peerj.7857

[11] Forest Herbarium-BKF. (2013). A Guide of Plant Selection for Flood Protection in the Northeast. Bangkok: Department of National parks Wildlife and Plant Conservation, 64.

[12] Mosaddik, M.A., Banbury, L., Forster, P., Booth, R., Markham, J., Leach, D., Waterman, P.G. (2004). Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytomedicine*. 11, 461-466. DOI: 10.1016/j.phymed.2003.12.001

[13] Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Kanarsa, T. & Buayairaksa, M. (2005). New Bioactive Clerodane Diterpenoids from the Bark of *Casearia grewiifolia*. *Journal of Natural Product*, *68*(2), 183-188. DOI: 10.1021/np049757k

[14] Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K. Buayairaksa, M. (2007). Cytotoxic clerodane diterpenoids from fruits of *Casearia grewiifolia*. *Journal of Natural Product*, *70(7)*, 1122-1126. DOI: 10.1021/np070083y

[15] Mosaddik, M.A, Forster, P.I, Booth, R. Waterman, P.G. (2007). Clerodane diterpenes from the stems of *Casearia grewiifolia* var. *gelonioides* (Flacourtiaceae/ Salicaceae *sensu lato*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 631-633. DOI: 10.1016/j.bse.2007.03.003

[16] Rayanil, K., Nimnoun, C., Tuntiwachwuttikul, P. (2012). New phenolics from the wood of *Casearia grewiifolia*. *Phytochemistry Letters*, 5, 59-62. DOI: 10.1016/j.phytol.2011.09.007

[17] Nuanyai, T., Chailap, B., Buakeaw, A., Puthong, S. (2017). Cytotoxicity of clerodane diterpenoids from fresh ripe fruits of *Casearia grewiifolia*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *39(4),* 517-521.

[18] Oliveira, A.S., Cercato, L.M., Santana, M.T., Oliverira, A.J., Santos, B.D., Duarte, M.C., Araujo, A.A.S., Silva, A.M.O., Camargo, E.A. (2017) The ethanol extract of Leonurus sibiricus L. induces antioxidant, antinociceptive and topical anti-inflammatory effect. *Journal of Ethanopharmacology*, *206(12),* 144-151. DOI: 10.1016/j.jep.2017.05.029

[19] Moise, O., Njoya, E.M., Abdalla, M.A., McGaw, L.J. (2019) Anti-inflammatory and antioxidant properties of leaf extract of eleven South African medicinal plants used traditionally to treat inflammation. *Journal of Ethanopharmacology*, 234, 27-35. DOI: 10.1016/j.jep.2018.12.030