ว.วิทย. มข. 46(2) 228-237 (2561) KKU Sci. J. 46(2) 228-237 (2018)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดครอบฟันสีและไมยราบ

Antioxidant Activity *Abutilon indicum* Sweet and *Mimosa pudica* L. Extracts

อำภา คนซื่อ[1*] ขวัญยืน เลี่ยมสำโรง[2] สุภาวดี ตรีรัตนถวัลย์[3] ศรีอรุณ โพธิ์เกตุ[1]

[1]คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

[2]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ต.ตลาด อ.เมือง จ.มหาสารคาม 44000

[3]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง หัวหมาก บางกะปิ กรุงเทพมหานคร 10240

[*]Corresponding Author, E-mail: ampa_ice@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดครอบฟันสีผสมไมยราบในอัตราส่วนที่เท่ากันในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ สารสกัดด้วยน้ำ (AMA), สารสกัดด้วยเอทานอล 50% (AMHE) และสารสกัดด้วยเอทานอล 80% (AME) โดยการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม, การหาปริมาณฟีนอลรวม, การวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay และ ABTS assay ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัด AME มีปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 61.472±2.335 mgGE g^{-1}Ext และ 617.427±29.434 mgQEg^{-1}Ext และยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัด AMHE และสารสกัด AMA เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.099±0.020 และ 0.230±0.018 mg mL^{-1} ตามลำดับ แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่า Ascorbic acid และ Trolox สารสกัด AMA มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay โดยมี FRAP values เท่ากับ 4.269±0.120 mgTE g^{-1}Ext จากผลการวิจัยนี้แสดงศักยภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยจากครอบฟันสีและไมยราบด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80% มีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี จึงควรศึกษาเพื่อหาโครงสร้างสารสำคัญ กลไกการออกฤทธิ์ และความปลอดภัย เพื่อพัฒนาเป็นยาต่อไป

ABSTRACT

This study was aimed to investigate antioxidant activity of extracts from *Abutilon indicum* Sweet mix with *Mimosa pudica* L. an equal amount extracted by using different solvents include aqueous (AMA), 50% ethanol (AMHE) and 80% ethanol (AME). By The total flavonoid contents (TFC), total phenolic (TPC), ferric reducing antioxidant power by Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, scavenging of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and ABTS+ radical scavenging assay respectively. The results revealed that the AME had the highest total phenolic and total flavonoid contents of 0.061±0.002 mgGE g-^{1}Ext and 1.235±0.001 mgQE g^{-1}Ext and the highest antioxidant capacity than aqueous extract (AMA) and hydro-ethanolic extract (AMHE) by DPPH and ABTS assay with IC_{50} of 1.099±0.020 and 0.230±0.018 mg mL^{-1} respectively. AMA had the highest antioxidant capacity than

AMHE and AME by FRAP assay FRAP values was 4.269±0.120 mgTE g^{-1}Ext. The results suggest that the Thai medicinal plant extracts had showed
antioxidative effect; therefore, chemical compound, mechanism of action, and toxicity for new drug development should be further evaluated.

คำสำคัญ: การต้านอนุมูลอิสระ ครอบฟันสี ไมยราบ
Keywords: Antioxidant activity, *Abutilon indicum* Sweet, *Mimosa pudica* L.

บทนำ

โรคเบาหวาน เป็นโรคที่ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อของร่างกาย ดังนั้นร่างกายจึงมีกลไกการตอบสนองเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ อย่างเป็นระบบ เรียกว่า ระบบต้านอนุมูลอิสระ ภาวะของโรคเบาหวานทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์และสมรรถนะของเอนไซม์ในระบบการต้านอนุมูลอิสระ (ทินกร และคณะ, 2556)

ครอบฟันสีและไมยราบเป็นพืชสมุนไพรที่มีการกล่าวอ้างว่าสามารถรักษาโรคเบาหวานได้ ดังปรากฏในหนังสือพจนานุกรมโรคและสมุนไพรไทย (วิทย์, 2542) เช่นเดียวกันกับในหนังสือบำบัดโรคด้วยการแพทย์ทางเลือก (สุณี, 2544)

ครอบฟันสี มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Abutilon indicum* (L.) Sweet อยู่ในวงศ์ Malvaceae เป็นพรรณไม้พุ่มขนาดเล็ก (นันทวัน และคณะ, 2539) ทั้งต้นพบองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด ประกอบด้วยสารกลุ่ม Alkaloids, Flavonoids, Tannins, Glycosides และ Saponins ซึ่งคาดว่าจะเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน (Krisanapun et al., 2009) จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า สารสกัดจากทั้งต้นส่วนสารสกัดด้วยบิวทานอลมีฤทธิ์ต้านเบาหวาน โดยการจับกับ PPAR-Gamma และสามารถกระตุ้น 3T3-L1 ซึ่งเป็นกลไกในการลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยการกระตุ้น promoter ของ GLUT-1 (Krisanapun et al., 2011) สารสกัดจากทั้งต้นมีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมกลูโคสและช่วยกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน โดยสารสกัดด้วยน้ำ ขนาด 0.5 และ 1 กรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดระดับน้ำตาลในพลาสมาในหนูเบาหวานระดับปานกลาง ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนในหนูปกติ และหนูเบาหวานระดับรุนแรง พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในพลาสมาได้เล็กน้อย สารสกัดนี้ยังสามารถยับยั้งการดูดซึมของกลูโคสผ่านลำไส้เล็กได้ และสารสกัดหยาบสามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อนของหนูถีบจักร และในเซลล์มะเร็งชนิด INS-1E (Krisanapun et al., 2009) สารสกัดเมทานอลจากใบมีฤทธิ์ต้านเบาหวานในหนูปกติและหนูเบาหวาน พบว่าสารสกัดขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดน้ำตาลในเลือดในหนูปกติได้ในนาทีที่ 60 และ 120 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Adisakwattana et al., 2009) สารสกัดเอทานอลจากใบ สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูได้ในชั่วโมงที่ 4 ถึงชั่วโมงที่ 8 และสารสกัดด้วยน้ำสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูได้ในชั่วโมงที่ 4 และชั่วโมงที่ 6 (Seetharam et al., 2002) และสารสกัดด้วยน้ำจากใบมีฤทธิ์ปกป้องตับ ในหนูขาวที่เหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อตับ พบว่า สารสกัดขนาด 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถป้องกันพิษต่อตับได้โดยค่าการทำงานของตับมีค่าใกล้เคียงกับยา Silymarin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) (Porchezhian and Ansari, 2005)

ไมยราบ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mimosa pucida* L. เป็นพืชในวงศ์ Fabaceae เป็นไม้ล้มลุกกึ่งเลื้อย ทอดแผ่ไปตามพื้นดิน (นันทวัน และคณะ, 2542) ทั้งต้น พบองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดประกอบด้วยสารกลุ่ม Glycosides, Flavonoids, Tannins, Saponins Phenolic และ Alkaloids (Sowmya and Ananthi, 2011) เป็นต้น โดยมี Mimosine เป็นองค์ประกอบหลัก (Sharma et al., 2001; Champanerkar et al., 2010; Ghani, 2003; Lakshmi et al., 2007) มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชชนิดนี้มากมาย อาทิเช่น สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบ มีฤทธิ์แก้ปวดต้านการอักเสบ (Chandrashekar and Manthale, 2012) สารสกัดด้วยน้ำจากใบมีฤทธิ์ขับปัสสาวะ (Sangma et al., 2010) สารสกัดเอทานอลจากทั้งต้นมีฤทธิ์ลดไขมัน (Sowmya and Ananthi, 2011) สารสกัดด้วยเมทานอลจากลำต้นและรากมีฤทธิ์สมานแผล (Kannan

et al., 2009) สารสกัดจากรากและส่วนเหนือดินด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเมธานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Chowdhury et al., 2008) สารสกัดจากเอทานอล 50% มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟากลูโคสซิเดสได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.008±0.0.005 mg mL^{-1} รองลงมาคือสารสกัดจากน้ำมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.021±0.013 mg mL^{-1} สารสกัดจากเอทานอล 80% มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.019±0.005 mg mL^{-1} (Konsue et al., 2015) สารสกัดเมทานอลจากรากไมยราบ ขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถป้องกันพิษต่อตับได้จากค่าการทำงานของตับ ได้แก่ SGOT, SGPT และบิลิรูบินในซีรั่ม ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเทียบกับ Silymarin (Suneetha et al., 2011) สารสกัดด้วยเมทานอลจากใบมีฤทธิ์ปกป้องตับโดยสารสกัดขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถป้องกันพิษต่อตับได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งเห็นได้จากแนวโน้ม Activity ของเอนไซม์ในซีรั่มเมื่อเทียบกับ Silymarin (Rajendran et al., 2009) สารสกัดด้วยน้ำจากใบไมยราบ ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูปกติได้ดีที่กว่ายา Glibenclamide อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$ และ $p\leq0.01$) ส่วนในหนูเบาหวาน สารสกัดไมยราบ ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ใกล้เคียงกับ Insulin และสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ดีกว่ายา Glibenclamide ในชั่วโมงที่ 3 และ 4 ของการทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$ และ $p\leq0.01$) Manosroi et al. (2011) สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูเบาหวานโดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง ขนาด 600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีค่าใกล้เคียงกับหนูเบาหวานที่ได้รับยา Metformin (Sutar et al., 2009) สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบขนาด 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์ในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของหนูถีบจักรปกติ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) (Amalraj and Ignacimuthu, 2002)

จากการกล่าวอ้างถึงสรรพคุณของครอบฟันสีและไมยราบที่ใช้รักษาโรคเบาหวานใน ปริมาณอย่างละเท่า ๆ กัน ใช้ชงกับน้ำร้อนเป็นชาดื่มแทนน้ำ ที่ปรากฏในหนังสือพจนานุกรมโรคและสมุนไพรไทย และพจนานุกรมโรคและสมุนไพรไทย ว่าสามารถใช้รักษาโรคเบาหวานได้นั้น และยังพบข้อมูลการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยเฉพาะฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลของไมยราบ และครอบฟันสี ดังจะเห็นได้จากรายงานการศึกษาข้างต้นมีความเป็นไปได้ว่ายาขนานนี้น่าจะมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ ซึ่งโรคเบาหวานมีความสัมพันธ์กับระดับของภาวะเครียดออกซิเดชัน ระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มสูงสามารถกระตุ้นการเกิดสารอนุมูลอิสระ ทั้งนี้ยังไม่พบข้อมูลการวิจัยเกี่ยวกับการนำยาสมุนไพรขนานนี้ เพื่อเป็นแนวทางเพิ่มข้อมูลทางด้านวิชาการในการสนับสนุนภูมิปัญญาทางการแพทย์แผนไทยที่มีการนำยาขนานนี้มาใช้ในการบำบัด ป้องกันโรค อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่าการรับประทานยาขนานนี้นอกจากจะช่วยลดละดับน้ำตาลในเลือดได้ อาจเนื่องมาจากสารต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพร ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขบวนการต่าง ๆ ในร่างกาย แต่เนื่องจากข้อมูลทางวิชาการที่รองรับยังไม่ชัดเจน ซึ่งทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยาสมุนไพรขนานนี้ ข้อมูลเหล่านี้มีความจำเป็นและสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับการนำไปใช้เพื่อป้องกัน หรือรักษาโรคเบาหวาน ซึ่งเป็นวิธีการเบื้องต้นในการศึกษาพืชสมุนไพรที่มีรายงานว่าสามารถรักษาโรคเบาหวานได้ อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของตัวอย่างพืช

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ ครอบฟันสี และไมยราบ (AM.) (ใช้ทั้งต้น) ที่เก็บในช่วงเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนสิงหาคม ปี พ.ศ. 2558 เก็บจากอำเภอเขาวง จังหวัดกาฬสินธุ์ ทำการตรวจเอกลักษณ์พืชโดยผู้เชี่ยวชาญ จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตัวอย่างพรรณไม้แห้งเก็บไว้ที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (MED-MP0001/AK.และ MED-AI0001/AK) พืชทั้ง 2 ชนิด มาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบที่ 45-50 องศาเซลเซียส อบจนแห้ง แล้วบดเป็นผงละเอียด ชั่งเตรียมผสมระหว่างครอบฟันสีและไมยราบ ในอัตราส่วน 1:1 เก็บใส่ภาชนะปิดสนิทแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมความชื้น

การเตรียมสารสกัดจากน้ำ (AMA)

นำผงสมุนไพร จำนวน 1 กิโลกรัม ต้มกับน้ำ 10 ลิตร ต้มเป็นเวลา 10 นาที ทำการต้มซ้ำอีกสองครั้ง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายที่ได้จากการกรองไปทำแห้งด้วย

เครื่อง Freeze dryer แล้วเก็บในภาชนะปิดสนิท ทึบแสงที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารสกัด 50% Ethanol (AMHE)

นำผงสมุนไพรไปหมักด้วย 50% Ethanol โดยใช้อัตราส่วนผงสมุนไพร : 50% Ethanol ในอัตราส่วน 1 : 5 หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นกรองกระดาษกรอง นำส่วนที่กรองได้ไประเหยโดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator ตามด้วยเครื่อง Freeze dryer แล้วเก็บในภาชนะปิดสนิท ทึบแสงที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารสกัด 80% Ethanol (AME)

นำผงสมุนไพรไปหมักด้วย 80% Ethanol โดยใช้อัตราส่วนผงสมุนไพร : 80% Ethanol ในอัตราส่วน 1 : 5 หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง นำส่วนที่กรองได้ไประเหยโดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator ตามด้วยเครื่อง Freeze dryer แล้วเก็บในภาชนะปิดสนิท ทึบแสงที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส

การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Singleton et al. (1999) โดยเตรียมสารสกัดของแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 100 μL เติมสารละลาย Folin–Ciocalteu ความเข้มข้น 0.2 N ปริมาตร 500 μL เขย่าและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียม-คาบอเนตความเข้มข้น 7.5 % w/v ปริมาตร 400 μL เขย่าและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 765 nm นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic acid

การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์

หาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยประยุกต์ตามวิธีของ Zhishen et al. (1999) โดยเตรียมสารสกัดของแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 100 μL จากนั้นเติม 2.5 % of $NaNO_2$ ปริมาตร 400 μL เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 500 μL เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม เติมน้ำ DI อีก 2,000 μL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Quercitin

การวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระ ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Benzie et al. (1996) โดยเตรียมสารสกัดของแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน นำสารตัวอย่างมา 100 μL จากนั้นเติม สารละลาย FRAP ปริมาตร 900 μL (300 mM Acetate buffer (pH 3.6): 10 mM Tripyridyltriazine solution: 20 mM Ferric chloride solution of 10: 1: 1) เขย่าให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 593 nm นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Trolox

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Brand-Williams et al. (1995) เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1 และ 1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 μL เติม DPPH ที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1 0.1 mM ในเอทานอล ปริมาตร 900 μL ลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นทำการ Vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน เป็น % Inhibition (% Inhibition = $[(Abs_{DPPH}-Abs_{DPPH+test}) \times 100] / Abs_{DPPH}$ เขียนกราฟระหว่าง % Inhibition และความเข้มข้น รายงานเป็นค่า IC_{50} (50% Inhibitory concentration) และเทียบกับสารมาตรฐาน Ascorbic acid และ Trolox

การทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ABTS assay

ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Re R, Pellegrini et al. (1999) เตรียมสารละลาย ABTS ด้วยการเปลี่ยน ABST ให้เป็นอนุมูลอิสระ ABTS•+ ด้วยการเติมสารละลาย $K_2S_2O_8$ จากนั้นทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วทำการเจือจางสารละลาย ABTS•+ ด้วยน้ำปราศจากไอออน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS•+ ประมาณ 0.7xx-0.8xx จากนั้นนำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1 และ 1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ปริมาตร 100 µL เติมสารละลาย ABTS•+ ที่เจือจางปริมาตร 900 µL ผสมให้เข้ากันจากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (% Inhibition) รายงานเป็นค่า IC_{50} (50% Inhibitory concentration) และเทียบกับสารมาตรฐาน Ascorbic acid และ Trolox

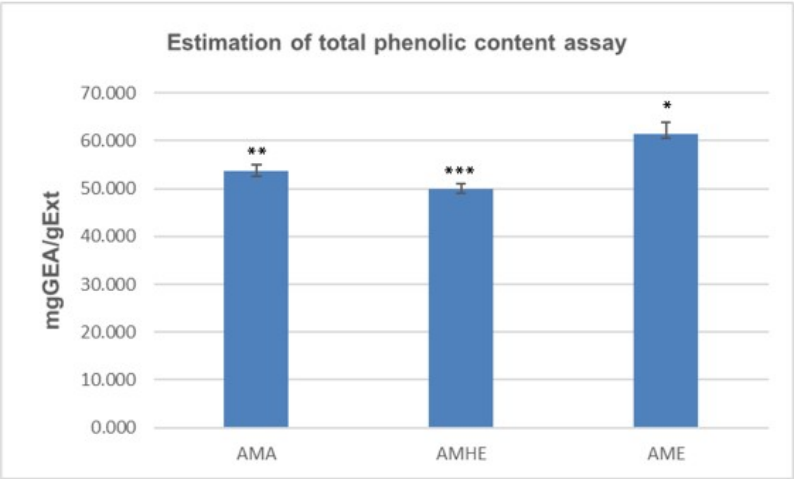
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองละ 4 ซ้ำ โดยทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และแต่ละความเข้มข้นด้วยวิธี Duncan multiple range test ที่ P-value คำนวณค่าสถิติ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11.5

ผลการวิจัย

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

ในการทดสอบสารสกัดครอบฟันสีผสมไมยราบ (AM) ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอล 80 % (AME) มีปริมาณฟีโนลิกรวมมากที่สุด คือ 61.472±2.335 mgGE g^{-1}Ext และรองลงมาคือโดยสารสกัดด้วยน้ำ (AMA) มีปริมาณฟีโนลิกรวมน้อยที่สุด คือ53.556±1.449 mgGE g^{-1}Ext และสารสกัดด้วยเอทานอล 50 % (AMHE) คือ 49.972±1.110 mgGE g^{-1}Ext (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดครอบฟันสีผสมไมยราบ สารสกัดด้วยน้ำ (AMA) สารสกัดด้วยเอทานอล 50% (AMHE) และสารสกัดด้วยเอาทนอล 80% (AME)

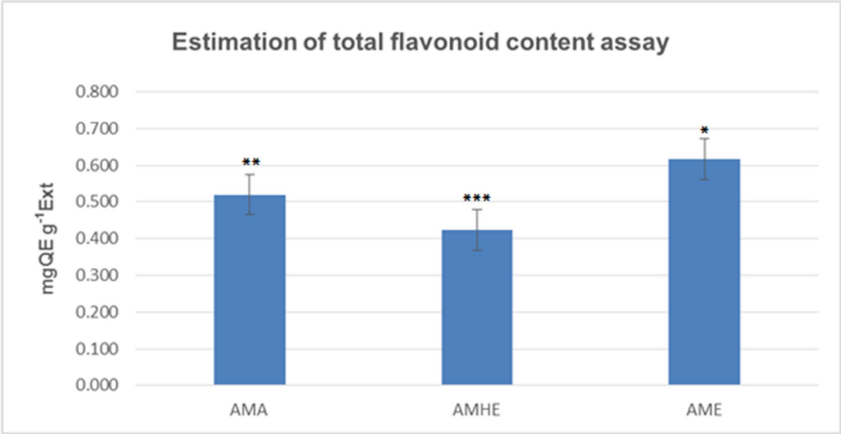
*,**,*** แสดงถึงความแตกต่างของชุดข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดครอบฟันสีผสมไมยราบ (AM) ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอล 80% (AME) มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด คือ617.427±29.434 mgQE g^{-1}Ext รองลงมาคือสารสกัดด้วยน้ำ (AMA) คือ 520.162±15.692 mgQE g^{-1}Ext โดยสารสกัดด้วยเอทานอล 50% (AMHE) มีฟลาโวนอยด์รวมน้อยที่สุด คือ 424.519±11.297 mgQE g^{-1}Ext (รูปที่ 2)

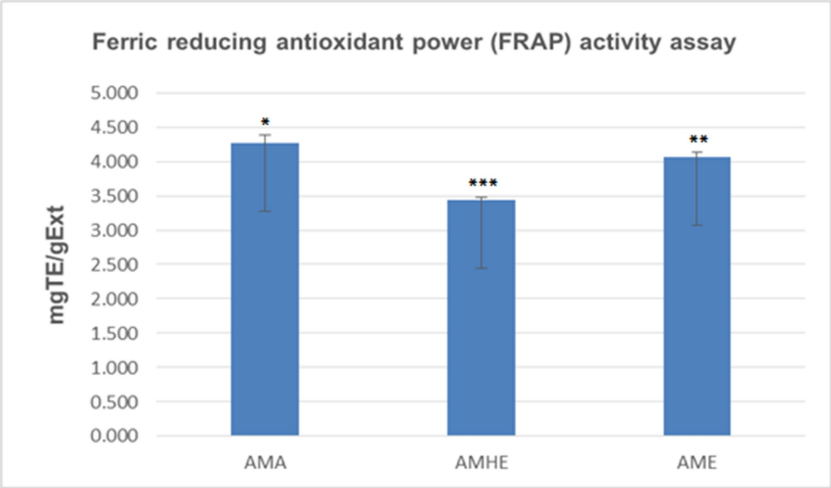
การวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระ ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

จากการทดสอบพบว่า สารสกัดครอบฟันสีผสมไมยราบ (AM) สารสกัดด้วยน้ำ (AMA) มีความสามารถในการเป็นสารรีดิวซ์มากที่สุด คือ 4.269±0.120 mgTE g^{-1}Ext รองลงมาคือสารสกัดด้วยเอทานอล 80% (AME) คือ 4.067±0.068 mgTE g^{-1}Ext โดยสารสกัดด้วยเอทานอล 50% (AMHE) คือ 3.437±0.039 mgTE g^{-1}Ext (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดครอบฟันสีผสมไมยราบ สารสกัดด้วยน้ำ (AMA) สารสกัดด้วยเอทานอล 50% (AMHE) และสารสกัดด้วยเอทานอล 80% (AME)

*,**,*** แสดงถึงความแตกต่างของชุดข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

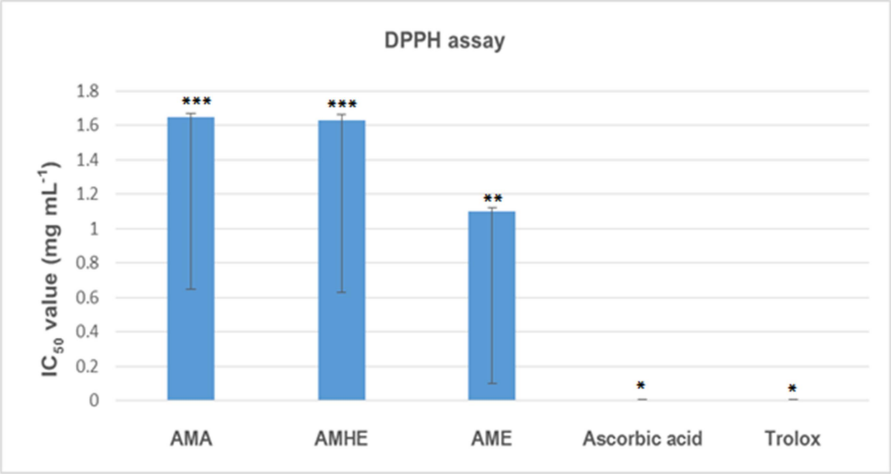


รูปที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธี FRAP assay ของสารสกัดครอบฟันสีผสมไมยราบ สารสกัดด้วยน้ำ (AMA) สารสกัดด้วยเอทานอล 50% (AMHE) และสารสกัดด้วยเอทานอล 80% (AME)

*,**,*** แสดงถึงความแตกต่างของชุดข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

สารสกัดครอบฟันสีผสมไมยราบ (AM) ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า Ascorbic acid มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.004±0.001 mg mL^{-1} รองลงมาคือ Trolox, สารสกัดด้วยเอทานอล 80% (AME), สารสกัดด้วยเอทานอล 50 % (AMHE) และสารสกัดด้วยน้ำ (AMA) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.005±0.001, 1.099±0.020, 1.629±0.032 และ 1.650±0.016 mg mL^{-1} ตามลำดับ (รูปที่ 4)

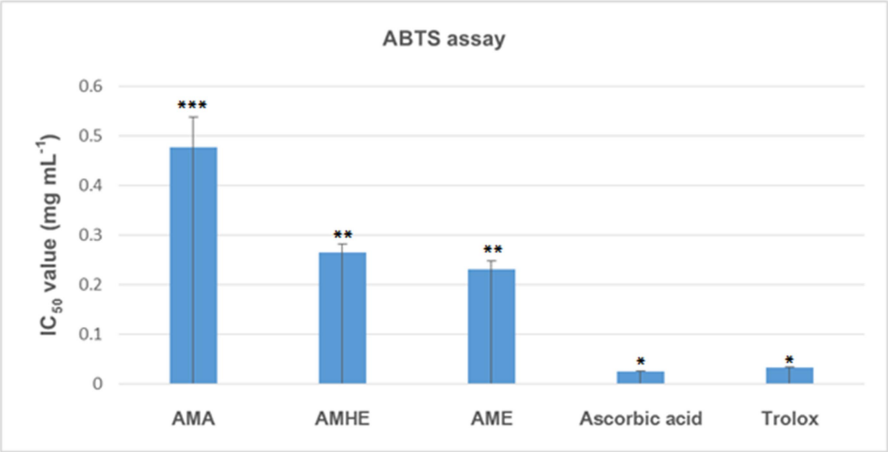


รูปที่ 4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธี DPPH assay ของสารสกัดครอบฟันสีผสมไมยราบ สารสกัดด้วยน้ำ (AMA) สารสกัดด้วยเอทานอล 50% (AMHE) สารสกัดด้วยเอทานอล 80% (AME) Ascorbic acid และ Trolox

*,**,*** แสดงถึงความแตกต่างของชุดข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี ABTS assay

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดครอบฟันสีผสมไมยราบโดย ABTS assay พบว่า Ascorbic acid มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.025±0.001 mg mL^{-1} รองลงมาคือสาร Trolox, สารสกัดด้วยเอทานอล 80% (AME), สารสกัดด้วยเอทานอล 50% (AMHE) และสารสกัดด้วยน้ำ (AMA) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.032±0.001, 0.230±0.018, 0.264±0.018 และ 0.476±0.061 mg mL^{-1} ตามลำดับ (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธี ABTS assay ของสารสกัดครอบฟันสีผสมไมยราบ สารสกัดด้วยน้ำ (AMA) สารสกัดด้วยเอทานอล 50% (AMHE) สารสกัดด้วยเอทานอล 80% (AME) Ascorbic acid และ Trolox

*,**,*** แสดงถึงความแตกต่างของชุดข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในครั้งนี้ เลือกการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenger) ด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจาก DPPH และ ABTS เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร ผลที่ได้จากการทดลองทั้งสองวิธีนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัด AM ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยสารสารสกัดด้วยเอทานอล 80% (AME) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด แต่น้อยกว่า Ascorbic acid และ Trolox และยังสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวม โดยพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอล 80% (AME) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมมากที่สุด ซึ่งผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับผลขององค์ประกอบทางเคมีของครอบฟันสีและไมยราบประกอบด้วยสารกลุ่ม ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ (Sowmya and Ananthi, 2011; Krisanapun et al., 2009) ในการศึกษานี้ สารสกัดด้วยตัวทำละลายด้วยเอทานอล 80% แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด เนื่องจากเอทานอลสามารถสกัดสารละลายสารพฤกษเคมีจำพวกสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ได้ดี จึงมีปริมาณสารฟีนอลมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอื่น ซึ่งปริมาณสารฟีนอลสูงจะส่งผลให้มีศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระสูง สารกลุ่มฟีนอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่มีโครงสร้างเป็น Aromatic Ring แทนที่ด้วยหมู่ Hydroxyl Group โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูง จึงทำให้อิเล็กตรอนที่มีอยู่อย่างหนาแน่น สามารถเกิดการเคลื่อนย้ายไปทั่วโครงสร้าง และทำให้เกิดการเสถียร ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อดึงอิเล็กตรอนไปก็ทำให้มีโครงสร้างที่เสถียรขึ้น และสารสกัดที่มีปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูงจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงด้วย เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิล (OH) บนโครงสร้างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ส่งผลให้การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Pourmorad et al., 2006) นอกจากนี้สารสกัดด้วยน้ำ (AMA) ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถให้อิเล็กตรอนในการรีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} (BenZie, Strain, 1996) ได้ดีที่สุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay เนื่องจากสารสกัดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นสารสกัดหยาบ ซึ่งประกอบด้วยสารพฤกษเคมีหลายชนิด ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดครอบฟันสีและไมยราบอาจมาจากสารที่สำคัญ คือ Phenolic และ Flavonoids (Sowmya and Ananthi, 2011) ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) ประเภทพอลิ-ฟีนอล (polyphenol) ฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มสารพฤกษเคมีที่มีสรรพคุณกว้างขวาง รวมทั้งมีสรรพคุณมากมาย มีคุณสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชัน (Antioxidant) (พร้อมจิต และรุ่งระวี, 2553) ซึ่งก่อนหน้านี้ มีการศึกษาของ Chowdhury et al. (2008) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไมยราบด้วยเมธานอลจากส่วนเหนือดินมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 296.92 mg mL^{-1} เทียบกับ Ascorbic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 131.29 mg mL^{-1} เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Manosroi et al. (2011) เมื่อศึกษาด้วยวิธีเดียวกัน พบว่าไมยราบที่สกัดด้วยน้ำ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 136.00±0.003 mg mL^{-1} เทียบกับ Ascorbic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 58.00±0.003 mg mL^{-1}

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดครอบฟันสีผสมไมยราบในอัตราส่วนที่เท่ากัน ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่า สารสกัดด้วยเอาทนอล 80% (AME) มีปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด และยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 50% (AMHE) และสารสกัดด้วยน้ำ (AMA) เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay และในวิธี FRAP สารสกัดที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ดี เพื่อเปลี่ยนรูปให้อยู่ในสภาวะที่เสถียรสูงที่สุด คือ สารสกัดด้วยน้ำ (AMA) สารสกัดด้วยเอทานอล 50% (AMHE) และ สารสกัดด้วยเอทานอล 80% (AME) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากยาขนานนี้ที่ประกอบไปด้วยครอบฟันสีและไมยราบสามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ส่งผลให้อนุมูลลดลง สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี ซึ่งสารสกัดที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นสารสกัดหยาบ อาจจะประกอบไปด้วยสารพฤกษเคมีหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจในการนำยาสมุนไพรขนานนี้มาค้นหาหรือพัฒนาสารจากยาขนานนี้เกิดจากสารสำคัญชนิดใด เพื่อให้ได้ข้อมูลในการนำมาใช้เป็นยา

สำหรับการป้องกัน หรือรักษาโรคเบาหวานได้ และการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ รวมทั้งการศึกษาความปลอดภัยต่อไปทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

ทินกร เหล่าออง, กนกวรรณ จารุกำจร และวรัญญา จตุพรประเสริฐ. (2556). ผลกระทบของระบบต้านอนุมูลอิสระและภาวะเครียดออกซิเดชั่นต่อพัฒนาการของภาวะเบาหวาน. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 9(1): 1-14.

นันทวัน บุณยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2539). สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (1). กรุงเทพฯ: ประชาชน.

นันทวัน บุณยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2542). สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (3). กรุงเทพฯ: ประชาชน.

พร้อมจิต ศรลัมพ์ และรุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล. (2553). รสยาสมุนไพรกับสารเคมี:ความเหมือนที่แตกต่าง. กรุงเทพฯ: หจก.สามลดา จำกัด.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. (2542). พจนานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ: อักษรพิทยา.

สุณี ธนาเลศกุล. (2544). บำบัดโรคด้วยการแพทย์ทางเลือก. กรุงเทพฯ: รีดเดอร์ส ไดเจสท์ (ประเทศไทย).

Adisakwattana, S., Pudhom, K. and Yibchok-anun, S. (2009). Influence of the methanolic extract from *Abutilon indicum* leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. African Journal of Biotechnology 8(10): 2011-2015.

Amalraj, T. and Ignacimuthu, S. (2002). Hyperglycemic effect of leaves of *Mimosapudica* Linn. Fitoterapia 73: 351-352.

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal. Biochem. 239: 70-76.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C., (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technology 28: 25-30.

Champanerkar, P.A., Vaidya, V.V., Shailajan, S. and Menon, S.N. (2010). A sensitive, rapid and validated liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) method for determination of Mimosine in *Mimosa pudica* Linn. Natural Science 2(7): 713-717.

Chandrashekar, D. K. and Manthale, D.M. (2012). Invention of analgesic and anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Mimosa Pudica* Linn leaves. Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research 1(1): 36-38.

Chowdhury, S. A., Islam, J., Rahaman Mahfujur, M.d., Rahman Mostafizur, M.d., Rumzhum, N., Sultana, R. and Parvin, N. M. (2008). Cytotoxicity, antimicrobial and antioxidant studies of the different plant parts of *Mimosa Pudica*. Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences 1(1&2): 80-84.

Dong, H.Q., Li, M., Zhu, F., Liu, F.L. and Huang, J.B. (2012). Inhibitory potential of trilobatin from Lithocarpus polystachyus Rehd against α-glucosidase and α-amylase linked to type 2 diabetes. Food Chemistry 130: 261-266.

Ghani, A. (2003). "Medicinal plants of Bangladesh". The Asiatic Society of Bangladesh., 2nd Ed, 302-303.

Kannan, S., Aravinth, S., Sam, E., Kumar J., Saminathan, K., Suthakaran R, Ravi kumar, M. and Parimala Devi B. (2009). Wound healing activity of *Mimosa pudica* Linn formulation. International Journal of PharmTech Research 11(4): 1554-1558.

Konsue A, Picheansoonthon C, Talubmook C. α-Glucosidase inhibitory activity of extracts from *Mimosa pudica* L. J Sci Technol MSU. 2015: 80-84.

Krisanapun, C., Peungvicha, P., Temsiririrkkul, R. & Wongkrajanga, Y. (2009). Aqueous extract of *Abutilon indicum* Sweet inhibits glucose absorption and stimulates insulin secretion in rodents. Nutrition Research 29: 579–587.

Krisanapun, C., Lee, S.H., Peungvicha, P., Temsiririrkkul, R. and Baek, S.J. (2011). Antidiabetic activities of *Abutilon indicum* (L.) Sweet are mediated by enhancement of Adipocyte differentiation and activation of the GLUT1 promoter. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011 (2011): 1-9.

Lakshmi S. N., Sasikumar N. M., Sunita S., Manisha M. B. and Ramesh T. S. (2007). Reversed-Phase High-Performance Thin-Layer Chromatographic Quantification of Mimosine from Whole Plant of *Mimosa pudica* Linn. Journal of Planar Chromatography 20(1): 49–51.

Manosroi, J., Zaruwa, Z., Moses, Manosroi, W. and Manosroi, A. (2011). Hypoglycemic activity of Thai medicinal plants selected from the Thai/Lanna Medicinal Recipe Database MANOSROI II. Journal of Ethnopharmacology 138: 92–98.

Porchezhian, E. and Ansari, S.H. (2005). Hepatoprotective activity of *Abutilon indicum* on experimental liver damage in rats. Phytomedicine 12: 62–64.

Rajendran, R., Hemalatha, S., Akasakalai, K., MadhuKrishna, C.H., Sohil, B.V. and Sundaram, M.R. (2009). Hepatoprotective activity of *Mimosa pudica* leaves against carbontetrachloride induced toxicity. Journal of Natural Products 2: 116-122.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 26: 1231-1237.

Sangma, T. K., Meitei, U. D., Sanjenbam, R. and Khumbongmayum, S. (2010). Diuretic property of aqueous extract of leaves of *Mimosa pudica* Linn. On experimental albino rats. Journal of Natural Products 3: 172-178.

Seetharam, Y.N., Gururaj C., Ramachandra, S.S. and Bheemachar. (2002). Hypoglycemic activity of *Abutilon indicum* leaf extracts in rats. Fitoterapia 73: 156-159.

Singleton, V.L., Orthofer. R. and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. Methods in Enzymology 299: 152-178.

Sowmya, A., and Ananthi, T. (2011). Hypolipidemic activity of *Mimosa pudica* Linn on butter induced hyperlipidemia in rats. Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences 1(4): 123-126.

Sutar, N.G., Sutar, U.N. and Behera, B.C. (2009). Antidiabetic activity of *Mimosa pudica* Linn in Albino Rats. Journal of Herbal Medicine and Toxicology 3(1): 123-126.

Stuart, A.R., Gulve, E.A., and Wang, M. (2004). Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. Chemical Reviews 104: 1255–1282.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry 64: 555-559.

❑❑❑❑❑