

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือก ผล และใบของไผ่หิน Radical Scavenging Activity of Bark, Fruit, and Leaf Extracts of *Akschindlium godefroyanum*

ณัฐพงศ์ ชัยภักดิ์^{1*}, กาญจนา สุขบัว², ดุสฎีพร หิรัญ³ และขวัญใจ กนกเมธากุล⁴
Nattapong Chaipukdee^{1*}, Kanjana Sukbua², Dussadeeporn Hirun³ and Kwanjai Kanokmedhakul⁴

^{1*,2,3} คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏชัยภูมิ จังหวัดชัยภูมิ 36000

⁴ หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

^{1*,2,3} Faculty of Arts and Science, Chaiyaphum Rajabhat University, Chaiyaphum 36000, Thailand.

⁴ Natural Products Research Unit, Department of Chemistry, and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

^{1*} Corresponding Author, E-mail : nattapong-c@cpru.ac.th

Received: 18 March 2021, Revised: 29 June 2021, Accepted: 20 September 2021

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือก ผล และใบของไผ่หิน (*Akschindlium godefroyanum*) ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging (DPPH) พืชตัวอย่างเก็บในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏชัยภูมิ โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอ็น-เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยคืออัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ผลการวิจัยพบว่า ในส่วนของเปลือกสารสกัดเมทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ($IC_{50} = 28.8 \mu\text{g/mL}$) ตามด้วยเอทิลอะซิเตทและเอ็น-เฮกเซน ($IC_{50} = 128.1$ และ $529.5 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ) ในส่วนของผลพบว่าสารสกัดเมทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ($IC_{50} = 98.2 \mu\text{g/mL}$) ตามด้วยสารสกัดเอทิลอะซิเตท ($IC_{50} = 698.2 \mu\text{g/mL}$) ส่วนสารสกัดเอ็น-เฮกเซนไม่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ และในส่วนของใบพบว่าสารสกัดเมทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงสุดตามด้วยสารสกัดเอ็น-เฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ($IC_{50} = 170.1, 309.0$ และ $447.7 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ) โดยรายงานวิจัยนี้เป็นการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพครั้งแรกของสารสกัดจากไผ่หิน

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, สารสกัด, *Akschindlium godefroyanum*, ไผ่หิน, DPPH assay

Abstract

The objective of this research was to determine the radical scavenging activity of bark, fruit, and leaf extracts of *Akschindlium godefroyanum* by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay (DPPH assay). Plant samples were collected from

Chaiyaphum Rajabhat University, Chaiyaphum Province, Thailand. The plants were extracted with n-hexane, ethyl acetate, and methanol, respectively. The research instrument was a UV-Vis spectrophotometer. The results showed that methanol extract from the barks exhibited the highest radical scavenging activities ($IC_{50} = 28.8 \mu\text{g/mL}$) followed by ethyl acetate and n-hexane ($IC_{50} = 128.1$ and $529.5 \mu\text{g/mL}$, respectively). For the fruits, methanol extract showed the highest activities ($IC_{50} = 98.2 \mu\text{g/mL}$) followed by ethyl acetate extract ($IC_{50} = 698.2 \mu\text{g/mL}$) whereas n-hexane extract was inactive. Among the extracts from leaves, methanol extract showed the highest activities followed by n-hexane and ethyl acetate extract ($IC_{50} = 170.1, 309.0$ and $447.7 \mu\text{g/mL}$, respectively). This was the first biological activity report of crude extracts from *Akschindlium godefroyanum*.

Keywords : radical scavenging activity, crude extract, *Akschindlium godefroyanum*, DPPH assay

1. บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radical) มีบทบาททั้งที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต อนุมูลอิสระในร่างกายเกิดขึ้นได้ทั้งจากกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในร่างกายและการได้รับจากสิ่งที่อยู่รอบตัวภายนอก เช่น มลพิษทางอากาศ ควันบุหรี่ แก๊สโอโซน รังสีเอกซ์ สารเคมี รวมไปถึงอาหารที่รับประทาน ปัจจุบันมลพิษทางอากาศเพิ่มขึ้นอย่างมาก นอกจากนี้ยังมีการใช้สารฆ่าแมลงในการเกษตรอย่างแพร่หลาย ทำให้ในชีวิตประจำวันมนุษย์ได้รับฝุ่นควันและสารเคมีที่เป็นอันตรายเข้าสู่ร่างกายอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

อนุมูลอิสระในร่างกายที่มีในปริมาณพอดีมีความจำเป็นต่อร่างกายโดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ รวมทั้งกระบวนการกำจัดโดยทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์ (phagocytosis) ด้วย ซึ่งเซลล์จะอาศัยสารอนุมูลอิสระเป็นตัวเข้าทำลาย แต่ถ้าร่างกายมีสารอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นและเกิดการสะสมในร่างกายมากเกินไปจะทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ส่งผลให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และโมเลกุลอื่น ๆ ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น มะเร็ง หัวใจขาดเลือด เบาหวาน ต้อกระจก อัลไซเมอร์ พาร์กินสัน ภาวะเสื่อมสภาพและแก่ก่อนวัย รวมถึงโรคทางระบบประสาทและโรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันทำงานผิดปกติด้วย ดังนั้นร่างกายจึงมีกระบวนการป้องกันไม่ให้เกิดการสะสมของสารอนุมูลอิสระที่มากเกินไปโดยการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ขึ้นมาเองภายในร่างกาย นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระยังได้รับมาจากแหล่งภายนอก ได้แก่ อาหารที่รับประทาน เป็นต้น เพื่อที่จะทำให้ร่างกายสามารถรักษาสสมดุลของอนุมูลอิสระในร่างกายไว้ได้และไม่ทำให้เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระมากเกินไป สารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญที่พบในผักและพืชที่มีสรรพคุณทางยา ได้แก่ เบต้าแคโรทีน วิตามินซี วิตามินอี และกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก โดยการรับประทานผักหรือพืชที่มีสรรพคุณทางยาเป็นประจำสม่ำเสมอจะสามารถช่วยต้านหรือลดปริมาณอนุมูลอิสระในร่างกายไม่ให้สะสมมากเกินไปจนส่งผลเสียหรือก่อให้เกิดความผิดปกติต่าง ๆ แก่ร่างกายได้ (บรรทด จอมสวรรค์, 2560)

Akschindlium godefroyanum (Kuntze) H. Ohashi มีชื่อต่าง ๆ ตามท้องถิ่น ได้แก่ ไชหิน ตองหมอง ต่างหมอง ดอกยักดาน ตองหมองดาน และกระโดนจาน เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Fabaceae และเป็นพืช

ชนิดเดียวของสกุล *Akschindlium* ลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นไม้พุ่ม ลำต้นตั้งตรง สูง 1.5-3 เมตร ลำต้นมีข้อเด่นชัด มีขนสีขาวและนวลแบ่ง แตกกิ่งก้านได้มาก ที่โคนต้น เรือนยอดเล็ก มีใบน้อย เปลือกสีเทา นวล ใบประกอบชนิดมีใบย่อยใบเดียว เรียงสลับ รูปไข่หรือรูปไข่แกมขอบขนาน กว้าง 5-8 เซนติเมตร ยาว 12-15 เซนติเมตร ฐานใบรูปหัวใจ ปลายใบมน ปลายใบแหลม แผ่นใบด้านบนสีเขียวแกมเทา ด้านล่างสีขาวนวล มีขนสั้น ๆ ขึ้นหนาแน่นที่ผิวใบทั้ง 2 ด้าน ก้านใบแผ่เป็นครีบบน ขอบใบเรียบ ดอกช่อแบบกระจุกออกที่ปลายกิ่ง ชูขึ้นเห็นเด่นชัด ยาวประมาณ 15-30 เซนติเมตร ดอกย่อยเป็นรูปคล้ายดอกถั่ว กลีบดอกสีม่วงแดง กลีบกลางรูปเกือบกลม กลีบคู่ล่างรูปขอบขนานแกมรูปไข่ เกสรเพศผู้มี 10 อัน เชื่อมกันเป็น 2 กลุ่ม เกสรเพศเมียมีรังไข่รูปแถบ มีขนสีขาว กลีบเลี้ยง เชื่อมติดกันตรงโคน ปลายแยกเป็น 4 กลีบ สีเขียวแกมแดง ผล เป็นฝักแบน คอดเป็นข้อ ๆ ประมาณ 3-5 ข้อ มีขนหนาแน่น เฉพาะตรงสันของฝัก มี 3-5 เมล็ด พบขึ้นทั่วไปตามโคกหิน ดินดาน และลานหินของป่าเต็งรัง ออกดอกตลอดปี ยอดอ่อนและใบอ่อน มีรสฝาดใช้รับประทานเป็นผักสดได้ (ภาพที่ 1) ในด้านสรรพคุณทางยา พบว่ารากใช้ต้มน้ำดื่มแก้โรกระยะอาหารและรักษาอาการเวียนศีรษะและใบใช้ต้มน้ำดื่มแก้บิด ท้องร่วง แก้กเกล็ด ปวดเอว ใบนำมาตากแห้งบดเป็นยารักษาเบาหวาน (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2553)

ภาพที่ 1 ต้นไผ่หิน (ซ้าย) ใบ (กลาง) ดอกและผล (ขวา)



จากการสืบค้นฐานข้อมูล SciFinder Scholars database 2020 พบว่ายังไม่เคยมีการรายงานการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากไผ่หินมาก่อน ดังนั้นข้อมูลด้านการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้จากส่วนต่าง ๆ ของไผ่หิน เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาเป็นอย่างยิ่ง โดยข้อมูลที่ได้จะสามารถใช้สนับสนุนสรรพคุณทางยาของพืชชนิดนี้ นอกจากนี้ยังสามารถเป็นข้อมูลสนับสนุนการพัฒนาสารสกัดของไผ่หินเพื่อประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดการต้านอนุมูลอิสระในอนาคตได้อีกด้วย

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือก ผล และใบของไผ่หินด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging (DPPH assay)

3. สมมติฐานการวิจัย

สารสกัดจากเปลือก ผล และใบของไผ่หินแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4. แนวคิดทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

4.1 แนวคิดทฤษฎี

4.1.1 อนุมูลอิสระ (free radical) คือโมเลกุลที่สามารถอยู่ได้อย่างอิสระโดยมีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ (unpaired electron) อยู่ภายในออร์บิทัลของอะตอม โมเลกุลดังกล่าวจะไม่เสถียรและมีความว่องไวจึงสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นได้ง่ายด้วยการให้หรือรับอิเล็กตรอน ซึ่งเรียกว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชัน (V Lobo, 2010) ส่วนใหญ่อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ประกอบไปด้วยอะตอมออกซิเจนที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาโดยจะเรียกว่า Reactive Oxygen Species (ROS) นอกจากนี้ยังมีโมเลกุลที่ประกอบไปด้วยอะตอมไนโตรเจนที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาเช่นกัน เรียกว่า Reactive Nitrogen Species (RNS) ตัวอย่าง ROS และ RNS ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ hydroxyl radical ($\text{OH}^\cdot$), superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$), nitric oxide radical ($\text{NO}^\cdot$), nitrogen dioxide radical ($\text{NO}_2^\cdot$), peroxy radical ($\text{ROO}^\cdot$), lipid peroxy radical ($\text{LOO}^\cdot$), hydrogen peroxide (H_2O_2), lipid hydroperoxide (LOOH) เป็นต้น หากร่างกายมนุษย์มีสารอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ เหล่านี้อยู่ในปริมาณมากจะทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ก่อให้เกิดการทำลายนิวเคลียสและเยื่อหุ้มเซลล์ กรดนิวคลีอิก โปรตีน คาร์โบไฮเดรต รวมไปถึงไขมันในร่างกายสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งไขมัน กรดนิวคลีอิก และโปรตีนเป็นสิ่งหลักที่สารอนุมูลอิสระสามารถเข้าทำลายได้โดยง่าย ส่งผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ความผิดปกติของระบบหัวใจและหลอดเลือด ความผิดปกติของระบบประสาท ความเสื่อมถอยของร่างกาย ความชรา รวมไปถึงการก่อให้เกิดมะเร็ง (Satish Balasaheb Nimse, 2015 ; Lien Ai Pham-Huy, 2008)

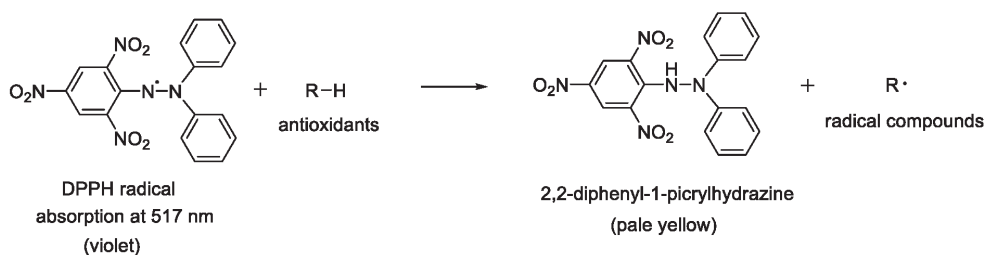
4.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่สามารถยับยั้งหรือหยุดปฏิกิริยาการทำลายของอนุมูลอิสระได้ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงมีหน้าที่รักษาสสมดุลหรือควบคุมไม่ให้อนุมูลอิสระเกิดการสะสมในร่างกายมากเกินไปอันจะส่งผลทำให้เกิดโรคหรือความผิดปกติในร่างกายขึ้นมา สารต้านอนุมูลอิสระมีอยู่ทั้งในรูปแบบที่เป็นเอนไซม์ (enzymatic antioxidant) และรูปแบบที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzymatic antioxidant) นอกจากนี้มีทั้งแบบที่ร่างกายสามารถผลิตขึ้นมาได้เอง (endogenous antioxidant) และแบบที่ได้รับจากแหล่งภายนอก (exogenous antioxidant) ได้แก่ แหล่งอาหารที่รับประทานเข้าไป เช่น วิตามินอี วิตามินซี บีตาแคโรทีน โกลโคปีน ฟลาโวนอยด์ รวมไปถึงกรดไขมันโอเมก้า 3 และ 6 เป็นต้น (Joye K Willcox, 2004)

4.1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity assay) คือการวัดความสามารถโดยรวมในการต้านอนุมูลอิสระหรือด้านการออกซิเดชัน ซึ่งสามารถทำได้ทั้งในรูปแบบการทดลองในสิ่งมีชีวิต (*in vivo* experimental model) และไม่ใช่สิ่งมีชีวิต (*in vitro* experimental model) โดยมีรูปแบบการทดลองอย่างหลากหลายวิธี เช่น 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl radical scavenging activity (DPPH assay), Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay, Ferric Reducing Ability of Plasma assay (FRAP) เป็นต้น ซึ่งวิธีต่าง ๆ เหล่านี้สามารถนำมาใช้วิเคราะห์และทดสอบเพื่อหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารใด ๆ ได้ โดยวิธีที่นิยมอย่างแพร่หลายคือวิธี DPPH assay

4.1.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay เป็นวิธีการทดสอบความสามารถของสารในการต้านอนุมูลอิสระที่พัฒนาขึ้นโดย Marsden S. Blois ในปี 1958 โมเลกุล 2,2-Diphenyl-1-

Picrylhydrazyl (DPPH) คืออนุมูลอิสระที่มีอิเล็กตรอนไม่เข้าคู่ (odd electron) อยู่ที่ตำแหน่งอะตอมไนโตรเจน (ภาพที่ 2) โมเลกุล DPPH สามารถรับอิเล็กตรอนหรือ hydrogen radical แล้วเกิดเป็นโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเข้าคู่และมีความเสถียรได้ สารละลาย DPPH ในตัวทำละลายเมทานอลจะมีสีม่วงที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 517 nm เมื่อโมเลกุล DPPH ทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมกับตัวรีดิวซ์ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้เกิดการสร้างพันธะโคเวเลนต์กับอะตอมอื่นขึ้นมาทำให้โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล DPPH เปลี่ยนแปลงไปและส่งผลทำให้สีของสารละลาย DPPH จางลงไปด้วย หากจำนวนโมเลกุลของตัวรีดิวซ์หรือสารต้านอนุมูลอิสระมีมากจะทำให้จำนวนโมเลกุลของ DPPH ถูกใช้ในการทำปฏิกิริยามีจำนวนมากด้วยซึ่งส่งผลให้สีของสารละลาย DPPH เปลี่ยนแปลงไปได้มาก (จางลงมาก) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายดังกล่าวจึงสามารถนำมาใช้ในการทดสอบความสามารถของสารประกอบหรือสารสกัดจากพืชหรือสิ่งมีชีวิตเพื่อหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ ปฏิกิริยารีดักชันของ DPPH radicals สามารถวัดได้โดยใช้เทคนิค สเปกโทรโฟโตเมทรีโดยวัดการลดลงของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm

ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาระหว่าง DPPH radical กับสารต้านอนุมูลอิสระ



4.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากฐานข้อมูล SciFinder Scholars database 2020 พบว่ายังไม่มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจาก *Akschindlium godefroyanum* จากอนุกรมวิธานพืชชนิดนี้พบว่าประกอบด้วยชื่อพืชทั้งหมด 4 ชื่อ ได้แก่ *Desmodium godefroyanum*, *Tadehagi godefroyanum*, *Meibomia godefroyana* และ *Droogmansia godefroyana* โดยพบว่ามีเฉพาะพืชในสกุล *Desmodium* เท่านั้นที่มีการรายงานการศึกษาและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมาแล้ว ส่วน *Akschindlium godefroyanum* พบเพียงการรายงานการศึกษาค่าประเภททางเคมีมาแล้วดังนี้

4.2.1 *Desmodium adscendens*

Muanda และคณะ (2011) ได้ศึกษาสารสกัดเมทานอล-น้ำ จากใบของ *D. adscendens* พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง โดยสารสกัดดังกล่าวแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหน่วย $IC_{50} = 4.00 \mu\text{g/mL}$ ทั้งการทดสอบด้วยวิธี 2,2'-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic) และวิธี DPPH assay (Xueqin, 2011)

Zielinska-Pisklak และคณะ (2015) รายงานผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 60% เอทานอล-น้ำ จากใบของ *D. adscendens* ด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดแสดงฤทธิ์ต้าน

อนุมูลอิสระในหน่วย $SC_{50} = 18.2 \mu\text{g/mL}$ หลังจากนั้น Abdulmumeen A. Hamid และคณะ (2016) รายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอ็น-เฮกเซนและเมทานอลจากส่วนของพืชดังกล่าวพบว่า สารสกัดมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระอย่างดีที่สุดที่ค่า $IC_{50} = 50.66$ และ $5.44 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

4.2.2 *Desmodium gangeticum*

Govindarajan และคณะ (2003) ได้รายงานเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก ส่วนเหนือดินของ *D. gangeticum* ในหลาย ๆ วิธี ได้แก่ DPPH assay, nitric oxide scavenging activity, ferryl-bipyridyl scavenging activity, hypochlorous acid scavenging activity และวิธี lipid peroxidation พบว่าสารสกัด 50% น้ำ-แอลกอฮอล์จากส่วนเหนือดินของพืชชนิดนี้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อย่างมีศักยภาพในทุกการทดสอบ สำหรับการทดสอบวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดแสดงค่าต้านอนุมูลอิสระ อย่างสูงที่ค่า $IC_{50} = 2.01 \text{ mg/mL}$ และจากการศึกษาสรุปได้ว่าสารสกัดของ *D. gangeticum* มีศักยภาพในการ ต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดีด้วยเหตุผลขององค์ประกอบทางเคมีในพืชชนิดนี้ที่ประกอบไปด้วย flavanoid และ isoflavanoid glycoside เป็นหลัก ซึ่งสารเคมีเหล่านี้มีคุณสมบัติที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ (Rastogi, 2011)

Gino A Kurian, Srilalitha Suryanarayanan, Archana Raman และ Jose Padikkala (2010) รายงานผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากรากของ *D. gangeticum* ด้วยวิธี ต่าง ๆ คือ DPPH assay, superoxide scavenging activity, hydroxide scavenging activity, nitric oxide scavenging activity และ lipid peroxidation model พบว่าสารสกัดแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจาก การทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวที่ค่า $IC_{50} = 36.3, 55.3, 43.7, 39.4$ และ $248 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

4.2.3 *Desmodium triflorum*

Lai และคณะ (2009) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจาก *D. triflorum* ด้วยวิธี DPPH assay และ trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) พบว่าสารสกัดจำนวน 0.4 mg แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับ $70.7 \pm 1.8 \mu\text{g}$ ของ alpha-tocopherol และเทียบเท่ากับ $51.3 \pm 1.6 \mu\text{g}$ ของ trolox ตามลำดับ นอกจากนี้ยังรายงานเกี่ยวกับแฟรกชันต่าง ๆ ที่เกิดจากการพาร์ทิชันสาร สกัดเมทานอล ได้แก่ เอ็น-เฮกเซน คอลโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล โดยพบว่าแฟรกชันเอทิลอะซิ เตทมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดจากการทดสอบแบบ DPPH assay และ TEAC

4.2.4 *Desmodium styracifolium*

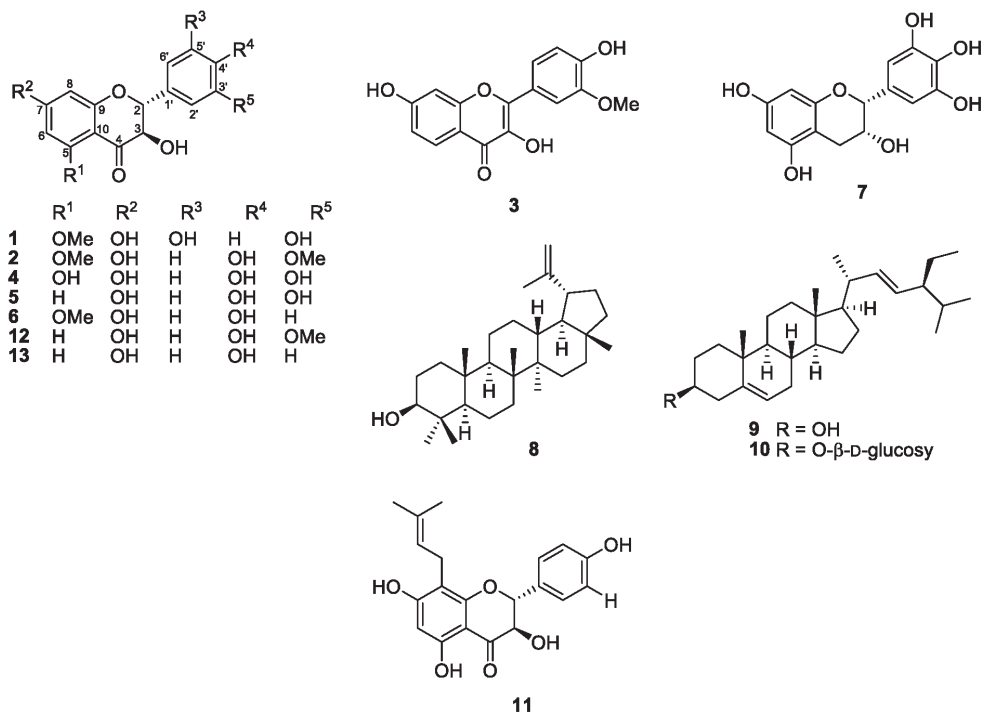
Shao-chun Mao, Zhun-ying Li และ Cong Li, (2007) รายงานการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัด 95% แอลกอฮอล์จาก *D. styracifolium* ด้วยวิธีการวัดการดูดกลืนแสง (photometric method) พบว่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระต่อ hydroxyl radical, superoxide radical, free radical ของควินบุรี และการยับยั้งต่อ lipid peroxidation มีค่า 60.7%, 87.5%, 21.1% และ 31.6% ตามลำดับ

4.2.5 *Akschindlium godefroyanum*

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ *A. godefroyanum* พบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภท flavonoids (1-7, 11-13) และ triterpenoids (8-10) ตามการรายงานของ Nattapong Chaipukdee,

Somdej Kanokmedhakul, Ratsami Lekphrom และ Kwanjai Kanokmedhakul (2014) และ Kanokkarn Saejueng และ Natcha Panthama (2015) ดังภาพที่ 3

ภาพที่ 3 สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ flavonoids และ triterpenoids ที่พบในไช้หิน



จากการรายงานองค์ประกอบทางเคมีของไช้หินพบสารประเภท flavonoids เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งสารกลุ่ม flavonoid นี้เป็นสารที่มีลักษณะเด่นในการต้านอนุมูลอิสระดังที่มีการรายงานโดย Pietta (2000) ดังนั้นสารสกัดจากไช้หินจึงน่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี

5. วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยเริ่มจากการเก็บและเตรียมพืชตัวอย่าง จากนั้นทำการสกัดพืชตัวอย่างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ขั้นตอนท้ายสารสกัดที่ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay โดยมีการละเอียดดังนี้

5.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

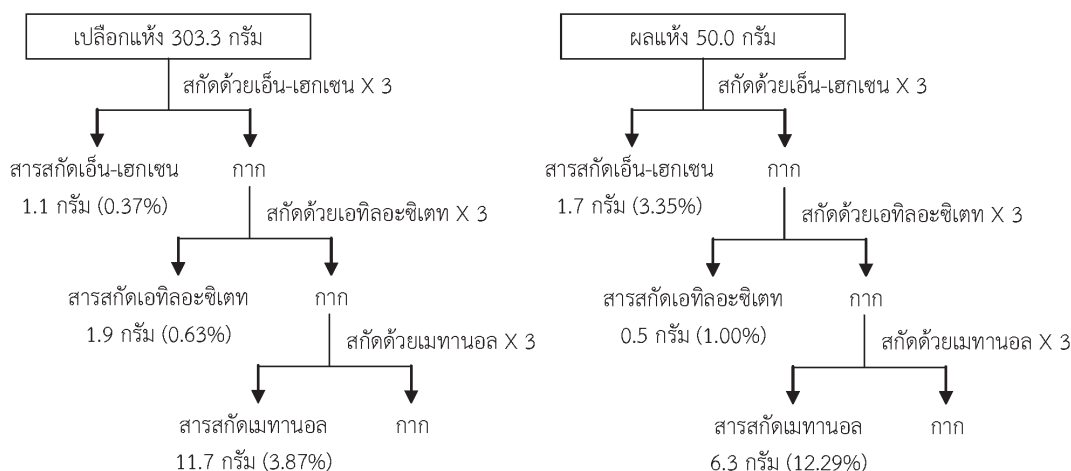
ตัวอย่างเปลือก ผล และใบไช้หินเก็บในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏชัยภูมิ อำเภอเมืองชัยภูมิ จังหวัดชัยภูมิ ตัวอย่างเปลือกและใบเก็บในเดือนกุมภาพันธ์ ส่วนตัวอย่างผลเก็บในเดือนกันยายน พ.ศ.2562

พืชตัวอย่างได้ทำการระบุเอกลักษณ์ชนิดพืชโดย ดร.ธีระวัฒน์ ศรีสุข ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ชิ้นส่วนพืชตัวอย่างบางส่วนเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช มหาวิทยาลัยขอนแก่น (herbarium code : KKU, voucher number : NC-KKU-03) ตัวอย่างเปลือกสด (1.50 กิโลกรัม) ผลสด (0.41 กิโลกรัม) และใบสด (1.10 กิโลกรัม) นำมาทำความสะอาดและตากแห้งในที่ร่ม จากนั้นบดละเอียดและบรรจุถุงเพื่อรอการสกัด ทำให้ได้ตัวอย่างเปลือก ผล และใบแห้งจำนวน 303.3, 50.0 และ 161.1 กรัม ตามลำดับ

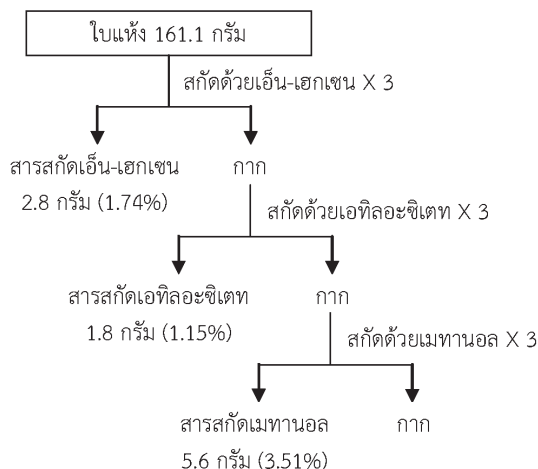
5.2 การสกัด

ทำการสกัดตัวอย่างเปลือก ผล และใบแห้งด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผ่านการกลั่นแล้ว 3 ชนิด คือ เอ็น-เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลตามลำดับ ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้องจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 72 ชั่วโมง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ทำให้ได้สารสกัดทั้ง 6 ชนิดในปริมาณดังแสดงในภาพที่ 4

ภาพที่ 4 ลำดับการสกัด ปริมาณสารสกัด และร้อยละผลได้ของสารสกัดแต่ละชนิดจากการสกัดตัวอย่างเปลือก ผล และใบไซหิน



ภาพที่ 4 (ต่อ) ลำดับการสกัด ปริมาณสารสกัด และร้อยละผลได้ของสารสกัดแต่ละชนิดจากการสกัดตัวอย่างเปลือก ผล และใบไซหิน



5.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ทำตามวิธีของ Bonina (2000) โดยนำสารละลายของสารสกัดทั้ง 9 ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 1 - 500 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 100 μL เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.063 mM ปริมาตร 900 μL สารละลายที่ได้นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น GENESYS 10S ยี่ห้อ Thermo Scientific สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH radical จะสามารถทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของ DPPH ลดลง จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยใช้การคำนวณดังสมการที่ (1)

$$\% \text{ radical scavenging} = \left(1 - \left(\frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \right) \times 100 \quad (1)$$

โดย A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์
 A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

คำนวณหาค่าการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของการลดลง 50% ของ DPPH radical (IC_{50}) ได้โดยใช้ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระและความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้วิเคราะห์ในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ และใช้สารมาตรฐาน gallic acid เพื่อเปรียบเทียบ

6. ผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของตัวอย่างสารสกัดทั้งหมดพบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ค่า $IC_{50} = 28.8 \mu\text{g/mL}$ รองลงมาคือสารสกัดเมทานอลจากใบที่ค่า $IC_{50} = 98.2 \mu\text{g/mL}$ สำหรับค่าการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดอื่น ๆ แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากไผ่ทั้ง 9 ชนิด

ส่วนของพืชตัวอย่าง	ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	IC_{50}^a ($\mu\text{g/mL}$)
เปลือก	เอ็น-เฮกเซน	529.5
	เอทิลอะซิเตท	128.1
	เมทานอล	28.8
ผล	เอ็น-เฮกเซน	309.0
	เอทิลอะซิเตท	447.7
	เมทานอล	170.1
ใบ	เอ็น-เฮกเซน	Inactive
	เอทิลอะซิเตท	698.2
	เมทานอล	98.2
	gallic acid ^b	9.3

^a ค่าการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของการลดลง 50% ของ DPPH radical

^b สารมาตรฐาน

7. สรุปผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไผ่ทั้ง 9 ชนิดด้วยวิธี DPPH assay พบว่ามีคุณสมบัติที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับพืชในอนุกรมวิธานใกล้เคียงกันและเป็นไปตามสมมติฐานการวิจัยที่ตั้งไว้ สารสกัดจากเปลือก ผล และใบของไผ่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน โดยพบว่าสารสกัดแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดสามอันดับแรกคือสารสกัดเมทานอลจากเปลือก สารสกัดเมทานอลจากใบ และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเปลือกที่ค่า $IC_{50} = 28.8, 98.2$ และ $128.1 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

8. อภิปรายผล

จากการพิจารณาชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัดตัวอย่างพืชพบว่าสารสกัดจากเมทานอลแสดงฤทธิ์ได้มากที่สุด รองลงมาคือเอทิลอะซิเตทและเอ็น-เฮกเซน เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีสภาพขั้วที่สูงจึงพบมากในสารสกัดที่มีสภาพขั้วสูง ส่งผลให้สารสกัดเมทานอลที่มีสภาพขั้วสูงแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดอื่น เมื่อพิจารณาจากชิ้นส่วนของพืชที่ทำการสกัดพบว่าเปลือกแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าส่วนอื่น ๆ ซึ่ง

เป็นไปได้ว่าส่วนของเปลือกมีสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระในปริมาณที่มากกว่า (Pier-Giorgio Pietta, 2000) และจากการศึกษานี้สามารถชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของต้นไช้หินในการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดีพร้อมทั้งมีแนวโน้มที่สามารถพัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีงผลในการต้านอนุมูลอิสระได้ด้วย

9. ข้อเสนอแนะ

9.1 ข้อเสนอแนะในการนำไปใช้

9.1.1 สารสกัดจากไช้หินสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใช้ภายนอกร่างกายได้ เช่น ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว หรือสบู่ เนื่องจากสารสกัดแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี โดยใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูง เช่น เอทานอล เป็นต้น

9.1.2 ถึงแม้ว่าไช้หินเป็นพืชที่สามารถรับประทานได้ แต่การนำสารสกัดไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับรับประทานเพื่อจุดประสงค์ในการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายหรือใช้ป้องกันการเกิดโรคจะต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด รวมถึงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากการรับประทานสารสกัดด้วย

9.2 ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

9.2.1 ถึงแม้ว่าไช้หินจะออกดอกและผลตลอดปี แต่จะมีบางช่วงที่ไม่พบจึงทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างดอกหรือผลเพื่อศึกษาในช่วงเวลาดังกล่าวได้ หากต้องการเก็บตัวอย่างดังกล่าวเพื่อการศึกษาครั้งต่อไปผู้วิจัยควรออกสำรวจและวางแผนการเก็บตัวอย่างพืชล่วงหน้าก่อนการทำวิจัยเพื่อป้องกันการเสียเวลาจากการรอเก็บตัวอย่าง

9.2.2 เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนของใบและผลไช้หิน ดังนั้นข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนของใบและผลนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของส่วนเหล่านี้ในโอกาสต่อไปได้

10. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร.ธีระวัฒน์ ศรีสุข สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการระบุเอกลักษณ์ชนิดพืชพร้อมทั้งให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการจัดอนุกรมวิธานของไช้หิน โดยงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัย คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏชัยภูมิ ปีงบประมาณ 2562

11. เอกสารอ้างอิง

- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. (2553). ทองหมอง. *ฐานข้อมูลสมุนไพร*. สืบค้นเมื่อ 19 มกราคม 2562. จาก <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=44>
- บรรพต จอมสุวรรณ, ธนศักดิ์ ชนะสาร, ประเสริฐ ไวยะกา, และศุภวุฒิ ใจกล้า. (2560).ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพของผักจ้ำ. *วารสารการวิจัยการสละองค์*. 11(3) : 1-9.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181 : 1199-1200.
- Bonina, F., Puglia, C., Tomaino, A., Saija, A., Mulinacci, N., Romani, A., Vincieri, F. F. (2000). In-vitro antioxidant and in-vivo photoprotective effect of three lyophilized extracts of *Sedum telephium* L. leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 52(10) : 1279-85.
- Chaipukdee, N., Kanokmedhakul, S., Lekphrom, R., Kanokmedhakul, K. (2014). Two new flavanonols from the bark of *Akschindlium godefroyanum*. *Natural Product Research*. 28(3) : 191-195.
- Govindarajan, R., Rastogi, S., Vijayakumar, M., Shirwaikar, A., Rawat, A. K. S., Mehrotra, S., Pushpangadan, P. (2003). Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 26(10) : 1424-1427.
- Hamid, A. A., Oguntoye, S.O., Ajao, A., Bintinlaiye, B.Y., Akinbile, A.A., Owolabi, N.O. (2016). Chemical composition, antimicrobial and free radical scavenging activities of extracts from the leaves of *Desmodium adscendens*. *Natural Products Journal*. 6(3) : 194-202.
- Kurian, G. A., Suryanarayanan, S., Raman, A., Padikkala, J. (2010). Antioxidant effects of ethyl acetate extract of *Desmodium gangeticum* root on myocardial ischemia reperfusion injury in rat hearts. *Chinese Medicine*. 5(3) : 1-7.
- Lai, S. C., Peng, W. H., Huang, S. C., Ho, Y. L., Huang, T. H., Lai, Z. R., Chang, Y. S. (2009). Analgesic and anti-inflammatory activities of methanol extract from *Desmodium triflorum* DC in mice. *American Journal of Chinese Medicine*. 37(3) : 573-588.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*. 4(8) : 118-26.
- Mao, S., Li, Z., Li, C. (2007). Studies on antioxidation activity of three plants of *Desmodium*. *Yunnan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*. 29(4) : 393-397.
- Muanda, F.N., Bouayed, J., Djilani, A., Yao, C., Soulimani, R., Dicko, A. (2011). Chemical Composition and, Cellular Evaluation of the Antioxidant Activity of *Desmodium adscendens* Leaves. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2011 : 1-9.
- Nimse, S. B., Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*. 5(35) : 27986-28006.

- Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*. 4(2) : 89-96.
- Pietta, P. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63(7) : 1035-1042.
- Rastogi, S., Pandey, M. M., Rawat, A. K. S. (2011). An ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological profile of *Desmodium gangeticum* (L.) DC. and *Desmodium adscendens* (Sw.) DC. *Journal of ethnopharmacology*. 136(2) : 283-296.
- Saejueng, K., Panthama, N. (2015). Radical scavenging activities of flavonoids from roots of *Akschindlium godefroyanum*. *Natural Product Research*. 29(12) : 1177-1179.
- Willcox, J., Ash, S., Catignani, G. (2004). Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44(4) : 275-295.
- Zielinska-Pisklak, M. A., Kaliszewska, D., Stolarczyk, M., Kiss, A. K. (2015). Activity-guided isolation, identification and quantification of biologically active isomeric compounds from folk medicinal plant *Desmodium adscendens* using high performance liquid chromatography with diode array detector, mass spectrometry and multidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 102 : 54-63.