

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมจากใบชายา

ณพัฐอร บัวฉุน^{1*} ผกามาศย์ ชูเสน²

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบชายา (*Cnidioscolus aconitifolius*) ทั้งแบบสด และแห้งจากศึกษาพบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากสารสกัดหยาบใบชายาสดมีปริมาณสูงที่สุดที่ 1.22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณฟีนอลิกรวมจากสารสกัดหยาบใบชายาสดมีปริมาณสูงที่สุดที่ 61.77 มิลลิกรัมแกลลิก ต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ปริมาณแทนนินรวมจากสารสกัดหยาบใบชายาสดมีปริมาณสูงที่สุดที่ 91.36 มิลลิกรัม แทนนิกต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging พบว่า สารสกัดหยาบเอทานอลจากใบชายาแห้งมีฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : ใบชายา ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

¹ หลักสูตรเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี
e-mail: napattaorn@vru.ac.th

² หลักสูตรเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี
e-mail: ga79710@gmail.com

* ผู้นิพนธ์หลัก e-mail: napattaorn@vru.ac.th

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOTAL PHENOLIC CONTENT FROM *CNIDOSCOLUS ACONITIFOLIUS* LEAVES

Napattaorn Buachoon^{1*} Phakamat Choosen²

Abstract

The present study was performed to evaluate the total flavonoids content, total phenolic content, total tannin content and antioxidant activities of the ethanolic extracts from *Cnidoscopus aconitifolius* fresh and dry leaves. The result showed that crude extract of *Cnidoscopus aconitifolius* fresh leaves had total flavonoids contents was 1.22 mg/ml, total phenolic content in crude extract of *Cnidoscopus aconitifolius* fresh leaves was 61.77 mg Gallic /g crude extract, total tannin content in crude extract of *Cnidoscopus aconitifolius* fresh leaves was 91.36 mg tannic /g crude extract. The highest antioxidant activity using DPPH free radical scavenging method was demonstrated by *Cnidoscopus aconitifolius* dry leaves at EC₅₀ 0.84 mg/mL

Keywords : *Cnidoscopus aconitifolius* leaves, total flavonoids content, total phenolic content, total tannin content and antioxidant activities

¹ Chemistry Program , Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage e-mail: send2duang@hotmail.com

² Chemistry Program , Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage e-mail:ga79710@gmail.com

* Corresponding author, e-mail:napattaorn@vru.ac.th

บทนำ

อนุมูลอิสระในร่างกายมนุษย์เกิดจากปัจจัยหลายประการทั้งภายในและภายนอกร่างกาย รวมทั้งวิถีชีวิตในปัจจุบันที่เปลี่ยนแปลงไปไม่ค่อยได้ใส่ใจสุขภาพไม่ว่าจะเป็นเรื่องการคัดเลือกคุณค่าและปริมาณของอาหารที่รับประทานที่ไม่เหมาะสม การพักผ่อนไม่เพียงพอ ไม่มีเวลาในการออกกำลังกายรวมถึงความเครียดในท่ามกลางสภาวะแวดล้อมและมลภาวะรอบตัวซึ่งล้วนแต่เป็นปัจจัยที่เพิ่มอนุมูลอิสระทั้งสิ้น ซึ่งในวงการแพทย์พบว่าป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์เสื่อมและนำไปสู่การแก่ชราหรือความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น ทำให้พบปัญหาสุขภาพจากโรคเรื้อรังมากขึ้นในช่วงอายุที่น้อยลงจากรายงานการศึกษาพบว่าสารพิษจากเคมีจำนวนมาก โดยเฉพาะสารกลุ่มฟีนอลิกจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ การได้รับสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงลดความเสี่ยงและความรุนแรงโรคเรื้อรังที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระได้ (สุรพงษ์รัตน์, บรรลือ สังข์ทอง, 2560; ณพัชร บัวฉวน, 2560, 2561)

สารที่นำมาใช้ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ เรียกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายต้องการและใช้เป็นประจำได้แก่ วิตามินซี และวิตามินอี (บังอร วงศ์รักษ์, ศศิลักษณ์ ปะยะสุวรรณ, 2549)

ใบชา (Cnidocolus aconitifolius) หรือคาน่าเม็กซิกันเป็นแหล่งของโปรตีน วิตามินแคลเซียม โพแทสเซียม และเหล็ก แล้วยังเป็นแหล่งที่อุดมสมบูรณ์ของสารต้านอนุมูลอิสระนอกจากนี้ ใบชายังมีระดับสารอาหารสูงกว่าผักใบเขียวชนิดใดๆ ที่ปลูกบนดิน 2-3 เท่าอีกด้วย แต่ใบชาดิบมีพิษเนื่องจากมีสารกลูโคไซด์ซึ่งจะปลดปล่อยสารพิษจำพวกไฮยาโนไดออกมา จึงจำเป็นต้องทำให้สุกก่อนกินโดยใช้เวลาประมาณ 2-3 นาที ในการทำให้สุก เพื่อลดฤทธิ์ของสารที่เป็นพิษให้อยู่ในระดับปลอดภัย(สมชาย กันธะวงศ์, 2560)

จากข้อมูลข้างต้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบชาแบบสดและแบบแห้งเพื่อเป็นการศึกษาเบื้องต้น และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินรวมของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากใบชาแบบสดและแบบแห้ง
2. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลของใบชาแบบสดและแบบแห้ง

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบชา

ใบชา (Cnidocolus aconitifolius) โดยความอนุเคราะห์จากศูนย์การเรียนรู้เศรษฐกิจพอเพียง สำนักส่งเสริมการเรียนรู้และบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์ นำมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด หั่นให้ละเอียด ส่วนหนึ่งนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้งและนำใบชาแบบสดและแบบแห้งไปชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีการแช่หมัก(Maceration) ที่สกัดโดยการแช่ในขวดโหล ปิดภาชนะทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดนำไปกรองแยกสารละลายโดยเครื่องกรองสุญญากาศ นำสารที่สกัดได้มาระเหย

ตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยสารภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้เป็นส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอล (Ethanol extract) แล้วชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ ละเก็บตัวอย่างไว้

การหาปริมาณฟีนอลิกรวม

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 1000 ppm และ 100 ppm

สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 1000 ppm เตรียมโดยชั่งกรดแกลลิก 0.025 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์และปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร จากนั้นเจือจางสิบเท่าให้ได้สารมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 100 ppm ด้วยการปิเปตมา 2.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยเอทานอลให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

1. นำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 100 ppm มาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร โดยแยกแต่ละหลอดการทดลอง
2. จากนั้นนำทุกหลอดมาเติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอร์รินปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีและเติม 7 เปอร์เซนต์ โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
3. นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที
4. วัดค่าวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (A_{760}) จากนั้นนำค่า A_{760} และความเข้มข้นของสารมาตรฐานแกลลิกมาเขียนกราฟมาตรฐานและหาค่าความชัน (m) เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดใบชา

1. นำสารสกัดใบชาแบบสดและแบบแห้ง มาตัวอย่างละ 0.05 กรัม มาละลายด้วย เอทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
2. นำสารสกัดที่เตรียมได้จากข้อ 1 มา ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
3. นำสารสกัดมาเติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอร์รินปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี และเติม 7 เปอร์เซนต์ โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
4. นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที
5. นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดช่วงความยาวคลื่น 200 - 800 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร
6. หาปริมาณฟีนอลิกรวมจากกราฟมาตรฐานแกลลิกที่ทำในวันเดียวกัน โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ
7. คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัด

การหาปริมาณแทนนินรวม

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกเข้มข้น 1000 ppm และ 100 ppm

สารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกเข้มข้น 1000 ppm เตรียมโดยชั่งกรดแทนนิก 0.025 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์และปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร จากนั้นเจือจางสิบเท่าให้ได้สารมาตรฐานกรดแทนนิกเข้มข้น 100 ppm ด้วยการปิเปตมา 2.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยเอทานอลให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแทนนิก

1. นำสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกเข้มข้น 100 ppm มาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร โดยแยกแต่ละหลอดการทดลอง
2. จากนั้นนำทุกหลอดมาเติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอร์รินปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีและเติม 7 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
3. นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที
4. วัดค่าวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (A_{760}) จากนั้นนำค่า A_{760} และความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแทนนิกมาเขียนกราฟมาตรฐานและหาค่าความชัน (m) เพื่อใช้วิเคราะห์แทนนินในสารสกัดต่อไป การตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบชา

การวิเคราะห์ปริมาณแทนนินรวมในสารสกัดใบชา

1. นำสารสกัดใบชาแบบสดและแบบแห้ง มาตัวอย่างละ 0.05 กรัม มาละลายด้วย เอทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
2. นำสารสกัดที่เตรียมได้จากข้อ 1 มา ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
3. นำสารสกัดมาเติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอร์รินปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี และเติม 7 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
4. นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที
5. นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดช่วงความยาวคลื่น 200 - 800 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร
6. หาปริมาณสารประกอบแทนนินจากกราฟมาตรฐานแทนนิกที่ทำในวันเดียวกัน โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ
7. คำนวณหาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัด

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การเตรียมสารละลายมาตรฐานรูทีน

1. การเตรียมสารละลายรูทีน ซึ่งรูทีน 20 มิลลิกรัม ละลายด้วย 80 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วย 80 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1.0, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 และ 0.05 มิลลิลิตร (ปิเปตสารละลายมาตรฐานรูทีนปริมาณ 5, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 มิลลิลิตร ตามลำดับ) ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วย 80 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล
2. เตรียมสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสารสกัดหยาบใบชาแบบสดและแบบแห้งอย่างละ 20 มิลลิกรัม ละลายด้วย 80% เอทานอล ปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร
3. เตรียมโซเดียมไนไตรต์ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งสารละลายโซเดียมไนไตรต์ 5.004 กรัม ละลายด้วยเมทานอล ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร
4. การเตรียม 10 เปอร์เซ็นต์ อะลูมิเนียมคลอไรด์ ซึ่งสารละลาย อะลูมิเนียมคลอไรด์ 10.087 กรัม ละลายด้วยเมทานอล ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร
5. การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่งสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10.002 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดใบชา

1. นำสารสกัดใบชาแบบสดและแบบแห้ง มาตัวอย่างละ 20 มิลลิกรัม มาละลายด้วย 80 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2. นำสารสกัดที่เตรียมได้จากข้อ 1 มา ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) ที่เวลา 0 นาที เติม 0.3 มิลลิลิตร ของ 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนไตรต์ ที่เวลา 5 นาที เติม 0.3 มิลลิลิตร ของ 10 เปอร์เซ็นต์ อะลูมิเนียมคลอไรด์ ที่เวลา 6 นาที เติม 2 มิลลิลิตร ของ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

3.การเตรียม Blank

ปิเปตน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 นาที เติม 0.3 มิลลิลิตร ของ 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนไตรต์ ที่เวลา 5 นาที เติม 0.3 มิลลิลิตร ของ 10 เปอร์เซ็นต์ อะลูมิเนียมคลอไรด์ที่เวลา 6 นาที เติม 2 มิลลิลิตร ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

4. คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัด

การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชาแบบสดและแบบแห้ง โดยการวัดสมบัติในการยับยั้ง DPPH radical

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. ชั่งสารสกัดหยาบใบชาแบบสดและแบบแห้งอย่างละ 0.010 กรัม ละลายด้วย Absolute Ethanol 20 มิลลิลิตร จนได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. นำมาเจือจางด้วย Absolute Ethanol ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ (500 250 125 62.5 และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. ชั่งสารละลายมาตรฐาน (BHT และ BHA) 0.010 กรัม ละลายด้วย Absolute Ethanol 20 มิลลิลิตร จนได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. นำมาเจือจางด้วย Absolute Ethanol ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ (500 250 125 62.5 และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH

ชั่ง DPPH 0.0237 กรัม ละลายด้วย Absolute Ethanol ปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้ Stock Solution เข้มข้น 6×10^{-3} โมลาร์ เมื่อจะนำมาใช้ให้เจือจางให้เป็น 6×10^{-5} โมลาร์ โดยปิเปตมา 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

นำสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่าง ๆ มาทดสอบความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH เทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT และ BHA

ตารางที่ 1 ขั้นตอนการเติมสารละลายเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

Test Sample	- สารละลายตัวอย่าง หรือ สารละลายมาตรฐานใน Absolute Ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ	2 มิลลิลิตร
	- สารละลาย DPPH 6×10^{-5} โมลาร์ ใน Absolute Ethanol	2 มิลลิลิตร
Blank	- สารละลายตัวอย่าง หรือ สารละลายมาตรฐานใน Absolute Ethanol	2 มิลลิลิตร
	- Absolute Ethanol	2 มิลลิลิตร
Control	- สารละลาย DPPH 6×10^{-5} โมลาร์ใน Absolute Ethanol	2 มิลลิลิตร
	- Absolute Ethanol	2 มิลลิลิตร

ผสมสารในแต่ละหลอดให้เข้ากันดี บ่มที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที ในที่มืด จากนั้นจึง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หลังจากนั้นทำการคำนวณหาร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังนี้ คือ

คำนวณหา % DPPH Scavenging

$$\% \text{ DPPH Scavenging} = \frac{\text{Control} - \text{Sample}}{\text{Control}} \times 100$$

พล็อตกราฟหาค่า EC_{50} เปรียบเทียบกับ BHA BHT และการสกัดใบชายาแบบสดและแบบแห้ง ในการรายงานค่าจะรายงานค่าเป็น EC_{50} ซึ่งได้จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Scavenging กับความเข้มข้น ซึ่งการคำนวณ EC_{50} คือความเข้มข้นที่มีค่า % Scavenging เท่ากับ 50

ผลการวิจัย

1. สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากใบชายา

ตารางที่ 2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบใบชายาแบบสดและแบบแห้ง

สารสกัด	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (mg /ml)
ใบชายาแบบสด	1.22
ใบชายาแบบแห้ง	0.44

จากตารางที่ 2 พบว่า สารสกัดหยาบจากใบชายาแบบสดมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากกว่าใบชายาแบบแห้ง เท่ากับ 1.22 และ 0.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบใบชายา

ตารางที่ 2 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบใบชายาแบบสดและแบบแห้ง

สารสกัด	ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg GAE/g crude extract)
ใบชายาแบบสด	61.77
ใบชายาแบบแห้ง	47.23

จากตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดหยาบใบชายาแบบสดมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าใบชายาแบบแห้ง เท่ากับ 61.77 และ 47.23 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ

3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบแทนนินรวมของสารสกัดหยาบใบชายา

ตารางที่ 4 ปริมาณสารประกอบแทนนินรวมของสารสกัดหยาบจากใบชายา

สารสกัด	ปริมาณสารประกอบแทนนินรวม (mg/mL)
ใบชายาแบบสด	91.36
ใบชายาแบบแห้ง	77.62

จากตารางที่ 4 พบว่า สารสกัดหยาบจาก ใบชายาแบบสดมีปริมาณแทนนินรวมมากกว่าใบชายาแบบแห้ง เท่ากับ 91.36 และ 77.62 มิลลิกรัมแทนนิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ

4. ผลการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบชายาโดยวิธี

DPPH radical

ผลการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบชายา เทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของBHTและBHA ค่าการดูดกลืนแสง ทดสอบโดยการวัดสมบัติในการยับยั้ง DPPH Radical Scavenging ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบชายา เทียบกับสารมาตรฐาน

สารทดสอบ	ความเข้มข้น (µg/mL)	DPPH Scavenging (%)	EC ₅₀ (mg/mL)
ใบชายาแบบสด	31.25	33.73	1.83
	62.50	48.09	
	125	65.79	
	250	81.08	
	500	94.90	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สารทดสอบ	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH Scavenging (%)	EC ₅₀ (mg/mL)
ใบชายาแบบ แห้ง	31.25	56.32	1.29
	62.50	64.30	
	125	78.83	
	250	85.86	
	500	92.36	
BHT	31.25	50.09	1.53
	62.50	57.09	
	125	67.70	
	250	74.67	
	500	84.55	
BHA	31.25	62.37	0.84
	62.50	66.88	
	125	75.77	
	250	79.17	
	500	84.09	

จากตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบชายา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า EC₅₀ คือ ใบชายาแบบแห้ง เท่ากับ 1.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและใบชายาแบบสด เท่ากับ 1.83 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับสารมาตรฐาน BHT และ BHA ซึ่งมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 1.53 และ 0.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

1. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบใบชายาแบบสดและแบบแห้งที่สกัดด้วยเอทานอล โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานรูทีน พบว่าสารสกัดหยาบใบชายาแบบสดและแบบแห้งสกัดด้วยเอทานอล มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 1.22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2. การหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบใบชายาแบบสดและแบบแห้งที่สกัดด้วยเอทานอล โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่าสารสกัดหยาบใบชายาแบบสดและแบบแห้งที่สกัดด้วยเอทานอล มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 61.77 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด 47.23 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ

3. การหาปริมาณแทนนินรวมของสารสกัดหยาบใบชายาแบบสดและแบบแห้งที่สกัดด้วยเอทานอล โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก พบว่าสารสกัดหยาบใบชายาแบบสดและแบบแห้งที่สกัดด้วยเอทานอล มีปริมาณแทนนินรวมเท่ากับ 91.36 มิลลิกรัมแทนนิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด 77.62 มิลลิกรัมแทนนิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ

4. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า สารสกัดหยาบใบชายาแบบแห้งที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดหยาบใบชายาแบบสดโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 1.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม 1.83 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ เทียบกับสารมาตรฐาน BHT และ BHA ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 1.53 และ 0.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

ในการทดลองทำการสกัดสารจากใบชายามาแช่ด้วยเอทานอลพบว่า พบว่าสารสกัดหยาบของใบชายาแบบสดและแบบแห้ง คิดเป็นร้อยละของสารสกัดเท่ากับ 5.14 และ 22.93 ตามลำดับ และจากการตรวจสอบสารพิษทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากใบชายา (*Cnidioscolus aconitifolius*) เมื่อทำการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบชายาสดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 61.77 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัด สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดใบชายาแบบแห้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อเทียบกับสารสกัดใบชายาแบบสด จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging พบว่า สารสกัดหยาบเอทานอลจากใบชายามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งผลดังกล่าวน่าจะเป็นผลมาจาก สารประกอบฟีนอลิกรวมที่ตรวจพบมากที่สุดในการสกัดหยาบเอทานอลจากใบชายา และนอกจากนี้ผลดังกล่าวยังยืนยันด้วยการตรวจทางพิษวิทยาเคมี โดยสารที่พบส่วนใหญ่ในใบของชายาเป็นสารประกอบฟีนอลิก เช่น แทนนิน ซึ่งสารดังกล่าวสามารถต้านอนุมูลอิสระได้อีกด้วย (อัญชนา เจนวิถีสข, 2544, ณพัชร บัวฉวน, 2558) และสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยของ Chanudom *et al.* (2014) พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสัมพันธ์กับคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มีองค์ประกอบของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จะมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำสารสกัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากใบชายาไปพัฒนาทำเป็นผลิตภัณฑ์หรือเครื่องสำอาง

2. ควรมีการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากใบชายาเพิ่มเติมด้วยวิธี ABTS และ FRAP เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

ณพัชร บัวฉวน. (2558). สารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากชะเอมไทย. *วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์*; 2558. 10(2): 78-95.

ณพัชร บัวฉวน. (2560). องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบมะขามป้อม. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. ปีที่ 10 ฉบับที่ 2, 8-17

ณพัชร บัวฉวน และเยาวนารถ งามนนท์. (2561). การพัฒนาโลชั่นบำรุงผิวจากสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสา. *วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* ปีที่ 13 ฉบับที่ 2, 74-85.

บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปะยสุวรรณ. (2549). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน. *ปริญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล*.

ปาลิตา วัฒนสืบสิน. 2556. *การเตรียมสารสกัดมาตรฐานใบย่านางเพื่อใช้ในเครื่องสำอาง*. หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

- สุรพงศ์ รัตนะ, บัณลือ สังข์ทอง. (2560). **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากดอกไม้หอมห้าชนิด.**
- ศรัณญา มณีทอง. (2559). **การสกัดและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร 4 ชนิดด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช.** สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์
- Abdalla MA, Sihanm ES, Alian YYHA, Amel OB, (2008). **Food safety knowledge and practice of street food-vendors in Khartoum city.** Sud. J. Vet. Sci. Anim. Husb. 47(1&2): 126-136
- Ayoola, G.A., Coker, H.A.B., Adesegun, S.A., Adepoju-Bello, A.A., Obaweya, K., Ezennia, E.C., & Atangbayila, T.O. (2008). **Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern nigeria.** Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7(3), 1019–
- Braca, A., Sortion, C., Politi, M., Morelli, I., & Meddez, J. (2002). **Antioxidant activity of flavonoids from Licania licaniaeflora.** Journal of Ethnopharmacology, 79(3), 379–381
- Chattopadhyay, K. and Chattopadhyay, B. D. (2008). **Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation & antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein.** Journal of research and education in Indian medicine. 127, 571-576.
- Chuanphonpanich S., Suttajit M., Phanichphant S., Buddhasukh D. and Sirithunyalug B.(2006) **Antioxidant Capacity of Broccoli Seeds Grown in Thailand.** Chiang Mai J. Sci. 33(1) : 117-122
- Lo, M., & Cheung, C. K. (2005). **Antioxidant activity of extracts from the from the fruiting dodies of Agrocybe acgeria var. alba.** Food Chemistry. 89(4), 533-539.
- Majhenic, L., Skerget, M., & Knez , Z. (2007). **Antioxidant and antimicrobial activity of quarana seed extracts.** Food Chemistry, 104(3), 1258-1268.
- Venkatesh, B., & Dorai, A. (2011). **Antibacterial and antioxidant potential of white and pink Nelumbo Nucifera Gaertn flowers.** International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics IPCBEE, 5, 213-217.