สารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรไทย บางชนิด
Phenolic compounds and antioxidant activities of selected Thai herb extracts

*อรอนงค์ ภูสีฤทธิ์[1] * ธีระพันธ์ จำเริญพัฒน์[2] เนตรนภา กุมารสิทธิ์[1] เรณุกา ระดาไสย์[1] และ สิริรัตน์ สังข์บัวดง[1]*
*Onanong Phuseerit[1] *,Theeraphan Chumroenphat[2], Netnapha kumarsit[1], Renuka Radasai[1] and Sirirat sangboudong[1]*

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พืชสมุนไพรไทย 3 ชนิด ได้แก่ หญ้างวงช้าง ผักคราดหัวแหวน และตำลึงทอง โดยวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) ปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวม (TFC) วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) ศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging และ ferric reducing/antioxidant power (FRAP) พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรหญ้างวงช้างมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด เท่ากับ 1467.11 µg RTE/g ปริมาณฟีนอลิกรวมพบมากที่สุดในสารสกัดจากตำลึงทองมีค่าเท่ากับ 540.48 µg GAE/g การวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) พบว่า สารประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบมาก ได้แก่ apigenin, quercetin, kaempferol, myricetin และ rutin สารประกอบฟีนอลิกที่พบมากได้แก่ ferulic acid, cafferic acid และ sinapicnic acid ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH อยู่ในระหว่าง 9.16-9.32 mg Trolox/g (p>0.05) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP พบว่า หญ้างวงช้าง มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 106.63 mmol $FeSO_4$/g จากการศึกษาครั้งนี้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ของสมุนไพรท้องถิ่นที่เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพื่อใช้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

คำสำคัญ: สารประกอบฟีนอลิก, สารต้านอนุมูลอิสระ, หญ้างวงช้าง, ผักคราดหัวแหวน, ตำลึงทอง

Abstract

The objective of this study was to analyze phenolic compounds and antioxidant activities of 3 selected Thai herbs (*Heliotropium indicum* L., *Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen*, *Passifloro foetida* L.). The samples were analyzed total phenolic content (TPC), total flavonoids content (TFC) and phenolic compounds using high performance liquid chromatography (HPLC). Antioxidant activity was analyzed using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging (DPPH) and ferric reducing/antioxidant power assays (FRAP). The results showed that *Heliotropium indicum* L. had the highest content of TFC (1467.11 µg RTE/g). The *Passifloro foetida* L. had the highest TPC (540.48 µg GAE/g). Major flavonoids identified were apigenin, quercetin, kaempferol, myricetin and rutin while predominant phenolic acids were ferulic acid, cafferic acid and sinapicnic acid. The DPPH radical scavenging assay of the three samples ranged from 9.16-9.32 mg Trolox/g (p>0.05). The extract of *Heliotropium indicum* L. had the highest FRAP value with concentration 106.63 mmol $FeSO_4$/g ($p \leq 0.05$). This study has provided useful information for showing weed herb as potential sources of bioactive components, high antioxidant properties and good source of phenolic compounds that may be of interest to consumers.

Keywords: Phenolic compounds, Antioxidant, *Heliotropium indicum* L., *Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen*, *Passifloro foetida* L.

[1] *ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด ร้อยเอ็ด 45120*
[2] *ศูนย์เครื่องมือกลาง กองส่งเสริมการวิจัยและบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาสารคาม 41500*
**Corresponding Author; E-mail: onanong-k@hotmail.com*

บทนำ

ปัจจุบันผู้คนหันมาสนใจเกี่ยวกับการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพมากขึ้น เนื่องจากปัญหาด้านสุขภาพที่เพิ่มสูงขึ้น พืช ผักและผลไม้เป็นอาหารที่มีการบริโภคเป็นอาหารเพื่อสุขภาพมาเป็นเวลานาน เนื่องจากเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีที่ดีในการช่วยป้องกันโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ และหลอดเลือด (Barreira et al., 2008; Ikram et al., 2009) จากการศึกษาพบว่าสารประกอบฟีนอลิกพบมากในพืช ผัก และผลไม้ เป็นสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระซึ่งมีความสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ (Ross and Kasum, 2002; Chirinos et al., 2010) การบริโภคผักและผลไม้ในปริมาณที่เหมาะสมเป็นประจำจึงให้ผลดีต่อสุขภาพในการป้องกันและลดอันตรายเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่าง ๆ สมุนไพรจัดเป็นพืชที่มีอิทธิพลต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์มาก ด้วยคุณค่าทางสารอาหาร สมบัติในด้านการป้องกันและรักษาโรค โดยเฉพาะความสามารถในการเป็น สารต้านอนุมูลอิสระ ถือเป็นภูมิปัญญาพื้นบ้านที่สืบทอดกันมา และถูกลืมเลือนไปเมื่อมนุษย์หันไปให้ความสำคัญ กับยาแผนปัจจุบันมากขึ้น สมุนไพรจึงถูกลดบทบาทและความสำคัญลงมาเป็นแค่อาหาร อย่างไรก็ตามปัจจุบันสมุนไพรไทยกลับมาเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายอีกครั้งทั้งในประเทศไทย และต่างประเทศ เพราะประชาชนได้รับทราบถึงผลดีของสมุนไพรและข้อจำกัดของยาแผนปัจจุบันกันมากขึ้น สมุนไพรหลายชนิดจึงถูกนำมาบริโภคในรูปของอาหารที่ให้ประโยชน์ต่อร่างกาย เพื่อให้สุขภาพร่างกายแข็งแรง นิยมนำมาผลิตเป็นเครื่องดื่มสมุนไพรเพื่อให้สะดวกแก่การบริโภคและได้รสชาติที่แปลกใหม่ กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ที่พบในสมุนไพร ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และ วิตามินต่าง ๆ โดยประเทศไทยมีสมุนไพรที่นิยมนำมาผลิตเป็นอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิด และแต่ละพื้นที่ยังมีความหลากหลายด้านชนิดสมุนไพร ซึ่งมีผลต่อคุณค่าทางโภชนาการ และสรรพคุณทางยารวมถึงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหลักที่พบได้ในพืช นอกจากมีหน้าที่ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหารแล้ว ยังมีบทบาทในการป้องกันโรคต่าง ๆ ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย เช่น โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคมะเร็ง เป็นต้น (อรอนงค์ ภูสีฤทธิ์ และคณะ, 2559) นอกจากนี้ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง สารกลุ่มดังกล่าวเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติจึงมีความปลอดภัย (วิภพ สุทธนะ, 2556) การใช้ประโยชน์จากพืชเป็นสมุนไพรมีมาช้านาน และสมุนไพรจำพวกผักและหญ้าเป็นชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ทั้งเป็นอาหารและยารักษาโรค เนื่องจากเป็นพืชสมุนไพรที่พบเห็นได้ทั่วไป และส่วนใหญ่เป็นวัชพืช เช่น หญ้างวงช้าง ผักคราดหัวแหวน และ ผักตำลึงทอง เป็นต้น ซึ่งสมุนไพรดังกล่าวมีสรรพคุณต่าง ๆ เช่น หญ้างวงช้างใช้รักษาอาการไอ ขับเสมหะ ผักคราดหัวแหวน นำมาใช้ แก้ไอ แก้อาการทอนซิลอักเสพ เป็นต้น (Neamsuvan and Bunmee, 2016) อย่างไรก็ตามสมุนไพรเหล่านี้มีการนำมาใช้ประโยชน์เฉพาะกลุ่มเท่านั้น เพื่อให้การนำไปใช้ประโยชน์ของสมุนไพร ผัก และหญ้า มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น

ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ของพืชสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ หญ้างวงช้าง ผักคราดหัวแหวน และตำลึงทอง เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญสามารถพบได้ในพืชสมุนไพร เพื่อเป็นข้อมูลด้านวิชาการและเป็นข้อมูลในการเลือกใช้ประโยชน์จากสมุนไพรและบริโภคเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ หญ้างวงช้าง (*Heliotropium indicum* L.) ผักคราดหัวแหวน (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen) และตำลึงทอง (*Passifloro foetida* L.) ในเขตพื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ด โดยทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเดือน พฤษภาคม-มิถุนายน จากนั้นล้างทำความสะอาดและหั่นบางขนาด 1 มิลลิเมตร นำไปทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (model FED 115, WTB Binder, Germany) ณ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างแห้งมีความชื้นไม่เกิน 7% จากนั้นนำตัวอย่างไปบดละเอียดเก็บใส่ถุงซิปเก็บที่ตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์

2. การสกัดตัวอย่างสมุนไพร

นำตัวอย่างพืชสมุนไพร มาบดให้ละเอียดและนำมาสกัดด้วยเมทานอล 80% ในอัตราส่วนผงแห้ง 1 กรัม ต่อ 20 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Shel Lab, Avenue Cornelius, USA) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง ปิดด้วยกระดาษฟอยล์เก็บสารที่สกัดได้ไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content)

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม ดัดแปลงวิธีจาก Abu Bakar et al. (2009) และ Kaisoon et al. (2011) โดยปิเปตสารสกัดตัวอย่าง อย่างละ 300 ไมโครลิตร ผสมกับสารมาตรฐาน Folin-Ciocalteus reagent 2.25 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติมสารละลาย Sodium carbonate 20 % (W/V) 2.25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoids)

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ดัดแปลงวิธีจาก Abu Bakar et al. (2009) และ Kaisoon et al. (2011) ปิเปตสารสกัดตัวอย่าง อย่างละ 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมกับน้ำ 2.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โซเดียมไนไตรต์ 5% ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 6 นาที ผสมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ 10% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมล (M) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร

5. การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH radical scavenging activity

การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH assay ดัดแปลงวิธีจาก Braca et al. (2001) และ Kaisoon et al. (2011) ปิเปตสารละลาย DPPH ที่เตรียมไว้ใส่หลอดที่ใส่สารสกัดตัวอย่างไปแล้วหลอดละ 3 มิลลิลิตร เพื่อให้ทำปฏิกิริยากันแล้ว Vortex ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

6. การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing /antioxidant power (FRAP)

การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay ดัดแปลงวิธีจาก Kubola and Siriamornpun (2008) และ Kaisoon et al. (2011) นำสารละลาย FRAP reagent จำนวน 1.8 มิลลิลิตร น้ำกลั่น จำนวน 180 ไมโครลิตร และสารสกัดจำนวน 60 ไมโครลิตร หรือ สารละลายมาตรฐานใส่ในหลอดทดลองนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

7. การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

การสกัดสารฟีนอลิก (Kubola et al., 2011) ตัวอย่าง 1 กรัม ผสมกับ เมทานอล: กรดไฮโดรคลอลิค (1:50,v/v) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง และทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-124, Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland) แล้วปรับปริมาตรด้วย เมทานอล: น้ำ (50:50, v/v) ให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมากรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (Shimadzu LC-20AC pumps, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยดีเทคเตอร์ชนิด photo diode array detector ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและ 320 นาโนเมตร และการวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์วัดที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร (Kaisoon et al., 2012)

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติ สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลประกอบด้วย ค่าร้อยละ (percentage) ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard Deviation) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance : One-Way ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics v.22 (2013)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. ปริมาณสารฟลาโวนอยด์และสารฟีนอลิกรวม

สารประกอบฟีนอลิก เช่น กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ พบได้ในพืช ผัก ผลไม้ ดอกไม้ และธัญพืช (Bonolia et al., 2004; Li and Smith et al., 2006; Kaisoon et al., 2012) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติเพื่อสุขภาพ ได้แก่ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นผลดีในแง่ของการรักษาสุขภาพของมนุษย์ (Imeh and Khokhar, 2002; LopezVelez et al., 2003) โดยการศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกรวมสามารถวิเคราะห์ได้โดยวิธี the folin–ciocalteu (F–C) เนื่องจากเป็นวิธีที่วิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและน่าเชื่อถือสำหรับการวิเคราะห์ในตัวอย่างอาหารและอาหารเสริม (Prior et al., 2005; Konczak et al., 2010) การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม ของตัวอย่างสมุนไพร 3 ชนิด พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยพบว่า

สารสกัดตำลึงทองมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่า สารสกัดจากหญ้างวงช้าง และสารสกัดจากผักคราดหัวแหวน โดยมีค่าเท่ากับ 540.48 µg GAE/g DW, 487.74 µg GAE/g DW และ 234.30 µg GAE/g DW ตามลำดับ การศึกษาสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม พบมากในตัวอย่างสมุนไพร หญ้างวงช้าง (1467.11±28.41 µg/g DW) ผักคราดหัวแหวน (364.59 µg/g DW) และตำลึงทอง (350.01 µg/g DW) ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกรวมของพืชสมุนไพร 3 ชนิด

ตัวอย่าง	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (µg /g DW)	ปริมาณของฟีนอลิกรวม (µg GAE/g DW)
หญ้างวงช้าง	1467.11±28.41[a]	487.74±5.05[b]
ผักคราดหัวแหวน	364.59±38.12[b]	234.30±2.86[c]
ตำลึงทอง	350.01±2.14[b]	540.48±8.40[a]

หมายเหตุ: ตัวอักษร a b c.... ที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95%

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

จากการศึกษาการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยการใช้เครื่อง HPLC โดยทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 5 ชนิด ดังนี้ rutin, myricetin, quercetin, apigenin, kaempferol พบว่าผลรวมของ สารประกอบฟลาโวนอยด์ของหญ้างวงช้าง มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ ตำลึงทอง และผักคราดหัวแหวน มีค่าเท่ากับ 1281.84 µg/g DW 1060.32 µg/g DW และ 430.55 µg/g DW ตามลำดับ และสารที่พบมากที่สุด ในหญ้างวงช้าง คือ apigenin เท่ากับ 1145.20 µg/g DW และ rutin มีค่าเท่ากับ 53.44 µg/g DW ส่วน myricetin, quercetin และ kaempferol พบมากในตำลึงทอง มีความเข้มข้นเท่ากับ 84.68 175.64 และ 155.13 µg/g DW ตามลำดับ (ตารางที่ 2) สารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติที่สำคัญช่วยควบคุมปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหาร และสามารถต่อต้านการเจ็บป่วยที่เกิดจากอนุมูลอิสระต่าง ๆ ได้ (Vanisree et al., 2008) โดยทำหน้าที่เป็นตัวขัดขวางหรือหยุดปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระ (free radical chain terminator) ตัวจับออกซิเจน (oxygen scavenger) หรือเป็น chelating agent ของโลหะ (ณัฏฐิกา ศิลาลาย, 2549) จากการศึกษาของ Vison และคณะ (1995) พบว่า สารประกอบฟลาโวนอยด์ในใบชา มีศักยภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) และเป็นตัวจับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ได้สูงกว่าวิตามินซี (vitamin C หรือ ascorbic acid) และวิตามินอี (vitamin E หรือ tocopherol) เพื่อป้องกันการเสื่อมของเซลล์จากอนุมูลอิสระ (Vison et al., 1995)

ตารางที่ 2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) ของพืชสมุนไพร 3 ชนิด

สารประกอบฟลาโวนอยด์ (µg/g DW)	ตัวอย่างสมุนไพร		
	หญ้างวงช้าง	ผักคราดหัวแหวน	ตำลึงทอง
Rutin	53.44±2.00[a]	11.96±0.68[c]	21.48±0.72[b]
Myricetin	32.11±0.56[c]	36.94±0.36[b]	84.68±1.86[a]
Quercetin	19.55±0.20[c]	81.20±3.83[b]	175.64±3.83[a]
Apigenin	1145.20±4.57 [a]	244.87±8.97[c]	623.40±8.22[b]
Kaempferol	31.55±2.15[c]	52.59±5.16[b]	155.13±5.64[a]
Total flavonoids	1281.84±39.47[a]	430.55±19.00[c]	1060.32±70.27[b]

หมายเหตุ: ตัวอักษร a b c.... ที่ไม่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนอลิกด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดฟีนอลิก โดยการใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ของตัวอย่างสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด โดยทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดฟีนอลิก กรดฟีนอลิกเป็นอนุพันธ์ของไฮดรอกซีเลตของไฮโดรเบนโซนิกและไฮโดรซินนามิก ซึ่งมักเกิดขึ้นในพืช เช่น เอสเทอร์, ไกลโคไซด์ และ bound complexes (Germano et al., 2006) การศึกษาครั้งนี้มีสารมาตรฐานกรดฟีนอลิก จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ gallic acid, sinapic, feraic acid, protoeatechaic, p-hydroxybenzoic acid, chorogenic acid, *p*-coumaric acid, vanillic acid, caffeic acid,syringic acid, syringic acid จากการศึกษาการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดฟีนอลิก โดยการใช้เครื่อง HPLC พบว่า ผลรวมของสารประกอบฟีนอลิก ในตำลึงทอง มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือผักคราดหัวแหวน และหญ้างวงช้าง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 118.63 µg/g DW 53.33 µg/g DW และ 28.52 µg/g DW ตามลำดับ และพบว่าในหญ้างวงช้าง มีสาร caffeic acid สูงที่สุด 15.87 µg/g DW ผักคราดหัวแหวนพบสาร *p*-coumaric acid สูงที่สุด เท่ากับ 26.20 µg/g DW และในตำลึงทองพบสาร ferulic acid และ sinapicnic acid สูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 35.50 µg/g DW และ 30.56 µg/g DW ตามลำดับ (ตารางที่ 3) กรดฟีนอลิก เช่น gallic acid (Manach et al., 2005), chlorogenic acid และ caffeic acid (Farah et al., 2008; Olthof et al., 2003) เป็นสารที่สามารถดูดซึมได้ในร่างกาย เมื่อเปรียบเทียบกับสารกลุ่มโพลีฟีนอลอื่น ๆ และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี จากการศึกษาของ Tomas-Barberan and Clifford (2000) พบว่า gallic acid สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ (Tomas-Barberan and Clifford, 2000)

ตารางที่ 3 ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) ของพืช สมุนไพร 3 ชนิด

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (µg/g DW)	ตัวอย่างสมุนไพร		
	หญ้างวงช้าง	ผักคราดหัวแหวน	ตำลึงทอง
Gallic acid	1.28±0.02[b]	2.44±0.18[a]	1.45±0.11[b]
Protocatechuic acid	0.89±0.00[b]	0.90±0.12[b]	9.62±0.12[a]
p-hydroxy benzoic acid	1.43±0.02[c]	2.70±0.02[a]	2.41±0.05[b]
Chorogenic acid	1.35±0.08[b]	3.45±0.02[a]	0.80±0.00[c]
Vanillic acid	1.26±0.03[c]	1.65±0.10[b]	2.07±0.05[a]
Cafferic acid	15.87±0.06[a]	11.50±0.11[c]	12.83±0.62[b]
Syringic acid	1.18±0.01[c]	1.25±0.01[b]	7.73±0.06[a]
p-coumaric acid	1.47±0.01[c]	26.20±0.24[a]	5.62±0.23[b]
Ferulic acid	2.27±0.17[b]	1.90±0.01[b]	35.50±0.82[a]
Sinapicnic acid	1.52±0.39[b]	1.35±0.15[b]	30.56±0.36[a]
Total phenolic acids	28.52±1.79[c]	53.33±0.96[b]	118.63±3.42[a]

หมายเหตุ: ตัวอักษร a b c.... ที่ไม่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4. กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging activity และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)

วิธี DPPH radical scavenging เป็นการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเบื้องต้น ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการทดสอบหาความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัด (Sakanaka et al., 2005) โดย DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จึงถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาผลการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยปกติสารต้านอนุมูลอิสระสามารถให้โปรตอนกับอนุมูลอิสระได้ จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระจะมีปฏิสัมพันธ์กับสาร DPPH ไม่ว่าจะเป็นการถ่ายโอนอิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนไปยัง สาร DPPH เพื่อปรับสภาพอนุมูลอิสระให้เป็นกลาง (Naik et al., 2003) เมื่อตัวอย่างสารสกัดที่มีสารต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับสาร DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น

517 นาโนเมตร จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์โดยวิธี DPPH พบว่าพืชสมุนไพร 3 ชนิด อยู่ระหว่าง 9.16-9.32 mg Trolox/g ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay) โดยวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระ (คุณสมบัติเป็น reductant) โดยในสารละลาย FRAP ประกอบ ด้วย Fe^{3+} และ 2,4,6-tri (2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) ในสภาวะที่เป็นกรด โดย Fe^{3+} ใน FRAP reagent จะรับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานหรือในสารสกัดจากสมุนไพรแล้วเปลี่ยนเป็น Fe^{2+} จากนั้นเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ TPTZ เปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้ จะวัดจากการเพิ่มขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Fe^{2+} และ TPTZ โดยค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่นดังกล่าวนี้จะใช้เป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (Benzie and Strain, 1996; กิตติพัฒน์ และปานทิพย์, 2560) จากการศึกษาพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์โดยวิธี FRAP พบมากคือ หญ้างวงช้าง 106.63 mmol $FeSO_4$/g ผักคราดหัวแหวน (90.18 mmol $FeSO_4$/g) และตำลึงทอง (81.20 mmol $FeSO_4$/g) ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging activity และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)

ตัวอย่าง	DPPH radical scavenging activity (mg Trolox/g)	Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay (mmol $FeSO_4$/g)
หญ้างวงช้าง	9.21±0.08[ns]	106.63±2.14[a]
ผักคราดหัวแหวน	9.16±0.20[ns]	90.18±7.07[b]
ตำลึงทอง	9.32±0.08[ns]	81.20±8.20[b]

หมายเหตุ: ตัวอักษร a b c.... ที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%; ns = ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ หญ้างวงช้าง ผักคราดหัวแหวน และตำลึงทอง พบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีความแตกต่างกัน โดย หญ้างวงช้าง มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด rutin และ apigenin สูงกว่า ผักคราดหัวแหวน และตำลึงทอง นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP สูงที่สุด ส่วนตำลึงทองพบว่ามีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด โดยกรดฟีนอลิกที่พบมาก ได้แก่ ferulic acid และ sinapicnic acid จากการศึกษาครั้งนี้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับสุขภาพของพืชสมุนไพรท้องถิ่นสำหรับไปใช้ประโยชน์ในด้านการบริโภคเป็นอาหารและสมุนไพรเพื่อสุขภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด ที่สนับสนุนเครื่องมือ และห้องปฏิบัติการในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ และ ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ. (2560). การสกัดและวิธีวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ, 3(1), 86-94.

ณัฏฐิกา ศิลาลาย. (2549). ฟลาโวนอยด์ในใบชา : หน้าที่ การใช้ประโยชน์ และการวิเคราะห์. วารสารเทคโนโลยีการอาหารมหาวิทยาลัยสยาม, 2 (1), 1-10.

วิภพ สุทธนะ. (2556). ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์:กลไกลการออกฤทธิ์. คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา.

อรอนงค์ ภูสีฤทธิ์, ธีระพันธ์ จำเริญพัฒน์, ดวงกมล พวงมัชชิมา และ อณิสณี แทนอาษา. (2559). การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของฟักข้าวจากกระบวนการทำแห้งที่ต่างกัน. การประชุมวิชาการระดับชาติครั้งที่ 13 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วันที่ 5-9 ธันวาคม 2559, 2736-2743.

Abu Bakar, M. F., Mohamed, M., Rahmat, A. and Fry, J. (2009). Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (Mangifera pajang) and tarap (Artocarpus odoratissimus). Food Chemistry, 113, 479–483.

Barreira, J. C. M., Ferreira, I. C. F., Roliveira, M. B. P. P. and Pereira, J. A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. Food Chemistry, 107, 1106–1113.

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. Analytical Biochemistry, 239, 70–76.

Bonolia, M., Marconib, E. and Caboni, M. F. (2004). Free and bound phenolic compounds in barley (Hordeum vulgare L.) flours evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry. Journal of Chromatography A, 1057, 1–12.

Braca, A. T., Nunziatina, D. B., Lorenzo, D., Pizza, C., Politi, M. and Morelli, I. (2001). Antioxidant principles from Bauhinia terapotensis. Journal of Natural Products, 64, 892–895.

Chirinos R., Galarza, J., Betalleluz-Pallardel, I., Pedreschi, R. and Campos, D. (2010). Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (Myrciaria dubia (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. Food Chemistry, 120(4), 1019–1024.

Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, C. M. and Lafay, S. (2008). Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. Journal of Nutrition, 138, 2309–2315.

Germano, M. P., D’Angelo, V., Biasini, T., Sanogo, R., De Pasquale, R. and Catania, S. (2006). Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from Trichilia emetic Vahl. Journal of Ethnopharmacology, 105, 368–373.

Ikram, E. H. K., Eng, K. H., Jalil, A. M. M., Ismail, A., Idris, S., Azlan, A., Nazri, H.S.M., Diton, N.A.M. and Mokhtar, R.A.M. (2009). Antioxidant capacity and total phenolic content of Malaysian underutilized fruits.
Journal of Food Composition and Analysis, 22(5), 388–393.

Imeh, U. and Khokhar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 6301–6306.

Kaisoon, O., Siriamornpun, S., Weerapreeyakul, N. and Meeso, N . (2011). Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. Journal of Functional foods, 3, 88-99.

Kaisoon, O., Konczak, I. and Siriamornpun, S. (2012). Potential health enhancing properties of edible flowers from Thailand. Food Research International, 46, 563–571.

Konczak, I., Zabaras, D., Dunstan, M. and Aguas, P. (2010). Antioxidant capacity and phenolic compounds in commercially grown native Australian herbs and spices. Food Chemistry, 122, 260–266.

Kubola, J. and Siriamornpun, S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (Momordica charantia L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. Food Chemistry, 110, 881–890.

Kubola, J., Siriamornpun, S. and Meeso, N. (2011). Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. Food Chemistry, 126, 972-981.

Li, B. B., Smith, B. and Hossain, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. Separation and Purification Technology, 48, 182–188.

Lopez-Velez, M., Martinez-Martinez, F. and Del Valle-Ribes, C. (2003). The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43, 233–244.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. American Journal of Clinical Nutrition, 81, 230S–242S.

Naik, G. H., Priyadarsini, K. I., Satav, J. G., Banavalikar, M. M., Sohoni, D. P., Biyani, M. K. and Mohan, H. (2003). Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. Phytochemistry, 63, 97–104.

Neamsuvan, O. and Bunmee, P. (2016). A survey of herbal weeds for treating skin disorders from Southern Thailand: Songkhla and Krabi Province. Journal of Ethnopharmacology, 193(4), 574-585.

Olthof, M. R., Hollman, P. C. H., Buijsman, M. N. C. P., Amelsvoort, J. M. M. -V. and Katan, M. B. (2003). Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. Journal of Nutrition, 133, 1806–1814.

Prior, R. L., Wu, X. and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 4290–4302.

Ross, J.A. and Kasum, C.M. (2002). Dietary Flavonoids Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. Annual Review of Nutrition, 22, 19-34.

Sakanaka, S., Tachibana, Y. and Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). Food Chemistry, 89, 569–575.

Tomas-Barberan, F. A. and Clifford, M. N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 1024–1032.

Vanisree, M., Alexander-Lindo, R. L., DeWitt, D. L. and Nair, M. G. (2008). Functional Food components of Antigonon leptopus tea. Food Chemistry, 106, 487–492.

Vison, J.A., Dabbagh, Y.A., Serry, M.M. and Jang, J. (1995). Plant flavonoid especially tea flavonoid are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. Journal of agricultural Food Chemistry, 43, 2800-2802.