

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ สารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด
ในสารสกัดมะหาด (*Lepisanthes rubiginosa*)
Antioxidant Activities, Total Phenolic and Total
Flavonoid Contents of *Lepisanthes rubiginosa*
crude extract.

รัฐศาสตร์ เด่นชัย^{1*}, ณลิตา ไพบูลย์², นพวรรณ พรศิริ³ และสุรพงศ์ รัตน์⁴
Denchai, R.¹, Phaiboon, N.², Pornsiri, N.³ & Rattana, S.⁴

บทคัดย่อ

มะหาด (*Lepisanthes rubiginosa*) เป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้ในตำรายาพื้นบ้านไทย การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากส่วนราก ลำต้น และใบของมะหาด (สกัดด้วยเอทิลเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล) สารสกัดทั้งหมดนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP หาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และหาปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric ตามลำดับการศึกษาพบว่าสารสกัด Methanol ของลำต้น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดโดยวิธี DPPH ($EC_{50} = 35.02 \pm 0.53$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และวิธี FRAP สารสกัด Methanol ของลำต้นให้ผลดีที่สุด (2.31 ± 0.02 มิลลิกรัมวิตามินซีสมมูลต่อกรัมสารสกัด) สารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัด Methanol ของลำต้น

¹สาขาการแพทย์แผนไทย คณะสาธารณสุขศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา 30000

Branch of Thai Traditional Medicine, Faculty of Public Health, Nakhon Ratchasima College Nakhon Ratchasima Province 30000

²สาขาสถาปัตยกรรมเพื่อสุขภาพและความงาม คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ วิทยาลัยนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา 30000
Branch of Health and beauty products, Faculty of Medical Sciences, Nakhon Ratchasima College Nakhon Ratchasima Province 30000

³สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร กรุงเทพมหานคร 10220
Branch of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Science and Technology, Phranakhon Rajabhat University Bangkok 10220

⁴สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม ต.นาราชควาย อ.เมือง จ.นครพนม 48000
Department of Science, Faculty of Education, Nakhon Phanom University, Narachakwai Subdistrict, Mueang District, Nakhon Phanom Province 48000

*Corresponding author: ratthazart_d@nmc.ac.th

สูงที่สุด (567.18 ± 6.24 มิลลิกรัมกรดกาโลลิกสมมูลต่อกรัมของสารสกัด) และสารสกัด Ethyl acetate ของใบมะหาด มีปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์มากที่สุด (175.14 ± 8.37 มิลลิกรัมเคอซีตินสมมูลต่อกรัมสารสกัด) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดมะหาดเป็นสมุนไพรที่น่าสนใจ ควรมีการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีสำคัญที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ในลำดับต่อไป

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิก ปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ มะหาด

Abstract

Lepisanthes rubiginosa were commonly used in Thai traditional medicine. This study aimed to investigate antioxidant activities, phenolic and flavonoid contents of root, stem and leaves by three solvents extract (hexane, ethyl acetate and methanol). The antioxidant activities were performed with DPPH and FRAP methods. Phenolic and flavonoid contents were performed with Folin-Ciocalteu method and aluminum chloride colorimetric method, respectively. The result showed that methanolic extract of *L. rubiginosa*'s stem showed the highest antioxidant activities in DPPH assay ($EC_{50} = 35.02 \pm 0.53$ $\mu\text{g/ml}$). Stem of methanol extract showed the highest FRAP value (2.31 ± 0.02 mg AEAC/mg extract) and stem extract showed the highest phenolic contents (567.18 ± 6.24 mg GAE/g Extract). However, the highest flavonoids content was found in ethyl acetate extract of *L. rubiginosa*'s leaves (175.14 ± 8.37 mg QE/g extract). The results indicated that *L. rubiginosa*'s extracts were interested in phytochemical composition analysis and further bioactivities study.

Keywords: Antioxidant activity, Total Phenolic, Total flavonoid, *Lepisanthes rubiginosa*

บทนำ

มะหาด (*Lepisanthes rubiginosa* (Roxb.) Leenh.) เป็นพืชในวงศ์ Sapindaceae มีการกระจายพันธุ์แถบเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่อินเดียถึงพม่า ตอนใต้ของจีนจนถึงภูมิภาคอินโดจีน ภูมิภาคมาเลเซียถึงตอนเหนือของออสเตรเลีย ในประเทศไทยพบได้ทุกภาค มักขึ้นในป่าผสมผลัดใบ ป่าดิบแล้ง ขอบป่าดิบชื้น ป่าชายหาด ป่าละเมาะ และพื้นที่รกร้างว่างเปล่า ขึ้นที่ระดับความสูงน้ำทะเลระดับปานกลางที่ประมาณ 300 – 1,200 เมตร ออกดอกเดือน

มกราคม ถึง มีนาคม ติดผลเดือนกุมภาพันธ์ ถึงพฤษภาคม ลักษณะข้อผลแสดงในภาพที่ 1 ใช้ประโยชน์คือเป็นไม้ประดับให้ร่มไม้ จัดสวน เนื้อไม้ใช้ในการก่อสร้าง ทำเฟอร์นิเจอร์ ทำฟืน เปลือกลำต้นเป็นยาบำรุงธาตุ แก้อาตุพิษ ผลสุกกินได้ บำรุงกำลัง แก้ท้องร่วง เมล็ดมีรสฝาด ต้มกินน้ำแก้ไอ บำรุงเส้นเอ็น (สราวุธ สังข์แก้ว, 2562) การศึกษาครั้งนี้ เน้นศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากมีรายงานจำนวนมากบ่งชี้ถึงอันตรายของอนุมูลอิสระ (Kunwar et al. 2011) ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์ภายในร่างกาย

ทำให้การทำงานของเซลล์ในร่างกายเหล่านั้นผิดปกติ (เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหนาม, 2554) และเกิดเป็นโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง เบาหวาน โรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น (Cornish and Garbary, 2010; Valko et al., 2007) การได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้สามารถลดความเสียหายของเซลล์ที่เป็นผลมาจากอนุมูลอิสระได้ สารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นสารพฤษเคมีที่สำคัญที่มีฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ (Hamid et al., 2010) มีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในพืชเป็นจำนวนมาก



ภาพที่ 1 ลักษณะของผลของมะหาด

จากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของมะหาด พบว่ามีรายงานน้อยมาก ดังนั้นในการศึกษารั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และ วิธี FRAP ของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบของมะหาดที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน รวมทั้งศึกษาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เนื่องจากสารในกลุ่มดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร (ลือชัย บุตุคุป, 2555)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ วิธี FRAP ของสารสกัดจากราก ลำต้น ใบของมะหาด

2. เพื่อศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ของสารสกัดจากราก ลำต้น ใบของมะหาด

วัสดุและวิธีดำเนินการ

1. วัตถุดิบและการสกัด

เก็บตัวอย่างมะหาด นำมาแยกเป็นส่วน ราก ลำต้น และใบมาทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ และอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำไปบดหยาบ จากนั้นนำไปหมักด้วยเฮกเซน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมากรองด้วยกระดาษกรองและระเหยแห้งเป็นสารสกัดชั้นเฮกเซน นำกากสมุนไพรไปแห้งแล้วนำมาหมักต่อด้วยเอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมากรองด้วยกระดาษกรองและระเหยแห้งเป็นสารสกัดชั้น เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ เก็บสารสกัดในภาชนะที่ปิดแสงเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (DPPH scavenging assay)

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน คือ Ascorbic acid โดยวิธี DPPH scavenging assay (Vongsak et al., 2013) โดยเตรียมสารตัวอย่างและสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วย Methanol

นำสารละลายที่ต้องการทดสอบปริมาตร 100 μL ทำปฏิกิริยากับ DPPH ที่ใช้ Methanol เป็นตัวทำละลาย ปริมาตร 100 μL ใน 96-well microplate ตั้งทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วย 96-well microplate reader ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ครั้ง แล้วคำนวณ %inhibition จากสมการ

$$\% \text{Inhibition} = \left(\frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

โดย A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลาย DPPH กับตัวทำละลาย A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ DPPH จากนั้นนำค่า % Inhibition คำนวณค่า EC_{50} (ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้ 50%) โดยการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างและ %inhibition ถ้าค่า EC_{50} ต่ำกว่า 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ แสดงว่ามีฤทธิ์ดีมาก ค่า EC_{50} ระหว่าง 65-152 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีฤทธิ์ดี ส่วนค่า EC_{50} มากกว่า 152 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีฤทธิ์ต่ำ (Joabe et al., 2010)

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (FRAP assay)

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างด้วยวิธี FRAP (Benzie and Strain, 1996) เทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานคือ Ascorbic acid ทำการเตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้น 1 mg/mL และสารละลาย FRAP Reagent โดยผสม 300 mM Acetate buffer (pH 3.6), 20 mM Ferric chloride solution และ 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine ใน 40 mM HCl) อัตราส่วน 10:1:1 จากนั้นนำสารตัวอย่างปริมาตร 10 μL ทำปฏิกิริยากับ

FRAP reagent ปริมาตร 300 μL ใน 96-well microplate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ด้วย 96-well microplate reader ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน Ascorbic acid ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารมาตรฐาน นำเสนอเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของ Ascorbic acid ในสารสกัด 1 มิลลิกรัม (mg Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity (AEAC)/mg Extract)

3. การหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิก (Total phenolic content)

ทำการหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในสารตัวอย่างโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu (Thaipong et al., 2006) เทียบกับสารมาตรฐาน คือ Gallic acid โดยนำสารตัวอย่างความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 15 μL น้ำกลั่น 240 μL และ 0.25 N Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 15 μL ทำปฏิกิริยาใน 96-well microplate 3 นาที แล้วเติม 1 N Na_2CO_3 30 μL ตั้งทำปฏิกิริยาในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm โดยใช้ 96-well microplate reader ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic acid ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารมาตรฐาน นำเสนอเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของ Gallic acid ในสารสกัด 1 กรัม (mg Gallic Acid Equivalent (GAE)/g Extract)

4. การหาปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Total flavonoids)

ทำการหาปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารตัวอย่างด้วยวิธี $AlCl_3$ colorimetric assay (Kim et al., 2003) เทียบกับสารมาตรฐานคือ Quercitin โดยนำสารตัวอย่าง 30 μ l น้ำกลั่น 120 μ l และ 5% $NaNO_3$ 10 μ l ทำปฏิกิริยาใน 96-well microplate เมื่อครบ 5 นาที เติม 10% $AlCl_3$ 10 μ l เมื่อครบ 6 นาที เติม 1 M $NaOH$ 60 μ l และ น้ำกลั่น 70 μ l ทำปฏิกิริยาครบ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน Quercitin ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารมาตรฐาน นำเสนอเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของ Quercitin ในสารสกัด 1 กรัม (mg Quercitin Equivalent (QE)/g Extract)

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analysis)

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ตามวิธีของ Scheffe's test

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

จากผลการศึกษาใน ตารางที่ 1 พบว่า สารสกัดจากพืชแต่ละชนิดให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Sakong et al. (2011) ที่พบว่า สมุนไพรพื้นบ้านในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย 31 ชนิด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันเมื่อพิจารณาสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์

ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด 3 อันดับแรก พบว่า สารสกัด Methanol ของราก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ($EC_{50} = 35.02 \pm 0.53 \mu g/ml$) รองลงมา คือ สารสกัด Ethyl acetate ของลำต้น และสารสกัด Methanol ของลำต้น ตามลำดับ ($EC_{50} = 81.75 \pm 9.92$ และ $94.70 \pm 3.34 \mu g/ml$ ตามลำดับ) โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในระดับดีมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Einbond et al. (2004) ที่พบว่าสารสกัด Methanol ของสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในระดับที่ดีมาก

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

จากผลการศึกษาดังแสดงใน ตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP สูงที่สุด คือ สารสกัด Methanol ของลำต้น (2.31 ± 0.02 mg AEAC/mg extract) รองลงมา คือ สารสกัด Methanol ของใบ และสารสกัด Methanol ของราก ตามลำดับ (1.58 ± 0.06 และ 1.39 ± 0.04 mg AEAC/mg extract ตามลำดับ) ซึ่งเมื่อพิจารณาพร้อมกับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จะพบว่า สารสกัดจากมะหาดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ทั้ง 2 วิธี ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากมีสารฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่เป็นจำนวนมาก ดังจะเห็นได้จากการศึกษาของ Siddiqua et al. (2010) ที่พบว่าสารสกัด Methanol ของสมุนไพรแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับที่สูง

เมื่อพิจารณาในภาพรวมระหว่างการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งโดยวิธี DPPH และ FRAP ของสารสกัดจากราก ลำต้น และใบมะหาด พบว่าสารสกัดจาก Methanol จะให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดรองลงมาคือ สารสกัด Ethyl acetate และ Hexane ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้อง

กับผลการศึกษาของ Rattana et al. (2010) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางซึ่งพบว่า สารสกัด Methanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี DPPH และ FRAP สูงที่สุด ซึ่งจะสูงกว่าสารสกัดชั้น Ethyl acetate, น้ำ, Dichloromethane และ Petroleum ether รวมทั้งผลการศึกษาของ Sindheet al. (2013) ที่พบว่า สารสกัด Ethanol ของสมุนไพรให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดน้ำ Chloroform และ Petroleum ether

ตารางที่ 1 ฤทธิ์อนุมูลอิสระของสารสกัดมะหาดที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH (Mean $\pm$ S.D., n=3)

ส่วนที่ใช้	ค่า EC ₅₀ (ไม่โครกรัมสารสกัดต่อมิลลิลิตร)		
	Hexane	EtOAc	MeOH
ราก	5,065.81 $\pm$ 542.17 ^{a*}	263.68 $\pm$ 27.46 ^f	94.70 $\pm$ 3.34 ^c
ลำต้น	4,920.47 $\pm$ 1551.12 ^g	174.98 $\pm$ 10.02 ^e	35.02 $\pm$ 0.53 ^b
ใบ	258.84 $\pm$ 43.34 ^f	81.75 $\pm$ 9.92 ^c	129.62 $\pm$ 8.77 ^d
L-ascorbic acid	1.74 $\pm$ 0.02 ^a		

* a, b, c, d, e, f, g ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

ตารางที่ 2 ฤทธิ์อนุมูลอิสระของสารสกัดมะหาดที่ทดสอบด้วยวิธี FRAP assay (Mean $\pm$ S.D., n=3)

ส่วนที่ใช้	Ascorbic Acid Equivalent (มิลลิกรัมวิตามินซีเทียบเท่าต่อกรัมสารสกัด)		
	Hexane	EtOAc	MeOH
ราก	0.77 $\pm$ 0.01 ^{c*}	1.33 $\pm$ 0.02 ^b	1.39 $\pm$ 0.04 ^b
ลำต้น	1.16 $\pm$ 0.03 ^b	1.29 $\pm$ 0.06 ^b	2.31 $\pm$ 0.02 ^a
ใบ	0.62 $\pm$ 0.01 ^c	0.79 $\pm$ 0.03 ^c	1.58 $\pm$ 0.06 ^b

* a, b, c ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

3. การหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิก (Total phenolic content)

จากผลการศึกษาใน ตารางที่ 3 พบสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดมะหาด มีปริมาณที่แตกต่างกันออกไป โดยพบสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัด MeOH ของลำต้น สูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัด Ethyl acetate ของใบ และ สารสกัด Methanol ของราก ตามลำดับ (567.18 $\pm$ 6.24, 471.96 $\pm$ 58.20 และ 434.90 $\pm$ 32.02 mg GAE/g Extract ตามลำดับ) ส่วนสารสกัด Hexane มีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกน้อยที่สุด เมื่อพิจารณาในภาพรวมพบว่า สารสกัดจาก Ethyl acetate เป็นสารสกัดที่มีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกมากที่สุด (Gallic Acid Equivalent สูงที่สุด) รองลงมาคือ สารสกัด Methanol และ Hexane ตามลำดับ

ตารางที่ 3 การหาปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดมะหาดด้วยวิธี Folin Ciocalteu assay (Mean $\pm$ S.D., n=3)

ส่วนที่ใช้	Total Phenolic content (มิลลิกรัมกรดกลอลิกเทียบเท่าต่อกรัมสารสกัด)		
	Hexane	EtOAc	MeOH
ราก	77.91 $\pm$ 77.17 ^{e*}	169.95 $\pm$ 6.29 ^d	434.90 $\pm$ 32.02 ^b
ลำต้น	90.10 $\pm$ 27.02 ^e	375.58 $\pm$ 30.52 ^b	567.18 $\pm$ 6.24 ^a
ใบ	347.05 $\pm$ 30.77 ^c	471.96 $\pm$ 58.20 ^b	420.88 $\pm$ 28.67 ^b

* a, b, c, d, e, ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$.

4. การหาปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content)

ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดของพืชมีปริมาณที่แตกต่างกันออกไป โดยสารสกัด Ethyl acetate ของใบ

มะหาด มีปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์มากที่สุด (175.14±8.37 mg QE/g Extract) รองลงมาคือ สารสกัด Hexane ของลำต้นมะหาด และ สารสกัด Hexane ของใบ ตามลำดับ (150.12±37.79, 146.94±6.88mg QE/g Extract ตามลำดับ) ส่วนสารสกัด Methanol ของใบมะหาดมีปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์น้อยที่สุด (51.31±1.09 mg QE/g Extract) เมื่อพิจารณาในภาพรวมพบว่า สารสกัดจากEthyl acetate เป็นสารสกัดที่มีปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์มากที่สุด (Quercitin Equivalent สูงที่สุด) รองลงมาคือ สารสกัด Hexane และ Methanol ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาปรากฏดัง ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดมะหาดด้วยวิธี $AlCl_3$ assay (Mean ± S.D., n=3)

ส่วนที่ใช้	Total flavonoid content (มิลลิกรัมเคอร์ซิตินเทียบเท่าต่อกรัมสารสกัด)		
	Hexane	EtOAc	MeOH
ราก	98.19 ± 1.98 ^{c*}	123.37 ± 3.47 ^b	79.91 ± 0.57 ^d
ลำต้น	150.12 ± 37.79 ^a	102.82 ± 15.11 ^c	64.70 ± 2.54 ^d
ใบ	119.60 ± 10.11 ^b	175.14 ± 8.37 ^a	90.75 ± 6.33 ^c

* a, b, c, d ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

เมื่อพิจารณาในภาพรวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จะพบว่ามีแนวโน้มสอดคล้องกัน นั่นคือ ถ้าสารสกัดจากพืชมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับสูง ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ก็จะสูงตามไปด้วย ทั้งนี้เนื่องจากสารกลุ่มฟีนอลิกและสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นสารที่พบได้ทั่วไปใน

ธรรมชาติโดยเฉพาะในพืช ฟีนอลิกพบในธรรมชาติมากกว่า 8,000 ชนิด ส่วนฟลาโวนอยด์พบมากกว่า 4,000 ชนิด ทั้งฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ถือว่าเป็นสารกลุ่มที่มีฤทธิ์สูงในการต้านอนุมูลอิสระหรือยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (ลือชัย บุตคุป, 2555) ดังนั้น ถ้าในสารสกัดมีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูง ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระก็จะสูงเช่นกัน สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kubola et al. (2011) ที่ทำการศึกษาสารพฤกษเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ป่าในประเทศไทย พบว่า ผลไม้ที่มีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูง ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งในวิธี DPPH และวิธี FRAP ก็จะสูงตามไปด้วย และผลการศึกษาของ Sakong et al. (2011) ที่พบว่า ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดพืชสมุนไพรแปรรูปตรงตามฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษาด้วยวิธี FRAP และ ABTS

สรุปผล

สารสกัดลำต้นมะหาดที่สกัดด้วย MeOH มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดทั้งวิธี DPPH และวิธี FRAP และมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกรวมสูงที่สุดด้วยเช่นกัน ส่วนปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์พบมากที่สุดในสารสกัด Ethyl acetate ของใบมะหาด จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า มะหาดเป็นสมุนไพรที่น่าสนใจ และควรมีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ในลำดับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์ สถานที่ทำวิจัยจาก สาขาชีววิทยาศาสตร์ คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม

เอกสารอ้างอิง

สรารุธ สังข์แก้ว. 2562. **รุกขวิทยาภาคสนาม**
Field Dendrology. ภาพพิมพ์,
กรุงเทพฯ

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554.
อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ:
แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา.
วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏ
ภาพลันธุ์ 1, 59-70.

ลือชัย บุตุคป. 2555. สารประกอบฟีนอลิกและ
ฤทธิ์ทางชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์*
และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
31, 443-455.

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J., 1996. The
Feric Reducing Ability of Plasma
(FRAP) as a Measure of
“Antioxidant Power”: The FRAP
Assay. *Analytical Biochemistry* 239,
70-76. Cornish,

M. L. and Garbary, D. J. 2010.
“Antioxidant from microalgae:
potential application in human
health and nutrition”. *Free Radical*
Biology & Medicine 25, 155-171.

Einbond, L. S. , Reynertson, K. A. , Luo X.
D., Basile, M. J. and Kennelly, E.
J. 2004. Anthocyanin antioxidants
from edible fruits. *Food*
Chemistry 84, 23–28.

Hamid, A.A., Aiyelaagbe, O.O., Usman,
L.A., Ameen, O.M. and Lawal, A.
2010. Antioxidants: Its medicinal
and pharmacological applications.
African Journal of Pure and
Applied Chemistry 4, 142-151.

Joabe, G. M., Thiago A. S. A., Valérium T.
N. A. C., Daniela, L. V. C., Maria, D.
R., Silene, C. N., Elba, L. C. A. and
Ulysses, P. A. 2010. Antiproliferative
Activity, Antioxidant Capacity and
Tannin Content in Plants of Semi-
Arid Northeastern Brazil.
Molecules 15, 8534-8542.

Kim, D.O., Jeong, S.W. and Lee, C. Y.
2003. Antioxidant capacity of
phenolic phytochemicals from
various cultivars of plums. *Food*
Chemistry 81, 321-326.

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

Kunwar, A., and Priyadarsini, K.I. 2011.
Free radicals, oxidative stress and
importance of antioxidants in
human health. *Journal of Medical*
& Allied Science 1, 53-60.

Rattana S., Phadungkit M. and Cushnie B.
2010. Phytochemical Screening,
Flavonoid Content and
Antioxidant Activity of *Tiliacora*
triandra Leaf Extracts. The 2nd
Annual International Conference
of Northeast Pharmacy Research
2010, 60-63.

Sakong P., Khampitak T., Cha'on U.,
Pinitsoontorn C., Sriboonlue P.,
Yongvanit P. and Boonsiri P. 2011.
Antioxidant activity and bioactive
phytochemical contents of
traditional medicinal plants in

- northeast Thailand. Journal of Medicinal Plants Research 5(31), 6822-6831.
- Siddiqua, A., Premakumari, K. B., Sultana R., Vithya and Savitha. 2010. Antioxidant activity and Estimation of total phenolic content of *Muntingia calabura* by colorimetry. International Journal of ChemTech Research 2, 205-208.
- Sindhe, M. A., Yadav, D. B. and Chandrashekar, A. 2013. Antioxidant and in vivo anti-hyperglycemic activity of *Muntingia calabura* leaves extracts. Der Pharmacia Lettre 5, 427-435.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. and Byrne, D.H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis 19, 669-675.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39, 44-84.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y. and Gritsanapan, W. 2013. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. Industrial Crops and Products 44, 566-57.