ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในลูกใต้ใบและหญ้าขัดมอญ

Antioxidant Activity and Total Phenolic Compounds of *Phyllanthus amarus* and *Sida acuta*

สุวรรณา จันคนา

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ อีเมลล์: sjankana@gmail.com

บทคัดย่อ

สารสกัดหยาบเอทานอลของต้นลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) และหญ้าขัดมอญ (*Sida acuta*) ถูกวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (DPPH radical scavenging assay) มีค่า IC_{50} เป็น 284.1 µg/mL และ 2213.9 µg/mL ตามลำดับ ในขณะที่ สารละลายมาตรฐาน Trolox มีค่า IC_{50} เป็น 11.6 µg/mL การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า สารสกัดลูกใต้ใบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 36.00 mg GAE/g of extract และสารสกัดหญ้าขัดมอญมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 910.00 mg GAE/g of extract

คำสำคัญ: ลูกใต้ใบ หญ้าขัดมอญ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิกรวม

Abstract

The antioxidant activity of crude ethanol extracts from *Phyllanthus amarus* and *Sida acuta* were evaluated by DPPH (DPPH radical scavenging assay). The ethanol extracts of *Phyllanthus amarus* and *Sida acuta* showed IC_{50} values of 284.1 µg/mL and 2213.9 µg/mL, respectively. Whereas IC_{50} value of the standard Trolox was 11.6 µg/mL. The Folin-Ciocalteu analysis was used for method of total phenolic determination. The results showed that total phenolic compounds in crude ethanol extracts from *Phyllanthus amarus* and *Sida acuta* were 36.00 mg GAE/g of extract and 910.00 mg GAE/g of extract, respectively.

Keywords: *Phyllanthus amarus*, *Sida acuta*, Antioxidant activity, Phenolic compounds

1. บทนำ

ในปัจจุบันมนุษย์เกิดการเจ็บป่วยด้วยโรคต่างๆมากมาย ซึ่งมีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากการมีอนุมูลอิสระมากเกินไป โดยโรคที่สำคัญและมีการศึกษากันมากได้แก่ โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคความจำเสื่อมโรคไขข้ออักเสบโรคชรา และโรคมะเร็งบางชนิด(Bagchi and Puri, 1998, pp. 350-360) มีหลายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่พิสูจน์ได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดการเกิดโรคต่างๆได้ เช่น การให้สารบีตาแคโรทีน วิตามินอี และเซลิเนียมมีผลลดการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้อย่างมีนัยสำคัญ (Blot and Taylor, 1993, pp. 1483-1491) สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มใหญ่จะอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกตัวอย่างสารประกอบฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และพอลิฟีนอล (polyphenol) เป็นต้น

ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อท้องถิ่น ได้แก่ มะขามป้อมดิน หญ้าใต้ใบ หญ้าใต้ใบขาว ลูกใต้ใบเป็นไม้ล้มลุก สูง 10-50 เซนติเมตร ใบเดี่ยวเรียงสลับ ดอกช่อกระจุกกลมออกที่ซอกใบ สรรพคุณพื้นบ้านใช้ทั้งต้นแก้พิษไข้ทุกชนิด (ศิริพร เหลียงกอบกิจ, 2546, หน้า 2-10) ต้นลูกใต้ใบมีสารที่เป็นประโยชน์ เช่น ไกลโคไซด์ ซาโพนิน ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ แทนนิน และลิกแนน เป็นต้น มีฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบ ยับยั้งเชื้อเอดส์ ต้านเชื้อไวรัส ลดการอักเสบ ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร แก้อาการท้องเสีย ต้านเนื้องอก มะเร็งและการก่อกลายพันธุ์ คุมกำเนิด และป้องกันพิษจาก ยาพาราเซทตะมอลได้ (มงคล คงเสน และคณะ, 2556, หน้า 153-163)

หญ้าขัดมอญ (*Sida acuta*) อยู่ในวงศ์ Malvaceae มีชื่ออื่น คือ หญ้าขัดใบ ยาว หญ้าขัดมอญเป็นวัชพืชใบกว้าง อายุปีเดียว เป็นไม้พุ่มต้นเตี้ย (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2561) การศึกษาวิจัยพบว่าหญ้าขัดมอญมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (Karou et at., 2003, pp. 291-294) หญ้าขัดมอญมีสารอัลคาลอยด์ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Karou et at., 2006, pp. 195-200)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าขัดมอญด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (DPPH assay) พร้อมทั้งทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดย วิธี Folin-Ciocalteu เพื่อเป็นฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในด้านการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชดังกล่าว ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มคุณประโยชน์ของลูกใต้ใบและหญ้าขัดมอญ ในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านสุขภาพต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในลูกใต้ใบและหญ้าขัดมอญ

2.2 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในลูกใต้ใบและหญ้าขัดมอญ

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พืชตัวอย่าง

พืชตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยคือ ใบของลูกใต้ใบและหญ้าขัดมอญ โดยลูกใต้ใบเก็บ จากชุมชนบ้านแท่นพระ ตำบลแท่นพระ อำเภอลำปลายมาศ จังหวัดบุรีรัมย์ และหญ้าขัดมอญ เก็บจากชุมชนบ้านเขว้า ตำบลโคกขมิ้น อำเภอพลับพลาชัย จังหวัดบุรีรัมย์

การเตรียมสารสกัดพืชตัวอย่างทำโดยนำพืชตัวอย่างตากในที่ร่มให้แห้งบดละเอียด 92.4788 กรัม นำมาสกัดโดยการแช่ในเอทานอล 500 มิลลิลิตร ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมาระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบ (crude ethanol extract) ของลูกใต้ใบและหญ้าขัดมอญ

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบลูกใต้ใบและสารสกัดหยาบหญ้าขัดมอญโดยวิธี DPPH assay ทำการทดสอบโดยวิธีของ Brand-Williams และคณะ (Brand-Williams et al., 1995, pp. 25-30) และได้ปรับปรุงตามวิธีของ Yen และ Hsieh (Yen and Hsieh, 1997, pp. 1646 – 1649) นำสารสกัดพืชทั้ง 2 ชนิดมาเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นในช่วง 200 - 1000 µg/mL ในเอทานอล ปริมาตร 1 mL เติมสารละลาย 0.2 mM DPPH ในเอทานอล ปริมาตร 2 mL ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้เอทานอลแทนสารสกัดพืช นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ (% scavenging) จากสมการ

$$\% \text{ scavenging} = [(A_{control} - A_{sample}) / A_{control}] \times 100$$

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล $DPPH^{\cdot}$ ได้ 50%) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดพืช โดยสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้ คือ trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-choman -2-carboxylic acid)

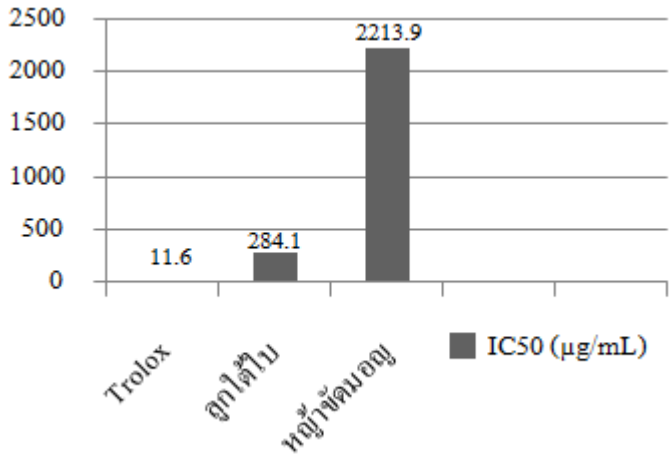
3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบลูกใต้ใบและสารสกัดหยาบหญ้าขัดมอญ โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965, pp. 144 – 158) และ

ปรับปรุงตามวิธีของ Kahkonen และคณะ (Kahkonen et al., 1999, pp. 3954-3962) นำสารสกัดพืชทั้ง 2 ชนิดมาเตรียมเป็นสารละลายที่ความเข้มข้นเหมาะสม ปริมาตร 1 mL ผสมกับ 10% v/v Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 5 mL ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 75 g/L ปริมาตร 4 mL ตั้งทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm เทียบกับ blank ซึ่งใช้เอทานอลแทนสารสกัดพืช นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic content) ในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/g of extract) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid)

4. ผลการวิจัย

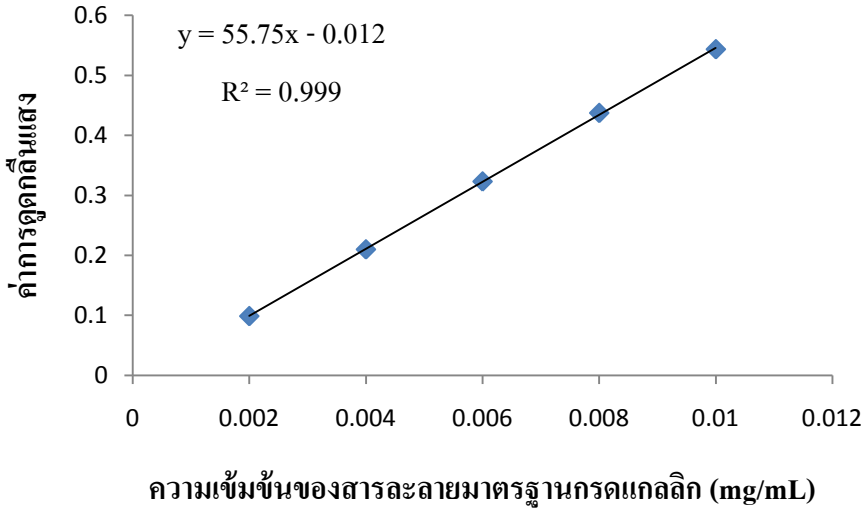
การสกัดด้วยเอทานอลของพืช 2 ชนิดได้แก่ ลูกใต้ใบและหญ้าขัดมอญ มีเปอร์เซ็นต์สารสกัดต่อน้ำหนักพืชแห้งคือ 5.36% และ 5.71% ตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดลูกใต้ใบและสารสกัดหญ้าขัดมอญ โดยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดลูกใต้ใบมีค่า IC_{50} เท่ากับ 284.1 µg/mL สารสกัดหญ้าขัดมอญ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2213.9 µg/mL ในขณะที่สารละลายมาตรฐาน Trolox มีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.6 µg/mL แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดลูกใต้ใบ หญ้าขัดมอญ และสารมาตรฐาน Trolox

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดลูกใต้ใบ และสารสกัดหญ้าขัดมอญ โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu โดยมีกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกแสดงดังรูปที่ 2 พบว่าสารสกัด

ลูกใต้ใบและสารสกัดหญ้าขัดมอญมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 36.00 mg GAE/g of extract และ 910.00 mg GAE/g of extract ตามลำดับ



ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

5. อภิปรายผล

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดลูกใต้ใบและสารสกัดหญ้าขัดมอญโดยวิธี DPPH assay เป็นการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลไนโตรเจนที่มีความคงตัวมาก อยู่ในรูปสารละลายจะมีสีม่วง โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะให้อะตอมไฮโดรเจนแก่ DPPH เปลี่ยนเป็น DPPHH ทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จะทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงลดลง ในความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดจะรายงานผลในค่า half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) ซึ่งหมายถึงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ 50% หากค่า IC_{50} มากบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ต่ำ แต่ในทางกลับกันหากค่า IC_{50} น้อยบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH สูง จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ลูกใต้ใบและสารสกัดหญ้าขัดมอญ พบว่าความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดพืชทั้งสองชนิด โดยสารสกัดลูกใต้ใบมีค่า IC_{50} 284.1 µg/mL สารสกัดหญ้าขัดมอญ มีค่า IC_{50} 2213.9 µg/mL จากค่า IC_{50} ของสารสกัดทั้งสองชนิดแสดงให้เห็นว่าสารสกัดลูกใต้ใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดหญ้าขัดมอญ แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดลูกใต้ใบยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารละลายมาตรฐาน Trolox

จาก ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดลูกใต้ใบและสารสกัดหญ้าขัดมอญ โดยใช้ วิธี Folin-Ciocalteu ทำการคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่าสารสกัดหญ้าขัดมอญมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดลูกใต้ใบ ซึ่งผลดังกล่าวไม่สอดคล้องกับผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อาจเนื่องมาจากกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระไม่ได้มีเพียงกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกเท่านั้น แต่ยังมีกลุ่มสารอื่นๆ เช่น ซาโปนิน (saponin) เทอร์พีน (terpene) เป็นต้น ซึ่งในลูกใต้ใบมีสารกลุ่มดังกล่าว (Ekaete and others, 2013, pp. 116-122) เมื่อถูกสกัดออกมาก็จะมีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สารสกัดลูกใต้ใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดหญ้าขัดมอญ

6. สรุปผล

สารสกัดด้วยเอทานอลของลูกใต้ใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือมีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH โดยมีค่า IC_{50} 284.1 µg/mL ซึ่งมากกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของหญ้าขัดมอญที่มีค่า IC_{50} 2213.9 µg/mL ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดลูกใต้ใบ 36.00 mg GAE/g of extract ในขณะที่สารสกัดหญ้าขัดมอญมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 910.00 mg GAE/g of extract

7. ข้อเสนอแนะ

7.1 ควรทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระควรมีการใช้วิธีอื่นร่วมด้วย เช่น FRAP, ABTS, Lipid peroxidation

7.2 ควรมีการทดสอบฤทธิ์เภสัชวิทยาด้านอื่นๆ ในลูกใต้ใบและหญ้าขัดมอญ เช่น การออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ เพื่อเพิ่มประโยชน์ของลูกใต้ใบและหญ้าขัดมอญ ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าให้แก่พืชในท้องถิ่นเพื่อพัฒนาไปเป็นพืชเศรษฐกิจต่อไป

เอกสารอ้างอิง

มงคล คงเสน อัจฉรา นิยมเดชา วาฟาห์ หาญณรงค์ และพนม สุขจันทร์. (2556). การรวบรวมคุณสมบัติและประโยชน์ของต้นลูกใต้ใบ. *วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์*. 5(4): 153-163.

ศิริพร เหลียงกอบกิจ. (2546). ลูกใต้ใบ & ตับอักเสบบี. *จุลสารข้อมูลสมุนไพร*. 20(4): 2-10.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. (2561). *วัชพืช* (ออนไลน์). แหล่งเข้าถึง:

http://ippc.acfs.go.th/pest/G001/T010/WEED079, 24 ธันวาคม 2561.

Bagchi K., and Puri S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 4: 350-360.

Blot W.J., Li J.Y. and Taylor P.R. (1993). Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst*. 85: 1483-1491.

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

Ekaete, D. U., Ukana, D. A. and Itoro E. U. (2013). Phytochemical screening and nutrient analysis of Phyllanthus amarus. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 3(4):116-122.

Kahkonen, M.P., Hopia A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. and Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem*. 47: 3954-3962.

Karou, D., Dicko, M.H., Sanon S., Simpore, J. and Traore., A.S. (2003). Antimalarial activity of *Sida acuta* Burm. f. (Malvaceae) and *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 89: 291-294.

Karou, D., Savadogo, A., Canini, A., Yameogo S., Montesano C., Simpore J., Colizzi V. and Traore, A.S. (2006). Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology*. 5(2): 195-200.

Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic*. 16: 144 – 158.

Yen G.C. and Hsieh C.L. (1997). Antioxidant effects of dopamine and related compounds. *J. Biotechnol. Biochem*. 61(10): 1646 – 1649.