สารพฤกษเคมีเบื้องต้น และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสลัดน้ำพืชสดและพืชแห้ง
Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Fresh and Dried *Nasturtium officinal* Plants

ณพัฐอร บัวฉุน[1]
Napattaorn Buachoon[1]
[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
[1]Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage
Received: June 20, 2019
Revised: September 11, 2019
Accepted: September 17, 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพฤกษทางเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแทนนินทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสลัดน้ำทั้งแบบสดและแบบแห้ง โดยนำ ใบ ลำต้น และรากทั้งแบบสดและแบบแห้งของสลัดน้ำ ทำการสกัดด้วยเอทานอล ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด แทนนินทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบด้วยวิธี DPPH radical scavenging จากการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาบของสลัดน้ำแบบสดและแบบแห้งพบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ คูมารินซาโปนิน แทนนิน และ โฟลบาแทนนิน สารสกัดจากใบแบบสดและแบบแห้งมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดปริมาณแทนนินทั้งหมด และ ปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด เท่ากับ 150.45±0.23 และ 210.30±0.02 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง 171.39±0.14 และ 189.23±0.03 มิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง และ 134.23±0.11 และ 140.56±0.42 มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง ตามลำดับ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging พบว่า สารสกัดหยาบสลัดน้ำแบบสดและแบบแห้งในใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 13.98±0.08 และ 11.85±0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด, สลัดน้ำ, พืชสด, พืชแห้ง

Abstract

The aim of this present study is to screen the phytochemical content l, total phenolic content, total tannin content, total flavonoid content and antioxidant activity of *Nasturtium officinale* from both fresh and dried sources. The *Nasturtium officinale* plant, both fresh and dried, such as leaf, trunk, and root extraction by ethanol was studied. The crude extracts from *Nasturtium officinale* analysis were obtained, including total phenolic content, total tannin content, total flavonoid content and antioxidant activity using DPPH radical scavenging method. In this study, the *Nasturtium officinale* phytochemical compounds and extracts were screened from both fresh and dried was flavonoids, coumarins, saponins, tannins and phlobatannins. The extracts from fresh and dried leafs showed the highest total phenolic content and total flavonoid content which was about 150.45±0.23 and 210.30±0.02 mg GAE/g extract, 171.39±0.14 and 189.23±0.03 mg TAE/g extract, 134.23±0.11 and 140.56±0.42 mg QE/g extract, respectively. The antioxidant activity using DPPH radical scavenging method extracts of both fresh and dried *Nasturtium officinale* leafs showed the highest antioxidant activity with EC_{50} values of 13.98±0.08 and 11.85±0.13 mg/mL, respectively.

Keywords: antioxidant activity, total phenolic content, *Nasturtium officinale*, fresh plants, dried plants

บทนำ

ปัจจุบันประชาชนได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับสุขภาพมากขึ้น ทั้งใส่ใจในเรื่องของการรับประทานอาหาร โดยหันมารับประทานอาหารประเภทพืชผักและผลไม้มากขึ้น เนื่องจากในพืชผักและผลไม้มีวิตามินและเกลือแร่ที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เช่น วิตามินอี วิตามินซี เบต้าแคโรทีน ทองแดง และสังกะสี เป็นต้น อนุมูลอิสระ (free radicals) ถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึม และในภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษ เช่น โอโซน โลหะหนัก ควันบุหรี่ เป็นต้น โดยภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะทำลายโครงสร้างและหน้าที่ของผนังเซลล์ ก่อให้เกิดความผิดปกติ และโรคต่าง ๆ ดังนั้นจำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกันสิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นโดยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดโรค ซึ่งผลการศึกษาจากงานวิจัย ได้ยืนยันว่า การบริโภคผัก ผลไม้ ธัญพืชที่ไม่ผ่านการขัดสีและพืชสมุนไพรต่าง ๆ ซึ่งเป็นแหล่งอาหารสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ (วิตามินซี เบต้าแคโรทีนแคโรทีนอยด์ รวมถึง สารกลุ่มโพลีฟีนอลิก) จะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรังที่สัมพันธ์กับอาหาร เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคสมอง เป็นต้น (Wongrak, 2006) สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าจับกับอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงถือเป็นตัวรีดิวซ์ การกำจัดอนุมูลอิสระ ด้วยการให้ไฮโดรเจนอะตอม และการกำจัดออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน รวมทั้งการรวมตัวกับโลหะ เป็นกลไกที่พบได้ในสารประกอบฟีนอลิก (Buachoon, 2017)

ผักพื้นบ้านไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเหมาะที่จะนำมาปรุงอาหารสร้างเสริมสุขภาพ (Phansawan, 2013) สลัดน้ำ หรือ *Nasturtium officinale* เป็นผักที่กำลังได้รับความนิยมในกลุ่มคนรักสุขภาพ มีแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญในแถบภาคเหนือและภาคใต้ของประเทศไทย เป็นผักที่ปลูกง่าย อุดมไปด้วยสารอาหารหลายชนิด ได้แก่ แคลเซียม ธาตุเหล็ก วิตามินต่าง ๆ (Justesen & Knuthsen, 2001) กระแสการกินสลัดน้ำเพื่อประโยชน์ทางสุขภาพและการ

รักษาโรคนั้น เริ่มเป็นที่กล่าวถึงในวงกว้างมากขึ้น มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ยืนยันฤทธิ์ของสลัดน้ำ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ (Somayeh et al., 2017) สารสลัดน้ำมีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูง โดยสารเหล่านี้มีหน้าที่ช่วยยับยั้งกระบวนการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย ลดไขมันในเลือด (Bahramikia & Yazdanparast, 2008; Bahramikia & Yazdanparast, 2010)

ทั้งนี้ยังไม่พบการศึกษาปริมาณสารในแต่ละส่วนของสลัดน้ำ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องลำต้น (phytochemical screening) หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แทนนินทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสลัดน้ำในส่วน ใบ ลำต้น และราก เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในทางการแพทย์และในการใช้เป็นอาหารเสริมต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของส่วนต่าง ๆ ของสลัดน้ำ ได้แก่ ใบ ลำต้น และราก ทั้งแบบสดและแบบแห้ง

2. ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แทนนินทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในส่วนต่าง ๆ ของสลัดน้ำ ได้แก่ ใบ ลำต้น และราก ทั้งแบบสดและแบบแห้ง

แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ

อนุมูล หรือ อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว อยู่ในออร์บิทัล วงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูล หรืออนุมูลอิสระคืออิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $A^{\bullet}$ อนุมูล $A^{-\bullet}$และ อนุมูล $A^{+\bullet}$ (Gulcin et al., 2002) โดยเฉพาะอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง อนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะ คือ มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ ตัวอย่างของอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{-\bullet}$) อนุมูลไฮดรอกซี ($^{\bullet}OH$) อนุมูลอัลคอกซี ($RO^{\bullet}$) และอนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี ($OH_2^{\bullet}$) อนุมูลอิสระเหล่านี้ จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก และขณะที่ไนตริกออกไซด์ (NO) หรือ อนุมูลไนตริกออกไซด์ ($^{\bullet}NO$) อนุมูลวิตามินอีและอนุมูลวิตามินซี เป็นอนุมูลที่มีความไวสูงรองลงมา (Yildirim et al., 2000; Buachoon, 2017)

สารต้านอนุมูลอสิระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่มีสมบัติยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระที่ร่างกายได้รับจากสิ่งแวดล้อม เช่น ควันบุหรี่ แอลกฮอลล์ รังสี UV เอ็กซเรย์ทำให้กลายเป็น สารที่ไม่มีอันตรายต่อเซลล์ร่างกาย (Yildirim et al., 2002) สารต้านอนุมูลอิสระจะต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน รวมถึงสามารถยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ สารต้านอนมูลอิสระที่เป็นสารจากธรรมชาติ (natural antioxidant) เช่น amino acids, ascorbic acids, carotenoids, flavonoids, melanoidins, other organic acids, peptides, tannins, และ tocopherols เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารสังเคราะห์ (synthetic antioxidant) เช่น tert-butyl-4-hydroxyanisol (BHA), tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) และ tert-butyl-hydroquinone (TBHQ) เป็นต้น (Rakariyatham & Janewithesuk, 2003)

กรอบแนวคิดการวิจัย

เพื่อศึกษาพฤกษทางเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด แทนนินทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสลัดน้ำ ในส่วนของ ใบ ลำต้น และราก ทั้งแบบสดและแบบแห้ง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างสลัดน้ำทำการเก็บจากโครงการหลวงทุ่งหลวง อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ ช่วงเดือนตุลาคม ถึง ธันวาคม พ.ศ.2561 และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์พืชโดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุนันท์ สุดใจ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏ วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

2. การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างสลัดน้ำ มาทำการแยกส่วนเป็นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ใบ ลำต้น และราก ล้างทำความสะอาดและผึ่งให้แห้ง โดยมีรายละเอียดส่วนที่นำมาทดสอบดังต่อไปนี้ (1) ใบ คือ ส่วนเฉพาะใบอ่อนที่เด็ดได้ด้วยมือ (2) ลำต้น คือ ส่วนที่ยืดตรงอยู่เหนือดินเป็นทรงกระบอกแนวตั้ง และ (3) ราก คือ ส่วนที่งอกต่อจากลำต้นลงไปในดิน

2.1 การเตรียมตัวอย่างแบบแห้งจากสลัดน้ำ

นำแต่ละส่วนของสลัดน้ำ (ใบ ลำต้น และราก) มาหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 50 °C จนกระทั่งแห้ง นำไปบดให้เป็นผงละเอียด ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2.2 การเตรียมตัวอย่างแบบสดจากสลัดน้ำ

นำแต่ละส่วนของสลัดน้ำ (ใบ ลำต้น และราก) มาหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำส่วนที่หั่นมาชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

3. การเตรียมสารสกัดหยาบสลัดน้ำ

นำตัวอย่างสลัดน้ำแบบสดและแบบแห้งแต่ละส่วน มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล โดยวิธีการแช่หมัก (maceration) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายของแต่ละตัวอย่าง โดยใช้การกรองด้วยสูญญากาศ นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบแต่ละตัวอย่างที่ได้ เก็บรักษาสารสกัดในภาชนะปิดทึบแสงที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

4. การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบสลัดน้ำโดยแบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนินแทนนิน โฟลบาแทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน (Ayoola et al., 2008; Koleva et al., 2002) แต่ละการทดสอบทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ดังนี้

4.1 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (flavoniods) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วย 50% เอทานอล เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออกนำของเหลวที่ได้จากการกรองใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เขย่าแล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

4.2 การตรวจสอบแอนทราควิโนน (anthaquinones) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรองไปเติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH3) เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

4.3 การตรวจสอบคูมาริน (coumarins) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วย 50 % เอทานอล เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรองเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (6 M NaOH) เขย่า ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบคูมาริน

4.4 การตรวจสอบซาโปนิน (saponins) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที เขย่าอย่างแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบซาโปนิน

4.5 การตรวจสอบแทนนิน (tannins) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรองเติมสารละลายเฟอริคคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

4.6 การตรวจสอบโฟลบาแทนนิน (phlobatannins) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ

5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรองเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (10% HCl) เขย่าแล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบโฟลบาแทนนิน

4.7 การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออกนำของเหลวที่ได้จากการกรอง ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบเทอร์ปีนอยด์

4.8 การตรวจสอบสเตียรอยด์ (steroids) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์มเขย่ากรองส่วนที่ไม่ละลายออกนำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมกรดแกลเซียลแอซีติกเขย่าแล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสเตียร์รอยด์

4.9 การตรวจสอบคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ (cardiac glycosides) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์มเขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออกนำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) เขย่าเติมกรดแกลเซียลแอซีติก เขย่าและค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

5. การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (ดัดแปลงวิธีจาก Tsai et al., 2005)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย folin-ciocalteu ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีและเติมโซเดียมคาร์บอเนต (7% Na_2CO_3) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร วาดกราฟเพื่อหาสมการเส้นตรง ทำการทดสอบเช่นเดียวกันกับสารสกัดเพื่อหาปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกและนำเสนอในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg GAE/g extract) โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ

6. การหาปริมาณแทนนินทั้งหมด (ดัดแปลงวิธีจาก Tsai et al., 2005)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย folin-ciocalteu ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีและเติมโซเดียมคาร์บอเนต (7% Na_2CO_3) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร วาดกราฟเพื่อหาสมการเส้นตรง ทำการทดสอบเช่นเดียวกันกับสารสกัดเพื่อหาปริมาณแทนนินในสารสกัดจากกราฟมาตรฐานของกรดแทนนิกและนำเสนอในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแทนนิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg TAE/g extract) โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ

7. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ดัดแปลงวิธีจาก Prommuak et al., 2008)

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี aluminium trichloride colorimetric โดยใช้เคอร์ซิตินเป็นสารมาตรฐาน เมื่อทำการผสมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน ให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ (1% $AlCl_3$) ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร วาดกราฟเพื่อหาสมการเส้นตรง ทำการทดสอบเช่นกันกับสารสกัดเพื่อหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานเคอร์ซิตินและนำเสนอค่าปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดรวมในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg QE/g extract)

8. การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ดัดแปลงวิธีจาก Prommuak et al., 2008)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT , BHA หรือสารสกัดหยาบสลัดน้ำที่มีความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, และ 31.25 µg/mL ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH 6x10-5 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีวัด

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหา % radical scavenging จากสูตร

$$\% \text{ radical scavenging} = [(Ac-As)/Ac] \times 100$$

โดย Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

ค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า effective concentration (EC_{50}) หรือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50% จากกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับ % radical scavenging

สถิติที่ใช้ในการทดสอบ

นำเสนอข้อมูลด้วย mean±SD. (n=3) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยสถิติ one-way analysis of variance (one-way ANOVA) และการทดสอบใช้ค่าความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 0.05 หากค่า $p<.05$ ถือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

1. ผลจากสกัดสารจากสลัดน้ำ

ผลการสกัดสลัดน้ำโดยวิธีการแช่หมักด้วยเอทานอล พบว่า สารสกัดหยาบสลัดน้ำแบบสดและแบบแห้งทั้งส่วนใบ ลำต้นที่ได้มีลักษณะสีเขียวเข้มหนืดและรากมีลักษณะสีเหลืองเข้มหนืด เมื่อนำมาหาร้อยละของสารสกัดหยาบสลัดน้ำ (%yield) พบว่า สารสกัดที่ได้จากการสกัดสลัดน้ำแบบสดของใบ ลำต้น และราก มีน้ำหนักคิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักพืชสด เท่ากับ 10.24, 8.45 และ 6.21 ตามลำดับ และการสกัดจากสลัดน้ำแบบแห้งของ ใบ ลำต้น และราก มีน้ำหนักคิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักพืชแห้ง เท่ากับ 9.93, 6.20 และ 5.35 ตามลำดับ

2. การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากสลัดน้ำทั้งแบบสดและแบบแห้ง โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โฟลบาแทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ อาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน พบว่าสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบเอทานอลของสลัดน้ำทั้งแบบสดและแห้ง มี 5 ชนิด คือ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน และโฟลบาแทนนิน ผลการทดลอง ดังตาราง 1

ตาราง 1

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องลำต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของสลัดน้ำ

สารพฤกษเคมีเบื้องต้น	สารสกัดหยาบแบบสด			สารสกัดหยาบแบบแห้ง		
	ใบ	ลำต้น	ราก	ใบ	ลำต้น	ราก
ฟลาโวนอยด์	+	+	+	+	+	+
แอนทราควิโนน	-	-	-	-	-	-
คูมาริน	+	+	+	+	+	+
ซาโปนิน	+	+	+	+	+	+
แทนนิน	+	+	+	+	+	+
โฟลบาแทนนิน	+	+	+	+	+	+
เทอร์ปีนอยด์	-	-	-	-	-	-
สเตียรอยด์	-	-	-	-	-	-
คาร์ดิแอคไกลโคไซด์	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ทดสอบไม่พบสาร
+ หมายถึง ทดสอบพบสาร

3. ผลการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด แทนนินทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ของสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของสลัดน้ำ

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของสลัดน้ำแบบสดและแห้ง ได้แก่ ใบ ลำต้น และราก มาทำการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด แทนนินทั้งหมด และ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด จะพบว่า สารสกัดสดจากใบจะมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด แทนนินทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด สูงที่สุด คือ 150.45± 0.23 mg GAE/g, 171.39±0.14 mg TAE/g และ 134.23±0.11 mg QE/g ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนลำต้นและราก ($p<.05$)ในสารสกัดหยาบสลัดน้ำแบบแห้งในใบจะมี ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดแทนนินทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด เช่นกันคือ 210.30±0.02 mg GAE/g, 189.23±0.03 mg TAE/g และ 140.56±0.42 mg QE/g ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนลำต้นและราก ($p<.05$) เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดจากพืชแบบสดและแบบแห้ง พบว่าแบบแห้งจะมีทั้งปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด แทนนินทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในปริมาณที่สูงแบบสดในทุกส่วนของพืช ($p<.05$) ยกเว้นส่วนรากที่มีค่าแทนนินทั้งหมดมีค่าใกล้เคียงกัน ($p<.05$) ผลดังตาราง 2

ตาราง 2

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด แทนนินทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบสลัดน้ำ

สารสำคัญ	สารสกัดหยาบสลัดน้ำ					
	สารสกัดจากพืชแบบสด			สารสกัดจากพืชแบบแห้ง		
	ใบ	ลำต้น	ราก	ใบ	ลำต้น	ราก
ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract)	150.45±0.23*	134.98±0.43**	98.32±0.12**	210.30±0.02*	168.09±0.03**	145.29±0.19**
ปริมาณแทนนินทั้งหมด (mg TAE/g extract)	171.39±0.14*	139.23±0.25**	120.11±0.10**	189.23±0.03*	145.98±0.15**	121.81±0.35**
ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g extract)	134.23±0.11*	87.29±0.59**	28.45±0.12**	140.56±0.42*	130.23±0.19**	34.34±0.28**

*p<.05 เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนใบของพืชที่สกัดแบบเดียวกัน

**p<.05 เมื่อเปรียบเทียบกับแบบสดของพืชส่วนเดียวกัน

4. ผลการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสลัดน้ำ ดังตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของสลัดน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า EC_{50} ของ ใบ ลำต้น และราก แบบสด เท่ากับ 13.98±0.08, 15.31±0.03 และ 17.20±0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และใบ ลำต้น และรากแบบแห้ง เท่ากับ 11.85±0.13, 12.89±0.16 และ 15.10±0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำค่า EC_{50} ของสารสกัดหยาบสลัดน้ำส่วนใบทั้งแบบสดและแบบแห้งมาเปรียบเทียบกันจะพบว่า ในสารสกัดหยาบส่วนใบแบบแห้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งดีกว่าสารสกัดส่วนใบมีฤทธิ์ที่ดีกว่าส่วนอื่น ๆ และเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน BHA และ BHT สารสกัดส่วนใบมีฤทธิ์ดีกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<.05)

ตาราง 3

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสลัดน้ำส่วนต่าง ๆ

สารสกัด	EC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารสกัด	EC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
BHT	14.57±0.02	BHA	17.35±0.07
ใบสด	13.98±0.08*	ใบแห้ง	11.85±0.13*
ลำต้นสด	15.31±0.03**	ลำต้นแห้ง	12.89±0.16**
รากสด	17.20±0.10**	รากแห้ง	15.10±0.15**

*p<.05 เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนใบของพืชที่สกัดแบบเดียวกัน

**p<.05 เมื่อเปรียบเทียบกับแบบสดของพืชส่วนเดียวกัน

การอภิปรายผล

จากการศึกษาการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสลัดน้ำ โดยการตรวจหาพฤกษทางเคมีเบื้องต้น พบสาร 5 กลุ่ม คือ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน และโฟลบาแทนนิน ซึ่งสารกลุ่มดังกล่าวนั้น ได้มีรายงานว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Venkatesh & Dorai, 2015; Wongrak, 2006) การวิเคราะห์หาปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแทนนินทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่าสารสกัดสลัดน้ำแบบแห้งมีปริมาณสารดังกล่าวมากกว่าแบบสดและพบปริมาณสารมากที่สุดในสลัดน้ำส่วนใบ โดยสารสกัดแห้งจากใบของสลัดน้ำมีปริมาณมากที่สุด จากการศึกษาพบว่าสารสกัดสลัดน้ำแห้งจากส่วนใบมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bahramikia and Yazdanparast (2008) ที่ทำการสกัดสลัดน้ำโดยใช้ตัวทำละลายคือเอทานอล และพบว่าสารสกัดสลัดน้ำมีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ 96.2 mg GAE/g และมีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 63.2 mg QE/g

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH ซึ่งอนุมูล DPPH เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว สารต้านอนุมูลอิสระจะให้หรือรับอิเล็กตรอนแก่อนุมูล DPPH ทำให้ได้เป็นสาร diphenyl picrylhydrazyl (DPPH:H) ที่ไม่เป็นอนุมูลอีกต่อไป ในการทดลองนี้พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH ของสารสกัดสลัดน้ำแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ โดยสารสกัดจากใบแบบแห้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลิสระสูง โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 11.85±0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร งานวิจัยของ Bahramikia and Yazdanparast (2008) ที่พบว่าสารสกัดสลัดน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 114.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร งานวิจัยของ Pourmorad et al. (2006) และ Buachoon and Ngamnon (2018) พบว่าสารสกัดมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในปริมาณที่สูงจะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูงด้วย โดยYildirim et al. (2000) พบว่ากลไกในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เกิดจากการให้หรือรับอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH ของสารจำพวกฟีนอล ซึ่งจะได้เป็นสาร DPPH ที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระอีกต่อไป ส่วน phenoxy radical ที่เกิดขึ้นจะจับกันเองทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมลูอิสระหยุดลง โดยสรุปแล้วจากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าสลัดน้ำเป็นพืชที่มีประโยชน์ โดยใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ การแปรรูปพืชด้วยการอบแห้งไม่มีผลต่อฤทธิ์ของพืช คุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระอาจเป็นหนึ่งในกลไกที่มีอยู่ในพืช อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมทางชีวภาพในสลัดน้ำ เพื่อที่จะนำสลัดน้ำมาใช้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติและพัฒนาเป็นอาหารเสริมในอนาคต

References

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. *Journal of Pharmaceutical Research, 7* (3), 1019–1024.

Bahramikia, S., & Yazdanparast, R. (2008). Effects of hydroalcoholic extracts of *Nasturtium officinale* on lipid profile in high-fat diet rats. *Journal Ethnopharmacology, 115*(1), 116-121.

Bahramikia, S., & Yazdanparast, R. (2010). Antioxidation efficacy of *Nasturtium officinale* extracts using various in vitro assay systems. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies, 3*(4), 283-290.

Buachoon, N., & Ngamnon, Y. (2018). Development of skin lotion from *Albizia myriophylla* Benth and *Ardista elliptica* Thumb crude extracts. *VRU Research and Development Journal Science and Technology, 13*(2), 74-85. (in Thai)

Buachoon, N. (2017). Chemical compositions and antioxidant activity of crude extract from *Phyllanthus emblica* L. *RMUTSB Academic Journal Science and Technology, 10*(2), 18-17. (in Thai)

Gulcin I., Oktay M.O., Kufrevioglu O.I., & Aslan A. (2002). Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L.) Ach. *Journal Ethnopharmacology, 79*(3), 325–329.

Justesen, U., & Knuthsen, P. (2001). Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional danih dishes. *Food Chemistry, 73*(2), 245-250. (in Thai)

Koleva, I.I., BeeK, T., Linseen, J.P.H., Groot, A., & Evstatieva, L.N. (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis, 13*(1), 817-821.

Phansawan, B. (2013). Free radicals, antioxidants and antioxidant activity determination. *Thai Science and Technology Journal, 21*(30), 275-286. (in Thai)

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., & Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology, 5*(11), 1142-1145. (in Thai)

Prommuak, C., D-Eknamkul, W., & Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extract. *Separation and Purification Technology, 62*(2), 444-448. (in Thai)

Rakariyatham, N., & Janewithesuk, A. (2003). *Antioxidant anticancer agent Thai vegetables and herbs*. Chiang Mai: Nopburi Printing. (in Thai)

Somayeh, S.,Farzaneh B. Danial J., Maryam G., & Fatemeh S.. (2017) Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Nasturtium officinale* involved in attenuation of gentamicin-induced nephrotoxicity. *Journal Toxicology Mechanisms and Methods, 27*(2), 107-114.

Tsai C. C., Chen H. S., Chen S. L., Ho Y. P., Ho K. Y., & Wu Y. M.. (2005). Lipid peroxidation: A possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *Journal Periodontal Research, 40*(5), 378–384.

Venkatesh, B., & Dorai, A. (2015). Antibacterial and antioxidant potential of white and pink *Nelumbo Nucifera* Gaertn flowers. *In proceeding of international conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics IPCBEE* (pp. 213-217). Nakhon Pathom: Kasetsart University, Kamphaengsean Campus, Nakhon Pathom. (in Thai)

Wongrak, B. (2006). *Antioxidant activity of indigenous vegetables*. Bachelor of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University. (in Thai)

Yildirim A., Mavi A., Oktay M., Kara A.A., Algur O.F., & Bilaloglu V., (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argenta* Desf Ex DC), sage (*Salvia triloba* L.) and black tea(*Camellia sinensis*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48*(10), 5030–5034.