

การเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรใบรางจืด ดอกอัญชัน และเปลือกองุ่นแดง

อรอนงค์ รักสวนจิกร¹, วชิร คุณกิตติ^{2*}

¹นักศึกษานิเทศศาสตร์ สาขาเกษตรกรรมและสหกรณ์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

²Ph.D., รองศาสตราจารย์, อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

*ติดต่อผู้ประพันธ์: วชิร คุณกิตติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002 email: watkhu@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรใบรางจืด ดอกอัญชัน และเปลือกองุ่นแดง

อรอนงค์ รักสวนจิกร¹, วชิร คุณกิตติ^{2*}

ว. เกษตรศาสตร์อีสาน 2559; 12(1) : 61-69

รับบทความ : 14 เมษายน 2557

ตอบรับ : 29 เมษายน 2559

บทนำ: รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl ; วงศ์ Acanthaceae) ดอกอัญชัน (*Clitoria ternatea* Lindl ; วงศ์ Leguminosae) และเปลือกองุ่นแดง (*Vitis vinifera* Lindl ; วงศ์ Vitaceae) เป็น สมุนไพรที่นิยมนำมาพัฒนาเป็นสารเสริมอาหารและเครื่องสำอางกันอย่างแพร่หลาย สารสำคัญหลักที่สกัดจากสมุนไพรที่พบเป็นสารประกอบฟีนอลิก มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ดี และอาจช่วยชะลอการเสื่อมสภาพของเซลล์ในร่างกายจากการทำลายของอนุมูลอิสระ แต่ยังคงขาดข้อมูลเชิงเปรียบเทียบคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อการศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดสด ดอกอัญชันสด และเปลือกองุ่นแดงแห้ง **วิธีการทดลอง:** ทำการหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu assay, หาปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดโดยวิธี pH-differential method, ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Free radical scavenging (DPPH), Lipid Peroxidation Inhibition, Ferric Reducing Power, ศึกษาฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธี Tyrosinase inhibition activity และศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา *Staphylococcus aureus* DMST 2658, *Staphylococcus epidermidis* DMST 12853, *Bacillus subtilis* DMST 15896 และ *Pityrosporum ovale* ATCC 64061 **ผลการทดลอง:** สารสกัดจากพืชที่มีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุดคือ ดอกอัญชัน>ใบรางจืด>เปลือกองุ่นแดง, มีปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุดคือ ดอกอัญชัน>เปลือกองุ่นแดง>ใบรางจืด สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ได้ดีที่สุดคือ เปลือกองุ่นแดง>ดอกอัญชัน>ใบรางจืด สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไขมันได้ดีที่สุดคือ ใบรางจืด>ดอกอัญชัน>เปลือกองุ่นแดง สมุนไพรที่สามารถรีดิวส์โลหะ Fe^{3+} ได้ดีที่สุดคือ ดอกอัญชัน>ใบรางจืด>เปลือกองุ่นแดง และสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ดีที่สุดคือ สารสกัดใบรางจืด แต่สมุนไพรทั้งสามชนิดสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ต่ำ **สรุปผล:** สมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันได้ดี เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและความสามารถในการฆ่าเชื้อของสมุนไพร พบว่าสารสกัดใบรางจืดน่าจะเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร

คำสำคัญ: ใบรางจืด; ดอกอัญชัน; เปลือกองุ่นแดง; สารฟีนอลิก; สารแอนโทไซยานิน; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน; ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส; ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

The comparative study in bioactivities of Rang jeud, Butterfly pea and red grape peel

Onanong Ruksounjik¹, Watcharee Khunkitti^{2*}

¹Graduate Student, Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

²Ph.D., Associate Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* **Corresponding author:** Watcharee Khunkitti, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University,
Khon Kaen 40002, email: watkhu@kku.ac.th

Abstract

The comparative study in bioactivities of Rang jeud, Butterfly pea and red grape peel

Onanong Ruksounjik¹, Watcharee Khunkitti^{2*}

IJPS, 2016; 12(1) : 61-69

Received : 14 April 2014

Accepted : 29 April 2016

Introduction: Rang Jeud (*Thunbergia laurifolia* Lindl ; Family Acanthaceae), *Butterfly pea* (*Clitoria ternatea* Lindl ; Family Leguminosae), and Red grape peel (*Vitis vinifera* Lindl ; Family Vitaceae) are becoming a popular herbs for food supplement and cosmetic ingredients. Phenolic compounds are major components found in these herb extracts which possess an effective antioxidant activity and may help to delay cell-aging due to free radical species. However, It is lack of the comparison data among these herbs. The aim of this study was to compare the biological activity of crude extracts among leave of Rang Jeud, butterfly pea flowers and red grapes peel. **Methods:** Chemical analysis of the extracts were determined for total phenolic compounds by Folin-Ciocalteu assay and total anthocyanin by pH-differential method. Bioactivities of the extracts were examined for antioxidant activity with free radical scavenging (DPPH), lipid peroxidation Inhibition, ferric reducing power, tyrosinase inhibition activity and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* DMST 2658, *Staphylococcus epidermidis* DMST 12853, *Bacillus subtilis* DMST 15896 and *Pityrosporum ovale* ATCC 64061. **Results:** The amount of phenolic compounds found in the extracts were as followings; butterfly-pea flowers > Rang Jeud > red grapes peel and the amount of anthocyanin found in butterfly-pea flowers > red grapes peel > Rang Jeud. The free radical scavenging activities of 3 extracts were ranked in the following order: red grapes peel > butterfly-pea flowers > Rang Jeud whereas inhibition of lipid peroxidation activity was as follows, Rang Jeud > butterfly-pea flowers > red grapes peel. In addition, the reducing power of butterfly-pea flowers exhibited more efficacy than Rang Jeud and red grapes peel. Furthermore, Rang Jeud leaf extract showed the highest antimicrobial activity. However, all herbal extracts processes low tyrosinase inhibitory activity. **Conclusions:** In comparison among three herbs, all extracts possessed good antioxidant activity which Rang Jeud extract appears to be the most potential herbs for further studies in terms of product development.

Keywords: *Thunbergia laurifolia* L; *Clitoria ternatea* L; *Vitis vinifera* L; Total phenolic compound; Anthocyanin; Antioxidant activity; Anti-tyrosinase; Anti-microbial activity

บทนำ

โรคผิวหนังแก้ก่อนวัย ริ้วรอยเหี่ยวย่น และสีผิวหมองคล้ำที่เกิดบนใบหน้า ส่วนใหญ่มักมีสาเหตุมาจากการเสื่อมสภาพของเซลล์ในร่างกาย โดยเซลล์ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ (Free radical) ที่ได้รับมาจากสภาพแวดล้อมภายนอก เช่น ควันบุหรี่ สารพิษ สารเคมี รังสีอัลตราไวโอเล็ต สารสังเคราะห์ต่างๆ และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย เช่น เกิดจากกระบวนการสันดาปอาหารเพื่อสร้างพลังงาน รวมถึงความเครียดต่างๆ ก็มีผลกระทบทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นได้ โดยธรรมชาติแล้วร่างกายของคนเราจะสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อทำลายอนุมูลอิสระ และป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในส่วนต่างๆ ของร่างกายได้เอง ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น แคตตาลีส กลูตาไธโอน ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส และสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากการรับประทานเข้าไป เช่น วิตามินซี วิตามินอี ไอโซ ฟลาโวน ฟลาโวนอยด์ โคเอนไซม์คิวเทน และไลโคปีน และยังมีการรายงานว่าสารฟีนอล (phenolic compounds) ที่พบในส่วนต่างๆ ของพืช สามารถยับยั้งกระบวนการออกซิเดชัน กำจัดโลหะหนัก (chelation) ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งสามารถใช้ในการลดความเข้มของสีผิว (Matsuura *et al.*, 2006) ต้านเอนไซม์อีลาสเทส (elastase enzyme) ส่งผลให้ผิวหนังเต่งตึง ลดความหย่อนยานของผิวหนัง และต้านจุลชีพต่างๆ ซึ่งได้มีการพัฒนาเพื่อนำมาใช้ทางด้านเวชสำอาง เนื่องจากมีผลในการชะลอความชราทำให้ผิวขาวและลดเลือนริ้วรอยได้ (Kim *et al.*, 1997)

ปัจจุบันผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้ความสนใจต่อการนำสมุนไพรจากธรรมชาติ มาใช้เป็นสารเสริมอาหารและเครื่องสำอางกันอย่างแพร่หลาย สมุนไพรที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ เช่น ใบรางจืด ดอกอัญชัน และเปลือกองุ่นแดง ซึ่งเป็นสมุนไพรที่มักนำมาสกัดสารสำคัญในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ดี (Rice-Evans *et al.*, 1997) มีรายงานถึงฤทธิ์ทางชีววิทยาของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด แต่ยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีววิทยาของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดสด ดอกอัญชันสด และเปลือกองุ่นแดงแห้ง เพื่อศึกษาศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางด้านสุขภาพและความงาม

วิธีดำเนินการวิจัย

1.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้ 2,2-azobis-(2-methylpropionamidine)-dihydrochloride (ABAP) (Aldrich, Germany), 2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazil (DPPH) (Fluka, Germany), Ethanol (Merck, Germany), Potassium chloride (KCl) (บริษัทเอกตรงเคมีภัณฑ์, ไทย), Folin Ciocalteu (MERCK, Germany), Gallic acid (Aldrich, Germany), Ammonium thiocyanate (Aldrich, Germany), Ferrous chloride (Aldrich, Germany), Potassium ferricyanide (Aldrich, Germany), Trichloroacetic acid (Aldrich, Germany) และ Ferric chloride (Aldrich, Germany)

1.2 วิธีการสกัดสารจากใบรางจืด ดอกอัญชัน และเปลือกองุ่นแดง

ใบรางจืดสด ดอกอัญชันสด เก็บจากสวนสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.วัชร คุณกิตติ เป็นผู้ช่วยพิสูจน์เอกลักษณ์ ซึ่งสมุนไพรดังกล่าวเก็บในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2556 ส่วนเปลือกองุ่นแดงแห้งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท วิลเลจฟาร์มไวน์เนอรี่จำกัด ซึ่งเป็นบริษัทผลิตไวน์จากองุ่น ตั้งอยู่ที่จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งขั้นตอนการสกัดจะใช้ใบรางจืดสด ดอกอัญชันสด และเปลือกองุ่นแดงแห้ง 200 g ต่อ 95% ethanol 600 g คัดเป็นอัตราส่วน 1:3 ส่วน (w/w) หมักทิ้งไว้ในที่มีดอยอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ก่อนนำมาทดสอบฤทธิ์ต่างๆ

1.3 การหาปริมาณสารแอนโทไซยานินส์ทั้งหมดโดยวิธี

pH-differential method

ดูดสารสกัดจากใบรางจืด ดอกอัญชัน และเปลือกองุ่นแดงที่อยู่ใน 95% ethanol 10 μ l ใส่ลงใน 96 well plate โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ pH 1 และ pH 4.5 กลุ่มที่ 1 เติม 0.025 M KCl pH 1 ปริมาตร 150 μ l กลุ่มที่ 2 เติม 0.4 M sodium acetate pH 4.5 ปริมาตร 150 μ l ผสมให้เข้ากันโดยใช้ pipette ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm และ 700 nm จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารแอนโทไซยานินส์ทั้งหมด จากสูตร

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH 1} - (A_{520} - A_{700})_{pH 4.5}$$

นำค่า A มาคำนวณหา Total anthocyanin pigment (mg/L)

$$TA = (A \times MW \times DF \times 1000) / \epsilon \times 1$$

คำนวณเทียบกับ cyanidin -3,5-diglucoside ที่มี MW = 611

ϵ คือ Molar absorptivity มีค่าเท่ากับ $26,900 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$

DF คือ dilution factor (15)

1.4 การหาปริมาณสารฟีนอลิก โดยวิธี Folin-Ciocalteu assay

ดูดสารสกัดใบรางจืด ดอกอัญชันและเปลือกองุ่นแดงที่อยู่ใน 95% ethanol 20 µl ใส่ลงใน 96 well plate แล้วเติม 10% Folin Ciocalteu phenol reagent 50 µl ผสมให้เข้ากัน เติม 7.5% sodium carbonate 40 µl จากนั้นทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืด 2 ชั่วโมง 30 นาที ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ 760 nm นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid

1.5 DPPH (Free radical scavenging) methods

ดูดสารสกัดจากใบรางจืด ดอกอัญชัน และเปลือกองุ่นแดง ที่ละลายอยู่ใน 95% ethanol 100 µl ใส่ลงใน 96 well plate ส่วนหลุมที่เหลือให้ใส่ ethanol 50 µl ในทุกหลุม จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของสารสกัดใบรางจืด โดยวิธี 2-fold dilution ที่ละ 50 µl ในส่วนของสารมาตรฐานจะใช้ Glutathione (GSH) 10 mg/ml 100 µl แล้วเติมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazil) เข้มข้น 0.0004 M ปริมาตร 50 µl ลงในทุกหลุม ยกเว้นหลุมที่ใช้เป็น blank จากนั้นผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเก็บในที่มืด 25 นาที ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหา %AI (%Inhibition) จากสมการ

$$\%AI = \frac{Abs_{control} - (Abs_{sample} - Abs_{blank})}{Abs_{control}} \times 100$$

1.6 Lipid Peroxidation Inhibition Assay Method

เตรียม Linoleic acid 50 µl /ml ใน 80% ethanol แล้วดูดลงใน eppendorf tube 50 µl และเตรียมสารมาตรฐาน GSH 10 mg/ml ใน Deionize water ใส่สารสกัดจากใบรางจืด ดอกอัญชัน เปลือกองุ่นแดง และ GSH 50 µl ลงไปใน Linoleic acid ที่เตรียมไว้ ทำในที่มืด จากนั้นเติม 0.07 M 2,2-azobis-(2-methylpropionamidine)-dihydrochloride (ABAP) 10 µl ทิ้งไว้ 10 นาที จึงใส่ 20% acetic acid 150 µl ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 5 นาที นำเข้าตู้ Incubator ที่ 70 °C 1 ชั่วโมง จึงเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ โดยเตรียม 75% ethanol ดูดมา 160 µl ใส่ลงใน 96 well plate ใส่สารสกัด 20 µl และในส่วนของ blank จะใช้ DI water 20 µl จากนั้นใส่ 15 % ammonium thiocyanate 10 µl ใส่ 10 mM Ferrous chloride 10 µl ใช้ multiple pipette ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 3 นาที ทำทั้งหมด 5 ซ้ำ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 500 nm

1.7 Ferric Reducing Power Assay method

เตรียมสารมาตรฐาน GSH 3 mg/ml ,2.5 mg/ml, 2 mg/ml, 1.5 mg/ml , 1 mg/ml และ 0.5 mg/ml ใน DI water แล้วดูดสารสกัดจากใบรางจืด ดอกอัญชัน เปลือกองุ่นแดง และ GSH ที่เตรียมไว้มา 250 µl ผสมกับ 1% potassium ferricyanide 250 µl ส่วนของ blank จะใส่ Phosphate buffer pH 6.8 250 µl ผสมกับ 1% potassium ferricyanide 250 µl ผสมให้เข้ากันและ incubate ที่ 50 °C 20 นาที จึงใส่ 10% Trichloroacetic acid ที่ละลายในน้ำ 250 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยาทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้น Centrifuge ที่ 800 rpm 10 นาที แล้ว pipette supernatant มา 30 µl ใส่ใน 96 well plate ใส่ DI water 160 µl และใส่ 0.1% Ferric chloride ที่ละลายในน้ำ 10 µl ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 10 นาที ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 700 nm

1.8 Assay for tyrosinase inhibition activity

ใส่ phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 120 µl ลงใน 96 well plate แล้วดูด L-tyrosine 1.25 g/ml ที่เตรียมใน DI water 40 µl ใส่ใน 96 well plate ดูด 500 U/ml mushroom tyrosinase ที่เตรียมใน deionize water 40 µl ลงใน 96 well plate ยกเว้นหลุมที่ใช้เป็น blank จากนั้นใส่สารสกัดจากใบรางจืด ดอกอัญชัน เปลือกองุ่นแดง และ GSH 1 mg/ml 40 µl ลงไป โดยใช้ DI water 40 µl เป็น negative control จากนั้นใช้ auto pipette ผสมให้เข้ากันแล้ว incubate ที่ 25 °C 15 นาที ในที่มืด ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ก่อนวัดค่าดูดกลืนแสงให้เขย่า plate 60 วินาที แล้ววัดที่ 475 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณหา %Inhibition จากสมการ

$$\%AI = \frac{Abs_{control} - (Abs_{sample} - Abs_{blank})}{Abs_{control}} \times 100$$

1.9 การทดสอบหาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* DMST 2658, *S. epidermidis* DMST 12853, *B. subtilis* DMST 15896 และ *P. ovale* ATCC 64061

นำเชื้อ *S. aureus* DMST 2658, *S. epidermidis* DMST 12853 และ *B. subtilis* DMST 15896 มาเลี้ยงใน Tryptic soy broth แล้ว Incubate 37 °C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นเตรียมเชื้อให้ได้ OD₆₀₀ = 0.1 pipette เชื้อมา 300 µl spread ให้ทั่ว plate จนแห้ง แล้วเจาะหลุมบน agar plate ใส่สารสกัดใบรางจืด ดอกอัญชัน และเปลือกองุ่นแดงที่อยู่ใน 95% ethanol ลงไป 50 µl ต่อหลุม จากนั้น Incubate 37 °C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วดูผล ส่วนเชื้อ *P. ovale* ATCC 64061 เวลาใช้

จะนำเชื้อมา centrifuge ที่ 3000 rpm 5 นาที (จนแยกชั้น) จากนั้น ดูส่วนของ oil ที่ขึ้น แล้วเติม Normal saline ลงไป vortex แล้วนำไป centrifuge ที่ 3000 rpm 5 นาที แล้วเจือจางเชื้อด้วย Normal saline เพื่อให้ได้ OD₆₀₀ = 0.1 pipette เชื้อ ปริมาตร 200 µl และ Olive oil 200 µl spread ให้ทั่ว plate ผึ่งให้แห้ง จากนั้นจะหุ้มบน agar แล้ว pipette สารสกัด 50 µl ลงไปต่อหลุม ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน จนเชื้อขึ้นเต็ม plate แล้วดูผล

ผลการศึกษาวิจัย

การหา % Yield ของสารสกัดรางจืด

จากการทดลองเพื่อหา % Yield ของสารสกัดโดยการระเหยเอาส่วนของ 95% ethanol ออกด้วย Rotaevaporator และนำมาทำให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียสพบว่า สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงมี % Yield สูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากดอกอัญชันสด และสารสกัดจากใบรางจืดสด ซึ่งเท่ากับ 7.48±0.04, 3.08± 0.02 และ 2.27±0.12 ตามลำดับ โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ (ดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณ Total anthocyanin และ Total phenolic compound (n=3)

สารสกัด	ปริมาณ anthocyanin (mg/L ± SD)	ปริมาณสาร Phenolic เทียบกับ gallic acid (GAE/g DW ± SD)
สารสกัดใบรางจืด	1431.0±89.1	83.34±6.06
สารสกัดดอกอัญชัน	8841.3±72.3	137.05±4.83
สารสกัดเปลือกองุ่นแดง	4984.2±119.6	32.16±0.01

GAE/g DW = มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อตัวอย่างแห้ง 1 กรัม

Lipid Peroxidation Inhibition Assay

จากผลการทดลอง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Lipid Peroxidation Inhibition Assay พบว่า สารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้น 297.9±28.7 µg/ml สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 % ได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดดอกอัญชัน 327.3±97.6 µg/ml และสารสกัดเปลือกองุ่นแดง 941.5±89.9 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดทั้งสามชนิด สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 % ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน Glutathione (GSH) 4699.8±646.4 µg/ml ค่าที่ได้แสดงผล (ตารางที่ 2)

การหาปริมาณสารฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu assay

จากผลการทดลองการหาปริมาณสารฟีนอลิก จากสารสกัดที่ละลายอยู่ใน 95% ethanol พบว่าสารสกัดจากดอกอัญชันมีปริมาณสารฟีนอลิกสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดใบรางจืด และสารสกัดเปลือกองุ่นแดง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 137.05±4.83, 83.34±6.06 และ 32.16±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อตัวอย่างแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

การหาปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดโดยวิธี pH-differential method

จากผลการทดลองการหาปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด โดยวิธี pH-differential method พบว่าสารสกัดจากดอกอัญชันมีปริมาณ anthocyanin สูงที่สุดคือ 8841.3±72.3 mg/L รองลงมาคือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง 4984.2±119.6 mg/L และสารสกัดจากใบรางจืด 1431.0±89.1 mg/L ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

DPPH (Free radical scavenging)

จากผลการทดลอง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (Free radical scavenging) พบว่า สารสกัดเปลือกองุ่นแดง สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 % ได้ดีที่สุด 10.9±2.0 µg/ml รองลงมาคือสารสกัดดอกอัญชัน 72.0±3.9 µg/ml และสารสกัดใบรางจืด 281.6±3.5 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดทั้งสามชนิด สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50 % ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน Glutathione (GSH) 443.8±36.9 µg/ml (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่า IC₅₀ ของสารสกัดจากการทดสอบด้วยวิธี Lipid peroxidation (n=5) และ วิธี DPPH (n=3)

สารสกัด	Lipid peroxidation (µg/ml)	DPPH (µg/ml)
	(IC ₅₀ ±SD)	(IC ₅₀ ±SD)
GSH	4699.8±646.4	443.8±36.9
สารสกัดใบรางจืด	297.9±28.7	281.6±3.5
สารสกัดดอกอัญชัน	327.3±97.6	72.0±3.9
สารสกัดเปลือกงุ่นแดง	941.5±89.9	10.9±2.0

Ferric Reducing Power Assay

จากผลการทดลอง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการ Reduce Ferric (Fe³⁺) โดยวิธี Ferric Reducing Power Assay ของสารสกัดใบรางจืด ดอกอัญชัน และเปลือกงุ่นแดง เปรียบเทียบกับ Glutathione (GSH) ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน

พบว่า สารสกัดเปลือกงุ่นแดงสามารถ Reduce Fe³⁺ ได้ดีกว่า GSH 1.72 เท่า สกัดใบรางจืดสามารถ Reduce Fe³⁺ ได้ดีกว่า GSH ประมาณ 1.20 เท่า ส่วนสกัดดอกอัญชัน Reduce Fe³⁺ ได้น้อยกว่า GSH ประมาณ 0.69 เท่า (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถ Reduce Fe³⁺ ได้โดยเทียบกับความเข้มข้นของ GSH (n=3)

สารสกัด	Conc. (mg/ml)	equivalent to GSH (mg/ml±SD)
สารสกัดใบรางจืด	1	1.20±0.06
สารสกัดดอกอัญชัน	1	0.69±0.02
สารสกัดเปลือกงุ่นแดง	1	1.72±0.09

Assay for tyrosinase inhibition activity

จากผลการทดลอง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase โดยวิธี Assay for tyrosinase inhibition activity ของสารสกัดที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 0.2 mg/ml พบว่าสารมาตรฐาน GSH ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ได้ 95.72±2.00% ในส่วนของสารสกัดพบว่า สารสกัดจากใบรางจืดสามารถยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ได้ดีที่สุด 27.80±2.41% รองลงมาคือสารสกัดดอกอัญชัน 22.04±2.42% และสารสกัดเปลือกงุ่นแดง 21.48±3.69 %ตามลำดับ

การทดลองหาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ

จากผลการทดลองหาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราพบว่าสารสกัดจากใบรางจืด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* DMST 2658, *S. epidermidis* DMST 12853, *B. subtilis* DMST 15896 และ *P. ovale* ATCC 64061 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากเปลือกงุ่นแดง และสารสกัดจากดอกอัญชันตามลำดับ ยกเว้นเชื้อ *S. aureus* DMST 2658 ที่สารสกัดดอกอัญชันสามารถยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกงุ่นแดง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัด

สารสกัด	Inhibition zone (mm±SD)			
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. ovale</i>
1% Chlorhexidine	25.8±0.4	18.8±0.4	17.8±0.4	-
0.25% selsun	-	-	-	17.6±0.5
สารสกัดใบรางจืด	17.0±1.6	12.8±0.4	13.8±1.6	11.8±0.4
สารสกัดดอกอัญชัน	13.8±0.4	8.8±0.4	8.8±0.8	-
สารสกัดเปลือกงุ่นแดง	11.4±0.5	9.8±0.4	10.4±1.1	9.8±0.4

อภิปรายผลการทดลอง

รางจืด (*Thumbergia laurifolia* Lindl.) เป็นพืชในวงศ์ Acanthaceae สารสกัดรางจืดมีองค์ประกอบหลักอยู่ใน กลุ่ม ฟีนอลิก (phenolics) กลุ่มแคโรทีน เช่น ลูทีน (lutein) (Chan *et al.*, 2012) และยังพบสาร delphinidin, apigenin, glucopyranoside และ chlorogenic acid จากการศึกษารายงานวิจัยพบว่าสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ด้านการอักเสบที่ดี (Oonsivilai *et al.*, 2007) และมีรายงานว่าสารสกัดรางจืดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ได้ (Cheeptham & Towers, 2002) และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้โดยการชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (Hahnvajjanawong *et al.*, 2013)

ดอกอัญชัน (*Clitoria ternatea* Lindl.) เป็นพืชในวงศ์ Leguminosae สารสกัดดอกอัญชันมีองค์ประกอบหลักคือสาร phenolic compounds, phlobatannins, และ tannins (Mathew *et al.*, 2009) ส่วนสีจากดอกอัญชันอยู่ในกลุ่ม flavonol glycosides เช่น quercetin และแอนโทไซยานินส์ (anthocyanin) (Kazuma *et al.*, 2003) จากการศึกษารายงานวิจัยพบว่าสารกลุ่ม flavonoids และ alkaloids ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ชะลอการเกิดโรคไข่ม้วนอุดตันในหลอดเลือด โรคหลอดเลือดหัวใจแข็งตัวและด้านการอักเสบที่ดี โดยลดปริมาณ malondialdehyde (MDA) และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และเอนไซม์ catalase (CAT) (Patil & Patil, 2011)

องุ่นแดง (*Vitis vinifera* Lindl.) เป็นพืชในวงศ์ Vitaceae สาร polyphenols หลักที่พบในสารสกัดองุ่น ได้แก่ caftaric acid ซึ่งเป็น tartaric acid ester ของ caffeic acid ส่วนรงควัตถุสีม่วงเข้มเป็น anthocyanin ชนิด malvidin-3-glucoside. และ flavan-3-ol catechin (Rice-Evans *et al.*, 1997) ในด้านฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพบว่าสามารถต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation และ ด้านการอักเสบที่ดี (Vitseva *et al.*, 2005)

จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงแห้ง มี % Yield สูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากดอกอัญชันสด และ สารสกัดจากใบรางจืดสด ในการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากเปลือกองุ่นแดงที่นำมาได้ผ่านการอบให้แห้งมาก่อน เมื่อนำมาสกัดจึงมี % Yield สูงที่สุด และเมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ทั้ง 3 กลไก พบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้ง Lipid

Peroxidation ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งได้ดีกว่า สารมาตรฐาน Glutathione (GSH) เรียงตามลำดับดังนี้ สารสกัดจากใบรางจืด สารสกัดจากดอกอัญชัน และ สารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ส่วนประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (Free radical scavenging) พบว่า สารสกัดทั้ง 3 ชนิดจะมีประสิทธิภาพดีกว่า GSH โดยสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดดอกอัญชันและใบรางจืดตามลำดับ (ตารางที่ 2) และพบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด เป็น reducing agent ที่แตกต่างกัน โดยสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดงสามารถ Reduce โลหะ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} ได้ดีกว่า GSH 1.72 เท่า ในขณะที่สกัดจากใบรางจืดสามารถ Reduce โลหะ Fe^{3+} เทียบเท่ากับ GSH ประมาณ 1.20 เท่า ส่วนสกัดดอกอัญชัน จะน้อยกว่า GSH (ตารางที่ 3) ทั้งนี้ผลในการเป็นสารต้านออกซิเดชันกับปริมาณ anthocyanin และ phenolic compounds จะมีดังนี้ สารสกัดดอกอัญชันจะมีปริมาณ anthocyanins และ phenolic compounds สูงที่สุดส่งผลให้เป็นสารสกัดที่มี reducing power มากที่สุด ในขณะที่สารสกัดใบรางจืดจะตรวจพบ phenolic compounds น้อยกว่า สารสกัดดอกอัญชัน แต่มากกว่าสารสกัดเปลือกองุ่นแดง แต่พบ anthocyanins ต่ำ ส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง lipid peroxidation ได้ดีที่สุด ในขณะที่สารสกัดเปลือกองุ่นแดงตรวจพบ anthocyanins มากแต่ phenolic compounds ต่ำที่สุด ส่งผลให้กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด แต่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง lipid peroxidation และ reducing power น้อยที่สุด ทั้งนี้ สารสกัดทั้ง 3 ชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ต่ำ (ตารางที่ 5) แสดงว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิดสามารถลดความเข้มข้นของสีผิวได้น้อยมาก เมื่อนำสารสกัดมาทำการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรคผิวหนัง 4 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* DMST 2658, *S. epidermidis* DMST 12853, *B. subtilis* DMST 15896 และ *P. ovale* ATCC 64061 พบว่า สารสกัดจากใบรางจืด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* DMST 2658, *S. epidermidis* DMST 12853, *B. subtilis* DMST 15896 และ *P. ovale* ATCC 64061 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง และสารสกัดจากดอกอัญชันตามลำดับ ยกเว้นเชื้อ *S. aureus* DMST 2658 ที่สารสกัดดอกอัญชันสามารถยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกองุ่นแดง อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของสารสกัดใบรางจืดในการฆ่าเชื้อก่อโรคผิวหนังจะต่ำกว่าสารมาตรฐาน chlorhexidine

digluconate (1%w/v) และ selenium sulphide (2.5%w/v) (ตารางที่ 4) มีการศึกษาสารสกัดใบรางจืดที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศมาเลเซียพบว่าปริมาณสารฟีนอลิกน้อยกว่าที่พบในประเทศไทยเท่าตัว ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากความแตกต่างของพื้นที่ปลูก อายุการเก็บ และสายพันธุ์ (Chan *et al.*, 2011)

Rice-Evan *et al.*, (1997) ได้ทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของ phenols กับประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชัน สารในกลุ่ม polyphenols เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่า vitamin C และ E เนื่องจากสามารถให้โปรตอน และอิเล็กตรอนได้ดี หรือเป็น reducing agent ที่ดี นอกจากนี้ยังมีศักยภาพในการเป็นสารที่จับกับโลหะโดยเฉพาะธาตุเหล็กและทองแดงได้ (metal-chelating agent) ซึ่งมีบทบาทในการต้านออกซิเดชันโดยไปจับกับโลหะหนักที่จะไปเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระได้ เมื่อพิจารณาจากปริมาณ total phenolic compounds และ anthocyanin ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ประกอบกับสารประกอบหลักที่มีตรวจพบในสมุนไพรที่แตกต่างกัน กับประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันที่ต่างกันบ่งชี้ให้เห็นว่าอาจเกิดจากการเรียงตัวของโครงสร้างของ phenolic compounds แตกต่างกัน ดังจะเห็นได้จากปริมาณ total phenolic compounds ของรางจืดจะน้อยกว่าอัญชันแต่จะพบว่า reducing power ของรางจืดจะมากกว่า นอกจากนี้การที่มีสารประกอบหลายชนิดผสมกันก็อาจส่งผลต่อการเพิ่มหรือลดประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชันได้

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดี และสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ ซึ่งน่าจะมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้เพื่อป้องกันความผิดปกติของร่างกายที่เกิดจากการเหนี่ยวนำความเครียดด้วยอนุมูลอิสระ แหล่งของอนุมูลอิสระเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส หรือเชื้อราทำให้เม็ดเลือดขาว polymorphonuclear leukocyte และ macrophages ที่เข้าไปทำลายเชื้อบริเวณที่อักเสบทำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระในปริมาณมาก ส่งผลให้โปรตีนถูกทำลาย ผิวหนังปลดปล่อยสารก่อให้เกิดอาการอักเสบ นอกจากนี้รังสียูวีจากแสงแดดทำให้ผิวหนังสร้างอนุมูลอิสระและกระตุ้นการสร้างเมลานินมากขึ้นเพื่อปกป้องไม่ให้ผิวถูกทำลาย ถ้ามากเกินไปอาจก่อให้เกิดการไหม้ และเกิดมะเร็งที่ผิวหนังได้ (Briganti & Picardo, 2003)

โดยสรุปเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและความสามารถในการฆ่าเชื้อของสมุนไพรรางจืด ดอกอัญชัน และ เปลือกงุ่นแดง พบว่าสารสกัดใบรางจืดน่าจะเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อใช้ภายนอก เนื่องจากสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี ฆ่าเชื้อก่อโรคผิวหนังรวมทั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดรังแค และมีฤทธิ์ที่มีรายงานว่าสามารถต้านการอักเสบได้ดี ส่วนดอกอัญชัน และ เปลือกงุ่นแดงอาจจะนำมาพัฒนาเป็นอาหารเสริม เพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่วัยรุ่น และป้องกันการเกิดโรคจากภาวะที่ร่างกายถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ

References

- Briganti, S., & Picardo, M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. JEAIVE 2003; 17(6): 663-669.
- Chan, E. W. C., Lye, P. Y., Tan, L. N., Eng, S. Y., Tan, Y. P., & Wong, Z. C. Effects of drying method and particle size on the antioxidant properties of leaves and teas of *Morus alba*, *Lagerstroemia speciosa* AND *Thunbergia laurifolia*. CI&CEQ 2012; 18(3).
- Chan, E. W., Eng, S. Y., Tan, Y. P., & Wong, Z. C. Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Thunbergia laurifolia* : A Review. P H C O G J 2011; 3(24): 1-6.
- Cheeptham, N., Towers, G. H. N. Light-mediated activities of some Thai medicinal plant teas. Fitoterapia 2002; 73.7: 651-662.
- Hahnvajjanawong, C., Seubwai, W., Boonmars, T., & Vaeteewoottacharn, K. Natural Products for Prevention and Treatment of Cholangiocarcinoma. Srinagarind Med J 2013; 27: 371-380.
- Kazuma, K., Noda, N., & Suzuki, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. Phytochemistry 2003; 62(2): 229-237.
- Kim, JH., & Kim, BJ. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. Int J CosmetSci 1997; 19: 299-307.

- Mathew, N., Anitha, M. G., Bala, T. S. L., Sivakumar, S. M., Narmadha, R., & Kalyanasundaram, M. Larvicidal activity of *Saraca indica*, *Nyctanthes arbor-tristis*, and *Clitoria ternatea* extracts against three mosquito vector species. *Parasitol Res* 2009; 104(5): 1017-1025.
- Matsuura, R., Ukeda, H., Sawamura, M. Tyrosinase inhibition activity of Citrus essential oils. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 2309-2313.
- Oonsivilai, R., Cheng, C., Bomser, J., Ferruzzi, MG. Ningsanond S Phytochemical profiling and phase II enzyme-inducing properties of *Thunbergia laurifolia* Lindl. (RC) extracts. *J Ethnopharmacol* 2007; 114(3): 300–306
- Patil, A. P., & Patil, V. R. Evaluation Of Invitro Antioxidant Activity Of Seeds Of Blue And White Flowered Varieties Of *Clitoria Ternatea* Linn. *Int J Pharmacy and Pharm Sci* 2011; 3(4).
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* 1997; 2(4): 152-159.
- Vitseva, O., Varghese, S., Chakrabarti, S., Folts, J. D., & Freedman, J. E. Grape seed and skin extracts inhibit platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46(4): 445-451.