

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือและสาบแร้งสาบกา

Radical Scavenging Activities of Crude Leaf Extracts from *Eupatorium odoratum* Linn. and *Ageratum conyzoides* Linn.

■ อรพินท์ เทพสิงห์แก้ว^{1*} เบญจลักษณ์ ทองช่วย¹
Orapin Thapsingkaew,^{1*} Benchaluk Thongchui¹
ศาสตราจารย์ ศาสตราจารย์
Sakorn Pomprasert²

¹ สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

² ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Abstract

Eupatorium odoratum Linn. (*E. odoratum*) and *Ageratum conyzoides* Linn. (*A. conyzoides*) are a tropical plants found in South East Asia. The leaves are used for bleeding prevention and wound healing. Aims of this study was to investigate the radical scavenging of *E. odoratum* and *A. conyzoides*. The dried leaves of *E. odoratum* and *A. conyzoides* were extracted by distilled water and 95% ethanol. The levels of total phenolic content and the scavenging of ABTS^{•+}, DPPH, hydroxyl, and superoxide anion radicals were determined. The cytotoxicities were also assessed in human monocytic U937 cell line. The results showed that the highest amount of total phenolic content was found in the aqueous leaf extract of *E. odoratum* at concentration of 23.01 ± 0.04 mg GAE/g dried weight. The aqueous leaf extract of *A. conyzoides* had the highest antioxidant activity of ABTS^{•+} and DPPH radicals with the total antioxidant capacity and the 50% DPPH radical inhibitory concentration (IC_{50}) values of 1.998 ± 0.002 mM Trolox/mg dried weight and 3.25 ± 0.01 mg/mL, respectively. Ethanolic leaf extract of *E. odoratum* had the highest hydroxyl radical scavenging activity with IC_{50} value of 0.076 ± 0.001 mg/mL, whereas the ethanolic leaf extract of *A. conyzoides* had the highest superoxide anion radical scavenging activity with IC_{50} value of 37.50 ± 2.12 mg/mL. Moreover, *E. odoratum* and *A. conyzoides* leaf extracts exhibited a cytotoxic effect on human monocytic U937 cell line. The ethanolic leaf extract of *A. conyzoides* had the highest cytotoxic effect on human monocytic U937 cell line with the IC_{50} value of 2.5 mg/mL. In summary, *E. odoratum* and *A. conyzoides* crude leaf extracts had the radical scavenging activities. However, *A. conyzoides* crude leaf extract showed a greater antioxidant activity than that of *E. odoratum*.

Keywords: *Eupatorium odoratum* Linn., *Ageratum conyzoides* Linn., Radical scavenging activity, Total phenolic content, ABTS^{•+} radical

บทคัดย่อ

สาบเสือ และสาบแร้งสาบกาเป็นพืชประจำถิ่นของประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ใบมีสรรพคุณช่วยในการห้ามเลือดและสมานแผลทำให้เป็นที่น่าสนใจในการนำมาใช้ในการแพทย์ทางเลือกมากขึ้น การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกา โดยสกัดสารจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกาที่อบแห้งด้วยน้ำกลั่น และเอทานอลความเข้มข้น 95% จากนั้นวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลเอบีทีเอส (ABTS) ดีพีพีเอช (DPPH) ไฮดรอกซิล (OH[•]) และซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O₂^{•-}) และทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด U937 โดยวิธี MTT ผลการศึกษาพบว่าใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดเท่ากับ 23.01 ± 0.04 mg GAE/g dried weight สารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยน้ำสามารถกำจัดอนุมูลเอบีทีเอส และดีพีพีเอชได้ดีที่สุดโดยมีค่าความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลดีพีพีเอชได้ 50% (IC₅₀) เท่ากับ 1.998 ± 0.002 mM Trolox/ mg dried weight และ 3.25 ± 0.01 mg/mL ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีที่สุดมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.076 ± 0.001 mg/mL ขณะที่สารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนได้ดีที่สุดมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 37.50 ± 2.12 mg/mL นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกามีความเป็นพิษต่อเซลล์ U937 โดยสารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 2.5 mg/mL จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยสารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดใบสาบเสือ

คำรหัส: สาบเสือ สาบแร้งสาบกา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิกรวม อนุมูลเอบีทีเอส

บทนำ

สาบเสือ (*Eupatorium odoratum* Linn.) และสาบแร้งสาบกา (*Ageratum conyzoides* Linn.) เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย เจริญเติบโตง่าย มีสรรพคุณหลากหลายในการรักษา เช่น รักษาแผลสด สมานแผล และห้ามเลือด เป็นต้น^{1,2} แม้จะมีข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชนี้อย่างจำกัด แต่ก็มีมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศไทยและประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกา พบว่ามีฤทธิ์ในการกระตุ้นกระบวนการแข็งตัวของเลือด และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Neisseria gonorrhoea*) ได้^{1,3-6} และพบว่าทั้งสาบเสือและสาบแร้งสาบกา มีสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ซาโปนิน (Saponins) แทนนิน (Tannins) โพลิบาแทนนิน (Phlobatannins) แอนทราควิโนน (Anthraquinones) สเตียรอยด์ (Steroids) เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และอัลคาลอยด์ (Alkaloids) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถกำจัดอนุมูลดีพีพีเอช (DPPH)⁷ และอนุมูลไนตริกออกไซด์ (NO[•])⁸ ได้คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรดังกล่าว

อาจเป็นกลไกหนึ่งร่วมกับกลไกอื่นๆ ของร่างกายในการรักษาและสมานแผล

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสาบเสือและสาบแร้งสาบกา รวมถึงศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดดังกล่าว เพื่อสนับสนุนฤทธิ์ของสมุนไพรในการต้านอนุมูลอิสระร่วมกับการกระตุ้นกระบวนการแข็งตัวของเลือดและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ประกอบกับสาบเสือ และสาบแร้งสาบกาเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย ดังนั้นจึงควรนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดและเพิ่มคุณค่าของสมุนไพรให้มีมูลค่ามากขึ้น

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมสารสกัดหยาบสมุนไพรจากใบสาบเสือและสาบแร้งสาบกา

สารสกัดหยาบสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบเป็นสารสกัดจากใบสาบเสือและสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยน้ำ สารสกัดใบสาบเสือและสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% โดยนำใบสาบเสือและใบสาบแร้งสาบกาที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก

และอบจนแห้งสนิทที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งใบสมุนไพรอบแห้งจำนวน 30 กรัม สกัดด้วยน้ำกลั่น หรือเอทานอลความเข้มข้น 95% ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยนำไปเขย่าใน shaker bath ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำไประเหิดให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer จนเป็นผง ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% นำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator เก็บผงสารสกัดที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) เป็นวิธีการที่อ้างอิงมาจาก Slinkard และคณะ⁹ วิธีการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทำโดยผสมสารละลายมาตรฐานกรดกัลลิก (Gallic acid) หรือสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่นปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร วัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากกราฟมาตรฐานในหน่วย mg gallic acid equivalents (GAE)/ gram dried weight

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลเอบีทีเอส

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลเอบีทีเอสเป็นวิธีการที่อ้างอิงมาจาก Re และคณะ¹⁰ โดยใช้ potassium persulfate ($\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$) ความเข้มข้น 2.45 mM กระตุ้น ABTS (2,2-azion-bis-3-ethylbenzothiazole-6-sulphonic acid) ความเข้มข้น 7 mM ให้เปลี่ยนเป็น ABTS^{++} cation radical ซึ่งมีสีเขียวอมฟ้า และสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยทำปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลานาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเอบีทีเอสที่ได้มาเจือจางในเอทานอล และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.70 ± 0.02 ก่อนใช้งานทุกครั้ง จากนั้นผสมสารมาตรฐานโทรลอคซ์ (Trolox) หรือเคอร์คิวติน (Quercetin) เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก (Positive control) หรือสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลายเอบีทีเอส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 6 นาที แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ฤทธิ์ต้านอนุมูลเอบีทีเอส (ABTS^{++} radical scavenging

activity) ของสารสกัดที่ใช้ทดสอบคำนวณจากอัตราส่วนการลดลงของค่าการดูดกลืนที่อ่านได้ของสารสกัดที่ใช้ทดสอบกับสารมาตรฐานแสดงในหน่วย mM trolox equivalent antioxidant activity per milligram dried weight (mM TEAC/ mg dried weight)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอชเป็นวิธีการที่อ้างอิงมาจาก Braca และคณะ¹¹ โดยผสมสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ หรือกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก หรือเมทานอล (Control) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับสารละลายดีพีพีเอชความเข้มข้น 0.001 M ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที อ่านการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity) จากสมการดังนี้

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{(\text{Absorbance Control} - \text{Absorbance Sample}) \times 100}{\text{Absorbance Control}}$$

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิล

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลเป็นวิธีการที่อ้างอิงมาจาก Chung และคณะ¹² โดยผสม Fe_2SO_4 EDTA ความเข้มข้น 10 mM, 2-deoxyribose และกรดกัลลิก (Gallic acid) ที่ความเข้มข้น 10 mM หรือสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร อย่างละ 200 ไมโครลิตร แล้วเติม phosphate buffer saline (pH 7.4) ความเข้มข้น 100 mM ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม H_2O_2 ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย trichloroacetic acid ความเข้มข้น 2.8% และ thiobarbituric acid ความเข้มข้น 1% อย่างละ 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลานาน 5 นาที แล้วทำให้เย็นในน้ำแข็ง และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิล ($\cdot\text{OH}$ scavenging activity) คำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\cdot\text{OH scavenging activity (\%)} = (1 - (\text{Ab}_s / \text{Ab}_c)) \times 100$$

(Ab_s = Absorbance of treated sample, Ab_c = Absorbance of treated control)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนเป็นวิธีการที่อ้างอิงมาจาก Gaulejac และคณะ¹³ โดยผสมสารละลาย hypoxanthine ความเข้มข้น 1.1 mM ปริมาตร 760

ไมโครลิตร กับ nitroblue tetrazolium ความเข้มข้น 300 μM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม N-acetyl cysteine (ชุดควบคุมผลบวก) หรือน้ำกลั่น (Control) หรือสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเติม xanthine oxidase (1.67 IU/mL) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร วัดการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ทุก 15 วินาที เป็นเวลานาน 6 นาที ฤทธิ์ต้านอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Superoxide radical scavenging activity) คำนวณจากสมการดังนี้

$$\text{Superoxide radical scavenging activity (\%)} = \frac{(\text{Absorbance Control} - \text{Absorbance Sample}) \times 100}{\text{Absorbance Control}}$$

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบสาบเสือและสาบแร้งสาบกา

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกาเป็นวิธีการที่อ้างอิงมาจาก Alley และคณะ¹⁴ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 (Human monocytic U937 cell line) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้นสุดท้าย 10% และมีสาร antibiotic ชนิด streptomycin - penicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5% โดยปริมาตร ซึ่งใช้เป็น complete media แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO_2 ที่ความเข้มข้น 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเซลล์ให้มีปริมาณ 1.0×10^5 cells/well ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 แบบ complete media โดยเติมลงใน 96-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO_2 ที่ความเข้มข้น 5% เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 mg/mL ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO_2 ที่ความเข้มข้น 5% เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก 100 ไมโครลิตร แล้วเติม MTT dye solution (5 mg/mL) จำนวน 10 ไมโครลิตร และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO_2 ที่ความเข้มข้น 5% เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง ดูหาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกทั้งหมดให้เหลือเฉพาะผลิตภัณฑ์ฟอร์มazan (Formazan) ที่กันหลุม เติม DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลิตภัณฑ์ฟอร์มazan เขย่าเป็นเวลานาน 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต (% cell viability) จากสมการดังนี้

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{Absorbance in test well}}{\text{Absorbance in vehicle control well}} \times 100$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงค่าในรูป mean $\pm$ SD วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ One-Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS 11.0 for Windows ค่า p value < 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ 23.01 ± 0.04 mg GAE/g dried weight ซึ่งสูงกว่าสารสกัดชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนสารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยน้ำ สารสกัดจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 21.32 ± 0.09 , 10.17 ± 0.16 และ 3.62 ± 0.05 mg GAE/g dried weight ตามลำดับ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลเอบีทีเอส

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลเอบีทีเอส (ABTS^{•+}) ของสารสกัดจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกา แสดงค่าในรูป trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) พบว่าสารสกัดจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกา มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลเอบีทีเอสได้ โดยสารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยน้ำสามารถกำจัดอนุมูลเอบีทีเอสได้ดีที่สุดมีค่า TEAC เท่ากับ 1.998 ± 0.002 mM Trolox/ mg dried weight ซึ่งสูงกว่าสารสกัดชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาคือ สารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำ สารสกัดจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% มีค่า TEAC เท่ากับ 1.867 ± 0.037 , 0.451 ± 0.009 และ 0.315 ± 0.017 mM Trolox/ mg dried weight ตามลำดับ

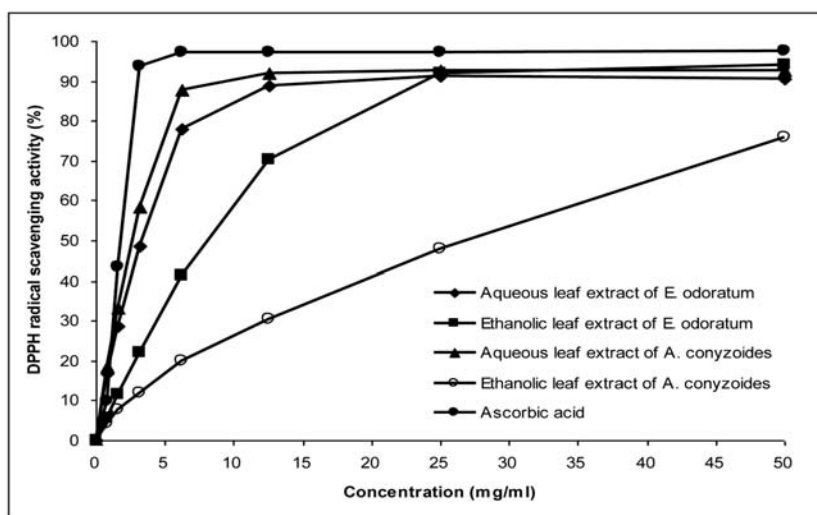
ฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช (DPPH[•]) แสดงในรูปค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลดีพีพีเอชได้ 50% (IC_{50}) พบว่า สารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอชได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำและสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.25 ± 0.01 , 3.72 ± 0.04 และ 8.71 ± 0.05 mg/mL ตามลำดับ ส่วนสาร

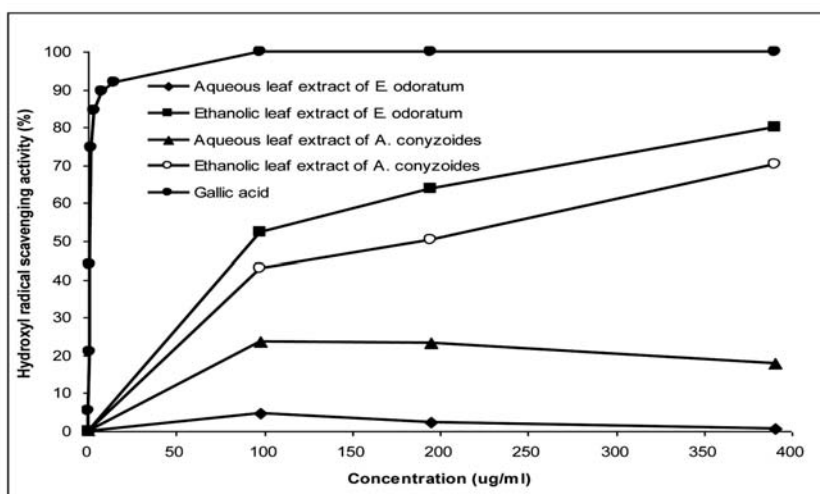
สกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% มีฤทธิ์ต้านอนุมูลดีฟิฟิเชต่ำที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 30.41 ± 0.75 mg/mL (รูปที่ 1) อย่างไรก็ตามถึงแม้สารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลดีฟิฟิเชสูงกว่าสารสกัดชนิดอื่น ซึ่งได้แก่ สารสกัดจากใบสาบเสือและสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลดีฟิฟิเชใกล้เคียงกันกับสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลดีฟิฟิเชต่ำกว่าอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 1)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิล

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิล ($\cdot OH$) ของสารสกัดจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกา พบว่าสารสกัดจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% มีฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีกว่าสารที่สกัดด้วยน้ำ โดยสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.076 ± 0.001 mg/mL และสารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.155 ± 0.007 mg/mL ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลต่ำกว่าอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสารสกัดจากใบสาบเสือและสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลไฮดรอกซิลต่ำ (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 DPPH radical scavenging activity of aqueous and ethanolic leaf extract of *E. odoratum* and *A. conyzoides*.



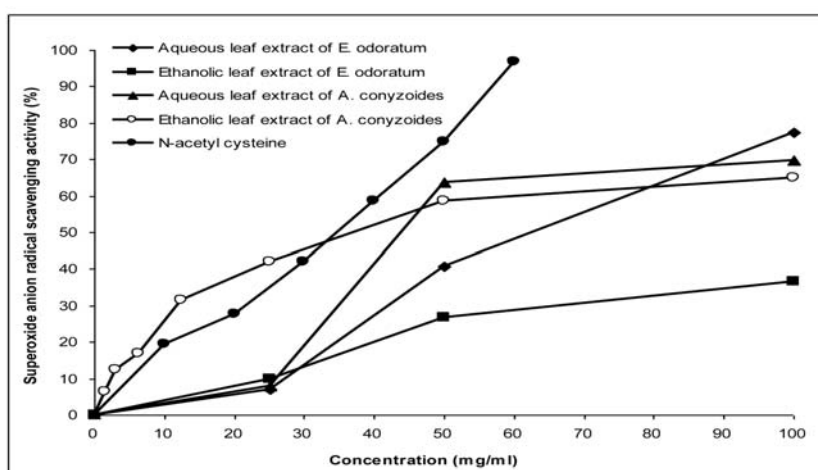
รูปที่ 2 Hydroxyl radical scavenging activity of aqueous and ethanolic leaf extract of *E. odoratum* and *A. conyzoides*.

ฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน

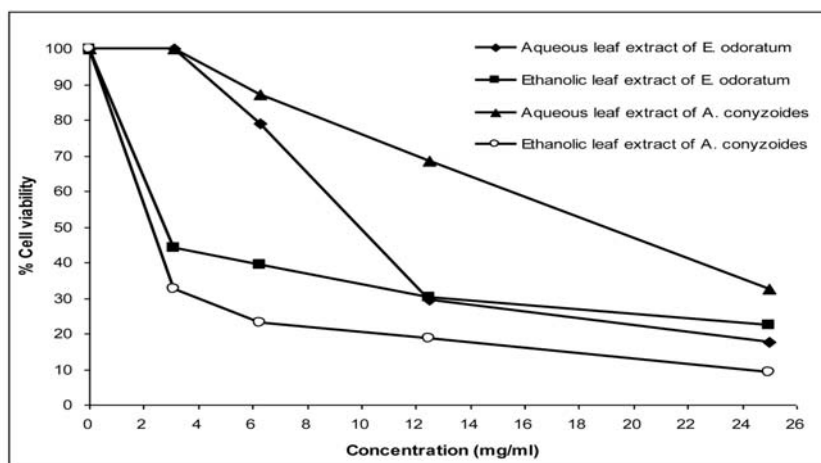
คุณสมบัติการต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot -}$) ของสารสกัดจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยน้ำ และเอทานอลความเข้มข้น 95% แสดงในรูปค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนได้ 50% (IC_{50}) พบว่าสารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 95% มีฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนได้ดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 37.50 ± 2.12 mg/mL ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนสูงกว่าสารสกัดชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาคือ สารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยน้ำ และสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำมีค่า IC_{50} เท่ากับ 43.95 ± 0.07 และ 62.50 ± 0.71 mg/mL ตามลำดับสำหรับสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% มีฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนได้ต่ำที่สุดโดยสามารถกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนได้สูงสุดที่ 37% (รูปที่ 3)

ความเป็นพิษของสารสกัดใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกา

ความเป็นพิษของสารสกัดจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกา แสดงในรูปค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด U937 ได้ 50% (IC_{50}) พบว่าสารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.5 mg/mL (รูปที่ 4) รองลงมาคือ สารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3 mg/mL สารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10 mg/mL และสารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยน้ำมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 19 mg/mL (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 Superoxide anion radical scavenging activity of aqueous and ethanolic leaf extract of *E. odoratum* and *A. conyzoides*.



รูปที่ 4 Cytotoxic effect of aqueous and ethanolic leaf extract of *E. odoratum* and *A. conyzoides* on human monocytic U937 cell line.

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบสาบเสือและสาบแร้งสาบกา มีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ โดยสารสกัดจากใบสาบเสือและสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกใกล้เคียงกัน และสูงกว่าสารสกัดจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% สารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด (23.01 ± 0.04 mg GAE/g dried weight) ซึ่งมีปริมาณต่ำกว่าสารสกัดชาเขียวที่สกัดด้วยน้ำเดือด (165 mg GAE)¹⁵ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากใบชาเขียวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกา หรือปริมาณสารตั้งต้น และกรรมวิธีในการสกัดแตกต่างกัน ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากใบสาบเสือและสาบแร้งสาบกา มีสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ โดยสารสกัดจากใบสาบเสือและสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยน้ำ จะพบสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ชาไปนิน แทนนิน และสเตียรอยด์ เป็นต้น ส่วนสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ จะพบได้ในสารสกัดจากใบสาบเสือและสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเมทานอล^{1,7,16,17} ดังนั้นสารสกัดจากใบสาบเสือและสาบแร้งสาบกาด้วยน้ำที่ได้จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้อาจมีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ชาไปนิน แทนนิน และสเตียรอยด์เป็นองค์ประกอบหลัก ดังจะเห็นได้จากฤทธิ์ต้านอนุมูลเอปิตีเอส ดีพีพีเอส ไฮดรอกซิล และซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้น และพบว่าสารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาและสาบเสือที่สกัดที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลเอปิตีเอส และดีพีพีเอสได้ดีที่สุด โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลเอปิตีเอสของสารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกา และสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำมีค่า TEAC เท่ากับ 1.998 ± 0.002 และ 1.867 ± 0.0037 mM/mg ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดจากลำต้นฝรั่ง (1.96 ± 0.016 mM/mg) และสูงกว่าสารสกัดจากผลฝรั่ง (0.893 ± 0.008 mM/mg) และเปลือกแก้วมังกร (0.685 ± 0.021 mM/mg) แต่มีฤทธิ์ต่ำกว่าสารสกัดจากใบฝรั่ง (4.91 ± 0.050 mM/mg) และเปลือกมังคุด (3.00 ± 0.016 mM/mg)¹⁸ อย่างไรก็ตาม สกัดจากใบสาบแร้งสาบกา และสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำสามารถกำจัดอนุมูลดีพีพีเอสได้ต่ำกว่าวิตามินซี ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานถึง 13 และ 15 เท่า ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดใบสาบแร้งสาบกาและสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% มี

ฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำและดีกว่าวิตามินซี ถึง 3 และ 5 เท่า ตามลำดับ¹⁶ นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ยังศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกาต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด U937 เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทิล อะซิเตท (Ethyl acetate) แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด A-549 และ P-388¹⁹ ซึ่งผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด และสารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยน้ำมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำที่สุด การสกัดสมุนไพรด้วยน้ำ และเอทานอลทำให้ได้สารสกัดที่มีสรรพคุณทางยาที่แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรดังกล่าวจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องคำนึงวิธีการได้มาของสารสกัดรวมทั้ง ชนิดของโรคที่ต้องการรักษา และขนาดของยาที่ต้องใช้ในการรักษา อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาค้นคว้าสนับสนุนฤทธิ์ของสมุนไพรในการต้านอนุมูลอิสระร่วมกับการกระตุ้นกระบวนการแข็งตัวของเลือดและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ประกอบกับสมุนไพรสาบเสือ และสาบแร้งสาบกาเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจต่ำจึงเหมาะสำหรับพัฒนาเป็น phytoantioxidant ที่นำมาประโยชน์ในการป้องกันการเกิด oxidative damage จากอนุมูลอิสระกลุ่มที่ออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (Reactive oxygen species) ได้ ดังนั้นจึงควรนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดและเพิ่มคุณค่าของสมุนไพรให้มีมูลค่ามากขึ้นต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2552 มหาวิทยาลัยพะเยา คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร และห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพ ศูนย์อนามัยที่ 10 เชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่างๆ งานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Okunade AL, Review *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae), *Fitoterapia* 2002; 73: 1–16.
2. Metwally AM, Ekejuba EC, Methoxylated flavonols and flavones from *Eupatorium odoratum* L., *Planta Medica* 1981; 42: 403.
3. Kasemrad W, Jannoi S, Pawichai S, Wongpayapkul L, Klungtrakul K, Pornprasert S, Evaluation of blood coagulation activity of Thai herbal extracts, *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2008; 41: 15-26.
4. Thang PT, Patrick S, Teik LS, Yung CS, Anti-oxidant effects of the extracts from the leaves of *Chromolaena odorata* on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes against hydrogen peroxide and hypoxanthine-xanthine oxidase induced damage, *Burns* 2001; 27: 319-27.
5. Tran VH, Hughes MA, Cherry GW, In vitro studies on the antioxidant and growth stimulatory activities of polyphenolic extract from *Cudrania cochichinensis* used in the treatment of wounds in Vietnam, *Wound Rep Reg* 1997; 5: 159-67.
6. Phithanchot C, Jannoi S, Tositarat T, Wongpayapkul L, Pornprasert S, Effect of *Eupatorium odoratum* leaf extract on hemostasis, *J Med Tech Assoc Thailand* 2006; 34: 1711-20.
7. Akinmoladun AC, Ibukun EO, Dan-Ologe IA, Phytochemical constituents and antioxidant properties of extract from the leaves of *Chromolaena odorata*, *Sci Res Essays* 2007; 2 :191-4.
8. Alisi CS, Onyeze GOC, Nitric oxide scavenging ability of ethyl acetate fraction of methanolic leaf extracts of *Chromolaena odorata* (Linn.), *Afr J Biochem Res* 2008; 2(7): 145-50.
9. Slingkard K, Singleton VL, Total phenal analysis: automation and comparison with manual methods, *Am J Enol Vitic* 1977; 28: 49-55.
10. Re R, Pellegrini N, Proreggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 1231-7.
11. Braca et al, Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*, *J Nat Prod* 2001; 64: 892-5.
12. Chung S, Osawa T, Kawakishi S, Hydroxyl radical-scavenging effect of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*), *Biosci Biotech Biochem* 1997; 61: 188-23.
13. Gaulejac NSC, Vivas N, Freitas V, Bourgeois G, The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method, *J Sci Food Agric* 1999; 79: 1081-90.
14. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Feasibility of drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Res* 1988; 48: 589-601.
15. Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY, Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine, *J Agri Food Chem* 2003; 51: 7292-5.
16. Krishani PM, Rathinam X, Kasi M, Ayyalu D, Surash R, Sadasivam K, A comparative study on the antioxidant activity of methanolic leaf extracts of *Ficus religiosa* L, *Chromolaena odorata* (L.), *King & Robinson*, *Cynodon dactylon* (L.) Pers. and *Tridax procumbens* L, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*; 2010: 348-50.
17. Srinivara Rao K, Chaudhury PK, Pradhan A, Evaluation of anti-oxidant activities and total phenolic content of *Chromolaena odorata*, *Food Chem Tox* 2010; 48: 729-32.
18. Tachakittirungrod S, Okonogi S, Chowwanapoonpohn S, Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract, *Food Chem* 2007; 107: 381-8.
19. Adebayo AH, Tan NH, Akindahunsi AA, Zeng GZ, Zhang YM, Anticancer and antiradical scavenging activity of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae), *Phcog Mag* 2010; 6: 62-6.