

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืช ในอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Biological Activities of Plant Extract at Pakpanang, Nakhon Si Thammarat Province: Antioxidant and Antibacterial Activities

มณฑล เลิศคนาวนิษฐกุล¹
กิตติศักดิ์ ขววิสิทธิ์¹
และ พูลสิทธิ์ หิรัญสาย¹

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพืชครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนาโดยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดพืช (ส้มโอทับทิมสยาม แก้วมังกร แห้วจุด ข้าวไข่มดรีน) จากอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีทดสอบดีพีพีเอช/เอบีทีเอส และทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธีซึมผ่านเข้าเนื้อวุ้น ปรากฏว่าสารสกัดจากพืชด้วยเอทานอลเท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมไปถึงแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้แตกต่างกันออกไป แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านยีสต์

คำสำคัญ: ปากพนัง สารสกัดจากพืช ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

บทนำ

ปัญหาสารมลพิษจากภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมตกค้างในสิ่งแวดล้อมมีอยู่เป็นจำนวนมาก รวมทั้งสารเคมีบางชนิดในอาหารและเครื่องสำอางยังทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการแพ้หรือเกิดผลข้างเคียงในระยะยาว ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อสิ่งมีชีวิตที่ไปสัมผัสโดนกับสารพิษเหล่านั้น ทำให้การใช้สารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจึงกลายเป็น

เป็นสิ่งที่มีการสนใจอย่างกว้างขวาง มีการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชไปใช้ประโยชน์ทั้งทางการแพทย์ ด้านเกษตรกรรม ด้านอุตสาหกรรม เป็นต้น ทำให้สารสกัดจากพืชได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเป็นสารเคมีที่พบเฉพาะในพืชและได้จากธรรมชาติมีฤทธิ์ทางชีวภาพ และประสิทธิภาพที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย อีกทั้งเกิดผลข้าง

¹สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80160

เคียงน้อย นอกจากนั้นยังช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์และของเหลือทิ้งทางการเกษตร และเพื่อช่วยลดการนำเข้าของยาหรือสารเคมีที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ

พืชเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญแหล่งหนึ่ง ของสารพิษเคมีซึ่งถูกใช้มาตั้งแต่สมัยอดีตเพื่อรักษาโรคต่างๆ และใช้บำรุงร่างกาย (Hassanpour et.al, 2011) ในที่นี้จะกล่าวถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชในสองด้านคือฤทธิ์ทางด้านการใช้ต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งมีผู้ศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางในประเทศไทยแต่ยังพบข้อมูลอยู่น้อยในพืชประจำถิ่นในพื้นที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช รายงานวิจัยนี้จะเป็นการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลยืนยันเบื้องต้นทางวิทยาศาสตร์ของสารพิษเคมีจากพืชท้องถิ่นในจังหวัดนครศรีธรรมราช ประเทศไทย ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียก่อโรค เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับผู้สนใจที่จะศึกษาค้นคว้าในด้านนี้ต่อไป หรืออาจจะเป็นการช่วยส่งเสริมและเพิ่มมูลค่าของพืชท้องถิ่นอย่างยั่งยืน

วิธีดำเนินงานวิจัย

1.การเตรียมสารสกัดพืช

1.1 การเตรียมสารสกัดพืชด้วยเอทานอล (Obi et.al., 2011; Dahiru et.al., 2013; Maobe et.al., 2013) นำส่วนของพืชท้องถิ่น จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ หัวของแห้วจุด เนื้อของผลส้มโอ เนื้อของผลแก้วมังกร เมล็ดข้าวไข่มดรีน โดยการไปจัดหาจากไร่สวนผลไม้ในอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช มาล้างทำความสะอาดและ ผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำส่วนของพืชไปอบต่อในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรือจนแห้ง ปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบดไฟฟ้า (ยกเว้นเนื้อผลไม้ไม่ต้องอบให้แห้งและไม่ต้องปั่นละเอียด) นำส่วนของพืชที่เตรียมไว้จำนวน 10 กรัม ใส่ลงในขวดดูแรน (Duran) แล้วเติมตัวทำละลายเอทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนที่ความเร็รรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกเก็บส่วนใส (การสกัดครั้งที่ 1) แล้วเติมเอทานอลลงไปในส่วนของตะกอนอีกครั้งทำซ้ำเป็นครั้งที่ 2 (การสกัดครั้งที่ 2) และทำซ้ำครั้งที่ 3 (การสกัดครั้งที่ 3) รวมส่วนใสของการสกัดทั้ง 3 ครั้ง ไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำไประเหยเอาเอทานอลออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเอทานอลระเหยออก

จนหมด ใช้สัญลักษณ์ E1, E2 และ E3 จากนั้นละลายด้วย 100% DMSO ให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม (ของแข็ง) ต่อ มิลลิลิตร (mg solid/ml) สารสกัดที่ได้ แล้วนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ทางด้านชีวภาพ หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ รวมไปถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค

1.2 การเตรียมสารสกัดพืชด้วยน้ำ

ทำการสกัดสารพิษเคมีเช่นเดียวกับ “การเตรียมสารสกัดจากพืชด้วยเอทานอล” แต่เปลี่ยนตัวทำละลายจากเอทานอลเป็นน้ำ จากนั้นนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilization) นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วย 100% DMSO ให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม (ของแข็ง) ต่อ มิลลิลิตร (mg solid/ml) สารสกัดที่ได้ติดฉลากเป็น W1 ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง (สุดท้ายได้สารสกัดที่ได้ติดฉลากเป็น W1, W2 และ W3 ของตัวอย่างแต่ละชนิด) แล้วนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ทางด้านชีวภาพ หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ รวมไปถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค

2.วิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Re et.al., 1999)

2.1 โดยวิธีเอบีทีเอส (ABTS radical scavenging assay) แยกเตรียมสารสกัดจากพืชในข้างต้นความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน DMSO แล้วปิเปตมาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96 well microtiter plate จากนั้นปิเปตสารละลายสต็อก 2, 2'-azino-bis (3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS มีสูตรโมเลกุล C₁₈H₁₈N₄O₆S₄ (ABTS ปริมาณ 0.0385 g ซึ่งสาร Potassium persulfate ปริมาณ 0.0066 g ผสมกับ น้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบ) ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 180 µl ผสมกับตัวอย่างสารสกัดพืช บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณ % inhibition จากสูตร [% inhibition = (1 – OD sample/OD blank)×100] สร้างกราฟมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยกำหนดแกน y เป็น % Inhibition และแกน x เป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox (เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 µg/ml) ใน DMSO คำนวณความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอสของสารสกัดพืชจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน Trolox

โดยหน่วยของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ เอบีทีเอสแสดงเป็นหน่วย mg Trolox /1 g extract (Trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC)

2.2 โดยวิธีดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging assay) แยกเติมสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัดพืชที่เตรียมไว้ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ใน 96 well microtiter plate จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM (ซึ่งสาร DPPH ปริมาณ 0.0020 กรัม ผสมกับเมทานอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร) ลงไปผสมปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เพอร์เซ็นต์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สามารถคำนวณตามสูตรดังนี้ % inhibition = $[1 - (\text{OD sample} / \text{OD blank})] \times 100$ สร้างกราฟมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยกำหนดแกน y เป็น % inhibition และแกน x เป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ascorbic acid คำนวณความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสมุนไพร จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ascorbic acid โดยหน่วยของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH แสดงเป็น หน่วย mg vitamin C/ 1 g extract (Vitamin C equivalent antioxidant capacity; VCEAC)

2.3 การรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การตรวจความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และรายงานผลเป็นค่า IC₅₀ เปรียบเทียบค่าที่ได้กับวิตามินซี ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกในการทดลอง ส่วนวิธี ABTS จะใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และรายงานผลเป็นค่า IC₅₀ เปรียบเทียบค่าที่ได้กับวิตามินซี ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกในการทดลอง

3.การตรวจวัดปริมาณฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (Singleton et.al., 1999)

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน gallic acid (ในตัวทำละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200 and 250 มิลลิกรัมต่อลิตร) หรือสารสกัดพืช ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ใน 96 well microtiter plate และเติมน้ำกลั่นหลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปต Folin-Ciocalteu phenol reagent หลุมละ 12.5 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที แล้วปิเปต 7% ของ sodium carbonate และน้ำกลั่น ลง

ไปหลุมละ 125 ไมโครลิตร และ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีฟ้าที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

สร้างกราฟมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยกำหนดแกน y เป็น OD และแกน x เป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกในตัวอย่างโดยนำมาเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid และแสดงหน่วยของฟีนอลิกเป็น gallic acid equivalent (mg GAE) ต่อสาร 1 กรัม

4.การตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของตัวอย่างสารสกัดพืช

เตรียมจานเพาะเชื้อทดสอบและการทดสอบโดยวิธี agar well diffusion (Kwaadsteniet et.al., 2005) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller Hinton (MH) ด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นไปปรับให้มีความเข้มข้นเชื้อประมาณ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปป้ายลงบนผิวหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH วางให้ผิวหน้าแห้งจึงเจาะหลุมทดสอบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.6-0.8 มิลลิเมตร จากนั้นนำตัวอย่างสารสกัดพืชหยดลงไปในหลุมทดสอบๆ ละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสของการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone)

5.การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนาโดยทำการหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยเทียบกับกลุ่มสารควบคุมการทดสอบ ได้แก่ Gallic acid Trolox วิตามินซี ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการวิจัย

1.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH และปริมาณของสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดพืชจากท้องถิ่นที่ปลูกในพื้นที่ปากพนัง ได้แก่ ส้มโอ 2 สายพันธุ์ (ส้มโอพันธุ์ทองดีและส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม) แก้วมังกร ข่าวไผ่มดริน และแห้วจุด จำนวนรวม 8 ตัวอย่าง แสดงข้อมูลดังตารางที่ 1 พบว่า

1.1 สัมไอทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เก็บในระหว่างเดือนธันวาคม 2556 (ตัวอย่างหมายเลข 1 ของแต่ละสายพันธุ์) มีองค์ประกอบส่วนที่ละลายน้ำได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และยังพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสาร ฟีนอลิกรวม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยามในตัวอย่างหมายเลข 2-4 ที่เก็บในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2557 และนำมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องตามธรรมชาติ ภายหลังจากเก็บจากต้น เป็นเวลา 5, 8 และ 10 วันตามลำดับ พบว่ามีระดับการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บในเดือนธันวาคม 2556 และนอกจากนี้ตัวอย่างหมายเลข 4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS สูงที่สุด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของส้มโทั้ง 2 สายพันธุ์จะสูงกว่าการตรวจด้วยวิธี ABTS

1.2 ตัวอย่างแก้วมังกรที่นำมาศึกษา พบว่าส่วนของสารที่ละลายในน้ำจะมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าส่วนที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล และสารจากแก้วมังกรในส่วนที่ละลายในเอทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในการทดสอบครั้งนี้ เมื่อนำผลรวมของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งในส่วนที่ละลายในน้ำและละลายในเอทานอล จะเห็นได้ว่าแก้วมังกรแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากส่วนที่ละลายในเอทานอลมีปริมาณของสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุด

1.3 ข้าวไข่มดรีนสามารถหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เพียงส่วนที่ละลายในน้ำได้เท่านั้น เนื่องจากข้อจำกัดของวิธีที่ใช้ในการศึกษา โดยในส่วนของสารที่ละลายในเอทานอล เมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งด้วยวิธี ABTS และ DPPH จะเกิดตะกอนของสารเกิดขึ้น ทำให้ไม่สามารถวัดและรายงานผลได้ อีกทั้งปริมาณสารที่สามารถสกัดได้นั้นมีน้อย จึงไม่เพียงพอกับการนำมาศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมได้ แต่จากข้อมูลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเฉพาะในส่วนที่นำมาศึกษาได้ จะพบว่าสารสำคัญส่วนที่ละลายในน้ำของข้าวไข่มดรีนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสำคัญที่ละลายในน้ำที่ได้จากตัวอย่างชนิดอื่นๆ

1.4 สำหรับการศึกษาตัวอย่างเห็ดจุด พบว่าความร้อนที่ใช้ในการต้มมีผลทำให้ระดับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ทั้งส่วนที่ละลายในน้ำและส่วนที่ละลายในเอทานอลแต่จะมีผลทำให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH ของเห็ดจุดมีค่าต่ำกว่าทดสอบด้วยวิธี ABTS เช่นเดียวกันกับที่พบในข้าว

ไข่มดรีน

2.ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

สารสกัดพืชจากตัวทำละลายเอทานอลเท่านั้น ที่แสดงฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์และฤทธิ์ดังกล่าว จะมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละตัวอย่างสารสกัด แต่ส่วนใหญ่แล้วแสดงฤทธิ์ได้น้อยทั้งในแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่สามารถต้านจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ ดังแสดงในตารางที่ 2

อภิปรายผลการวิจัย

1.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกรวม

ABTS มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้กลายเป็น $ABTS^{+•}$ ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีฟ้า-เขียว มีความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) ที่ 734 นาโนเมตร เมื่อเติมสารทดสอบที่มีกิจกรรมต้านออกซิเดชันจะทำให้ $ABTS^{+•}$ ลดลง ซึ่งทำให้สีจางลง ผลการวิเคราะห์จะคำนวณเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox และแสดงในหน่วยของ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ส่วน อนุมูล DPPH $^{•}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง อยู่ในรูปอนุมูลอิสระอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูล การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม โดยวัดการลดลงของสีเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป ที่ความยาวคลื่น 515 nm DPPH radical ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง (scavenging activity) สารละลายของ DPPH $^{•}$ มีสีม่วงในเมทานอล และเมื่อได้รับ H^{+} จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมักสัมพันธ์กับปริมาณสารฟีนอลิก ซึ่งสาร phosphomolybdicphosph-hotungstic acid ในน้ำยา Folin-Ciocalteu จะถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl group ของ total polyphenol เกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะหาได้โดยการเทียบกับปริมาณของ gallic acid โดยที่เอทานอลสามารถสกัดสารฟลักซ์เคมีได้มากกว่าน้ำ (ตารางที่ 1) อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์ เนื่องจากเอทานอลสามารถละลายสารฟลักซ์เคมีพวกสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มพอลิฟีนอลและฟลาโวนอยด์ได้ดี (Pinelo et.al., 2004; Mendonca-Filho et.al.,

2012) ซึ่งปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวมมากส่งผลให้ปริมาณการกำจัดอนุมูลอิสระสูง (Paixao et.al., 2007) เนื่องจากสารในกลุ่มฟีนอลิกมีโครงสร้างเป็น Aromatic Ring ต่อกับ Hydroxyl Group ทำให้สารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่เป็นโมเลกุลที่มีขั้วและสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ โดยสารประกอบฟีนอลิกมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระคือ เมื่อสารประกอบฟีนอลิกถูกสารอนุมูลอิสระดึงอิเล็กตรอนออกไป ส่งผลให้โมเลกุลเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน แต่เนื่องจากโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูง จึงช่วยให้อิเล็กตรอนที่มีอยู่อย่างหนาแน่นนั้นสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายไปทั่วโครงสร้างได้และทำให้โครงสร้างเกิดการเสถียร ส่วนสารอนุมูลอิสระเมื่อดึงอิเล็กตรอนไปก็ทำให้มีโครงสร้างที่เสถียรขึ้น (Pietta, 2000) อย่างไรก็ตามซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ปริมาณน้ำตาล aromatic amines กรดแอสคอร์บิก กรดอินทรีย์ และอื่นๆ อีกมากอาจส่งผลให้พบค่าฟีนอลิกที่สูงเกินจริงเมื่อวิเคราะห์ด้วย Folin-Ciocalteu reagent (Waterhouse, 2002; Huanget.al., 2005) ทำให้การรายงานผลนั้นสูงเกินจริงและการวัดสีด้วยวิธีนี้ไม่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกแต่อย่างใด (Huang et.al., 2005) นอกจากนี้ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกซึ่งอาจแบ่งเป็น 5 กลุ่มย่อยคือ flavonols, anthocyanins, hydroxycinnamides, flavanones, flavan-3-ols และ oligomeric procyanidins พบว่ากลุ่มของ flavanones มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมได้น้อยกว่ากลุ่มของ anthocyanins และ flavonols มากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักผลไม้บางชนิดจึงถูกวิเคราะห์ว่ามีน้อยกว่าโดยไม่สัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกที่ปรากฏอยู่จริง (Proteggente et.al., 2002)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารส่วนที่ละลายในเอทานอลของแก้วมังกรจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งที่ทดสอบด้วยวิธี ABTS และ DPPH สูงที่สุด ซึ่งส่วนหนึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการสกัดส่วนดังกล่าวมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากที่สุด ในส่วนของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามพบว่าตัวอย่างที่เก็บในช่วงเดือนธันวาคม 2556 จะมีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าตัวอย่างที่เก็บได้ในเดือนกุมภาพันธ์ 2557 และการเก็บส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามไว้นานประมาณ 10 วัน ภายหลังจากการเก็บจากต้น จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับภูมิปัญญาของชุมชนโดยจะมีการบ่มเก็บส้มโอไว้ประมาณ 1-2 อาทิตย์ภายหลังจากการเก็บเกี่ยวจากต้น จะให้รสชาติและคุณค่าของส้มโอดีกว่าการนำมารับประทานโดยทันที ในส่วนของแก้วจุดแสดงให้เห็นว่าแก้ว

จุดต้มจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าแก้วจุดดิบ แม้ว่ากระบวนการต้มจะส่งผลให้มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมลดลงก็ตาม อย่างไรก็ตามการทดสอบในครั้งนี้เป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปพัฒนาต่อเท่านั้น เนื่องจากอุปสรรคและข้อจำกัดในเรื่องของจำนวนตัวอย่างและระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวตัวอย่าง ที่อาจจะส่งผลต่อความน่าเชื่อถือของข้อมูลในการทดลอง อย่างไรก็ตามวิธี decolorimetric assay สามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระได้เฉพาะกลุ่มที่มีความสามารถในการรับ-ให้อิเล็กตรอนหรือให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระในกลุ่มเปอร์ออกไซด์เท่านั้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่ละลายในไขมัน เช่น วิตามินอีหรือกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการกำจัดออกซิเจนอะตอมเดี่ยว เช่น เบต้าแคโรทีน ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีการนำเสนอนี้ อันดับของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผัก-ผลไม้ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี decolorimetric assay จึงต้องพิจารณาถึงข้อจำกัดของวิธี มิฉะนั้นจะสร้างความเข้าใจที่ผิดพลาดและคลาดเคลื่อนให้แก่ผู้บริโภคได้

2.ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

การสกัดสมุนไพรด้วยเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อมากที่สุด ในขณะที่สกัดด้วยน้ำไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ อย่างไรก็ตามไม่มีสารสกัดใดสามารถต้านเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ได้ รายงานวิจัยเกี่ยวกับพืชสมุนไพรในการต้านการเจริญของเชื้อจะมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละชนิดของพืชดังกล่าว และส่วนใหญ่ความสามารถในการต้านเชื้อมักจะเป็นฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้มาจากพืชสมุนไพร (จิราภรณ์ บุรากร และ เรือนแก้ว ประพฤติ, 2555; Obi et.al., 2011; Dahiru et.al., 2013; Maobe et.al., 2013) หรือจากเปลือกผลไม้ (พงศธร ล้อสุวรรณ และคณะ, 2551) แต่พบฤทธิ์ดังกล่าวได้น้อยในเนื้อผลไม้ และฤทธิ์ของสารสกัดพืชด้วยเอทานอลที่ต้านเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดจากน้ำเนื่องมาจากว่าสารพิษทุกชนิดที่สำคัญส่วนใหญ่สามารถสกัดออกมาได้ด้วยเอทานอลดีกว่าน้ำดังที่ได้วิจารณ์ไว้ในส่วนของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในข้างต้น (จิราภรณ์ บุรากร และ เรือนแก้ว ประพฤติ, 2555; Pietta, 2000; Pinelo et.al., 2004; Paixao et.al., 2007; Obi et.al., 2011; Mendonca-Filho, 2012; Dahiru et.al., 2013) ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ พงศธร ล้อสุวรรณ และคณะ, 2551; Esekhiagbe et.al., 2009; Senful et.al., 2009)

ตารางที่ 1ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดพืชท้องถิ่นจากพื้นที่ปากพนัง

ตัวอย่าง	หมายเลข ตัวอย่าง	วิธีการสกัด	%yield of extract	การต้านอนุมูลอิสระ ($\mu\text{mole Trolox/g}$)		ปริมาณ ฟีนอลิกรวม (mg Gal/g)
				ABTS	DPPH	
ส้มโอ (พันธุ์ทองดี)	1	AE	6.42	28.12 $\pm$ 6.71	363.93 $\pm$ 34.73	33.51 $\pm$ 7.04
ส้มโอ	1	AE	6.96	35.18 $\pm$ 1.43	307.30 $\pm$ 31.38	28.21 $\pm$ 2.24
(พันธุ์ทับทิมสยาม)	2	AE	13.23	9.73 $\pm$ 1.45	18.35 $\pm$ 1.25	26.91 $\pm$ 5.26
	3	AE	12.75	9.58 $\pm$ 1.08	18.19 $\pm$ 1.44	26.61 $\pm$ 3.71
	4	AE	12.17	12.24 $\pm$ 0.99	18.16 $\pm$ 1.83	26.21 $\pm$ 6.00
แก้วมังกร	1	AE	8.09	15.42 $\pm$ 1.13	UR	15.04 $\pm$ 4.48
		EE	2.63	83.26 $\pm$ 48.07	584.47 $\pm$ 106.36	58.56 $\pm$ 10.80
ข้าวไร่ดำ	1	AE	0.73	54.21 $\pm$ 7.72	41.42 $\pm$ 2.14	UR
		EE	1.32	UR	UR	
แห้วจุด	1	AE	4.30	33.92 $\pm$ 2.63	7.27 $\pm$ 0.21	41.58 $\pm$ 5.82
		EE	1.27	UR	UR	25.56 $\pm$ 3.01
		BAE	6.79	35.86 $\pm$ 3.06	14.62 $\pm$ 3.67	40.09 $\pm$ 9.45
		BEE	9.03	21.46 $\pm$ 3.48	UR	15.05 $\pm$ 4.03

UR: ไม่สามารถรายงานผลได้ เนื่องจากข้อจำกัดของวิธีทดสอบ; AE: ส่วนที่ละลายในน้ำ; EE: ส่วนที่ละลายในเอทานอล; BAE: ส่วนละลายน้ำภายหลังจากผ่านการต้ม; BEE: ส่วนที่ละลายในเอทานอลภายหลังจากผ่านการต้ม

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผลไม้ด้วยตัวทำละลายเอทานอล

จุลินทรีย์	ผลไม้และผลิตภัณฑ์พื้นบ้าน															ควบคุม (100% DMSO)
	แก้วมังกร			ส้มโอ			แห้วจูด			แห้วจูดต้ม			ข้าวไข่มดรีน			
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	
แบคทีเรียแกรมบวก																
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>M. luteus</i> TISTR 884	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>S. aureus</i> TISTR 517	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
แบคทีเรียแกรมลบ																
<i>E. coli</i> TISTR 887	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Ps. aeruginosa</i> TISTR 1467	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 292	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
ยีสต์																
<i>C. albicans</i> BCC 5390	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+ มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ; - ไม่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

B. *cereus*, *Bacillus cereus*; *M. luteus*, *Micrococcus luteus*; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; *E. coli*, *Escherichia coli*, *Ps. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *S. Typhimurium*, *Salmonella Typhimurium*; *C. albicans*, *Candida albicans*

+* 100% DMSO มีฤทธิ์ต้าน *Candida albicans* BCC 5390

E1, สารสกัดพืชด้วยเอทานอลครั้งที่ 1; E2, สารสกัดพืชด้วยเอทานอลครั้งที่ 2; E3, สารสกัดพืชด้วยเอทานอลครั้งที่ 3

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดส้มโอ แก้วมังกร ข้าวไข่มดรีน แห้วจูด ไม่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์อย่างเด่นชัด ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งต่อไปควรศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในขั้นตอนต่างๆ ของการเก็บรักษาผลไม้ เพื่อให้ทราบว่าเป็นขั้นตอนดังกล่าวมีผลลดหรือเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหรือไม่อย่างไร เพื่อ

ให้เป็นแนวทางในการเพิ่มคุณค่าผลไม้ให้ได้ประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด สำหรับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ อาจต้องมีการศึกษาการสกัดสารพิษจากเปลือกผลไม้มาศึกษาควบคู่กับสารสกัดจากเนื้อผลไม้เพื่อเป็นการยืนยันฤทธิ์ที่ดีในการต้านเชื้อจากผักผลไม้ที่นำมาศึกษาเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าพืชท้องถิ่นอย่างยั่งยืน และควรบริโภคพืชหลากหลายชนิดร่วมกัน โดยเฉพาะพืชที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นประโยชน์นานาประการต่อร่างกาย

ช่วยควบคุมการทำงานในระบบต่างๆ ของร่างกายให้เกิดความสมดุล ช่วยชะลอความเสื่อม ช่วยป้องกันและรักษาโรคเป็นประโยชน์ต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีเส้นใยสูงจึงป้องกันโรคอ้วน อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นประโยชน์ทางด้านโภชนาการจึงควรที่จะบริโภคพืชที่มีสารประกอบที่หลากหลาย เพื่อให้เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย นอกจากนี้ควรบริโภคพืชที่สด สะอาด เพื่อที่จะได้รับสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายได้ครบและได้รับคุณค่าทางด้านโภชนาการที่สำคัญของร่างกาย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ (มวล.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนด้านวิชาการและทุนวิจัย (WU-TRF_ABC5601) และนักวิจัยมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่ให้การสนับสนุนและเข้ามามีส่วนร่วมงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- จิราภรณ์ บุรากร และ เรือนแก้ว ประพฤติ. 2555. ผลของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยจำนวน 7 ชนิดต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย. **วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก** 10(1): 12-22.
- พงศธร ล้อสุวรรณ จิตศิริ รัชตพันธุ์ และ ศศิธร จันทนวราร. 2551. สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านจุลินทรีย์ของเปลือกผลไม้. **การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46** : 554-561.
- Dahiru, D., Malgwi, A.R. and Sambo, H.S. 2013. Inhibitory Effect of Senna siamea Leaf Extracts on Selected Microorganisms. **American Journal of Medicine and Medical Sciences** 3(5): 103-107.
- Esekhiagbe, M., Agatemor, M.M.U. and Agatemor, C. 2009. Phenolic content and antimicrobial potentials of Xylopia aethiopica and Myristica argentea. **Macedonian Journal of Chemical Engineering** 28(2): 159–162.
- Hassanpour, S., Maheri-Sis, N., Eshratkhan, B., and Baghbani, F. 2011. Plants and secondary metabolites (Tannins): A review. **International Journal of Forest, Soil and Erosion** 1(1): 47-53.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53: 1841-1856.
- Kwaadsteniet, M.D.E, Todorov, S.D., Knoetze, H. and Dicks, L.M.T. 2005. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by Enterococcus mundtii ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal of Food Microbiology** 105: 433-434.
- Maobe, A.G., Gatebe, E., Gitu, L. and Rotich, H. 2013. Preliminary Phytochemical Screening of Eight Selected Medicinal Herbs Used for the Treatment of Diabetes, Malaria and Pneumonia in Kisii Region, Southwest Kenya. **European Journal of Applied Sciences** 5(1): 1-6.
- Mendonca-Filho, R.R. 2012. **Bioactive Phyto-compounds: New Approaches in the Phytosciences**, in; Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs, Ahman, I., Aqil, F. and Owais, M. (Ed.).
- Obi, R.K., Nwanebu, F.C., Ndubuisi-Nnaji, U.U., Onuoha, L.N. and Chiegboka, N. 2011. Ethanolic Extraction and Phytochemical Screening of Two Nigerian Herbs on Pathogens Isolate from Wound Infections. **Pharmacie Globale (IJCP)** 10(2): 1-5.
- Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J.C. and Camara, J.S. 2007. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. **Food Chemistry** 105: 204-214.

- Pietta, P. 2000. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Product** 63: 1035-1042.
- Pinelo, M., Lara, M., Maria, J.S. and Maria, C.N. 2004. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. **Food Chemistry** 88(2): 201-207.
- Proteggente, A.R., Pannala, A.S., Paganga, G., Buren, L.V., Wagner, E., Wiseman, S. and van de Put, E. 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. **Free Radicals Research** 6(2): 217-233.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine** 26: 1231-1237.
- Senful, M., Yildiz, E., Gungor, N., Cetin, B., Eder, Z. and Ercisli, S. 2009. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plant. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science** 22(1): 102-106.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology** 299: 152-178
- Waterhouse, A.L. 2002. Determination of total phenolics. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry** I1.1.1-I1.1.8. New York: John Wiley & Sons.