การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษเฉียบพลันของต้นย่านางแดง

EVALUATION OF ANTI-OXIDANT ACTIVITY AND ACUTE TOXICITY OF BAUHINIA STRYCHNIFOLIA STEMS

พรพิมล ตั้งเจียวลี้[1] นันทพงศ์ ขำทอง[2] และ ธีรทัศน์ สุดสาย[3]

[1] นักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัย
ponpimon.mint14@gmail.com

[2] อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ถนนพหลโยธิน
nanthaphong.k@rsu.ac.th

[3] อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม หลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
teeratad.su@wu.ac.th

บทคัดย่อ

ย่านางแดง (*Bauhinia strychnifolia* Craib.) จัดเป็นหนึ่งในพืชสกุลชงโคที่มีคุณค่าและมีความสำคัญทางการแพทย์พื้นบ้านของไทย งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นย่านางแดงและความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง จากการศึกษาพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากต้นย่านางแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.2 µg/mL และยังพบว่าส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทที่แยกจากสารสกัดต้นย่านางแดงด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.5 µg/mL การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดด้วยเอทานอลและส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทจากต้นย่านางแดง พบว่าไม่ทำให้หนูขาวเล็กเพศผู้และเพศเมียแสดงอาการความเป็นพิษ เมื่อได้รับแบบครั้งเดียวในขนาด 2.0 g/kg น้ำหนักตัว และไม่พบว่าหนูขาวเล็กที่ได้รับสารสกัดแสดงอาการความเป็นพิษอื่น ๆ ตลอดการทดลอง เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและสารฟลาโวนอยด์รวม พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากต้นย่านางแดงมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมและสารฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 550.3 µg GAE/mg extract และ 337.0 µg catechin/mg extract ตามลำดับ โดยส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมและสารฟลาโวนอยด์รวมสูง เท่ากับ 655.6 µg GAE/mg extract และ 411.0 µg catechin/mg extract ตามลำดับ จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทที่แยกสกัดได้จากสารสกัดต้นย่านางแดงด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงและมีความปลอดภัย โดยต้นย่านาแดงมีสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นหลัก

คำสำคัญ: ต้นย่านางแดง, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ความเป็นพิษเฉียบพลัน

ABSTRACT

Bauhinia strychnifolia Craib. is one of the *Bauhinia* plants that has been traditionally used in Thai folk medicine. The present study aimed to investigate the anti-oxidant activity and acute toxicity of *B. strychnifolia* stems by DPPH radical scavenging assay and acute toxicity test in mice, respectively. The ethanolic extract of *B. strychnifolia* effectively neutralized harmful extracellular free radicals in the DPPH assay with an IC_{50} value of 2.2 µg/mL. Moreover, the ethyl acetate fraction obtained from fractionation of the ethanolic extract also exhibited the same effect with the IC_{50} value of 2.5 µg/mL. The acute toxicity of the ethanolic extract and ethyl acetate fraction of *B. strychnifolia* was found to be greater than 2.0 g/kg of body weight in both male and female Swiss albino mice. In addition, during the day of the observation period, the animals were observed with no significant signs of toxicity, adverse pharmacological effects or abnormal behavior. The ethanolic extract of *B. strychnifolia* had total phenolic and total flavonoid contents with 550.3 µg GAE/mg extract and 337.0 µg catechin/mg extract, respectively, while the ethyl acetate fraction had those contents with 655.6 GAE/mg extract and 441.0 µg catechin/mg extract, respectively. The results indicated that the ethanolic extract and ethyl acetate fraction of *B. strychnifolia* had high anti-oxidant activity and were safe. From this study, the stem of *B. strychnifolia* was found to contain phenolic and flavonoid compounds which might be responsible for the anti-oxidant activity of this plant.

Keywords: *Bauhinia strychnifolia*, Anti-oxidant activity, Acute toxicity

1. บทนำ

อนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวในโมเลกุล จึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลและทำลายสมดุลของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย โดยการทำลายองค์ประกอบหลักของเซลล์ เช่น ทำลายหน้าที่ของเซลล์เมมเบรนอันนำไปสู่การตายของเซลล์ ทำลายดีเอ็นเอ แตกพันธะเปปไทด์ของโปรตีนทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นสาเหตุของการเกิดสภาวะทางพยาธิสภาพในโรคสำคัญบางโรค ได้แก่ โรคหัวใจและไขมันอุดตันในเส้นเลือด การกลายพันธุ์ และการเกิดมะเร็ง อนุมูลอิสระยังทำให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตมากขึ้น โดยทำให้เกิดการแตกของโครโมโซมและการทำลายดีเอ็นเอ นอกจากนั้นโรคที่มีการอักเสบเรื้อรังจากอนุมูลอิสระจะสามารถทำให้เกิดมะเร็งตามมาได้ ดังนั้นการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระสามารถชะลอการเกิดกระบวนการเหล่านี้ได้ (ประสงค์ เทียนบุญ, 2553)

พืชในสกุลชงโค (*Bauhinia*) เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน และฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง นอกจากนี้พืชในสกุลนี้ยังใช้บำรุงร่างกายและรักษาอาการต่าง ๆ เช่น บำรุงโลหิต แก้น้ำเหลืองเสีย แก้พิษ แก้ผื่นคัน แก้ไข้ แก้ปวดเมื่อย และต้านการอักเสบ (ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์, 2551) ย่านางแดง (*Bauhinia strychnifolia* Craib.) จัดเป็นหนึ่งในพืชสกุลนี้ โดยทางการแพทย์แผนไทยนิยมใช้ ใบ ต้น และรากย่านางแดง เพื่อการล้างพิษ รักษาไข้ แก้พิษเบื่อเมา และอาการแพ้ (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540) นอกจากนี้มีรายงานการใช้ใบหรือต้นนำมาต้มเพื่อเป็นยาบำรุงร่างกาย รักษาโรคมะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ และมะเร็งในกระเพาะอาหาร (Yuenyongsawad, Bunluepuech, Wattanapiromsakul, &

Tewtrakul, 2013) จากข้อมูลการใช้ต้นย่านางแดงมีความสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นร่วมกับโรคหรืออาการดังกล่าว อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับความปลอดภัยของสารสกัดต้นย่านางแดงที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมาก่อน จึงจำเป็นต้องมีการวิจัยเพื่อยืนยันฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดต้นย่านางแดง เพื่อพัฒนาสารสกัดสมุนไพรย่านางแดงมาใช้ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นการตระหนักถึงความสำคัญและคุณค่าของสมุนไพรไทยเพื่อสนับสนุนให้เกิดการนำสมุนไพรไทยมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยอย่างยั่งยืน

จากสรรพคุณทางยาของต้นย่านางแดงในการรักษาอาการที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดและส่วนสกัดจากต้นย่านางแดง เพื่อนำข้อมูลไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบต่าง ๆ ในอนาคต

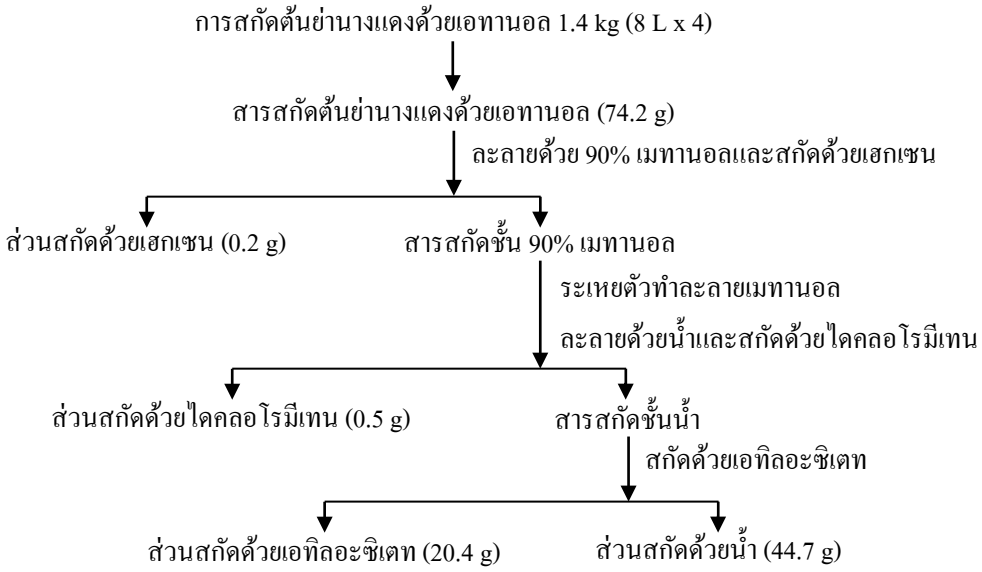
2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากต้นย่านางแดง

3. การดำเนินการวิจัย

3.1 การสกัดสารจากต้นย่านางแดง

ต้นย่านางแดงแห้งในการศึกษาครั้งนี้ ซื้อจากร้านยาไทยเจริญสุขโอสถ จ.นครปฐม หั่นต้นย่านางแดงแห้งเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปอบที่อุณหภูมิ 50-60 °C เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จนแห้งสนิท นำมาบดเป็นผงหยาบด้วยเครื่องบดไฟฟ้า เก็บผงบดหยาบที่ได้ในภาชนะปิดสนิท ในที่แห้งและเย็น จากนั้นนำผงบดหยาบของต้นย่านางแดง 1.4 kg มาสกัดโดยใช้วิธีการสกัดแบบหมัก (maceration) ด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ปริมาตร 8 L ทำการสกัดซ้ำ 4 ครั้ง จากนั้นกรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 รวมสารสกัดทั้งหมดนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 °C จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัดเอทานอลปริมาณ 74.2 g มาสกัดแยกส่วนด้วยวิธีสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction) เพื่อสกัดแยกกลุ่มสารสำคัญตามคุณสมบัติการละลายในตัวทำละลายต่าง ๆ คือ ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ตามลำดับ จากนั้นระเหยตัวทำละลายออก จะได้ส่วนสกัดเฮกเซน ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดน้ำ โดยได้น้ำหนักของส่วนสกัดแสดงดังรูปที่ 1 จากนั้นนำสารสกัดและส่วนสกัดจากต้นย่านางแดงมาเตรียมสารละลายของตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10 mg/mL ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) สำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



รูปที่ 1 การสกัดแยกสารจากต้นย่านางแดง

3.2 การศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกรวม

การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic content) ที่มีในสารสกัดจากต้นย่านางแดงด้วยวิธี Folin-Ciocalteu หรือ gallic acid equivalent (GAE) ใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียมสารสกัดตัวอย่างและสารมาตรฐาน gallic acid 1 mg/mL ละลายใน absolute ethanol หลังจากนั้นดูดสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 20 µL ใส่ลงใน 96-well plate จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 µL เขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 6 นาที เติม 7% sodium carbonate (Na_2CO_3) ปริมาตร 80 µL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ทำการทดสอบตัวอย่างละ 4 ครั้ง และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเฉลี่ยในรูปไมโครกรัมของ gallic acid equivalent (GAE) ต่อมิลลิกรัมสารสกัด (µg GAE/mg extract) (Settharaksa et al., 2014)

3.3 การศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid content) ในสารสกัด โดยนำสารสกัดความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 25 µL ผสมกับน้ำ 125 µL เติม 5% sodium nitrate ($NaNO_3$) ปริมาตร 25 µL แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 10% aluminium chloride ($AlCl_3$) ปริมาตร 15 µL แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 1 M sodium hydroxide (NaOH) ปริมาตร 50 µL หลังจาก 10 นาทีนำไปวัดการดูดกลืนแสงวัดที่ 510 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์จากสมการของกราฟสารละลายมาตรฐาน cathechin ความเข้มข้น 0-200 µg/mL ทำการทดสอบตัวอย่างละ 4 ครั้ง และผลที่ได้แสดงเป็นไมโครกรัม cathechin เทียบเท่าต่อมิลลิกรัมของสารสกัด (µg cathechin/mg extract) (Settharaksa et al., 2014)

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เตรียมตัวอย่างสารสกัดและสารมาตรฐานใน absolute ethanol ที่ความเข้มข้น 0.78-200 ug/mL นำตัวอย่างและสารมาตรฐาน คือ butylated hydroxytoluene (BHT) และ quercetin มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยเติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 100 µL ลงใน

96-well plate หลังจากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 6×10^{-5} M ปริมาตร100 µL แล้วนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ตรวจวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วย microplate reader (Epoch, Biotek) จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ และสร้างกราฟระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทำการทดสอบจำนวน 4 ซ้ำ เพื่อหาค่า 50% inhibitory concentration (IC_{50}) (Sudsai, Wattanapiromsaku, & Tewtrakul, 2013) โดยการคำนวณร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มีดังนี้

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

โดยที่ A_{control} = Absorbance of control - Absorbance of control blank

A_{sample} = Absorbance of sample - Absorbance of sample blank

3.5 การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูทดลอง

การศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในหนูทดลองด้วยวิธีการประเมิน 50% lethal dose (LD_{50}) เป็นไปตามข้อเสนอโครงการวิจัยที่ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิยาลัยรังสิต (RSEC 05/2558) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้หนูขาวเล็กพันธุ์ Swiss albino เพศผู้และเพศเมียอายุ 6 สัปดาห์ น้ำหนัก 30-40 g จากศูนย์สัตว์ทดลองภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัตว์ทดลองได้รับอาหารมาตรฐานและน้ำดื่มที่เพียงพอตลอดเวลาก่อนเริ่มการทดลอง โดยสัตว์ทดลองถูกเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ควบคุมอุณหภูมิที่ 22 ± 3°C ความชื้นสัมพัทธ์ 30-70 % และแสงสว่าง 12 ชั่วโมง/วัน

การหาค่า LD_{50}ของสารสกัดและส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงจากจากต้นย่านางแดงในหนูขาวเล็กใช้วิธี up-and-down method (Bruce, 1985) โดยทำการอดอาหารหนูขาวเล็ก 6 ชั่วโมง ก่อนการทดลอง ต่อมาสัตว์ทดลองได้รับสารสกัดขนาด 2.0 g/kg น้ำหนักตัว โดยป้อนครั้งละ 1 ตัว กลุ่มควบคุมป้อนตัวทำละลาย (Tween 80:น้ำ, 2.5:97.5) โดยขนาดของสารสกัดสามารถเพิ่มหรือลดได้โดยใช้ค่า constant multiplicative factor (viz., 2.0) ขึ้นอยู่กับผลการทดลองของขนาดสารสกัดก่อนหน้านั้น สังเกตอาการของหนูขาวเล็กหลังจากได้รับสารสกัดอย่างใกล้ชิดในช่วง 30 นาที ถึง 8 ชั่วโมงแรก และทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 14 วันหลังทำการทดลอง ลักษณะ signs of toxicity ที่สังเกตคือ tremor, convulsion, hyperactivity, sedation, grooming, loss of righting reflex, respiratory depression, coma และ death

3.6 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

สำหรับการวิเคราะห์ทางสถิตินั้น ข้อมูลทั้งหมดจะถูกระบุในรูปของ mean ± standard error of mean (S.E.M.) (ทำการทดลองซ้ำจำนวน 4 ครั้ง) ซึ่งการคำนวณหาค่า IC_{50} จะถูกคำนวณโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel และการวิเคราะห์ข้อมูลจะใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way analysis of varience: ANOVA) ร่วมกับ Dunnett's test ทั้งนี้ค่า *p*-value ที่มีค่า $p<0.05$ ถือเป็นค่านัยสำคัญทางสถิติ

4. ผลการวิจัย

4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ คำนวณได้จาก linear regression equation ของกราฟมาตรฐานของ gallic acid โดยมีสมการดังนี้ $y = 0.0039x + 0.0042$, $R^2 = 0.998$ จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดจากต้นย่านางแดงด้วยเอทานอลมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูง 550.3 µg GAE/mg extract ในขณะที่ส่วนสกัดด้วยเฮกเซน

ส่วนสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดด้วยน้ำ มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 48.9, 389.9, 655.6 และ 567.6 µg GAE/mg extract ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารฟีนอลิกรวม ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม และการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดและส่วนสกัดจากต้นย่านางแดง

ตัวอย่างจากต้นย่านางแดง	ปริมาณฟีนอลิกรวม (µg GAE/mg extract)	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (µg catechin/mg extract)	DPPH assay (IC_{50}, µg/mL)
สารสกัดด้วยเอทานอล	550.3 ± 1.5	337.0 ± 0.9	2.2 ± 0.1 *
ส่วนสกัดด้วยเฮกเซน	48.9 ± 1.8	46.2 ± 1.9	>200
ส่วนสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน	389.9 ± 1.1	120.3 ± 1.2	107.0 ± 1.7
ส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท	655.6 ± 0.9	411.0 ± 1.1	2.5 ± 0.5 *
ส่วนสกัดด้วยน้ำ	567.6 ± 1.3	355.5 ± 1.4	2.1± 0.2 *
BHT	-	-	26.2 ± 0.8
Quercetin	-	-	0.8± 0.7

ผลของตัวอย่างทดสอบแสดงในรูปของ mean ± S.E.M. ของสารสกัดและส่วนสกัดจากต้นย่านางแดง (n = 4)
* ค่า IC_{50} ของตัวอย่างทดสอบแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ BHT โดย p<0.05
- หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ คำนวณได้จาก linear regression equation ของกราฟมาตรฐานของ catechin โดยมีสมการ คือ $y = 0.0022x - 0.0032$, $R^2 = 0.997$ จากผลการศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดต้นย่านางแดงด้วยเอทานอลมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 337.0 µg catechin/mg extract ในขณะที่ส่วนสกัดด้วยเฮกเซน ส่วนสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดด้วยน้ำ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 46.2, 120.3, 411.0 และ 355.5 µg catechin/mg extract ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 จากการศึกษาของ Yuenyongsawad et al. (2013) พบว่าเมื่อนำส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง HT-29, HeLa, MCF-7 และ KB cells ที่ดี มาแยกสารบริสุทธิ์ ได้สารบริสุทธิ์ 3 สาร ได้แก่ quercetin, 3,5,7,3′,5′-pentahydroxyflavanonol-3-*O*-α-L-rhamnopyranoside และ 3,5,7-trihydroxychromone-3-α-L-rhamnopyranoside นอกจากนี้ยังสามารถแยกสารผสมระหว่าง β-sitosterol และ stigmasterol อีก 1 ชนิด จากรายงานผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและส่วนสกัดจากต้นย่านางแดงเป็นสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยพบได้สูงในส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท

4.2 ผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดและส่วนสกัดจากต้นย่านางแดง

จากการวิจัยครั้งนี้เมื่อนำสารสกัดและส่วนสกัดจากต้นย่านางแดงไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล ส่วนสกัดด้วยเฮกเซน ส่วนสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดด้วยน้ำ มีค่า IC_{50} ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งสารสกัดและส่วนสกัดจากต้นย่านางแดงนี้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดีเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน โดยสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบนี้ คือ quercetin และ

BHT ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.8 และ 26.2 µg/mL ตามลำดับ จากตารางที่ 1 สารสกัดด้วยเอทานอล (IC_{50} เท่ากับ 2.2 µg/mL) ส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (IC_{50} เท่ากับ 2.5 µg/mL) และส่วนสกัดด้วยน้ำ (IC_{50} เท่ากับ 2.1 µg/mL) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT อย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารมาตรฐาน quercetin สอดคล้องกับการศึกษาการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของใบย่านางแดงที่สกัดด้วยวิธีการต้มกับน้ำ การหมักด้วย 95% เอทานอล การหมักด้วย 50% เอทานอล และกากที่เหลือจากการหมักด้วยเอทานอลนำมาต้มสกัดอีกครั้ง พบว่าสารสกัดใบย่านางแดงที่ได้จากการต้มกากหลังจากการหมักด้วย 95% เอทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.50 µg/mL ซึ่งสารออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระเป็นสารกลุ่มฟีนอลิก (Sayompark, Itharat, & Hansakul, 2012)

จากการศึกษาส่วนสกัดต่าง ๆ ที่แยกได้จากสารสกัดต้นย่านางแดงด้วยเอทานอล โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ซึ่งมีขั้ว (polarity) ที่ต่างกัน ทำให้ได้ส่วนสกัดที่ประกอบด้วยสารสำคัญที่มีขั้วต่างกัน ส่งผลให้ส่วนสกัดที่ได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน จากข้อมูลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (IC_{50} เท่ากับ 2.5 µg/mL) และส่วนสกัดด้วยน้ำ (IC_{50} เท่ากับ 2.1 µg/mL) มีศักยภาพที่จะนำไปทำการศึกษาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทซึ่งมีขั้วไม่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนสกัดด้วยน้ำ ประกอบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม และผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ชี้ให้เห็นว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทที่แยกได้จากสารสกัดต้นย่านางแดงด้วยเอทานอลมีปริมาณสารฟีนอลิกรวม (655.6 µg GAE/mg extract) และปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (411.0 µg catechin/mg extract) สูง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี มีศักยภาพสูงเหมาะสมสำหรับการนำมาทำการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูขาวเล็กต่อไป

4.3 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดและส่วนสกัดต้นย่านางแดงในหนูขาวเล็ก

จากผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูขาวเล็กพันธุ์ Swiss albino (ตารางที่ 2) เมื่อหนูขาวเล็กเพศผู้ (38.7 ± 1.2 g) และเพศเมีย (34.5 ± 1.6 g) ได้รับสารสกัดด้วยเอทานอล และส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทจากต้นย่านางแดงในขนาด 0.5-2.0 g/kg น้ำหนักตัว พบว่าค่า LD_{50} ของสารสกัดด้วยเอทานอลและส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีค่ามากกว่า 2.0 g/kg ทั้งเพศผู้และเพศเมีย จากการสังเกตพฤติกรรมต่าง ๆ หลังจากหนูขาวได้รับสารสกัดด้วยเอทานอลและส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทอย่างใกล้ชิดในช่วง 30 นาที จนถึง 8 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลและส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทที่ขนาด 2.0 g/kg ไม่ทำให้หนูขาวมีอาการแตกต่างจากกลุ่มควบคุมในช่วง 6 ชั่วโมง หลังจากได้รับสารสกัดดังกล่าว เมื่อสังเกตอาการต่อไปจนครบ 14 วันหลังจากหนูขาวได้สารสกัด พบว่าหนูขาวที่ได้รับสารสกัดในขนาด 0.5-2.0 g/kg น้ำหนักตัว ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม และไม่แสดงอาการความเป็นพิษอื่น ๆ ตลอดการทดลอง จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าการได้รับสารสกัดด้วยเอทานอลและส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทแบบครั้งเดียวในปริมาณ 0.5-2.0 g/kg น้ำหนักตัว ไม่ทำให้เกิดพิษต่อหนูขาวเล็ก แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลความปลอดภัยของสารสกัดจากสมุนไพรย่านางแดงยังมีจำกัดเฉพาะข้อมูลในส่วนใบย่านางแดงเท่านั้น โดยพบว่าสารสกัดใบย่านางแดงด้วยเอทานอลไม่มีความเป็นพิษต่อหนูที่ได้รับในขนาด 3.0 g/kg (Somsak, Noilod, Chachiyo, & Kraithep, 2015) ดังนั้นเพื่อให้ข้อมูลด้านความปลอดภัยของสมุนไพรย่านางแดงเพิ่มมากขึ้น การศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดและส่วนสกัดจากต้นย่านางแดงในขนาดที่สูงกว่า 2.0 g/kg น้ำหนักตัว และการได้รับสารสกัดและส่วนสกัดจากต้นย่านางแดงในระยะยาวซึ่งอาจมีผลต่อสัตว์ทดลองได้ จำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 2 การศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารสกัดและส่วนสกัดจากต้นย่านางแดงในหนูขาวเล็ก

ชุดการทดสอบ	ขนาดของสารสกัด (mg/kg น้ำหนักตัว)						การประเมินผล
	500		1000		2000		
	M	F	M	F	M	F	
กลุ่มควบคุม (ตัวทำละลาย)	O	O	O	O	O	O	หยุดการทดสอบ
สารสกัดด้วยเอทานอล	O	O	O	O	O	O	หยุดการทดสอบ
ส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท	O	O	O	O	O	O	หยุดการทดสอบ

M = Male Swiss albino mice; F = Female Swiss albino mice; O = survived

5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดและส่วนสกัดจากต้นย่านางแดง ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเอทานอลและส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทต้นย่านางแดงมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงและมีความปลอดภัยเมื่อได้รับในขนาด 2.0 g/kg น้ำหนักตัว โดยสารสกัดด้วยเอทานอลและส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีสารออกฤทธิ์ในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

จากการศึกษาข้างต้นควรทำการศึกษาหาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดและส่วนสกัดจากต้นย่านางแดงเมื่อได้รับอย่างต่อเนื่องในระยะยาว เพื่อสนับสนุนการใช้สารสกัดต้นย่านางแดงในการศึกษาและการควบคุมคุณภาพเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ประสงค์ เทียนบุญ. (2553). บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระกับสุขภาพ. *วารสารคลินิกอาหารและโภชนาการ*. *4*(2), 69-79.

ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์. (2551). สารทุติยภูมิและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชสกุลชงโค. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*, *10*(3), 116-130.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2540). *สารานุกรมสมุนไพรไทย รวมหลักเภสัชกรรมไทย*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

Bruce, R. D. (1985). An up-and-down procedure for acute toxicity testing. *Fundamental and Applied Toxicology, 5*(1), 151-157.

Sayompark, S., Itharat, A., & Hansakul, P. (2012). Comparative study of antioxidant activities and total phenolic content of *Bauhinia strychnifolia* leaves extracts. In: 1st Conference on Graduate Student Network of Thailand (GS-NETT 2012); December 18 2012; Thammasat Convention Park (TUC Park), Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani.

Settharaksa, S., Madaka, F., Sueree, L., Kittiwisut, S., Sakunpak, A., Monton, C., & Charoenchai, L. (2014). Effect of solvent types on phenolic, flavonoid contents and antioxidant activities of *Syzygium gratum* (Wight) S.N. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *6*(2), 114-116.

Somsak, V., Noilod, J., Chachiyo, S., & Kraithep, S. (2015). Antimalarial activity of ethanolic leaf extract of *Bauhinia strychnifolia* in mice infected with *Plasmodium berghei*. *Malaria Control & Elimination*, *4*(2), 1000131. doi: 10.4172/ MCE.1000131.

Sudsai, T., Wattanapiromsaku, C., & Tewtrakul, S. (2013). Inhibition of nitric oxide production by compounds from *Boesenbergia longiflora* using lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Songklanakarin Journal of Science and Technology, 35*(3), 317-323.

Yuenyongsawad, S., Bunluepuech, K., Wattanapiromsakul, C., & Tewtrakul, S. (2013). Anti-cancer activity of compounds from *Bauhinia strychnifolia* stem. *Journal of Ethnopharmacology*, *150*(2), 765-769.