องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ

จักรพงษ์ กาวิวงศ์[1] อรุณี อินทร์จาด[1] อรวิภา เรียนกระศิลป์[1] กฤติญา กมลคร[1,2] พรหมพร ศรีสร้อยทองสุก[1]
ดำรงศักดิ์ เป็กทอง[3]และ สุภาวดี พาหิระ[1*]

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, [2]ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ [3]ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
[*]supawadeep@nu.ac.th

บทคัดย่อ

น้ำยางพญาสัตบรรณ (Alstonia scholaris, วงศ์ Apocynaceae) มีรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพไม่มากนัก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวัดองค์ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากส่วนดังกล่าว น้ำยางพญาสัตบรรณสดนำมาสกัดด้วย 95 % เอทานอล แล้วนำสารสกัดหยาบมาสกัดต่อด้วยวิธีลิควิดลิควิดพาร์ติชัน ระเหยสารละลายอินทรีย์ออก จะได้สารสกัดหยาบจากเอทานอล (ASL-EtOH, 3.7% yield ของน้ำยางสด) สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน (ASL-DCM), เอทิลอะซิเตท (ASL-EtOAc) และน้ำ (ASL-Water) คิดเป็น 53.8, 5.6 และ 34.7 % yield ของสารสกัดหยาบ สารสกัดทั้งสี่ชนิดถูกนำมาวัดหาองค์ประกอบทางเคมีเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยใช้วิธีมาตรฐานทางพฤกษเคมี และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

ผลการทดลองหาองค์ประกอบทางเคมีทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณชี้ให้เห็นว่า ASL-EtOH และ ASL-DCM มีสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์และฟีนอลิก ปริมาณมาก เท่ากับ 567.8±1.74 และ 572.2±0.52 mg UAE/g extract และ 9.8±1.07 และ 20.9±0.19 mg GAE/ g extract ตามลำดับ ASL-EtOAc และ ASL-Water อุดมไปด้วยสารกลุ่มอัลคาลอยด์และฟลาโวนอยด์ถึง 130.7±7.71 และ 92.6±3.17 µg BCE/g extract และ 37.5±0.20 และ 14.3±1.04 mg RTE/ g extract ตามลำดับ ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ DPPH ของ ASL-EtOH, ASL-DCM, ASL-EtOAc และ ASL-Water (5 mg/ml) คือ 25.2±3.96, 63.6±4.74, 94.1±0.96 และ 42.3±0.73 % ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ ASL-EtOAc สูงกว่าสารสกัดชั้นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value < 0.01). ดังนั้นผลจากการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นศักยภาพของน้ำยางของพญาสัตบรรณในการเป็นแหล่งวัตถุดิบที่ดีในการค้นหาสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

คำสำคัญ: พญาสัตบรรณ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ องค์ประกอบทางเคมี สารทุติยภูมิ

Chemical Constituents and Antioxidant Activity of the *Alstonia scholaris* Latex Extract

Jakkrapong Kawiwong[1], Arunee Injard[1], Aonvipa Riankrasin[1], Kittiya Kamonlakorn[1,2], Phromporn Srisoithongsug[1], Dumrongsak Pekthong[3], and Supawadee Parhira[1*]

[1] Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

[2] Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

[3] Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

** supawadeep@nu.ac.th*

Abstract

The latex of "Payasattaban" (Alstonia scholaris, Apocynaceae family) has less reports on its chemical composition and biological activity. Thus, the objectives of this research were to determine the chemical constituents and antioxidant activity of its extracts. The fresh latex was extracted with 95% ethanol followed by liquid-liquid partition. The organic solvent of each layer was removed to obtain ASL-EtOH (3.7% yield of the fresh latex), ASL-DCM, ASL-EtOAc and ASL-Water around 53.8, 5.6 and 34.7 % yield of ASL-EtOH. All four extracts were determined for their phytochemical composition by using qualitative and quantitative standard protocols. Their antioxidant activities were evaluated by using DPPH assay.

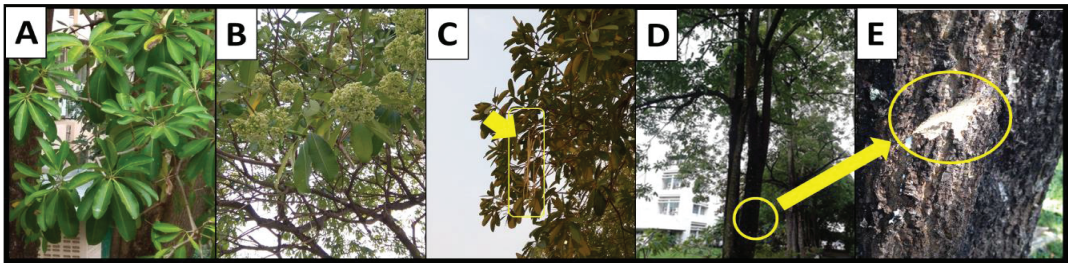
The results in both qualitative and quantitative determination revealed that ASL-EtOH and ASL-DCM were abundant with triterpenoids and phenolic compounds around 567.8±1.74 and 572.2±0.52 mg UAE/ g extract and 9.8±1.07 and 20.9±0.19 mg GAE/ g extract, respectively. Moreover, ASL-EtOAc and ASL-Water were rich with alkaloids and flavonoids at 130.7±7.71 and 92.6±3.17 µg BCE/g extract and 37.5±0.20 and 14.3±1.04 mg RTE/ g extract, respectively. The % inhibition of DPPH activities of ASL-EtOH, ASL-DCM, ASL-EtOAc and ASL-Water (5 mg/ml) were 25.2±3.96, 63.6±4.74, 94.1±0.96 and 42.3±0.73. The antioxidant activity of ASL-EtOAc was significantly higher than those of other extracts (P value < 0.01). Therefore, these results indicated that the latex of A. scholaris is a good source for discovery of secondary metabolites with antioxidant activity.

Keywords: *Alstonia scholaris*, antioxidant, chemical constituent, secondary metabolite

1. บทนำ

พญาสัตบรรณ (*Alstonia Scholaris*) เป็นพืชในวงศ์ Apocynaceae มีชื่อสามัญคือ White cheese wood, Shaitan wood, Pulai, Chatiyan wood, Blackboard tree หรือ Indian devil tree มีชื่อเรียกภาษาไทยหลากหลาย เช่น พญาสัตบรรณ สัตบรรณ หัส-บัน จะบัน หรือตีนเป็ด เป็นพืชที่มีถิ่นดั้งเดิมในประเทศจีน อินเดีย และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สามารถพบได้ทั่วทุกภาคในประเทศไทย (ประไพรรัตน์ สีพลไกล, 2555) ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของใบ (A) ดอก (B) ผล (C) ลำต้น (D) ของพญาสัตบรรณ และภาพที่ 1E แสดงลักษณะของน้ำยางสีขาวที่ไหลออกมาเนื่องจากการถูก

กรีดบริเวณลำต้น การแพทย์พื้นบ้านในหลายประเทศ เช่น ไทย จีน อินเดีย และปากีสถาน ได้นำส่วนต่างๆ ของพญาสัตบรรณมาใช้เพื่อรักษาโรคและอาการที่หลากหลาย ส่วนมากมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการการอักเสบ เช่น มาลาเรีย ข้ออักเสบ และโรคทางเหงือกและฟัน (Dey, 2011และ Feng et al., 2013) การศึกษาหลายเรื่องชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของต้นพญาสัตบรรณมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจ เช่น ลดการปวด ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Dey 2011, Feng et al., 2013, Ganjewala and Gupta, 2013, Khanum et al., 2014 และ Wong et al., 2011) ส่วนของน้ำยางสีขาวและใบสามารถนำมาใช้รักษาบาดแผลภายนอก แผลเปื่อยและโรคผิวหนัง ทั้งการแพทย์แผนจีนและทางอายุรเวชแสดงให้เห็นถึงประวัติการใช้ส่วนต่างๆ ของพญาสัตบรรณที่มีทั้งประโยชน์และโทษในทางการแพทย์แผนโบราณมาอย่างยาวนาน ใบและเปลือกต้นของพญาสัตบรรณเป็นแหล่งของสารทุติยภูมิหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่มอินโดลอัลคาลอยด์ เช่น echitamine, strictaubomine, akuammiginone และ echitaminic acid (ประไพรรัตน์ สีพลไกล, 2555) นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ เช่น ursolic acid, cycloeucalenol, betulin, betulinic acid และ oleanolic acid (Feng et al., 2013) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น kaempferol, quercetin และ isorhamnetin (Hui et al., 2009) รายงานการสกัดสารทุติยภูมิกลุ่มต่างๆ มักมาจากการสกัดส่วนของใบและเปลือกลำต้นเป็นส่วนใหญ่ แต่การศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำยางของต้นพญาสัตบรรณมีรายงานไม่มากนัก คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณเพื่อใช้เป็นแนวทางในการค้นหาสารใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ



ภาพที่ 1 ลักษณะของใบ (A) ดอก (B) ผล (C) ลำต้น (D) และน้ำยางจากส่วนของลำต้นที่ถูกกรีด (E) ของพญาสัตบรรณ (*Alstonia scholaris*) ณ บริเวณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก ประเทศไทย

2. วัตถุประสงค์งานวิจัย

เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเชิงคุณภาพ เชิงปริมาณ และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ

3. สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารละลายอินทรีย์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง (AR grade) ซื้อจากบริษัท RCI Labscan ประเทศไทย berberine chloride, gallic acid, rutin, trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ dimethoxy sulfoxide (DMSO) ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา ursolic acid ซื้อมาจากบริษัท Tokyo chemical, ประเทศญี่ปุ่น Folin-Ciocalteu reagent ซื้อจากบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี Vanilla (AR grade) จากบริษัทในประเทศจีน Bromocresol green, Aluminum chloride hexahydrate และ Sodium hydroxide (AR grade) ซื้อจาก บริษัท Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การเก็บน้ำยางพญาสัตบรรณ

น้ำยางสดของพญาสัตบรรณ ถูกจัดเก็บจากต้นพญาสัตบรรณ ในบริเวณรอบคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก ระหว่าง เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2558 – พฤษภาคม 2560 โดยการกรีดรอบลำต้น แล้วใช้กระบอกฉีดยาดูดน้ำยางสีขาวที่ไหลออกมาจากบริเวณที่กรีด เก็บไว้ในขวดพลาสติกสะอาด น้ำยางสดจะถูกนำไปเก็บในช่องแช่แข็งทันที (0 °C) จนกว่า

จะรวมกันได้ปริมาณมากเพียงพอสำหรับการสกัดในขั้นตอนถัดไป ตัวอย่างแห้งแสดงลักษณะของ ดอก ผล ใบ กิ่ง ก้าน ของพญาสัตบรรณที่เป็นแหล่งของน้ำยางสด รหัสจัดเก็บ 003825 ได้รับการระบุเอกลักษณโดย ผศ. ดร. ปราณี นางงาม ถูกจัดเก็บ ณ หอพรรณไม้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

4.2 การเตรียมสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ

น้ำยางสดของพญาสัตบรรณ (4 L) ถูกนำออกมาจากช่องแช่แข็ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 °C ข้ามคืนให้ละลายจนสามารถเทออกจากขวดได้ นำมาสกัดด้วย เอทานอล (95 %v/v, 4 L) โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยในการสกัด (ultrasonicator, Elma, ประเทศเยอรมนี) ครั้งละ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ได้เป็นของเหลวขุ่น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองแล้วนำส่วนสารละลายใสไประเหยแห้งโดยใช้ Rotary evaporator (Buchi, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) ที่อุณหภูมิ 45 °C จนได้สารสกัดหยาบเอทานอล (ASL-EtOH) มีลักษณะเป็นผงแห้งสีขาวแกมเหลือง 147.9 g (3.7 % yield ของน้ำยางสด) หลังจากนั้น ASL-EtOH (70 g) ถูกนำไปสกัดโดยใช้วิธีลิควิด-ลิควิด พาร์ติชัน โดยนำไปกระจายตัวในน้ำ 200 ml แล้วสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 400 ml แล้วตามด้วยการสกัดโดยเอทิลอะซิเตท 400 ml เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายอินทรีย์ออก จะได้สารสกัดในชั้นไดคลอโรมีเทน (ASL-DCM, 37.7 g, 53.8 % yield) และสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท (ASL-EtOAc, 3.9 g, 5.6 % yield) ส่วนชั้นน้ำที่เหลือนำไปแช่แข็งแล้วทำให้แห้งโดยวิธี freeze drying ได้สารสกัดชั้นน้ำ (ASL-Water, 24.3 g, 34.7 % yield) การสกัดทุกขั้นตอนทำซ้ำ 3 ครั้ง

4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเชิงคุณภาพของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ

4.3.1 อัลคาลอยด์ (alkaloids)

การทดสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์โดยนำสารสกัด ASL-EtOH, ASL-DCM, ASL-EtOAc และ ASL-Water มาละลายด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 25 mg/ml จำนวน 1 ml เติม 2% sulfuric acid 20 ml แล้วแบ่งสารละลายออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน ส่วนแรกนำมาทำปฏิกิริยากับ Mayer's reagent หากสารสกัดมีอัลคาลอยด์ จะให้ผลบวกโดยเกิดตะกอนสีขาวนวลเกิดขึ้นและส่วนที่สองนำมาทำปฏิกิริยากับ Dragendolff's reagent หากสารสกัดมีอัลคาลอยด์ จะให้ผลบวกโดยเกิดตะกอนสีส้มหรือแดงอิฐ บันทึกผลตามปริมาณของตะกอนที่สังเกตได้ (Kamonlakorn and Parhira, 2019)

4.3.2 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

การทดสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Shinoda's Test โดยนำสารสกัด ASL-EtOH, ASL-DCM, ASL-EtOAc และ ASL-Water จำนวน 5 ml (ความเข้มข้น 25 mg/ml ในเมทานอล) ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมแถบ Magnesium ribbon 2-3 ชิ้น หยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2-3 หยด ทำการทดสอบเทียบกับผลึก rutin สังเกตสีที่เกิดขึ้นภายใน 1-2 นาที หากพบฟลาโวนอยด์สารละลายที่ได้มีสีส้ม ชมพู เลือดหมูถึงม่วง หรือแดง (บางครั้งอาจได้เป็นสีเขียวหรือน้ำเงิน) บันทึกผลตามความเข้มของสีที่สังเกตได้ (Kamonlakorn and Parhira, 2019)

4.3.3 ไตรเทอร์พีนอยด์-สเตอรอยด์ (triterpenoids-steroids)

การทดสอบสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์และสเตอรอยด์ ด้วยวิธี Liebermann-Burchard test โดยนำสารสกัด ASL-EtOH, ASL-DCM, ASL-EtOAc และ ASL-Water จำนวน 1 ml (25 mg/ml ในเมทานอล) ใส่หลอดทดลองขนาด 20 ml เติมน้ำ 5 ml แล้วสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 5 ml ใช้หลอดหยดดูดสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนมาระเหยแห้งในถ้วยกระเบื้องบน water bath ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วตรวจสอบโดยหยด acetic anhydride 1-2 หยด ลงบนสารสกัดผสมให้เข้ากัน แล้วหยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1-2 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น หากพบสเตอรอยด์จะให้สีฟ้า, น้ำเงินถึงสีเขียว และหากพบไตรเทอร์พีนอยด์จะให้สีแดงชมพูถึงสีม่วงแดง บันทึกผลตามความเข้มของสีที่สังเกตได้ (Kamonlakorn and Parhira, 2019)

4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเชิงปริมาณของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ

4.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณรวมสารกลุ่มอัลคาลอยด์

ปริมาณรวมของสารกลุ่มอัลคาลอยด์วัดโดยวิธีการของ Salamah and Ningsih, 2017 โดยมีการเปลี่ยนแปลงวิธีเล็กน้อย โดยนำสารสกัด ASL-EtOH, ASL-DCM, ASL-EtOAc และ ASL-Water อย่างละ 1 g เติม 2 N กรดไฮโดรคลอริก 1 ml สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 10 ml 3 ครั้ง ปรับความเป็นกรดด่างของชั้นน้ำให้เป็นกลางด้วย 0.1 N Sodium hydroxide แล้วเติม Bromocresol green solution (BCG) ลงไป 5 ml ตามด้วย Phosphate buffer (pH 4.7) 5 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 4 ครั้ง ครั้งละ 1, 2, 3 และ 4 ml รวมชั้นคลอโรฟอร์มเข้าด้วยกัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดรังสีสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu, ประเทศญี่ปุ่น) ที่ความยาวคลื่น 420 nmแล้วนำมาคำนวณหาค่าปริมาณรวม

ของสารกลุ่มอัลคาลอยด์ แล้วรายงานค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ในหน่วย µg berberine chloride equivalent (BCE)/g extract จากกราฟมาตรฐานของ berberine chloride (ช่วงความเข้มข้น 2.5-15.0 µg/ml)

4.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณรวมสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

การหาปริมาณรวมของสารทุติยภูมิกลุ่มฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากน้ำยางพญาสัตบรรณ วัดโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Baba and Malik, 2015 และ Chang et al., 2012 โดยปิเปตสารสกัดที่ต้องการทดสอบ (1 mg/ml ใน เอทานอล (50 %v/v)) 1 ml เติม 2% Aluminum chloride solution 1 ml ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 25 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm คำนวณหาปริมาณรวมฟลาโวนอยด์ จากการคำนวณค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของ สารฟลาโวนอยด์มาตรฐาน rutin (ช่วงความเข้มข้น 10-50 µg/ml) รายงานค่าเฉลี่ยของการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในหน่วย mg rutin equivalent (RTE)/g extract

4.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณรวมสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์

การวัดปริมาณรวมของสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ปีนอยด์ ในสารสกัดทั้ง 4 ชนิด ดำเนินการตามวิธีของ Wei, et al., 2015 โดยปิเปตสารตัวอย่าง (ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน acetic acid) 200 µl เติม 5% vanillin-acetic solution 0.5 ml ตามด้วย sulfuric acid 0.8 ml ตั้งทิ้งไว้ที่มืด ที่อุณหภูมิ 70°C รอทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที เติม acetic acid 2 ml นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 547 nm คำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์จากกราฟมาตรฐานของ ursolic acid (ความเข้มข้น 1-20 µg/ml) รายงานค่าเฉลี่ยของการทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ในหน่วย mg ursolic acid equivalent (UAE)/g extract

4.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณรวมสารกลุ่มฟีนอลิก

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเชิงปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิก โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteau assay เป็นวิธีการที่ปรับเปลี่ยนเล็กน้อยจากวิธีการของ Baba and Malik, 2015 โดยเตรียมสารสกัด ASL-EtOH, ASL-DCM, ASL-EtOAc และ ASL-Water ให้มีความเข้มข้น 0.2 mg/ml ในเมทานอล นำสารละลายอย่างละ 1 ml มาทำปฏิกิริยากับ 10% Folin-Ciocalteau reagent 2 ml ทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 2% Sodium bicarbonate 1.5 ml ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm แล้วคำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในหน่วย mg gallic acid equivalent (GAE) /g extract จากกราฟมาตรฐานของ gallic acid ช่วงความเข้มข้น 1.7-13.3 µg /ml ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย วิธี DPPH assay นี้ ประยุกต์จากวิธีของ Ramachandra et al., 2012 ดังต่อไปนี้ เจือจาง stock solution ของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ ASL-EtOH, ASL-DCM, ASL-EtOAc และ ASL-Water (100 mg/ml ใน DMSO) และ Trolox (6-hydroxy2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) (10 mg/ml) ด้วยเมทานอลจนครบ 75 µl เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาของสารสกัดแต่ละชนิดและTrolox เป็น 5 และ 0.1 mg/ml, ตามลำดับ ใช้ DMSO และเมทานอลในปริมาณที่เท่ากันเป็น vehicle control เติมลงไปใน 96-well plate แล้วปิเปต สารละลาย 0.2 mM DPPH solution 150 µl ลงไปทำปฏิกิริยา หุ้ม 96-well plate ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (BioTek, ประเทศสหรัฐอเมริกา) คำนวณหาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง (% inhibition DPPH activity) ได้จากการเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH solution ของ vehicle control ที่ปราศจากสารสกัด แสดงดัง สมการที่ 1 ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง รายงานผลเป็น ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

% inhibition DPPH activity = [1- (Absorbance sample/Absorbance vehicle control)] x 100.....สมการที่ 1

4.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของ DPPH radical (% inhibition DPPH activity) ของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ

(P value < 0.01) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 15.0 ด้วยวิธี One-way ANOVA ตามด้วย Post Hoc test วิธี Bonferroni

5. ผลและอภิปรายผลการวิจัย

5.1 ลักษณะทั่วไปและร้อยละผลผลิตของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ

จากการสกัดน้ำยางสดของพญาสัตบรรณ จำนวน 4 L ด้วยเอทานอล (95 %v/v) โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยในการสกัด พบว่าภายหลังจากการระเหยแห้งแล้ว ได้ ASL-EtOH มีลักษณะเป็นผงแห้งสีขาวแกมเหลือง 147.9 g คิดเป็นร้อยละผลผลิต 3.7 ของน้ำยางสด เมื่อนำ ASL-EtOH 70 g ไปสกัดโดยใช้วิธีลิควิดลิควิด พาร์ติชัน โดยกระจายตัวในน้ำแล้วสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ตามด้วยเอทิลอะซิเตท เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายอินทรีย์ออกแล้วได้สารสกัด ASL-DCM จำนวน 37.7 g (53.8 % yield) มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีเขียวแกมเหลือง และสารสกัด ASL-EtOAc (3.9 g, 5.6 % yield) มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีเหลือง ส่วนสารสกัด ASL-Water ที่ได้จากการ freeze drying ชั้นน้ำที่เหลือจากการสกัด มีลักษณะเป็นผงแห้งสีขาว จำนวน 24.31 g (34.7% yield)

5.2 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ

5.2.1 องค์ประกอบทางเคมีเชิงคุณภาพของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ

ผลการทดสอบองค์ประกอบทางเคมีเชิงคุณภาพของสารสกัดจากยางของพญาสัตบรรณ พบว่า ASL-EtOH ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบตรวจพบสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์และไตรเทอร์พีนอยด์ ASL-DCM ตรวจพบเฉพาะสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์เท่านั้น ส่วน ASL-EtOAc ตรวจพบสารทุติยภูมิทั้งอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์และไตรเทอร์พีนอยด์ โดยมีปริมาณตะกอนค่อนข้างมากและสีที่เกิดจากปฏิกิริยาค่อนข้างเข้มชี้ให้เห็นว่าน่าจะมีปริมาณของสารทุติยภูมิค่อนข้างมาก สำหรับสารสกัดในชั้นน้ำ ASL-Water ตรวจพบสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ในระดับมากแต่สารกลุ่มอัลคาลอยด์และฟลาโวนอยด์ตรวจพบไม่มากนัก สารสกัดที่ทดสอบทุกชนิดตรวจไม่พบสเตียรอยด์ จากการทดสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธีทางพฤกษเคมีเบื้องต้นชี้ให้เห็นว่าสารสกัดชั้น ASL-EtOAc เป็นสารสกัดที่อุดมด้วยอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์และไตรเทอร์พีนอยด์

5.2.2 องค์ประกอบทางเคมีเชิงปริมาณของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเชิงปริมาณของสารสกัดจากน้ำยางพญาสัตบรรณ เป็นการตรวจสอบปริมาณรวมของสารทุติยภูมิ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ไตรเทอร์พีนอยด์และฟีนอลิก ในสารสกัดจากน้ำยางพญาสัตบรรณ 4 ชนิด ได้แก่ ASL-EtOH, ASL-DCM. ASL-EtOAc และ ASL-Water แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเชิงปริมาณของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ

สารสกัด	ปริมาณรวมสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (µg BCE/g extract)	ปริมาณรวมสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (mg RTE/g extract)	ปริมาณรวมสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ (mg UAE/g extract)	ปริมาณรวมสารกลุ่มฟีนอลิก (mg GAE/g extract)
ASL-EtOH	32.8±5.50	1.2±0.09	567.8±1.74	9.8±1.07
ASL-DCM	21.2±1.20	4.2±0.29	572.2±0.52	20.9±0.19
ASL-EtOAc	92.6±3.17	37.5±0.20	53.0±1.37	4.1±0.09
ASL-Water	130.7±7.71	14.3±1.04	86.1±3.57	1.8±0.04

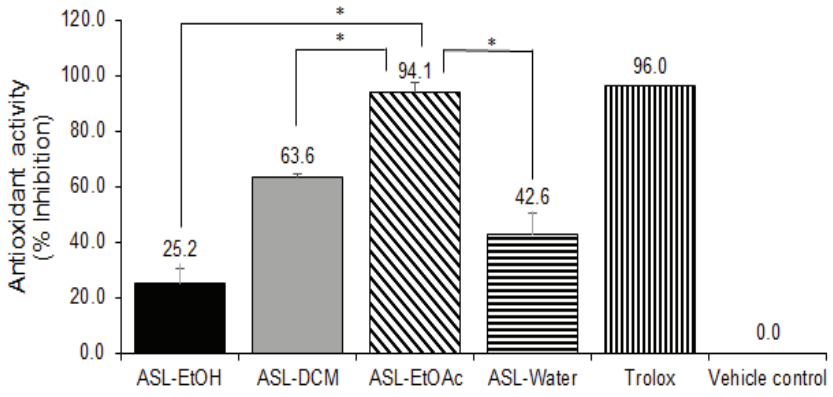
หมายเหตุ BCE = berberine chloride equivalent, RTE = rutin equivalent, UAE = ursolic acid equivalent และ GAE = gallic acid equivalent ค่าปริมาณรวมของสารทุติยภูมิที่แสดงในตาราง เป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

จะเห็นได้ว่า สารสกัดหยาบ ASL-EtOH เป็นสารสกัดที่มีปริมาณรวมของสารในกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์สูงถึง 567.8 mg UAE/g extract โดยมีสารกลุ่มฟีนอลิก อัลคาลอยด์และฟลาโวนอยด์ไม่มากนัก สารสกัด ASL-DCM เป็นสารสกัดที่ได้จากการสกัดแยกสารสกัดหยาบเอทานอล ด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว คือ ไดคลอโรมีเทน ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารสกัดนี้อุดมไปด้วยสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์โดยมีปริมาณสูงถึง 572.2 mg UAE/ g extract สอดคล้องกับคุณสมบัติทั่วไปของสารในกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ที่มักละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก (20.9 mg GAE/g extract) ที่พบในปริมาณสูงกว่าสารสกัดในชั้นอื่น ส่วนสารกลุ่มอัลคาลอยด์และฟลาโวนอยด์ มีปริมาณรวมไม่มาก

นัก สารสกัด ASL-EtOAc เป็นสารสกัดที่มีขั้วปานกลาง พบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์มากที่สุด (37.5 mg RTE/g extract) อีกทั้งยังพบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ที่ค่อนข้างสูงถึง 92.6 µg BCE/g extract ในขณะที่ปริมาณรวมของสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์และฟีนอลิกพบในปริมาณไม่มากนัก สำหรับสารสกัด ASL-Water พบว่ามีปริมาณรวมของสารกลุ่มอัลคาลอยด์สูงที่สุดถึง 130.7 µg BCE/g extract แต่สารกลุ่มฟลาโวนอยด์และไตรเทอร์พีนอยด์ พบในระดับปานกลาง แต่พบสารกลุ่มฟีนอลิกในปริมาณน้อย

5.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบโดยการวัดร้อยละการยับยั้งการทำงานของ DPPH radical ของสารสกัดจากน้ำยางพญาสัตบรรณทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ASL-EtOH, ASL-DCM, ASL-EtOAc และ ASL-Water ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml โดยใช้ Trolox 0.1 mg/ml และ DMSO ในเมทานอล เป็น positive control และ vehicle control ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 2 จะเห็นได้ว่าสารสกัด ASL-EtOAc มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ DPPH (94.1 % inhibition) สูงกว่าสารสกัดในชั้น ASL-DCM, ASL-Water และ ASL-EtOH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value < 0.01) เมื่อพิจารณาร่วมกับองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดแล้ว พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด มีความสอดคล้องกับปริมาณของสารทุติยภูมิในกลุ่มฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกซึ่งพบมากที่สุดในสารสกัด ASL-EtOAc และ ASL-DCM ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าหลายการศึกษาที่ชี้ให้เห็นว่า สารทุติยภูมิกลุ่มฟลาโวนอยด์และฟีนอลิก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Ramachandra et al., 2012 และ Ganjewala and Gupta, 2013)



ภาพที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ ASL-EtOH, ASL-DCM, ASL-EtOAc และ ASL-Water ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml, Trolox (positive control) ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml และ vehicle control (DMSO) แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของ % inhibition DPPH activity ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง
* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value < 0.01)

6. สรุปผลการวิจัย

จากการวัดองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากน้ำยางพญาสัตบรรณทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ พบว่า สารสกัดหยาบเอทานอล และสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน พบสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ในปริมาณสูง ส่วนสารในกลุ่มอื่นๆ พบในปริมาณไม่มากนัก สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท และชั้นน้ำพบอัลคาลอยด์และฟลาโวนอยด์ในปริมาณค่อนข้างมาก ส่วนสารกลุ่มอื่นพบในปริมาณไม่มากนัก สารสกัดจากน้ำยางพญาสัตบรรณ (5 mg/ml) ทั้ง 4 ชนิด ที่ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay แสดง % inhibition DPPH activity ในช่วง 25.2 – 94.1 โดยพบว่า สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท มี % inhibition สูงถึง 94.1% ซึ่งสูงกว่าสารสกัดชั้นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value < 0.01) ผลการวิจัยชี้ให้เห็นความน่าสนใจของสารสกัดจากน้ำยางของพญาสัตบรรณ ในการเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลาย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี เหมาะแก่การนำไปศึกษาวิจัยต่อ จนถึงการสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์ รวมถึงการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ ต่อไป

7. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายได้ กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2559 หมายเลขโครงการ R2559C003

เอกสารอ้างอิง (References)

ประไพรรัตน์ สีพลไกล. (2555). สารอินโดอัลคาร์ลอยด์และฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นพญาสัตบรรณ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**, 14 (1), 54-65.

Baba, S.A., & Malik, S.A. (2015) Determination of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antimicrobial and Antioxidant Activity of a Root Extract of *Arisaema jacquemontii*. **Journal of Taibah University for Science,** 9, 449–454.

Chang, C. L., Lin C. S., & Lai GH. (2012) Phytochemical Characteristics, Free Radical Scavenging Activities, and Neuroprotection of Five Medicinal Plant Extracts. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, 984295.

Dey, A. (2011). *Alstonia scholaris* R.Br. (*Apocynaceae*): Phytochemistry and Pharmacology: A Concise Review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 1 (6), 51-57.

Feng, L., Yuan, Y., Liu, X., Gu, J., Zhang, H., & Wang, Y. (2013). A Combination of Alkaloids and Triterpenes of *Alstonia scholaris* (Linn.) R. Br. Leaves Enhances Immunomodulatory Activity in C57BL/6 Mice and Induces Apoptosis in the A549 Cell Line. **Molecules**, 18 (11), 13920-39.

Ganjewala, D., & Gupta, A.K. (2013) Study on Phytochemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Properties of Different Parts of *Alstonia scholaris* Linn. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, 3 (2), 379-84.

Hui, T., Sun, Y., Zhu, L., Guo, W., & Rao, G. (2009). Flavonoids in Leaves of *Alstonia scholaris*, **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, 34 (9), 1111-1113.

Kamonlakorn, K., & Parhira, S. (2019) Qualitative and Quantitative Phytochemical Analysis of the Extracts from *Dillenia indica* L. **Proceedings of the 35th International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences & CU-MPU International Collaborative Research Conference,** 221-224.

Khanum, S. (2014) Pharmacological Investigation of the Chloroform Extracts of *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. **Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation,** 3 (1), 14-19.

Ramachandra, Y.L, Ashajyothi, C., & Padmalatha, S. (2012) Antioxidant Activity of *Alstonia Scholarsis* Extracts Containing Flavonoid and Phenolic Compounds. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,** 4 (3), 424-426.

Salamah, N., & Ningsih, D. (2017) Total Alkaloid Content in Various Fractions of *Tabernaemonata sphaerocarpa* Bl. (*Jembirit*) Leave. **Materials Science and Engineering**, 259, 012017.

Wei, L., Zhang, W., Yin, L., Yan, F., & Xu, Y., & Chen, F. (2015) Extraction Optimization of Total Triterpenoids from *Jatropha curcas* Leaves using Response Surface Methodology and Evaluations of Their Antimicrobial and Antioxidant Capacities. **Electronic Journal of Biotechnology**, 18 (2), 88-95.

Wong, S.K., Lim, Y.Y., Abdullah, N.R., & Nordin, F.J. (2011) Assessment of Antiproliferative and Antiplasmodial Activities of Five Selected Apocynaceae Species. **BMC Complementary and Alternative Medicine,** 11, 3.