

การทดลองการต้านอนุมูลอิสระของใบบัวบก Antioxidant test of *Centella asiatica*

จันทกาญจน์ จุลทัศน์¹ นลินนิภา รัตนประเสริฐ² พิตะวัน แสนชั้น³ วิไลวรรณ สิมเชื้อ⁴ ปิยะนุช เหลืองงาม⁵
E-mail: sb6340148204@lru.ac.th, sb6340148212@lru.ac.th, sb6340148216@lru.ac.th

บทคัดย่อ

การทดลองเรื่องการต้านอนุมูลอิสระของใบบัวบก มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบบัวบก ศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดใบบัวบก และศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบบัวบก ซึ่งการทดลองนี้ใช้อนุมูล DPPH และ ABTS เทียบกับความสามารถของสารมาตรฐาน 2 ชนิดคือ แกลลิกและเคอร์เซติน พบว่าสารสกัดใบบัวบกมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งรายงานในค่า (IC₅₀) เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH โดยให้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC₅₀) คือ สารสกัดใบบัวมีค่า (IC₅₀) เท่ากับ 5715.675 mg/L สำหรับค่าสารมาตรฐาน Gallic และ Quercetin มีค่า (IC₅₀) เท่ากับ 0.465 mg/L และ 0.999 mg/L วิธี ABTS พบว่ามีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC₅₀) คือ สารสกัดใบบัวมีค่า (IC₅₀) เท่ากับ 13198.541 mg/L สำหรับค่ามาตรฐาน Gallic และ Quercetin มีค่า (IC₅₀) เท่ากับ 6.916 mg/L และ 1.925 mg/L กลุ่มฟีนอลิกจะใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic และกลุ่มฟลาโวนอยด์จะใช้วิธี Zhu *et al.* (2010) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน Quercetin พบว่าในสารสกัดใบบัวบกมีปริมาณฟีนอลิกรวมเฉลี่ยเท่ากับ 16.529 mg/L ส่วนฟลาโวนอยด์รวมเฉลี่ยเท่ากับ 26.26 mg/L

คำสำคัญ: การต้านอนุมูลอิสระของใบบัวบก ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

Abstract

Antioxidant test of *Centella asiatica*. The objective of this study was to study the total phenolic content of *Centella asiatica* extract. To study the total flavonoid content of *Centella asiatica* extract. and to study the antioxidant activity of *Centella asiatica* extract This experiment used DPPH and ABTS radicals to compare the capabilities of two standard substances, gallic and quercetin. It was found that *Centella asiatica* extract has the ability to anti free radicals. which was reported in the value (IC₅₀) when tested by DPPH method. The concentration of the extract that can inhibit the free radicals 50% (IC₅₀) was *Centella asiatica* extract (IC₅₀) was 5715.675 mg/L for the Gallic standard. and Quercetin (IC₅₀) was 0.465 mg/L and 0.999 mg/L. ABTS method found that the extract concentration that can inhibit free radicals 50% (IC₅₀) is *Centella asiatica* extract (IC₅₀) was 13198.541 mg/L for Gallic and Quercetin standard values (IC₅₀) were 6.916 mg/L and 1.925 mg/L. Folin-Ciocalteu colorimetric comparison with Gallic standard curve and flavonoid group using Zhu *et al.* (2010) method. Compared with Quercetin standard curve, *Centella asiatica* extracts showed average total phenolic content. was 16.529 mg/L, while the mean total flavonoid was 26.26 mg/L.

Keywords: *Centella asiatica* antioxidant activity, total phenolic content, total flavonoid content

ความเป็นมาของปัญหา

บัวบก (Asiatic pennywort) ชื่อวิทยาศาสตร์ (*Centella asiatica* Linn.) วงศ์ Umbelliferae โดยใบบัวบกมีชื่อเรียกทั่วไปในภาคกลาง คือ บัวบก ภาคเหนือและ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่าผักหนอก ส่วนภาคใต้เรียกว่าผักแว่น นอกจากนี้ยังมีชื่อท้องถิ่นอื่นๆ ว่าผักหนอก จำปาเครือ หรือกะบังนอก (ไทย-ลำปาง) ผักแว่น (เหนือ ตะวันออก) มั่นทุงกะบรรณิ (สันสกฤต) เตี้ยกัเข้า อัมคัก (ประเทศจีน) ปะหนะ เอชา เตาะ (กระเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) (สิริลักษณ์, 2548) บัวบกเป็นพืชผักสมุนไพรชนิดหนึ่ง (มูลนิธิสุขภาพไทย, 2547; Das and Mallick, 1991; Zainol *et al.*, 2003) และที่พบสารเอเชียติโคไซด์ (asiaticoside) ในใบ (Luangchonlathan *et al.*, 2004) ซึ่งมีลำต้นทอดเลื้อยตามพื้นดิน มีใบแบบเดี่ยว ขอบใบลักษณะหยัก ปลายใบ กลม ใบเกิดเป็นกลุ่มจำนวน 2-10 ใบ เส้นใบยุบ จากด้านบนเห็นได้ชัดเจน ผิวใบด้านล่างเรียบและมีขนสั้นๆ เล็กน้อย (Brikhaus *et al.*, 2000) คนไทย

¹⁻³ นักศึกษาหลักสูตรครุศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย

⁴ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์

⁵ อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย

นิยมบริโภคบัวบกมานานแล้ว โดยบริโภคในรูปของ ผักสด เป็นผักเครื่องเคียงกับอาหารประเภทต่างๆ เช่น ขนมจีน น้ำพริก ผัดไท ลาบ (พรรณิภา, 2542) คณะผู้วิจัยได้เลือกใบบัวบกจากแหล่งปลูกจังหวัดเลย หมู่บ้านผาแบ่น ตำบลบุสม อำเภอยางตลาด จังหวัดเลย มีลักษณะ เป็นใบเดี่ยวมีใบขนาดเล็ก คล้ายรูปไต ค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ใบเฉลี่ย 4.60 เซนติเมตร ขอบใบแบบจักซี่ฟันหรือ หยักมนสม่ำเสมอ โคนใบเว้าลึก ใบเรียงตัวเป็น กระจุยซ้อนเหลื่อมกัน จำนวน 15-20 ใบต่อด้าน ก้าน ใบสีเขียวอมม่วง ยาวเฉลี่ย 11.40 เซนติเมตร ดอก ออกที่ซอกใบ จำนวน 3-4 ดอก ผลย่อย จำนวน 2 ผล บางส่วนแยกจากกันเมื่อผลแก่ โหลสีม่วงแดง ความยาวโหลเฉลี่ย 6.10 เซนติเมตร และมีปริมาณสารเอเชียติโคไซด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของบัวบกอยู่มาก

สารสำคัญในบัวบก คือ asiaticoside ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดจากใบบัวบกที่ให้ปริมาณสารสกัดแห้ง เป็นวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ปริมาณสารสกัดแห้ง และสาร asiaticoside ที่สูง สารสำคัญที่สูง เป็นพืชสมุนไพรที่ให้สารในกลุ่มไตรเทอเพนอยด์ ไกลโคไซด์ (Triterpenoid glycoside) หลายชนิด เช่น กรดเอเชียติก (Asiatic acid) สารเอเชียติโคไซด์ (Asiaticoside) และกรดแมดิแคสซิก (Madecassic acid) หรือ สารแมดิแคสซอล (Madecassol) ที่ให้ผลด้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Antioxidation) ซึ่งส่งผล ในการลดความเสื่อมของเซลล์ อวัยวะต่างๆ ของร่างกายได้ และยังพบว่าสารไกลโคไซด์เหล่านี้ยังช่วยเร่งการสร้างสาร คอลลาเจน (Collagen) ที่เป็นโครงสร้างของผิวหนัง จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการกระตุ้นให้แผลสมานตัวได้เร็ว อีกทั้ง มีรายงานว่าใบบัวบกมีประโยชน์ทางการแพทย์มากมาย ได้แก่ ช่วยบำรุงประสาทและความจำ บำรุงหัวใจ บำรุงตับ บำรุงไต และสมอง ช่วยขับปัสสาวะ รักษาบาดแผล แผลเปื่อย แก้กโรคเรื้อรัง แก้กิด แก้อาการปวดศีรษะและเป็นไข้ นอกจากนี้บัวบก ยังมีคุณค่าทางอาหารเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีวิตามินหลายชนิด ได้แก่ วิตามินเอ ไทอะมิน (วิตามินบี 1) โรโบฟลาวิน (วิตามินบี 2) ไนอะซิน (วิตามินบี 3) วิตามินซี กรดอะมิโนต่างๆ ได้แก่ แอสพาเทรต กลูตาเมต เซอรีน ทรีโอนีน อะลานีน ไลซีน ฮิสทีดิน และมีธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็กในปริมาณสูงเช่นกัน จึงนับว่าเป็นสมุนไพรที่มีคุณประโยชน์อย่างยิ่ง (จันทร์พร ทองเอกแก้ว, 2556, 70) สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดออกซิเดชัน กระบวนการออกซิเดชันจริงๆ แล้วก็คือกระบวนการรวมตัวกับออกซิเจนนั่นเอง (ตัวอย่างของการรวมกันระหว่างออกซิเจนกับธาตุอื่นเช่น เหล็กรวมกับออกซิเจน ก็เกิดสนิมเหล็ก น้ำมันพืช รวมกับออกซิเจน จะทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืนเป็นต้น) ในความเป็นจริงไม่มีสารประกอบสารใดสารหนึ่งสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้ทั้งหมด เพราะ สารอนุมูลอิสระเองก็มีมากมายหลายประเภท เกิดจากธาตุหลายชนิด เราจึงต้องการสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันในการหยุดกระบวนการออกซิเดชัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายนั้นต้องการและใช้อยู่เป็นประจำ ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี ความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประเภทวิตามินซี เบต้าแคโรทีน แคโรทีนอยด์ รวมถึงสารกลุ่มโพลีฟีนอลิก โดยวิธีที่จะได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ คือ การรับประทานเข้าไปเป็นประจำ

การใช้ประโยชน์จากบัวบกทางด้านเภสัชกรรม และcatalase ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในการต้านการเกิดด้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Anti-Oxidation) ปฏิกิริยาออกซิเดชัน สำหรับการทำงานของ สารอนุมูลอิสระ ทำให้ลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ทำลายสารอนุมูลอิสระ ต่างๆ ได้ เนื่องจากพิษของสารอนุมูลอิสระมีผลทำให้เกิด ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ส่งผลให้เกิด ความผิดปกติกับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในร่างกาย ได้แก่ ไขมัน โปรตีน และนิวคลีโอไทด์ โดยเฉพาะโมเลกุลของ กรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid, PUFA) จะเกิดกระบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ของฟอสโฟลิปิดซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ลิปิด เปอร์ออกไซด์ (lipid peroxide) ที่เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นสารที่ไม่คงตัวและสามารถเปลี่ยนเป็นสารอื่น ได้ เช่น สารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde; MDA) R—CH ดังรูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะส่งผล ให้การทำงานของร่างกายผิดปกติ เกิดการตายของเซลล์ หรือเนื้อเยื่อของอวัยวะภายในร่างกาย ทำให้เกิดโรคเรื้อรัง ต่างๆ ได้แก่ โรคหัวใจ โรคไตวายเรื้อรัง โรคกระเพาะ เป็นต้น ซึ่งระดับของ MDA นั้นสามารถนำมาใช้เพื่อดูภาวะ เครียดออกซิเดชันได้ กล่าวคือ ถ้าปริมาณของ MDA นั้นมีปริมาณมาก แสดงว่าผนังเซลล์มีการสลายเนื่องมาจาก อนุมูลอิสระ โดยมีรายงานการศึกษาของนักวิจัยที่สนับสนุน การค้นพบสารที่เป็นตัวต่อต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant defense) จากสารสกัดบัวบก ได้แก่ Hussin และคณะ ที่ได้ทำการศึกษการให้สารสกัดจากบัวบก ร่วมกับวิตามินอี (a-tocopherol) ในน้ำดื่มแก่หนูทดลอง เป็นเวลา 25 วัน พบว่าระดับ MDA ในเลือดลดลง อันเกิด จากการลดลงของปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันและเพิ่มการ ทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ทำลายสารอนุมูลอิสระ (free radical-scavenging) ได้แก่ superoxide dismutase (SOD) เร่งการสร้างสารคอลลาเจน (Collagen synthesis enhancer) โดยคอลลาเจนจัดเป็นโปรตีนสำคัญของผิวหนัง และอยู่คู่กับโปรตีนที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ อีลาสติน (Elastin) คอลลาเจนมีหน้าที่เหมือนโครงสร้างของผิว และ ทำให้ผิวเต่งตึง อีลาสตินจะมีหน้าที่สร้างความยืดหยุ่นให้ กับผิว และทำให้ผิวที่เป็นโครงสร้างของผิวหนังไม่มีริ้วรอย ช่วยรักษาแผล รอยเหี่ยวย่น และลดการอักเสบ สารสกัดจากใบบัวบกจึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการกระตุ้นให้แผล สมานตัวได้เร็วขึ้น มีรายงานจากนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน ได้ศึกษาการนำสารสกัดจากใบบัวบกที่ชื่อ เอเชียติโคไซด์ มาทดสอบความสามารถในการรักษาแผลเมื่อทาภายนอก ที่ความเข้มข้นเพียง 0.2%

สามารถให้ผลในการเร่งการ สมานแผลหรือช่วยทำให้แผลหายเร็วขึ้น โดยผ่าน กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเร่งให้เซลล์มีการสร้างเส้นใยคอลลาเจน (Collagen Synthesis) และเร่งการสร้าง ซ่อมแซมเส้นเลือดที่เสียหายไป (Angiogenesis) ให้กลับ คืนมาด้วยประโยชน์ดังกล่าว บัวบก จึงถูกนำมาใช้เพื่อรักษาแผลร้อนในในปากได้ ช่วยเพิ่มการไหลเวียนของเส้นเลือดฝอยและการ แลกเปลี่ยนออกซิเจนต่อเนื่องเยื่อ ทำให้ลดความเสี่ยงของ การบวม อักเสบในผู้สูงอายุที่มีแรงดันในเส้นเลือดต่ำสูง หรือลดอาการโรคเลือดคั่งที่ทำให้ขาบวมในผู้ที่เดินทาง นานๆ ในรถหรือเครื่องบิน โดยมีคณะแพทย์ และ นักวิทยาศาสตร์ในสหรัฐอเมริกาได้ทำการทดลองใช้สาร สกัดจากใบบัวบก (Titrated extract of *Centella asiatica* ; TECA) ให้กับคนไข้ที่มีปัญหาเรื่องของระบบไหลเวียน เลือดที่มีต่อเท้าและขา (Lower Limb) จนเกิดภาวะเจ็บปวด จำนวน 94 คน โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยที่ให้ TECA ในปริมาณวันละ 120 มิลลิกรัม และ 60 มิลลิกรัม และกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ให้สารสกัดดังกล่าว (Con blind) แต่ให้สารอื่นๆ ที่ไม่มีตัวยาแทน (Placebo) ผลการทดลองพบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับสารสกัดจากใบบัวบก มีอาการ เจ็บปวดเท้าและขา น้อยลง และมีอาการบวมลดลง อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดดังกล่าว มีอาการของโรครุนแรงขึ้น ดังนั้นจึงไม่น่า สงสัยเลยว่าทำไมคนไทยจึงนิยมที่จะดื่มน้ำต้มจากใบบัวบก เพื่อแก้ปัญหาลูกเขี้ยว เนื่องจากปัญหาลูกเขี้ยว นั้นเกิดจากเส้นเลือดแดงขนาดเล็กถูกทำลายจากการ กระแทกทำให้เกิดการคั่งของเลือด และหากระบบไหลเวียน ของเลือดบริเวณดังกล่าว ถูกปรับปรุงก็จะทำให้ภาวะฟกช้ำ ดำเขียวหรือเจ็บปวดหายไป นอกจากนี้สรรพคุณจากตัวอย่างผลการวิจัยดังกล่าว ช่างต้นแล้ว ยังพบว่าสารสกัดจากใบบัวบกสามารถให้ สรรพคุณที่เกิดต่อเนื่องจากการปรับปรุงระบบไหลเวียน โลหิตและหลอดเลือดอื่นๆ อีกมากมาย เช่น สามารถป้องกัน ภาวะความจำเสื่อม (โรคอัลไซเมอร์) ป้องกันภาวะ สมองขาดเลือดไปหล่อเลี้ยง บำรุงสมอง ทำให้มีความคิด อ่านดีขึ้นได้ แต่ยังเป็นการทดลองในระดับสัตว์ทดลอง เช่น งานวิจัยของ Veerendra and Gupta ได้ทำการศึกษา ผลของสารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 100, 200 and 300 mg/kg ต่อการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในหนูทดลอง ที่ได้รับสาร Intracerebroventricular (i.c.v.) streptozotocin (STZ) ซึ่งเป็นสารที่เป็นตัวแปรที่บ่งบอกถึงความชรา ปริมาณ 3 mg/kg, i.c. ในวันที่ 1 และ 3 ของการทดลอง จากนั้นได้ให้สารสกัดใบบัวบกแก่หนูเป็นเวลา 21 วัน เมื่อครบถึงวันที่ 21 ของการทดลอง จึงนำสารสกัดจากสมอง ของหนูทดลองมาวิเคราะห์ปริมาณ MDA, glutathione, Superoxide dismutase และ catalase ที่เป็นตัวแปรในการ เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันพบว่าสารสกัดใบบัวบกที่ความเข้มข้น 200 and 300 mg/kg สามารถลดระดับของการเกิด MDA และเพิ่มปริมาณของ glutathione และ catalase ซึ่ง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากบัวบกสามารถลดการเกิดภาวะ เครียดออกซิเดชันที่เกิดจาก i.C.V. STZ ได้ คุณค่าทางโภชนาการต่อสุขภาพ ใบบัวบกถูกนำมาเป็นผักสด แก่แก้มอาหารหลาย ประเภท ได้แก่ หมี่กรอบ ก๋วยเตี๋ยวผัดไทย แกงเผ็ด ลาบ ก้อย และน้ำพริกต่างๆ ใบบัวบก 100 กรัม ให้พลังงาน 44 กิโลแคลอรี ประกอบด้วย โปรตีน 1.8 กรัม ไขมัน 0.9 กรัม คาร์โบไฮเดรต 7.1 กรัม เส้นใย 2.6 กรัม แคลเซียม 146 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 30 มิลลิกรัม เหล็ก 3.9 มิลลิกรัม วิตามินเอ 10,962 วิตามินบี 1 0.24 มิลลิกรัม วิตามิน บี 2 0.09 มิลลิกรัม ไนอะซิน 0.8 มิลลิกรัม และวิตามินซี 4 มิลลิกรัม จะเห็นว่าบัวบกเป็นสมุนไพรที่น่าสนใจมาก นอกจากจะมีสารที่มีประโยชน์ทางด้านยารักษาโรคแล้วยังมีคุณค่าโภชนาการสูงอีกด้วย ดังนั้นการบริโภคใบบัวบก เป็นอาหารและเป็นเครื่องดื่มจะส่งผลดีต่อร่างกาย เป็นอย่างยิ่ง (จันทร์พร ทองเอกแก้ว, 2556, 71-74) จากการท้าววิจัยจะได้ฐานข้อมูลการผลิตบัวบก เพื่อให้นักวิจัยนำไปพัฒนาต่อในงานวิจัยด้านอื่นๆ ต่อไป เช่น การวิจัยพัฒนาเสริมจากสารสกัดบัวบก

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณฟลีโนลิกรัมของสารสกัดใบบัวบก
2. เพื่อศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดใบบัวบก
3. เพื่อศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบบัวบก

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างผักใบบัวบก ใบบัวบก ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Centella asiatica* Urban. จากพื้นที่ บ้านผาแบ่น อำเภอยางตลาด จังหวัดเลย โดยมีการเตรียมตัวอย่างผักใบบัวบกเริ่มจากนำใบบัวบก มาล้างทำความสะอาด เด็ดใบออกจากก้าน แล้วนำมาอบในตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 2 ชม. แห้งที่ได้มาบดให้ละเอียด ซึ่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง จำนวน 10 กรัม สกัดโดยใช้ตัวทำละลายในสารสกัด คือ Ethanol 80% สกัดด้วยคลื่นเสียง 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไประเหยทำตัวละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจะได้สารสกัดหยาบเก็บสารสกัดในขวดเก็บสารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง

2. วิธีทำการทดลอง

- 2.1 นำใบบัวบก มาล้างทำความสะอาด
- 2.2 นำใบบัวบกมาอบในตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

- 2.3 นำใบบวบกแห้งที่ได้มาบดให้ละเอียด
- 2.4 ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง จำนวน 10 กรัม
- 2.5 สกัดโดยใช้ตัวทำละลายในสารสกัด คือ Ethanol 80% สกัดด้วยคลื่นเสียง 30 นาที
- 2.6 นำสารละลายที่ได้ไประเหยทำตัวละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจะได้สารสกัดหยาบเก็บสารสกัดในขวดเก็บสารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง
- 2.7 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของใบบวบด้วยวิธี DPPH
 - 2.7.1 ปิเปต 1×10^{-4} M ของสารละลาย DPPH มา 1 มิลลิลิตร
 - 2.7.2 ปิเปตสารละลายของใบบวบ ที่มีความเข้มข้น ลงในหลอดทดลองใน ข้อ 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยหลอดที่เป็นที่ control ใช้เอทานอลแทนสารละลายของใบบวบ
 - 2.7.3 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm
 - 2.7.4 นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้ง ดังสมการ และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC₅₀)
- 2.8 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของใบบวบด้วยวิธี ABTS
 - 2.8.1 เตรียมอนุมูลอิสระ ABTS โดยผสม ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ กับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ อัตราส่วน 1:1 ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
 - 2.8.2 เจือด้วยเมทานอล เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ประมาณ 0.70 ± 0.03
 - 2.8.3 จากนั้นนำสารผสมที่เตรียมได้ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายตัวอย่างใบบวบที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครลิตร
 - 2.8.4 ตั้งไว้ในที่มืดที่มีอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
 - 2.8.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC₅₀)
- 2.9 การทดสอบวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric
 - 2.9.1 นำตัวอย่างสารสกัดใบบวบมาละลายด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL แล้วปิเปตสารละลาย ปริมาตร 20 μ L ใส่ใน 96 well-microplate
 - 2.9.2 เติมสารละลาย 7.5 % Na₂CO₃ ปริมาตร 80 μ L
 - 2.9.3 ตั้งไว้ในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
 - 2.9.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm
- 2.10 การทดสอบวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธีการของ Zhu et al. (2010)
 - 2.10.1 นำตัวอย่างสารสกัดใบบวบมาละลายด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL
 - 2.10.2 นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 500 μ L ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติม 5 % NaNO₂ ปริมาตร 75 μ L ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 6 นาที
 - 2.10.3 เติม 10 % AlCl₃ ปริมาตร 150 μ L ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที
 - 2.10.4 เติม 1M NaOH ปริมาตร 500 μ L สุดท้ายเติมน้ำกลั่นปริมาตร 275 μ L เขย่านาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปิเปตสารละลายลงใน 96 well-microplate ปริมาตร 200 μ L
 - 2.10.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้คาเทชินเป็นสารมาตรฐาน

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาวิจัยเรื่องการทดลองการต้านอนุมูลอิสระของใบบวบ ผู้วิจัยได้นำข้อมูลจากการทดลองจำนวน 4 การทดลอง โดยมีการนำเสนอผลการวิเคราะห์ข้อมูลดังต่อไปนี้

การวิเคราะห์ข้อมูล และการแปลผลการวิเคราะห์ข้อมูลการศึกษางานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป ในการประมวลผลข้อมูล ผู้ทำการได้วิเคราะห์และนำเสนอ ในรูปแบบของตารางประกอบคำอธิบาย โดยเรียงลำดับหัวข้อการวิเคราะห์ข้อมูลเป็น 4 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของใบบวบด้วยวิธี DPPH

การทดลองที่ 2 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของใบบวบด้วยวิธี ABTS

การทดลองที่ 3 การทดสอบวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric
การทดลองที่ 4 การทดสอบวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธีการของ Zhu et al. (2010)

4. ผลการทดลอง

- 4.1 การต่อต้านอนุมูลอิสระของใบบัวบกโดยใช้วิธี DPPH สารมีการต้านอนุมูลอิสระอย่างชัดเจน ความเข้มข้นของสารตัวอย่างใบบัวบก 3,020 – 7,550 mg/L มีฤทธิ์ยับยั้ง 39.88 – 57.11 %
- 4.2 การต่อต้านอนุมูลอิสระของใบบัวบกโดยใช้วิธี DPPH สารมีการต้านอนุมูลอิสระอย่างชัดเจน ความเข้มข้นของสารสกัด Gallic 0 – 1.33 mg/L มีฤทธิ์ยับยั้ง 0 – 62.77 %
- 4.3 การต่อต้านอนุมูลอิสระของใบบัวบกโดยใช้วิธี DPPH สารมีการต้านอนุมูลอิสระอย่างชัดเจน ความเข้มข้นของสารสกัด Quercetin 0.35 - 1.33 mg/L มีฤทธิ์ยับยั้ง 46.24 – 61.38 %
- 4.4 การต่อต้านอนุมูลอิสระของใบบัวบกโดยใช้วิธี ABTS สารมีการต้านอนุมูลอิสระอย่างชัดเจน ความเข้มข้นของสารตัวอย่างใบบัวบก 3,020 – 7,550 mg/L มีฤทธิ์ยับยั้ง 3.468 – 27.167 %
- 4.5 การต่อต้านอนุมูลอิสระของใบบัวบกโดยใช้วิธี ABTS สารมีการต้านอนุมูลอิสระอย่างชัดเจน ความเข้มข้นของสารสกัด Gallic 0.67 – 1.67 mg/L มีฤทธิ์ยับยั้ง 35.65 – 37.98 %
- 4.6 การต่อต้านอนุมูลอิสระของใบบัวบกโดยใช้วิธี ABTS สารมีการต้านอนุมูลอิสระอย่างชัดเจน ความเข้มข้นของสารสกัด Quercetin 0.67 - 1.67 mg/L มีฤทธิ์ยับยั้ง 15.06 – 44.29 %
- 4.7 การต่อต้านอนุมูลอิสระของใบบัวบกโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric สารมีการต้านอนุมูลอิสระอย่างชัดเจน ความเข้มข้น 20 - 80 mg/L ค่าความดูดกลืนแสง 1.867 – 3.11
- 4.8 สารตัวอย่างใบบัวบกมีปริมาณฟีนอลิกรวมเฉลี่ยเท่ากับ 16.529 mg/L
- 4.9 การต่อต้านอนุมูลอิสระของใบบัวบกโดยใช้วิธี Zhu et al. (2010) สารมีการต้านอนุมูลอิสระอย่างชัดเจน ความเข้มข้น 20 - 80 mg/L ค่าความดูดกลืนแสง 1.360 – 2.014
- 4.10. สารตัวอย่างใบบัวบกมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเฉลี่ยเท่ากับ 26.26 mg/L

อภิปรายผล

1. จากการทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักใบบัวบก สายพันธุ์ของจังหวัดเลย

ในเอทานอลโดยวิธี DPPH assay ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร วิธี ABTS assay วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร นอกจากนี้ผู้วิจัยยังคำนวณหาปริมาณสารสำคัญ 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มฟีนอลิกจะใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic และกลุ่มฟลาโวนอยด์จะใช้วิธี Zhu et al. (2010) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน Quercetin พบว่าในสารสกัดใบบัวบกมีปริมาณฟีนอลิกรวมเฉลี่ยเท่ากับ 16.529 mg/L ส่วนฟลาโวนอยด์รวมเฉลี่ยเท่ากับ 26.26 mg/L

2. จากการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของใบบัวบก จากการวิเคราะห์สามารถสรุปได้ดังนี้

2.1 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของใบบัวบก พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีผลแตกต่างกันทำได้โดยการเจือจางสารสกัดหลายความเข้มข้นจำนวน 4 ความเข้มข้นแล้วทดสอบหาร้อยละการยับยั้งของอนุมูล DPPH พบว่าเมื่อมีความเข้มข้นมากขึ้นสารสกัดใบบัวบกจะมีร้อยละการยับยั้งมากขึ้น เมื่อคำนวณหา IC_{50} สารสกัดใบบัวมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5715.675 mg/L สำหรับค่ามาตรฐาน Gallic และ Quercetin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.465 mg/L และ 0.999 mg/L

2.2 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ของใบบัวบก พบว่าพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS มีผลแตกต่างกันทำได้โดยการเจือจางสารสกัดหลายความเข้มข้นจำนวน 4 ความเข้มข้นแล้วทดสอบหาร้อยละการยับยั้งของอนุมูล ABTS พบว่าเมื่อมีความเข้มข้นมากขึ้นสารสกัดใบบัวบกจะมีร้อยละการยับยั้งมากขึ้น เมื่อคำนวณหา IC_{50} สารสกัดใบบัวมีค่า IC_{50} เท่ากับ 13198.541 mg/L สำหรับค่ามาตรฐาน Gallic และ Quercetin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.916 mg/L และ 1.925 mg/L

ข้อเสนอแนะ

1. การเลือกใบบัวบกในการสกัด ควรเลือกใบบัวบกที่สด ใหม่ ควรทำความสะอาด เด็ดใบออกจากตัวก้าน และเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดควรทำการสกัดใบบัวบกในช่วงฤดูที่ให้ผลผลิต
2. ขั้นตอนของการระเหยตัวทำละลายออก ควรกำจัดตัวทำละลายออกให้หมด รวมถึงความชื้นด้วย เพื่อให้การชั่งน้ำหนักไม่เกิดการผิดพลาดและได้น้ำหนักที่แท้จริงของสารสกัด

3. วิธีการสกัดอาจเปลี่ยนไปใช้วิธีอื่นได้ เช่น วิธีการแช่ วิธีการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงร่วมด้วยในการสกัด วิธีการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมด้วยในการสกัด เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ และ สมจิตต์ ปาละภาศ. (2557). การตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาใบขลุ่ย และผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อ ความสามารถในการออกฤทธิ์. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- จันทร์พร ทองเอกแก้ว. (2556). บัวบกสมุนไพรมาคุณประโยชน์. อุบลราชธานี: มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
- ชัชวิน เพชรเลิศ. (2562). ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันของส่วนสกัดเอทานอลจากข้าวสาลีต่างๆ. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา
- นิคม นาคสุพรรณ. (2555). เครื่องดื่มสมุนไพรและไวน์ไทยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ประนอม ใจอ้าย, มณฑิรา ภูติวรนาถ, พรรณพิมล สุริยะพรหมชัย, คณิศร มนุษย์สม และ สากล มีสุข. (2556). การคัดเลือกพันธุ์บัวบกที่ให้ผลผลิตและสารสำคัญสูงในพื้นที่ภาคเหนือและภาคกลาง.แพร่: ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตร.
- พรรณนิภา. (2542). การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของบัวบกสายพันธุ์ต่างๆ. <<https://li01.tci-thaijo.org/index.php/tjst/article/download/165784/119953/462923>>
- พาณี ศิริสะอาด. (2564). ชนิดของใบบัวบก. <<https://hd.co.th/asiatic-pennywort-drink-helps-bruising>> (สืบค้นเมื่อ 10 มิถุนายน 2565).
- ลาวिता. (2561). งานวิจัยสารสกัดใบบัวบก. <<https://www.lavitathailand.com/2018/04/research/สารสกัดใบบัวบก-และ\สรรพค/>> (สืบค้นเมื่อ 10 มิถุนายน 2565).