



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
THE THAILAND RESEARCH FUND

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การวิจัยสารต้านอนุมูลอิสระจากสมุนไพรไทย”
(Research of Antioxidant from Thai Medicinal Plants)

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร โอโกโนกิ และคณะ

เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การวิจัยสารต้านอนุมูลอิสระจากสมุนไพรไทย”

คณะผู้วิจัย สังกัด

- | | |
|------------------------------|--|
| 1. รศ. ดร. ศิริพร โอโณนิก | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 2. ผศ. ดร. ชฎารัตน์ ดวงรัตน์ | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 3. ผศ. ดร. สมบัติ เขาวนพูนผล | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 4. อ. ดร. ทรงยศ อนุชปรีดา | คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย

สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
Executive Summary	ii
สารบัญตาราง	vi
สารบัญรูปภาพ	ix
บทคัดย่อภาษาไทย	xi
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	xiii
บทที่	
1. บทนำ	1
2. การทดลอง	10
3. ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล	31
4. สรุปผลการทดลอง	123
เอกสารอ้างอิง	125
ภาคผนวก ก Standard Curve ของ Gallic Acid	138
ภาคผนวก ข ผลการศึกษาสารสกัดทั้ง 43 ตัวอย่าง โดย DPPH Method	140
ภาคผนวก ค ผลการศึกษา Cytotoxicity ต่อ PBMC ของสารสกัดทั้ง 43 ตัวอย่าง	156
ภาคผนวก ง ผลการศึกษา Cytotoxicity ต่อ Caco-2 ของสารสกัดทั้ง 43 ตัวอย่าง	172
ภาคผนวก จ Reprint เรื่อง Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels	188
ภาคผนวก ฉ Reprint เรื่อง Antioxidant Active Principles Isolated from <i>Psidium guajava</i> Grown in Thailand	198
ภาคผนวก ช Reprint เรื่อง Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract	214

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่สนับสนุนงบประมาณสำหรับโครงการวิจัยนี้ ภายใต้งบวิจัยพื้นฐานแบบกำหนดทิศทางเคมีทางยา (Direct Basic Research, DBG) พ.ศ. 2547

Executive Summary

ชื่อโครงการ	Research of Antioxidant from Thai Medicinal Plants
ชื่อหัวหน้าโครงการ	รศ. ดร. ศิริพร โอโกโนกิ
หน่วยงานที่สังกัด	สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ Antioxidant จากสารสกัดพืชสมุนไพร
2. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร
3. เพื่อสกัดแยกบริสุทธิ์ (Purification) และศึกษาสูตรโครงสร้าง (Structure Elucidation) ของสารที่ให้ฤทธิ์ Antioxidant สูงสุด
4. เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารออกฤทธิ์สำคัญที่แยกได้

สิ่งที่ได้ดำเนินและที่ค้นพบ

ได้เริ่มทำการวิจัยโดยการเก็บรวบรวมพืชสมุนไพร มาได้ทั้งหมด 26 ชนิด ส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการศึกษาในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เช่นพืชบางชนิดใช้เฉพาะส่วนใบ บางชนิดใช้ส่วนของใบและลำต้น บางชนิดใช้ส่วนของเปลือกผลหรือเมล็ด เป็นต้น การเลือกชนิดพืชและส่วนของพืชที่ใช้ในการวิจัยนี้ เลือกมาจาก 3 วิธี คือ 1) Random sampling คือหาง่าย / มีปริมาณมาก / เป็นของเหลือใช้ 2) Chemotaxonomic approach คือเลือกที่มีรายงานว่ามียาฤทธิ์ Antioxidant และ 3) Ethnopharmacological information คือได้รับข้อมูลจาก local knowledge ในการนี้จึงทำให้ได้ตัวอย่างที่จะนำมาศึกษา รวมทั้งสิ้นจำนวน 43 ชนิด ได้นำตัวอย่างทั้ง 43 ชนิดมาเตรียมสารสกัดหยาบโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่าได้สารสกัดหยาบในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยมีค่า %yield อยู่ในช่วง 0.46 – 17.52 % ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและส่วนที่นำมาใช้ สารสกัดหยาบทั้ง 43 ชนิดถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ Antioxidant โดยใช้ 4 วิธี คือ 1) DPPH method, 2) ABTS method, 3) Lipid peroxidation method และ 4) FRAP method ค่าชี้วัดฤทธิ์ antioxidant ของแต่ละวิธี คือ IC_{50} , TEAC, Antioxidant Activity (AA), และ Equilibrium Concentration (EC) ตามลำดับ โดยที่ค่า IC_{50} ถ้าต่ำแสดงถึงฤทธิ์ Antioxidant สูง ส่วนค่าอื่น ๆ ยิ่งสูงแสดงถึงฤทธิ์ Antioxidant ยิ่งแรง ผลการทดลองพบว่าสารสกัดแต่ละชนิดมียาฤทธิ์ Antioxidant แตกต่างกัน เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวไปทดสอบความเป็นพิษต่อ

เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC) ของคน และ Caco-2 cell ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใหญ่ไม่เป็นพิษต่อ PBMC ยกเว้นสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุด ใบรางจืด และใบฟ้าทะลายโจร ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ PBMC ได้อย่างชัดเจน โดยมีค่า $IC_{50} = 4.9, 5.3$ และ 8.6 mcg/ml ตามลำดับ ส่วนผลต่อ Caco-2 cell พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใหญ่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ Caco-2 cell ยกเว้นสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่สามารถยับยั้งได้ โดยมีค่า $IC_{50} = 32$ mcg/ml จากผลของการศึกษาฤทธิ์ Antioxidant พบว่านอกจากสารสกัดหยาบทั้ง 43 ชนิดจะแสดงฤทธิ์ Antioxidant แตกต่างกันไปแล้ว ยังแสดงกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างกันไปด้วย เช่น สารสกัดจากใบฝรั่งแสดงฤทธิ์โดยไปยับยั้งอนุมูลอิสระ (ABTS free radical) ได้สูงสุดในขณะที่มีกลไกการยับยั้ง lipid peroxidation น้อยกว่าสารสกัดจากใบทับทิม, ใบสระแหน่, ลำต้นฟ้าทะลายโจร, ใบกะเพรา และฝักระถิน ส่วนสารสกัดจากเปลือกมังคุดแสดงฤทธิ์ Antioxidant โดยไปต้าน oxidized intermediate product ได้สูงที่สุด (ดูจากค่า EC มากที่สุด) แต่พบว่ามีกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ABTS free radical) น้อยกว่าสารสกัดจากใบฝรั่ง, เปลือกทับทิม, ใบทับทิม และเปลือกเงาะ เป็นต้น ดังนั้นในการพิจารณาคัดเลือกส่วนและชนิดพืชสมุนไพรเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป จึงพิจารณาจากกลไกใดกลไกหนึ่งเป็นสำคัญและใช้กลไกอื่นเป็นปัจจัยเสริม กลไกหลักที่ใช้ในการพิจารณาในครั้งนี้คือกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอนุมูลอิสระ ABTS เนื่องจากการศึกษาด้วยวิธี ABTS ทำได้สะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ นอกจากนั้นได้ใช้ Criteria อื่น ๆ ร่วมพิจารณาด้วย เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (สารสกัดที่เลือกต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์ หรือเป็นพิษน้อยที่สุด) % yield ของสารสกัด ความยากง่ายในการสกัดและการเตรียมตัวอย่าง รวมถึงความยากง่ายในการจัดหาสมุนไพรเหล่านั้นด้วย เช่น ใบฝรั่ง ใบทับทิม และเปลือกผลทับทิม มีฤทธิ์ antioxidant สูง และหาได้ง่าย เนื่องจากพบทั่วไปทางภาคเหนือของประเทศ เก็บได้ตลอดฤดูกาล จึงถูกคัดเลือก ส่วนพืชบางชนิดแม้มีฤทธิ์ antioxidant สูง แต่ไม่ถูกเลือก เช่น เปลือกผลมังคุด และเปลือกผลเงาะ เนื่องจากไม่ได้เป็นพืชท้องถิ่น(ทางภาคเหนือ) มีราคาแพงและออกเฉพาะบางฤดู เป็นช่วงสั้น ๆ เช่น ช่วงเดือนมิถุนายน – กรกฎาคม เท่านั้น ส่วนลำไยและกล้วยแม้จะเป็นพืชท้องถิ่น (ทางภาคเหนือ) แต่ส่วนที่นำมาใช้สกัดเตรียมได้ยากมาก เช่น เมล็ดลำไยใช้เฉพาะส่วนเปลือกหุ้มเมล็ด (สีน้ำตาลดำ) เท่านั้น ส่วนเปลือกกล้วยใช้เฉพาะส่วนเปลือกนอกสีเขียวเท่านั้น อีกทั้ง % yield ได้น้อย จึงไม่ถูกเลือก

จาก Criteria ดังกล่าว ส่วนของพืช 5 ชนิดคือ ใบฝรั่ง ใบสระแหน่ เปลือกผลทับทิม ใบทับทิม และใบรางจืด จึงถูกเลือกเพื่อนำมาศึกษาต่อไป โดยทำการเตรียมสารสกัดแยกส่วนของพืชทั้ง 5 ตัวอย่าง โดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่าง ๆ กัน ได้แก่ n-Hexane, Ethyl acetate, n-Butanol, และ Methanol จึงได้สารสกัดแยกส่วนทั้งหมด 20 ชนิด สารสกัดแยกส่วนที่ได้ มีความบริสุทธิ์มากกว่า

สารสกัดหยาบที่ได้ในตอนแรก ได้นำสารสกัดทั้ง 20 ชนิดมาตรวจสอบ tannin, flavonoids, และ total phenolic content พบว่าสารสกัดแยกส่วนจาก methanol ของส่วนของพืชทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณ tannin และ total phenolic content สูง สารสกัดแยกส่วนแต่ละชนิดมีองค์ประกอบของ flavonoid ชนิดต่าง ๆ แตกต่างกัน เมื่อนำสารสกัดแยกส่วนทั้ง 20 ชนิดมาศึกษาโดย spectroscopy ในช่วงคลื่น UV และ IR พบว่าสารสกัดแยกส่วนเหล่านั้นประกอบด้วย functional group ต่าง ๆ กัน เช่น hydroxyl group และ aromatic compounds เป็นต้น ได้นำสารสกัดแยกส่วนทั้ง 20 ชนิด มาทดสอบฤทธิ์ Antioxidant ผลการทดลองพบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบทับทิม ใบฝรั่ง และเปลือกผลทับทิม มีฤทธิ์ ฤทธิ์ Antioxidant สูงที่สุดโดยเฉพาะส่วนของสารสกัดแยกส่วนที่ได้จาก methanol จากการศึกษาปริมาณ total phenolic content ในสารสกัดพบว่าสารสกัดแยกส่วนทั้งสามนี้มีปริมาณ total phenolic content สูงที่สุดเช่นกัน จึงพิจารณาว่า total phenolic content ที่มีอยู่ในสารสกัดแยกส่วนเหล่านี้มีอิทธิพลต่อฤทธิ์ Antioxidant เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบทับทิมและเปลือกผลทับทิมมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปรกติ ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกใบฝรั่งซึ่งสารสกัดแยกส่วนแสดงฤทธิ์ Antioxidant สูงที่สุด และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปรกติ ไปทำการแยกสารออกฤทธิ์

การแยกสารออกฤทธิ์จากใบฝรั่งได้ทำโดย Repeated Column Chromatography ที่ปรับเปลี่ยนสถานะทั้ง Stationary phase และ Mobile phase จนกระทั่งได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด เรียกว่า สาร 1, 2 และ 3 ได้ทำการหาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิด โดย MS, IR, NMR พบว่าสารทั้งสามคือ Quercetin, Morin และ Quercetin-3-O-glucopyranoside ตามลำดับ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ Antioxidant ของสารทั้งสามที่แยกได้นี้ พบว่าสาร 1 หรือ Quercetin มีฤทธิ์ Antioxidant มากที่สุดและไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปรกติ

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าในบรรดาสมุนไพรไทยที่นำมาศึกษาทั้งหมด ฝรั่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด เนื่องจากให้สารที่มีฤทธิ์ Antioxidant สูงที่สุด ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารที่ได้มาจากส่วนของใบฝรั่ง เป็นสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปรกติ สารดังกล่าวมีชื่อว่า Quercetin

ผลงานที่ได้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- 1 Siriporn Okonogi, Suganya Tachakittirungrod, Sombat Chowwanapoonpohn, Songyot Anuchpreeda, and Chadarat Duangrat. (2007). Comparison of Antioxidant Capacity and Cytotoxicity of Certain Fruit Peels. Food Chemistry 103, 839-846.
- 2 S. Tachakittirungrod, S. Okonogi, and S. Chowwanapoonpohn. (2007). Comparative Study on Antioxidant Activity of Certain Plants in Thailand: Mechanism of Antioxidant Action of Guava Leaf Extract. Food Chemistry 103, 381-388.
- 3 Suganya Tachakittirungrod, Fumio Ikegami, and Siriporn Okonogi (2007). Antioxidant Active Principles Isolated from *Psidium guajava* Grown in Thailand. Scientia Pharmaceutica (Sci. Pharm.) 179-193.

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1-1 แสดงชื่อพืชสมุนไพรทั้ง 26 ชนิด ที่ทำการศึกษา	4
2-1 แสดงส่วนของพืชสมุนไพรที่นำมาเตรียมสารสกัดหยาบ	11
2-2 แสดงสารสกัดแยกส่วนของสมุนไพรที่คัดเลือก	20
2-3 แสดงรายละเอียดของ mobile phase ที่ใช้กับ HPLC	25
3-1 แสดง % yield ของสารสกัดหยาบ	31
3-2 แสดงฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัดทดสอบโดยวิธี ABTS	34
3-3 แสดงฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัดทดสอบโดยวิธี DPPH	36
3-4 แสดงฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัดทดสอบโดยวิธี FRAP	38
3-5 แสดงฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัดทดสอบโดยวิธี Lipid peroxidation	40
3-6 ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (PBMC) ของคน	43
3-7 แสดงฤทธิ์ต้าน Caco-2 cell ของสารสกัดหยาบ	45
3-8 แสดง % Yield ของสารสกัดแยกส่วนของสมุนไพรที่คัดเลือก	49
3-9 แสดงผล Phenolic and Tannin Test	50
3-10 แสดงผล Flavonoids Test	51
3-11 แสดงผล Total phenolic compounds	52
3-12 แสดงผล UV absorption	54
3-13 แสดงตำแหน่งของ IR spectrum ของ Methanol extract	61
3-14 แสดงตำแหน่งของ IR spectrum ของ Butanol extract	62
3-15 แสดงตำแหน่งของ IR spectrum ของ Ethyl acetate extract	63
3-16 แสดงตำแหน่งของ IR spectrum ของ Hexane extract	64

ตารางที่	หน้า
3-17 แสดงฤทธิ์ Antioxidant ของสารสกัดแยกส่วน โดยวิธี DPPH	71
3-18 แสดงฤทธิ์ Antioxidant ของสารสกัดแยกส่วน โดยวิธี ABTS	72
3-19 แสดงฤทธิ์ Antioxidant ของสารสกัดแยกส่วน โดยวิธี FRAP	73
3-20 แสดงฤทธิ์ Antioxidant ของสารสกัดแยกส่วน โดยวิธี Lipid peroxidation	74
3-21 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบสาระแนต่อ PBMC	75
3-22 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบฝรั่งต่อ PBMC	75
3-23 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมต่อ PBMC	75
3-24 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบทับทิมต่อ PBMC	76
3-25 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบรางจืดต่อ PBMC	76
3-26 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดแยกส่วนเมื่อทดสอบ Cytotoxicity ต่อ PBMC	83
3-27 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบสาระแนต่อ Caco-2 cell	84
3-28 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบฝรั่งต่อ Caco-2 cell	84
3-29 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมต่อ Caco-2 cell	84
3-30 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบทับทิมต่อ Caco-2 cell	85
3-31 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบรางจืดต่อ Caco-2 cell	85
3-32 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดแยกส่วนเมื่อทดสอบ Cytotoxicity ต่อ Caco-2 cell	85
3-33 แสดงค่า TEAC ของ Fractions ที่ได้จาก SECC	93
3-34 แสดงค่า TEAC ของ Fraction ที่รวมจาก HPLC pattern	98
3-35 แสดงการรวม Fraction ที่ได้จากผลของ TLC	99
3-36 แสดงค่า IC_{50} จาก DPPH Method ของแต่ละตัวอย่าง	100
3-37 แสดงการรวม Fraction C ที่ได้จากผลของ TLC	100
3-38 แสดงการรวม Fraction C-II ที่ได้จากผลของ TLC	101

ตารางที่	หน้า
3-39 แสดงการรวม Fraction D ที่ได้จากผลของ TLC	101
3-40 แสดงการรวม Fraction D-III ที่ได้จากผลของ TLC	102
3-41 แสดงการรวม Fraction D ที่ได้จากผลของ TLC	103
3-42 แสดงการรวม Fraction E-II ที่ได้จากผลของ TLC	103
3-43 แสดงการรวม Fraction E-II-B ที่ได้จากผลของ TLC	103
3-44 แสดงการรวม Fraction E-II-B-b ที่ได้จากผลของ TLC	103
3-45 แสดงค่า Melting point ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้	104
3-46 แสดงผลจาก EI-MS ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้	104
3-47 แสดง IR absorption band ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้	108
3-48 แสดง NMR attribution ของ Quercetin และ Compound 1	111
3-49 แสดง NMR attribution ของ Morin และ Compound 2	112
3-50 แสดง NMR attribution ของ Quercetin-3-O-glucopyranoside และ Compound 3	116
3-51 แสดงค่า IC_{50} ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบฝรั่ง	120
3-52 แสดงค่า TEAC ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบฝรั่ง	120
3-53 แสดงค่า EC ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบฝรั่ง	120
3-54 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของ Compound 1 ต่อ PBMC	121
3-55 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของ Compound 1 ต่อ KB-31 cells	121

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า	
3-1	แสดง UV spectra ของสารสกัดจากใบสระระแห่น	56
3-2	แสดง UV spectra ของสารสกัดจากใบฝรั่ง	57
3-3	แสดง UV spectra ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม	58
3-4	แสดง UV spectra ของสารสกัดจากใบทับทิม	59
3-5	แสดง UV spectra ของสารสกัดจากใบรางจืด	60
3-6	แสดง IR spectra ของสารสกัดจากใบสระระแห่น	65
3-7	แสดง IR spectra ของสารสกัดจากใบฝรั่ง	66
3-8	แสดง IR spectra ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม	67
3-9	แสดง IR spectra ของสารสกัดจากใบทับทิม	68
3-10	แสดง IR spectra ของสารสกัดจากใบรางจืด	69
3-11	แสดง Cytotoxicity ต่อ PBMC ของสารสกัดแยกส่วน	76
3-12	แสดง Cytotoxicity ต่อ Caco-2 cell ของสารสกัดแยกส่วน	86
3-13	แสดง HPLC pattern ของ fraction จาก SECC	94
3-14	แสดง HPLC pattern ของ Fraction ที่รวมได้	98
3-15	แสดง HPLC pattern ของ Quercetin	99
3-16	แสดง IR spectra ของ Compound 1	105
3-17	แสดง IR spectra ของ Compound 2	106
3-18	แสดง IR spectra ของ Compound 3	107

รูปที่	หน้า
3-19 แสดง ^1H -NMR ของ Compound 1	109
3-20 แสดง ^{13}C -NMR ของ Compound 1	110
3-21 แสดงสูตรโครงสร้าง ของ Compound 1	111
3-22 แสดง ^1H -NMR ของ Compound 2	113
3-23 แสดง ^{13}C -NMR ของ Compound 2	114
3-24 แสดงสูตรโครงสร้าง ของ Compound 2	115
3-25 แสดง ^1H -NMR ของ Compound 3	117
3-26 แสดง ^{13}C -NMR ของ Compound 3	118
3-27 แสดงสูตรโครงสร้าง ของ Compound 3	119
3-28 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของ Compound 1 ต่อ PBMC	122
3-29 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของ Compound 1 ต่อ KB-31 cells	122

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และความเป็นพิษต่อเซลล์ของพืชสมุนไพรที่พบทั่วไปในประเทศไทย นอกจากนั้นยังเป็นการเสาะหาสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุดและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปรกติน้อยที่สุด พร้อมทั้งศึกษาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์นั้นด้วย

งานวิจัยของโครงการจึงเริ่มต้นด้วยการรวบรวมพืชสมุนไพรในประเทศ โดยมีหลักเกณฑ์ว่าต้องเป็นพืชสมุนไพรที่หาได้ง่าย มีปริมาณมาก หรือเป็นของเหลือใช้ หรือเป็นพืชที่มีรายงานทั้งทางวิทยาศาสตร์หรือทางภูมิปัญญาพื้นบ้านว่าใช้เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยเหตุนี้จึงรวบรวมพืชสมุนไพรได้ 26 ชนิด บางชนิดใช้เพียงส่วนเดียว เช่น ส่วนของใบ หรือส่วนลำต้น หรือส่วนราก บางชนิดใช้หลาย ๆ ส่วน ดังนั้นจึงรวบรวมได้ทั้งหมด 43 ตัวอย่าง ได้นำมาเตรียมสารสกัดหยาบจากเอธานอล ได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 43 ชนิด แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยใช้วิธี ABTS, DPPH, FRAP, และ Lipid peroxidation อีกทั้งได้นำไปศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้ Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) เป็นตัวแทนเซลล์ปรกติ และใช้ Caco-2 cell เป็นตัวแทนเซลล์มะเร็ง ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระดับที่แตกต่างกัน สารสกัดส่วนใหญ่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปรกติ ยกเว้นสารสกัดจากเปลือกมังคุด ใบรางจืด และใบฟ้าทะลายโจร ที่แสดงค่า IC_{50} ต่อเซลล์ปรกติเท่ากับ 4.9, 5.3 และ 8.6 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดหยาบจากเปลือกผลมังคุดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 32 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

จากฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ได้ ทำให้พิจารณาเลือกตัวอย่างพืช 5 ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง ใบสะระแหน่ เปลือกผลทับทิม ใบทับทิม และใบรางจืด ไปทำการสกัดแยกส่วน โดยใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต บิวทานอล และเมธานอล ทำให้ได้สารสกัดแยกส่วน 20 ชนิด เมื่อนำสารสกัดแยกส่วนทั้ง 20 ชนิดนี้ ไปศึกษาสมบัติเคมีเบื้องต้น พบว่ามีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ และพบปริมาณของฟีนอลิกสูงในสารสกัดแยกส่วนจากเมธานอล เมื่อนำสารสกัดแยกส่วนทั้ง 20 ชนิด ไปทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดแยกส่วนจากเมธานอลของใบฝรั่ง เปลือกผลทับทิม และใบทับทิม มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุด แต่เนื่องจากเปลือกผลทับทิมและใบทับทิมแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปรกติ ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดจากใบฝรั่งไปทำการแยกสกัดหาสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อไป

การแยกสารบริสุทธิ์จากใบฝรั่งได้ใช้หลักการของคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าสามารถแยกสารสำคัญได้ 3 ชนิด ตั้งชื่อว่า สาร 1 สาร 2 และสาร 3 จากการศึกษาสูตรโครงสร้างของสารทั้ง 3 ชนิด โดยอาศัยหลักการของ Spectroscopy และทางเคมี ทำให้ทราบว่า สาร 1 สาร 2 และสาร 3 คือ เควอร์ซิทิน มอริน และ เควอร์ซิทิน-3-โอ-กลูโคไพราโนไซด์ ตามลำดับ เมื่อนำสารทั้ง 3 ชนิด มาศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเปรียบเทียบกัน ก็พบว่า สาร 1 หรือ เควอร์ซิทิน มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุด โดยให้ค่า TEAC, IC₅₀ และ EC เป็น 24.19 ± 0.06 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร, 1.20 ± 0.02 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร และ 35.64 ± 0.24 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำสารนี้มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMC และ KB-31 พบว่าสารนี้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทั้งสองเลย

จากการศึกษาทั้งหมดนี้พอสรุปได้ว่า ในบรรดาพืชสมุนไพรทั้ง 26 ชนิด หรือ 43 ตัวอย่างที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ใบฝรั่งเป็นแหล่งพืชสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด เนื่องจากมีสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุด ซึ่งสารที่ว่านี้มีชื่อว่า เควอร์ซิทิน

คำสำคัญ: สารต้านออกซิเดชัน ฝรั่ง พืชสมุนไพร เปลือกผลไม้ ความเป็นพิษต่อเซลล์

ABSTRACT

This research project was aimed to compare the antioxidant activity and cytotoxicity of medicinal plants commonly found in Thailand. The study was also to find out the most active principle that showed the highest antioxidant activity and the least toxicity to normal cells. Structure elucidation of the pure active compound (s) was also carried out.

The research work began with plant collection based on ethnopharmacological information, chemotaxonomic approach and random sampling. According to this, 26 kinds of medicinal plants were collected. After taking part separation; e.g. leaf, stem, root, 43 plant samples were obtained. The ethanol crude extracts of all 43 samples were prepared and evaluated for their antioxidant activities using ABTS, DPPH, FRAP and lipid peroxidation methods. The cytotoxicity of all extracts was also tested by using peripheral blood mononuclear cell (PBMC) as a model of normal cell and Caco-2 cell as a model of cancer cell. Results revealed that all of crude extracts possessed antioxidant activity but at a different level. Most extracts were not toxic to PBMC except those from *Garcinia mangostana* fruit peel, *Thunbergia laurifolia* leaves and *Andrographis paniculata* leaves that showed IC₅₀ value of 4.9, 5.3 and 8.6 µg/ml to PBMC, respectively. The crude extract of *Garcinia mangostana* fruit peel also showed inhibition of Caco-2 cancer cells.

From the antioxidant activity point of view, 5 plant samples *Psidium guajava* leaves, *Mentha cordifolia* leaves, *Punica granatum* fruit peel, *Punica granatum* leaves and *Thunbergia laurifolia* leaves were selected for fractionation process using n-hexane, ethyl acetate, n-butanol and methanol as the extracting solvents. Thus, 20 fractionated extracts were obtained. Basic chemical test indicated that these 20 fractions were composed of various kinds of flavonoids. High total phenolic content was found in methanolic fractionates of all samples. These 20 fractions were tested for antioxidant activity and cytotoxicity to PBMC and Caco-2 cells. Results indicated that methanolic fractionates of *Psidium guajava* leaves, *Punica granatum* fruit peel and *Punica granatum* leaves possessed high antioxidant activity. However, fractionates of *Punica granatum* fruit peel and *Punica granatum* leaves showed high toxicity to normal cells. Therefore, the extract of *Psidium guajava* leaves was selected for further purification by using column chromatography with various conditions of stationary and mobile phases. Finally, three active principles, compound **1**, **2** and **3** were isolated. Their structures were

determined on the basis of spectroscopic and chemical methods. Compound **1** was found to be quercetin, whereas compound **2** and compound **3** were identified as morin and quercetin-3-O-glucopyranoside. Among these 3 principles, compound **1** showed the most potent antioxidant activity with the TEAC, IC₅₀, EC values of 24.19 ± 0.06 mg/ml, 1.20 ± 0.02 µg/ml and 35.64 ± 0.24 mg/ml, respectively. The cytotoxicity to PBMC and KB-31 revealed that compound **1** had no toxic to such cells. It was concluded that among 43 plant samples of 26 kinds of plants, *Psidium guajava* leaves was the most potential source for antioxidant principle. The most active substance in *Psidium guajava* leaves was found to be quercetin.

Keywords: Antioxidant, *Psidium guajava*, Medicinal plant, Fruit peel, Cytotoxicity

บทที่ 1

บทนำ

โรคร้ายบางชนิด เช่น โรคหัวใจ และโรคมะเร็ง นับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญมากในปัจจุบัน การรักษาโรคดังกล่าวต้องอาศัยเทคโนโลยีขั้นสูงและค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมาก แต่จากการศึกษาจนทำให้ทราบถึงสาเหตุและกลไกการเกิดโรคต่าง ๆ ทำให้พบว่าโรคร้ายเหล่านั้นรวมถึงความแก่ชรา มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวมีสาเหตุสำคัญมาจากอนุมูลอิสระในร่างกายนั่นเอง ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาสารต้านอนุมูลอิสระจึงมีบทบาทสำคัญต่อการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันและทำให้มีผลในการป้องกันโรคร้ายต่าง ๆ ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระเหล่านั้นได้

สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ นับได้ว่ามีความปลอดภัยมากที่สุดต่อการบริโภคเพื่อยับยั้งและป้องกันอนุมูลอิสระ ผลิตภัณฑ์สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติส่วนใหญ่ในปัจจุบันได้มาจากอาหารแปรรูป เช่น ฮอป (hop) และเบียร์ เนื่องจากปฏิกิริยาบางชนิดที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร เช่น ปฏิกิริยา Maillard ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนด้วยน้ำ (protein hydrolysis) และกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) ทำให้เกิดสารประกอบบางชนิดที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ อย่างไรก็ตามกระบวนการแปรรูปอาหารเองอาจทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเสื่อมสลายลงได้โดยง่าย ดังนั้นการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพรซึ่งเป็นแหล่งอาหารธรรมชาติโดยตรงน่าจะปลอดภัยและมีประสิทธิภาพดีกว่า

คณะผู้วิจัยเห็นว่าการมีการศึกษาหาสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพรโดยตรง โดยยังไม่ผ่านการแปรรูปใด ๆ และสมุนไพรที่สนใจเป็นสมุนไพรที่หาได้ง่ายโดยเฉพาะทางภาคเหนือของประเทศไทย เช่น กะถิน ชะพลู ผักเชียงดา ฟ้าทะลายโจร และรางจืด ฯลฯ หรือเป็นส่วนหนึ่งของพืชสมุนไพรที่เป็นของเหลือใช้ทิ้งซึ่งว่างไม่มีประโยชน์ เช่น เปลือกมังคุด เปลือกกล้วย เปลือกมะพร้าว และเมล็ดลำไย โดยในขั้นตอนแรกจะนำสารสกัดหยาบของพืชสมุนไพรส่วนที่สนใจแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบกับฤทธิ์ antioxidant กับสารมาตรฐาน แล้วจึงทำการเลือกพืชเพียงชนิดเดียวที่ให้ฤทธิ์ antioxidant สูงสุด มาทำการสกัดสารสำคัญและหาสูตรโครงสร้าง และเพื่อความมั่นใจในความปลอดภัยของตัวยาที่สกัดได้ จึงทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดอีกด้วย

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีงานวิจัยต่างๆที่มุ่งเน้นไปยังแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ เช่น ในเครื่องดื่มประเภทชา โดยเฉพาะอย่างยิ่งชาเขียวมีสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญ คือ epigallocatechin gallate (EGCG) มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพมากกว่า อัลฟ่า-โทโคฟีรอล หรือ tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) โดยประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระของ

สารประกอบฟีนอลิกในชาเขียวเรียงลำดับจากน้อยไปมาก ดังนี้ epicatechin < epicatechin gallate < epigallocatechin < epigallocatechin gallate (Prakash, 1997) ในขณะที่ Wiseman และคณะ (1996) ได้ทำการวิจัยเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดจากชาเขียวและชาดำ พบว่าสารสกัดเอชานอลจากชาเขียวมีประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระดีกว่าชาดำ

นอกจากในชาแล้วยังพบสารต้านอนุมูลอิสระในพืชชนิดอื่นอีก ดังเช่นในปี ค.ศ. 1995 มีรายงานการค้นพบสารต้านอนุมูลอิสระในเห็ดป่าชนิดหนึ่ง (Kasuka และคณะ, 1995) ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Suillus bovinus* (L:Fr.) O. Kuntz ซึ่งสารดังกล่าวจำแนกได้ 2 ชนิด คือ variegatic acid เป็นรงควัตถุสีส้ม และ dibenzoquinone-4,4 เป็นรงควัตถุสีส้มแดง สารทั้ง 2 ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่า variegatic acid มีประสิทธิภาพดีกว่า dibenzoquinone-4,4 ต่อมา Takeyama และคณะ (1997) พบว่าสาหร่าย *Euglena gracilis* Z. สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น วิตามินซี วิตามินอี และ เบต้า-แคโรทีน ได้ นอกจากในสาหร่ายยูกลีนาแล้ว ในสาหร่ายเกลียวทองก็พบสารต้านอนุมูลอิสระเช่นกันดังเช่นจากรายงานการวิจัยของ Miranda และคณะ (1998) ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina maxima*) พบว่าสารในสาหร่ายเกลียวทองที่แสดงสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารประกอบฟีนอลิก โทโคฟีรอล และ เบต้า-แคโรทีน

ได้มีการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารหลายชนิด (Rice-Evans และ Miller, 1996) พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำแอปเปิ้ลได้แก่ chlorogenic acid และ phloretin ในน้ำส้ม ได้แก่ วิตามินซี hesperidin และ narirutin ในลูกเกด ได้แก่ anthocyanin ส่วนในน้ำชาสารต้านอนุมูลอิสระที่พบ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกประเภท catechin

Paganga และคณะ (1999) ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผักและผลไม้บางชนิด เช่น ในมะเขือยาว พบ chlorogenic acid เป็นองค์ประกอบหลัก และพบ delphinidin ในส่วนของเปลือก ในแอปเปิ้ลพบสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น chlorogenic acid, procyanidin, catechin, rutin และ phloridzin เป็นต้น ส่วนในหัวหอมพบ quercetin และ glycoside

นอกจากสารต้านอนุมูลอิสระประเภทสารประกอบฟีนอลิกจะพบได้ในอาหารประเภทผัก ผลไม้ หรือ เครื่องดื่มแล้ว ยังพบในธัญพืชต่างๆด้วย เช่น ข้าวบาร์เลย์ (Maillard และคณะ, 1996) โดยพบสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญ 3 กลุ่ม คือ flavan-3-ols อนุพันธ์ของ hydroxycinnamic acid และ flavonol ในเมล็ดธัญพืชหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรน์ ข้าวโอ๊ต และ buckwheat ก็มีรายงานการพบสารต้านอนุมูลอิสระ (Zielinski และ Kozłowska, 2000) พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอล 80 % ของเมล็ดธัญพืชดังกล่าวทุกชนิดแสดงสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเรียงลำดับประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระจากมากไปน้อย ดังนี้ buckwheat > ข้าวบาร์เลย์ > ข้าวโอ๊ต > ข้าวสาลี = ข้าวไรน์ ในส่วนของรำข้าวที่

แสดงสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระเรียงลำดับประสิทธิภาพจากมากไปน้อย ได้แก่ รำข้าว buckwheat > รำข้าวโอ๊ต > รำข้าวบาร์เลย์ อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากเมล็ดข้าว buckwheat เท่านั้นที่แสดงคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระ Miranda และคณะ (2000) ได้ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในฮ็อพ (hop) และ เบียร์ พบว่าเป็นสารในกลุ่ม prenylated flavonoid ซึ่งได้แก่ prenylchalcone และ prenylflavanone ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL (Low-Density Lipoprotein) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย copper sulfate เข้มข้น 2 μM พบว่า prenylchalcone สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ได้ทั้งที่ความเข้มข้น 5 และ 25 μM ส่วน prenylflavanone มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำกว่า prenylchalcone เล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่า xanthohumol ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม prenylchalcone ที่พบมากที่สุดในฮ็อพและเบียร์ มีประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระสูงมากในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL โดยประสิทธิภาพสูงกว่า อัลฟา-โทโคฟีรอล และ genistin แต่ต่ำกว่า quercetin

มีรายงานว่าแม้ว่าในอาหารจะพบสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glucose oxidase, และ catalase แต่ส่วนใหญ่เอนไซม์เหล่านี้จะถูกทำให้เสื่อมสภาพ (inactive) เนื่องจากความร้อนในระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร (Eriksson และ Na, 1995) ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ โทโคฟีรอล และสารประกอบฟีนอลิกสามารถทนต่อความร้อนที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหารได้ดี

Antony และคณะ (2000) ทำการวิจัยพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา Maillard มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยจากการทดลองให้เกิดปฏิกิริยา Maillard ขึ้นระหว่างน้ำผึ้งและกรดอะมิโนไลซีน โดยการนำไปรีฟรี้กซ์ด้วยน้ำเป็นเวลา 4, 8, 12, 16 และ 20 ชั่วโมง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าวไปวัดค่า pH และค่าการดูดกลืนแสงของรงควัตถุสีน้ำตาลที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร พบว่า pH ที่วัดได้ลดลงจาก 4.20 เป็น 3.65 ตามระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจาก 0.6 เป็น 1.6 ตามระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ส่วนประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

พืชสมุนไพรที่สนใจนำมาศึกษาในโครงการวิจัยครั้งนี้มีทั้งหมด 26 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1-1 บางชนิดมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัดหยาบบ้างแล้ว แต่บางชนิดยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวแต่มีรายงานพบสาร phenolic และ/หรือ tannin ปริมาณสูง และพืชบางชนิดมีรายงานฤทธิ์อื่น ๆ ในขณะเดียวกันพืชบางชนิดคณะผู้วิจัยได้ทำ preliminary test มาบ้างแล้ว ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ตารางที่ 1-1 แสดงชื่อพืชสมุนไพรทั้ง 26 ชนิด ที่ทำการศึกษา

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	Family
1. <i>Andrographis paniculata</i> Wall.	ฟ้าทะลายโจร	Acanthaceae
2. <i>Clausena lansium</i>	มะไฟจีน	Rutaceae
3. <i>Citrus hystrix</i>	มะกรูด	Rutaceae
4. <i>Cocos nucifera</i> Linn.	มะพร้าว	Palmae
5. <i>Cymbopogon citrates</i>	ตะไคร้	Gramineae
6. <i>Dregea volubilis</i> Stapf.	ผักฮ้วนหมู	Asclepladaceae
7. <i>Eupheria longan</i> Lam.	ลำไย	Sapindaceae
8. <i>Garcinia mangostana</i> Linn.	มังคุด	Guttiferae
9. <i>Gymnema inodorum</i> Decne.	ผักเชียงดา	Asclepladaceae
10. <i>Hylocereus undatus</i>	แก้วมังกร	Cactaceae
11. <i>Hyptis suaveolens</i>	แมงลักคา	Labiatae
12. <i>Lansium domesticum</i>	ลองกอง	Meliaceae
13. <i>Leucaena leucocephala</i> de Wit.	กระถิน	Leguminosae
14. <i>Marsdenia glabra</i> Cost.	ผักแว่น	Asclepladaceae
15. <i>Mentha cordifolia</i>	สะระแหน่	Labiatae
16. <i>Musa sapientum</i> Linn.	กล้วย	Musaceae
17. <i>Nephelium lappaceum</i>	เงาะ	Sapindaceae
18. <i>Ocimum basilicum</i> Linn.	โหระพา	Labiatae
19. <i>Ocimum gratissimum</i>	ยี่หระ	Labiatae
20. <i>Ocimum sanctum</i> Linn.	กะเพรา	Labiatae
21. <i>Oroxylum indicum</i>	เพกา	Bignoniaceae
22. <i>Passiflora foetida</i>	เสาวรส	Plasifloraceae
23. <i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	ชะพลู	Piperaceae
24. <i>Psidium guajava</i> Linn.	ฝรั่ง	Myrtaceae
25. <i>Punica granatum</i> Linn.	ทับทิม	Punicaceae
26. <i>Thunbergia laurifolia</i>	รางจืด	Thunbergiaceae

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Wall.) มีรายงานว่า diterpenes จาก aqueous extract มีฤทธิ์ antioxidant เมื่อทดสอบโดย hexachlorocyclohexane-induced liver damage ใน mice (Trivedi และคณะ, 2001; Koul และ Kapil, 1994)

มะไฟจีน (*Clausena lansium*) มีรายงานการค้นพบสารสำคัญหลายชนิด เช่น oxirane carboxamide (Milner และคณะ, 1996) และสารจำพวก monoterpene ในน้ำมันหอมระเหยจากผลถึง 59% (Wong และคณะ, 1998) นอกจากนี้ในเมล็ดมีรายงานพบสารที่เป็น trypsin inhibitor ซึ่งแสดงฤทธิ์ antifungal ด้วย (Ng Tzi และคณะ, 2003)

มะกรูด (*Citrus hystrix*) พืชชนิดนี้มีรายงานว่า มีฤทธิ์ antimicrobial (Pyo และ Oo, 2007) นอกจากนี้มีรายงานพบสาร glyceroglycolipids ซึ่งมีฤทธิ์ Antitumor promoting activity (Murakami และคณะ, 1996) สารสกัดจากเปลือกผลมีรายงานว่า มีฤทธิ์ Antifertility (Piyachaturawat และคณะ, 1985)

มะพร้าว (*Cocos nucifera* Linn.) ไม่มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์ antioxidant แต่มีรายงานการใช้ส่วนของจาวมะพร้าว ในการยับยั้ง lipid peroxidation ในหนูทดลอง (Manoj และคณะ, 1999)

ตะไคร้ (*Cymbopogon citrates*) มีฤทธิ์ Antidiarrhoeal activity (Tangpu และ Yadav, 2006) ในน้ำมันหอมระเหยของตะไคร้มีรายงานว่า มี Phenylpropanoid moiety ซึ่งเป็นกลุ่มหลักที่มีฤทธิ์ antiplatelet activity (Tognolini และคณะ, 2006), anticancer (Dudai และคณะ, 2005) และ antioxidant activity (Cheel และคณะ, 2005)

ผักฮ้วนหมู (*Dregea volubilis* Stapf.) มีรายงานพบสาร triterpenoid aglycone ที่มีฤทธิ์ป้องกัน selenite cataract ในสัตว์ทดลอง (Biju และคณะ, 2007) ในด้านองค์ประกอบมีรายงานพบ พบ Polyhydroxy pregnanes ในดอก (Panda และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังพบ glycoside หลายชนิด เช่น dregeosides, dregeanin, vicenin-2, vitexin, isovitexin, isoorientin, rutin, quercetin, luteolin และ apigenin (Yoshimura และคณะ, 1985; Panda และคณะ, 2006) และพบว่า glycoside บางชนิดเป็น antitumor (Yoshimura และคณะ, 1983) มีรายงานว่าในใบ ผล และเมล็ด มี erythroagglutinins ซึ่งมี Antihelminthic action (Deshpande และ Patil, 2001) สามารถทำลายตัวอ่อนของพยาธิพวง *Haemonchus contortus* และ *Helicoverpa armigera* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Deshpande และ Patil, 2003) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสารสกัดด้วยน้ำจากใบของพืชชนิดนี้อาจก่อให้เกิด hepatotoxicity (Tennekoon และคณะ, 1991)

ตำแย (*Euphoria longana* Lam.) ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์ Antioxidant แต่มีรายงานการพบ tannin (Hsu และ Chyn, 1991) และ phenolic constituents (Lin และ Tsai, 1995) จากส่วนของเมล็ด และดอก ตามลำดับ

มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) มีรายงานว่าเปลือกมังคุดมี tannin อยู่สูงทั้งในส่วน bark (Holloway และ Scheinmann, 1975) และส่วนเปลือกผล (Ketsa และ Atantee, 1998)

ผักเชียงดา (*Gymnema inodorum* Decne.) มีการค้นพบว่าสารสกัดจากผักเชียงดามีสารสำคัญพวก triterpene glycoside ซึ่งให้ฤทธิ์ Antidiabetic (Atsugi และคณะ, 1993) การศึกษาต่อมาพบว่าสารดังกล่าวทำให้เกิดการลดลงของ glucose absorption ในร่างกาย (Shimizu และคณะ, 1997)

แก้วมังกร (*Hylocereus undatus*) มีรายงานพบ pentacyclic triterpene จากใบของพืช (Gutierrez และคณะ, 2007) และพบว่าน้ำสกัดจากใบและผลมีฤทธิ์สมานแผล (Perez และคณะ, 2005) เนื่องจากเปลือกผลมีสีแดงสด จึงมีการสกัดเอาสีเหล่านี้นมาศึกษาพบว่าเป็นพวก Betacyanin Pigments (Wybraniec และ Mizrahi, 2002; Stintzing และคณะ, 2002)

แมงลักคา (*Hyptis suaveolens*) เป็นพืชที่มีน้ำมันหอมระเหยที่มีกลิ่นหอม ผู้วิจัยเคยได้นำมาศึกษาพบว่ามีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราก่อโรคผิวหนังได้ดีมาก นอกจากนั้นสารสกัดจากใบยังมีฤทธิ์ต่าง ๆ ได้แก่ antiplasmodial activity (Chukwujekwu และคณะ, 2005) Antinociceptive effect (Santos Thiago และคณะ, 2007) และ Wound healing property (Shirwaikar และคณะ, 2003)

ลองกอง (*Lansium domesticum*) มีรายงานว่าในเปลือกผลลองกองมี bicyclic triterpene ชนิดหนึ่ง ชื่อ Lansic acid (Kiang และคณะ, 1967; Habaguchi และคณะ, 1968) และมีการสกัดสารนี้มาศึกษาพบว่ามีฤทธิ์รักษาผิวและผมร่วงศีรษะล้าน (alopecia) ได้ (Ogawa และคณะ, 1988) จึงมีการนำสารสกัดนี้มาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางสำหรับผิวหนังและเส้นผม (Kobayashi และคณะ, 1988; Kawai, 1990)

กะถิน (*Leucaena leucocephala* de Wit.) มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ antioxidant เทียบกับพืชสมุนไพรตัวอื่น ๆ ในประเทศเยเมน (Alzoreky และ Nakahara, 2001) พบว่าฤทธิ์ antioxidant เกิดจากสาร carotinoid (Wood และคณะ, 1983)

สะระแหน่ (*Mentha cordifolia*) เป็นพืชในวงศ์เดียวกับแมงลักคา กะเพรา และโหระพา มีน้ำมันหอมระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะ น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต่าง ๆ ได้แก่ Insecticidal activity และ genotoxic activities (Khalfi และคณะ, 2006; Franzios และคณะ, 1997) และ antipathogenic bacteria (Imai และคณะ, 2001) นอกจากนั้นยังมีรายงานฤทธิ์ของสารสกัดโดยตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น Antimutagenic activity (Yu และคณะ, 2004) Antihistaminic (Yamamura และคณะ, 1998) และรวมถึง Antioxidant (Elmastas และคณะ, 2005)

กล้วย (*Musa sapientum* Linn.) มีรายงานการศึกษาพบฤทธิ์ Antioxidant (Goel และคณะ, 2001) anti-ulcer (Goel และ Sairam, 2002) ของ methanol extract จากส่วนของเปลือกกล้วย และมีรายงานการพบสาร tannin เป็นจำนวนมากในส่วนของเปลือกกล้วย (Saeed และ Khan, 1996)

เงาะ (*Nephelium lappaceum*) มีการวิจัยองค์ประกอบของผลเงาะ พบว่ามีทั้ง protein, carbohydrate, ไขมัน และ Polyamines (Ortiz และ Cordero, 1984; Kondo และคณะ, 2001) นอกจากนั้นยังมีรายงานพบวิตามินซี ในเนื้อผล (Wall, 2006) ซึ่งเกี่ยวข้องทำให้ผลเงาะมีฤทธิ์ Antioxidant ได้

โหระพา (*Ocimum basilicum* Linn.) พืชชนิดนี้มีน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ antifungal ที่มีประสิทธิภาพดีมาก โดยเฉพาะที่เป็น plant pathogenic fungus (Oxenham และคณะ, 2005) มีการทดลองนำน้ำมันหอมระเหยของโหระพาไปผสมในตำรับ spray แล้วนำไปฉีดผลไม้สดที่ต้องเก็บไว้นาน พบว่า spray ดังกล่าวสามารถป้องกันไม่ให้เชื้อราขึ้นบนผลไม้ได้เลย (Anthony และคณะ, 2003) การศึกษา GC/MS ของน้ำมันหอมระเหยของโหระพาทำให้ทราบว่ามีการประกอบประกอบสำคัญมากมาย แต่ที่มีมากที่สุดคือ Me chavicol (83.58-87.21%) และรองลงมาตามลำดับคือ 1,8-cineole (2.45-3.37%), linalool (0.04 - 2.69%) และ Me eugenol (1.4 - 2.68%) ส่วน monoterpenes และ sesquiterpenes พบบ้างแต่น้อยมาก (Riaz และคณะ, 1994) เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานว่าน้ำสกัดจากใบโหระพามีฤทธิ์ Hypolipidaemic activity และ Antioxidant activity (Souliman และคณะ, 2006)

ยี่หระ (*Ocimum gratissimum*) เป็นพืชที่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับ Biological activity ค่อนข้างมาก ทั้งจากสารสกัดหยาบและจากน้ำมันหอมระเหย เช่น ฤทธิ์ Antidiarrhoeal จากน้ำสกัดของใบยี่หระ ซึ่งกล่าวว่ามีสาร tannins, steroids และ triterpenoid ที่เป็นองค์ประกอบ (Offiah และ Chikwendu, 1999) Obob (2006) ได้นำสารสกัดใบยี่หระมาศึกษาพบว่าฤทธิ์ Antioxidant และ Antimicrobial เนื่องจากพบว่ามีสารสกัดมีองค์ประกอบจำพวก saponin, anthraquinone, alkaloid and glycosides, และ total phenolic content อยู่ในปริมาณสูง สารสกัดใบยี่หระยังมีฤทธิ์ Hypoglycaemic (Aguiyi และคณะ, 2000) และฤทธิ์ Antihelminthic โดยพบว่าสารสกัดใบยี่หระสามารถกำจัดตัวอ่อนของ *Haemonchus contortus* and *Heligmosomoides polygyrus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Njoku และ Asuzu, 1998) นอกจากนั้นน้ำมันหอมระเหยของยี่หระยังมีฤทธิ์ Antifungal อีกด้วย (Faria และคณะ, 2006) ทางด้านเภสัชกรรมเทคโนโลยี มีการสกัดเมือกหุ้มเปลือกเมล็ดยี่หระออกมาเป็นสารช่วยในการตั้งตำรับ เช่นเป็น suspending agent (Anroop และคณะ, 2005) และ binder (Anroop และคณะ, 2006)

กะเพรา (*Ocimum sanctum* Linn.) เป็นพืชอาหารชนิดหนึ่งที่มีการศึกษา Biological activity กันมาก มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ Wound healing (Somasekar และคณะ, 2006) และ Modulatory effect (Dutta และคณะ, 2007) ของกะเพราว่าเป็นผลมาจากฤทธิ์ Antioxidant ซึ่งมีการศึกษามากทั้งใน in vitro และ in vivo (Kath และ Gupta, 2006; Gupta และคณะ, 2005; Samson และคณะ, 2007; Manikandan และคณะ, 2007) นอกจากนั้นยังกะเพรายังสามารถป้องกัน skin tumorigenesis ได้ด้วย (Rastogi และคณะ, 2007)

เพกา (*Oroxylum indicum*) เป็นพืชอาหาร ในตำรายาแผนโบราณของจีน ระบุสรรพคุณผล (ฝัก) ของเพกาว่าเป็น anti-inflammatory, anti-pyretic และ anti-hypersensitivity มีรายงานวิจัยแสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกกรากเพกาว่ามีฤทธิ์ Antiulcer (Khandhar และคณะ, 2006) และฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Nakahara และคณะ, 2001; Roy และคณะ, 2007)

เสาวรส (*Passiflora foetida*) เป็นพืชที่นิยมนำน้ำคั้นจากผลมารับประทาน ระบุสรรพคุณว่าทำให้สุขภาพตาดีเนื่องจากมีวิตามินเอสูง มีรายงานวิจัยพบสารหลายชนิดจากพืชนี้ เช่น polyketides alpha-pyrone (Echeverri และคณะ, 2001), cyanohydrin glycosides (Andersen และคณะ, 1998) นอกจากนั้นยังพบ flavonoids หลายชนิดในสารสกัดจากใบเสาวร (Ulubelen และคณะ, 1982; Echeverri และคณะ, 1985) ชนิดหนึ่งคือ Ermanin พบว่ามีฤทธิ์กำจัดแมลงและตัวอ่อนของผีเสื้อได้ดี (Echeverri และคณะ, 1991)

ชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.) มีรายงานพบว่าสารสกัดหยาบของชะพลูมีองค์ประกอบหลายชนิด ได้แก่ Phenylpropanoids, hydrocinnamic acid และ beta-sitosterol และมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด (Peungvicha และคณะ, 1998) antimicrobial activity (Masuda และคณะ, 1991), antimalarial activity (Najib และคณะ, 1999) และ antioxidant activity (Liu และคณะ, 2002)

ฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.) เป็นพืชพื้นบ้านของไทย ผลฝรั่งมีกลิ่นหอมชื่นใจ เป็นพืชผลที่สามารถรับประทานได้ มีรายงานวิจัยพบว่ากลิ่นหอมของผลฝรั่งมาจากน้ำมันหอมระเหยที่มีองค์ประกอบของสารถึงประมาณ 40 ชนิด โดยมีองค์ประกอบหลักคือ beta-caryophyllene, limonene, 3-phenylpropyl acetate, และ (Z)-3-hexenyl acetate หรือ (E)-cinnamyl acetate (Pino และคณะ, 1999) และจากภูมิปัญญาพื้นบ้านใบฝรั่งยังใช้แก้อาการท้องเสียได้อีกด้วย มีรายงานว่าสารสกัดใบฝรั่งมีฤทธิ์ Antibacterial หลายชนิด (Sanchez และคณะ, 2005; Geidam และคณะ, 2007) อาจเป็นด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้ใช้แก้อาการท้องเสียได้จากการค้นคว้าทบทวนเอกสารพบรายงานวิจัยเกี่ยวกับฝรั่งเป็นจำนวนมาก และพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ Antidiabetic activity จาก ethanol extract ของเปลือกต้นฝรั่ง (Mukhtar และคณะ, 2006) ฤทธิ์ Antiinflammatory activity และ Analgesic effect จากน้ำสกัดใบฝรั่ง (Ojewole, 2006) และฤทธิ์ Anti-nociceptive effect จาก Ethanol extract ของใบฝรั่ง (Somchit และคณะ, 2004) มีรายงานว่าน้ำสกัดจากใบฝรั่งสามารถป้องกัน cell apoptosis (Hsieh และคณะ, 2007a) นอกจากนั้นยังมีรายงานฤทธิ์ป้องกัน blood coagulation (Hsieh และคณะ, 2007b) และ ฤทธิ์ depressant activity (Meckes และคณะ, 1996) ในด้านองค์ประกอบ มีรายงานพบสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ flavonoids, flavanols, procyanidins และ prodelphinidins (Qa'dan และคณะ, 2005)

ทับทิม (*Punica granatum* Linn.) มีรายงานพบสารจำพวก Flavonoids จากทับทิม สารดังกล่าวแสดงฤทธิ์ antiperoxidative agents ที่มีประสิทธิภาพมาก (Sudheesh และ Vijayalakshmi, 2005) นอกจากนั้นยังมีการวิจัยพบว่าสารสกัดผลทับทิมด้วย Methanol มีฤทธิ์ Antibacterial activity (Naz และคณะ, 2007) สารสกัดจากเปลือกผลมีฤทธิ์ป้องกัน Atherosclerosis และ Thyroid dysfunction ได้ (Parmar และ Kar, 2007) สารสกัดดังกล่าวสามารถป้องกันการเกิด liver fibrosis ในหนูทดลองที่มี biliary-obstruction ได้ด้วย (Toklu และคณะ, 2007) การวิจัยทางด้าน Antioxidant activity พบว่าในทับทิมมีสารชนิดหนึ่ง คือ Ellagitannin มีฤทธิ์ Antioxidant ดีและมีความปลอดภัยสูง (Heber และคณะ, 2007)

รางจืด (*Thunbergia laurifolia*) มีการศึกษาฤทธิ์ด้านอาการเหมือนติดยา amphetamine (Thongsaard และ Marsden, 2002) และมีรายงานพบ Iridoid glucosides (Kanchanapoom และคณะ, 2002) แต่ยังไม่มียางาน biological activity ของสารดังกล่าว นอกจากนั้นมียางานฤทธิ์อื่น ๆ ของสารสกัดรางจืด ได้แก่ Anti-diabetic effect (Aritajat และคณะ, 2004), Hepatoprotective activity (Pramyothin และคณะ, 2005) และ Antimutagenicity (Saenphet และคณะ, 2005; Oonsivilai และคณะ, 2007)

ด้วยเหตุดังกล่าวข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงได้พิจารณาจัดทำโครงการวิจัยนี้ขึ้น โดยมีจุดประสงค์ดังต่อไปนี้

1. เพื่อหาสารต้านออกซิเดชันที่มีฤทธิ์แรง มีความปลอดภัยสูงจากสมุนไพร
2. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ Antioxidant จากสารสกัดพืชสมุนไพร
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร
4. เพื่อสกัดแยกบริสุทธิ์ (Purification) และศึกษาสูตรโครงสร้าง (Structure Elucidation) ของสารที่ให้ฤทธิ์ Antioxidant สูงสุด
5. เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารออกฤทธิ์สำคัญที่แยกได้

โดยมีระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัยตลอดโครงการ 3 ปี

บทที่ 2

การทดลอง

วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

1. พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่นำมาศึกษามีทั้งหมด 26 ชนิด แต่ละชนิดใช้ส่วนต่าง ๆ แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2-1 รวมทั้งหมด 43 ตัวอย่าง

2. เครื่องมือ

1. High Performance Liquid Chromatography Apparatus
2. JNM- α 600 spectrometer (JEOL)
3. FT/IR-230 spectrophotometer (JASCO)
4. Vacuum Rotary Evaporator (EYELA[®], N-100)
5. pH Meter (Henna)
6. Multiple-Point Stirrer
7. Hot Air Oven (Memmert)
8. Refrigerator
9. High Speed Centrifuge
10. Analytical Balance
11. Nikon Camera
12. Microtiter plate reader (Biorad 680)
13. Melting point apparatus (Yanako)
14. EI-MS apparatus (JEOL GC mate)
15. Filter apparatus
16. HPLC (Agilent Technologies, USA)

ตารางที่ 2-1 แสดงส่วนของพืชสมุนไพรที่นำมาเตรียมสารสกัดหยาบ

ตัวอย่างที่	ชื่อพืช	ส่วนที่นำมาใช้*
1	ฟ้าทะลายโจร	ใบ
2	ฟ้าทะลายโจร	ลำต้น
3	มะไฟจีน	ใบ
4	มะกรูด	ใบ
5	มะกรูด	ลำต้น
6	มะกรูด	ผิวผล
7	มะพร้าว	เปลือก
8	ตะไคร้	ใบ
9	ตะไคร้	ใบสด
10	ตะไคร้	ลำต้น
11	ตะไคร้	ลำต้นสด
12	ตะไคร้	ราก/เหง้า
13	ผักฮ้วนหมู	ใบ/ลำต้น
14	ลำไย	เมล็ด
15	มังคุด	เปลือกผล
16	ผักเชียงดา	ใบ
17	ผักเชียงดา	ลำต้น
18	แก้วมังกร	เปลือกผล
19	แมงลักคา	ใบ/ลำต้น
20	ลองกอง	เปลือกผล
21	กระถิน	ใบ
22	กระถิน	ฝักอ่อน
23	ผักเสี้ยว	ใบ
24	สระแหน่	ใบ
25	สระแหน่	ลำต้น

ตัวอย่างที่	ชื่อพืช	ส่วนที่นำมาใช้*
26	กล้วย	เปลือกผลสุก
27	กล้วย	เปลือกผลดิบ
28	เงาะ	เปลือกผล
29	โหระพา	ใบ
30	โหระพา	ลำต้น
31	ใบยี่หระ	ใบ
32	กระเพรา	ใบ
33	กระเพรา	ลำต้น
34	เพกา	ฝัก
35	เสาวรส	เปลือกผล
36	ชะพลู	ใบ
37	ฝรั่ง	ใบ
38	ฝรั่ง	ลำต้น
39	ฝรั่ง	ผลดิบ
40	ทับทิม	ใบ
41	ทับทิม	เมล็ด
42	ทับทิม	เปลือกผลดิบ
43	รางจืด	ใบ

* ส่วนของพืชที่นำมาใช้เป็นส่วนของพืชสดแล้วนำไปอบให้แห้ง ยกเว้นตัวอย่างที่ 9 และ 11 ไม่อบแห้ง

3. สารเคมี

1. DPPH (2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)
2. ABTS (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt)
3. Trolox (6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)
4. Potassium persulfate
5. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole)
6. DMSO (Dimethyl sulfoxide)
7. Solvents (Ethanol AR, Methanol AR, n-Butanol AR, Ethyl acetate AR, n-Hexane AR, Chloroform AR)
8. Beta-Carotene
9. Linoleic acid
10. Tween 20
11. TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine)
12. Hydrochloric acid
13. Ferric chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
14. Sodium acetate
15. Acetic acid
16. Ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
17. Gallic acid
18. Butylated hydroxytoluene (BHT)
19. Cosmosil 75 μm C₁₈-OPN (Nacalai Tesque)
20. Sephadex LH-20 (GE Healthcare)
21. Silica gel 60 (230-400 mesh) (Merck)
22. Toyopearl HW-40C (TOSOH)
23. MCI-gel (Mitsubishi)

4. วิธีทดลอง

4.1 การรวบรวมพืชสมุนไพรที่น่าสนใจ

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชสมุนไพรที่คาดว่าจะน่าจะมีสารสำคัญในการออกฤทธิ์ antioxidant โดยมีหลักในการคัดเลือกสมุนไพรดังกล่าว 3 วิธี ได้แก่

- 1.1 Random sampling คือหาง่าย / มีปริมาณมาก / เป็นของเหลือใช้
- 1.2 Chemotaxonomic approach คือเลือกที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ antioxidant
- 1.3 Ethnopharmacological information คือได้รับข้อมูลจากการบอกเล่าหรือภูมิปัญญาท้องถิ่น (local knowledge)

4.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากตัวอย่างพืชสมุนไพร

ทำดังต่อไปนี้

1. โดยการนำตัวอย่างพืชสมุนไพรมาล้างน้ำสะอาด หั่นให้เป็นชิ้นบาง ๆ หรือชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท โดยใช้เวลาประมาณ 48-72 ชั่วโมง (ยกเว้นตัวอย่างสมุนไพรที่ต้องการศึกษาเป็นพืชสด ไม่ต้องผ่านกระบวนการอบ)
2. นำสมุนไพรที่ได้จากข้อ 1 ไปบดให้ละเอียดที่สุด แล้วทำการหมัก (Maceration) ใน Ethanol โดยใช้ปริมาณผงสมุนไพรต่อตัวทำละลาย = 1:4 โดยปริมาตร
3. ภายหลังการหมักได้ 3 วัน โดยคนให้ทั่วทุกวัน นำมากรอง
4. นำ Filtrate ไประเหยตัวทำละลายบางส่วนออก โดย Rotary Evaporator
5. นำกากสมุนไพรที่ได้ไปหมักต่อ
6. การหมักข้อ 2 ถึงข้อ 5 เรียกว่า Maceration 1 Cycle ทำการหมัก 3 Cycles
7. นำ Filtrate แต่ละ Cycle มารวมกัน คนให้เข้ากัน แล้วระเหยตัวทำละลายออกจนหมด
8. นำสารสกัดหยาบที่ได้เก็บในภาชนะปิดสนิท ป้องกันแสง และเก็บในตู้เย็น

4.3 การศึกษาฤทธิ์ Antioxidant

โดยใช้ 4 วิธี คือ Scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH Method), Scavenging effect on 2,2'-Azino-bis(3-methylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS Method), Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP Method), และ Lipid peroxidation Method ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

4.3.1 DPPH Method

วิธีนี้ทำโดยดัดแปลงวิธีของ Gamez และคณะ (1998) และ Brand-Williams และคณะ (1995) ดังต่อไปนี้

ผสมสารสกัดใน ethanol ให้ได้เป็น ethanolic solution ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดอยู่ในช่วง 0.1 – 1.0 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ละลาย DPPH ใน ethanol แล้วนำไปผสมกับ ethanolic solution ของสารสกัดที่เตรียมไว้ เติม ethanol จนได้ความเข้มข้นของ DPPH เป็น 100 μ M ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าอย่างแรง แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ DPPH ที่เหลือในแต่ละเวลา โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ Microtiter plate reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ฤทธิ์ antioxidant ที่วัดได้เป็นฤทธิ์การจับอนุมูลอิสระ ซึ่งคำนวณจาก % inhibition ดังสมการต่อไปนี้ เมื่อ OD_{blank} คือที่ใช้ ethanol แทนสารสกัด ค่าบ่งชี้ความแรงของฤทธิ์คือ IC_{50} ซึ่งคือความเข้มข้นของสารสกัดที่มี % inhibition เท่ากับ 50%

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(OD_{blank} - OD_{sample})}{OD_{blank}} \times 100$$

4.3.2 ABTS Method

วิธีนี้ทำโดยดัดแปลงวิธีของ Re และคณะ (1999) ดังต่อไปนี้

เตรียมอนุมูลอิสระของ ABTS โดยใช้สารละลาย ethanolic ของ ABTS ตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 7 mM ทำปฏิกิริยากับสารละลาย 2.45 mM $K_2S_2O_8$ โดยให้ทำปฏิกิริยากันในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 – 18 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางสารละลายผสมที่ได้ด้วย ethanol จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.7 ± 0.2 หน่วย จากนั้นผสมสารสกัดใน ethanol ให้ได้เป็น ethanolic solution ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1.0 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ใช้สารละลายนี้ 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS ที่เตรียมได้จำนวน 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้ Microtiter plate reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ฤทธิ์ Antioxidant ที่ได้หมายถึงฤทธิ์การจับอนุมูลอิสระ ABTS ค่าที่บ่งชี้ความแรงของฤทธิ์จะเป็นค่าที่เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox เรียกว่า TEAC มาจากคำว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity ซึ่งค่านี้แสดงถึงความเข้มข้นของ Trolox ที่ให้ฤทธิ์ Antioxidant เท่ากับสารที่ทดสอบ 1.0 มิลลิกรัม

4.3.3 FRAP Method

วิธีนี้ทำโดยดัดแปลงวิธีของ Benzie และ Strain (1996) ดังต่อไปนี้

เตรียม FRAP reagent โดยผสมสารละลาย 2.5 มิลลิลิตร ของ 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl กับสารละลาย 2.5 มิลลิลิตร ของ 20 mM FeCl₃ แล้วเติม 20 มิลลิลิตร ของ 0.3 M Acetate buffer pH 3.6 ที่เตรียมเสร็จใหม่ ๆ ลงไปผสมให้เข้ากัน เจือจางสารสกัดให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ใช้สารละลายนี้เพียง 20 ไมโครลิตรผสมกับ FRAP reagent 180 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผสมที่ได้ที่ 595 นาโนเมตร โดยใช้ Microtiter plate reader ฤทธิ์ Antioxidant ที่ได้หมายถึงฤทธิ์การมี reduction power โดยหากสารสกัดมีฤทธิ์ดังกล่าวมาก ก็จะให้ค่าการดูดกลืนแสงของ Fe²⁺ มาก ค่าที่แสดงออกมาเป็นค่าความเข้มข้นของ Fe²⁺ (ที่สมดุลกับ 1 mM FeSO₄) ที่เกิดจากสารตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม เรียกว่า Equivalent concentration (EC)

4.3.4 Lipid peroxidation Method

วิธีนี้เรียกชื่ออีกอย่างหนึ่งว่า Beta-carotene bleaching model ทำ ดังต่อไปนี้

เตรียมสารละลาย Beta-carotene 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ใน Chloroform และนำสารละลายนี้มา 2.0 มิลลิลิตร แล้วเติม Linoleic acid 50 มิลลิกรัม และ Tween20 50 มิลลิกรัม ลงไป คนให้เข้ากันแล้วนำไปตั้งบน water bath อุณหภูมิ 50 °C คนจนสารละลายขุ่น แล้วเติมน้ำที่ผ่านการให้ oxygen นาน 2 ชั่วโมง ลงไป พร้อมคนแรงๆจะได้ emulsion นำ emulsion ที่ได้ 180 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลายของสารสกัดตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Microtiter plate reader ที่ 490 นาโนเมตร ซึ่งเท่ากับเป็นการวัดที่นาที่ที่ศูนย์ (OD_{T0}) และนำ plate เข้า incubate ที่ 45 °C เป็นเวลา 240 นาที (OD_{T240})

ในการทดสอบควบคุมโดยการวัด Blank และ Control โดยเตรียม Blank จากการใช้ Chloroform แทน Beta-carotene solution เตรียม Control จากการผสมน้ำ 180 ไมโครลิตร ด้วย emulsion 20 ไมโครลิตร เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วให้นำค่าที่ได้มาคำนวณค่า Antioxidant activity (AA) เป็นเปอร์เซ็นต์ ดังสูตรข้างล่างนี้

$$\% \text{ Antioxidant activity} = 100 \times \frac{(\text{OD}_{T0} - \text{OD}_{T240}) \text{ of control} - (\text{OD}_{T0} - \text{OD}_{T240}) \text{ of sample}}{(\text{OD}_{T0} - \text{OD}_{T240}) \text{ of control}}$$

4.4 การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ใช้วิธีวิเคราะห์เรียก MTT assay ซึ่งดัดแปลงมาจาก Alley และคณะ (1988) แบ่งการทดลองเป็น 2 ประเภทตามชนิดของเซลล์ ดังต่อไปนี้

4.4.1 การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งที่ใช้ศึกษาคือ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2) หรือเซลล์มะเร็งปากมดลูก (KB-31) ซึ่งมีวิธีการศึกษาดังต่อไปนี้

1. ทำการเลี้ยงเซลล์ใน tissue culture flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ใน Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented ด้วย 10% fetal bovine serum 1% Penicillin/Streptomycin mixture (10,000 units/ml) และ 0.1% nonessential amino acid
2. บ่มใน incubator ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ เซลล์จะเจริญจนมีการเรียงตัวเป็น monolayer ในอาหารเลี้ยงเซลล์
3. ทำการ subculture เซลล์ทุกๆ 5-7 วัน หรือจากการดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ว่าเซลล์มีการเจริญและแบ่งตัวเป็นชั้นเดียวเกือบเต็มภาชนะ
4. เมื่อเซลล์ที่ใช้ในการศึกษามีการเจริญประมาณ 80-90% จะทำการแยกเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยว และทำการเตรียมเซลล์ให้มีปริมาณ 8×10^4 cell/ml นำไปใส่ใน 96 well culture plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร (n = 3) จะได้ปริมาณเซลล์ 8×10^3 cell/well
5. บ่ม 96 well plate ที่ 37 °C ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดจากพืชความเข้มข้นต่างๆลงไปในแต่ละ well ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ สารสกัดอยู่ในช่วง 5 – 100 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร โดยใช้ DMSO ช่วยละลาย และความเข้มข้นของ DMSO สูงสุดไม่เกิน 1.0 %
7. เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO ความเข้มข้น 1.0 %ลงในหลุมที่เป็น Control (คือหลุมที่ไม่มีสารทดสอบอยู่)
8. ทำการบ่ม 96 well plate ต่อที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
9. ทำการตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT assay โดยนำเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปริมาณ 100 µL/well ด้วย multi-channel pipette
10. เติมน้ำ MTT dye solution ปริมาณ 15 µL/well และทำการบ่มเซลล์ต่อที่ 37°C ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
11. ทำการคว่ำ plate เพื่อเอาส่วนใสทิ้งทั้งหมด เหลือแต่เฉพาะผลึก formazan ติดอยู่ที่ก้นหลุม
12. เติมน้ำ DMSO ปริมาณ 200 µL/well แล้วผสมให้เข้ากัน

13. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm และใช้ 630 nm เป็นค่าอ้างอิง โดยใช้เครื่องอ่านอีไลซ่า (ELISA reader)
14. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability หรือ % cell survival) ดังที่แสดงในสมการข้างล่างนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของ OD จากหลุมทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยของ OD จากหลุมควบคุม}} \times 100$$

4.4.2 การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

เซลล์ปกติที่ใช้ศึกษาคือ Peripheral Blood Mononuclear Cell หรือ PBMC มีวิธีการศึกษาดังต่อไปนี้

1. ทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดของมนุษย์ โดยการปั่นแยกตามความแตกต่างของความหนาแน่น (Density gradient) โดยใช้ Ficoll-hypaque solution (Sigma, MO, USA) เพื่อให้ได้เซลล์เม็ดเลือดขาวที่เรียกว่า Peripheral Blood Mononuclear Cell หรือ PBMC
2. สำหรับเซลล์ PBMC ได้ทำการเตรียมเซลล์ให้มีปริมาณ 1×10^6 cell/mL นำไปใส่ใน 96 well culture plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ($n = 3$) จะได้ปริมาณเซลล์ 1×10^5 cell/well โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่มี 10% FCS, 0.5% Penicillin/ Streptomycin mixture (10,000 units/mL) และ 0.5% glutamine stock (200mM)
3. บ่ม 96 well plate ที่ 37°C ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 100 μL /well ที่มีสารสกัดแต่ละชนิดในความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 1 – 100 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร
5. เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมให้มี 1% DMSO ลงในหลุมที่ใช้เป็นหลุมสารสกัดควบคุม (vehicle control) หรือก็คือหลุมที่ไม่มีสารทดสอบผสมอยู่
6. บ่ม 96 well plate ต่อที่ 37°C ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
7. นำเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งปริมาณ 100 μL /well ด้วย multi-channel pipette
8. เติม MTT dye solution ปริมาณ 15 μL /well และทำการบ่มเซลล์ต่อที่ 37°C ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
9. ทำการคว่ำ plate เพื่อเอาส่วนใสทิ้งทั้งหมด เหลือแต่เฉพาะผลึก formazan ติดอยู่ที่ก้นหลุม
10. เติม DMSO ปริมาณ 200 μL /well แล้วผสมให้เข้ากัน
11. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm และใช้ 630 nm เป็นค่าอ้างอิง โดยใช้เครื่องอ่านอีไลซ่า (ELISA reader)

12. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability หรือ % cell survival) ดังที่แสดงในสมการข้างล่างนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของ OD จากหลุมทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยของ OD จากหลุมควบคุม}} \times 100$$

4.5 การคัดเลือกตัวอย่างสมุนไพรที่เหมาะสม

โดยทำการประเมินจากผลการทดลอง โดยพิจารณาจากส่วนของพืชที่ให้ฤทธิ์สูง พืชน้อย หา ง่าย จำนวน 5 ชนิด ซึ่งจากการพิจารณาดังกล่าวสามารถเลือกพืชตัวอย่างได้ 5 ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง ใบสาระแน เปลือกผลทับทิม ใบทับทิม และใบรางจืด จึงนำตัวอย่างของพืชทั้ง 5 ชนิด ไปศึกษาใน ขั้นตอนต่อไป

4.6 การสกัดแยกส่วนพืชสมุนไพรที่คัดเลือก

โดยทำการแยกสกัดพืชสมุนไพรที่คัดเลือกทั้ง 5 ชนิด โดยวิธี Maceration เช่นเดียวกับการเตรียม Ethanol extract แต่แตกต่างกันตรงที่ solvent ที่ใช้ จะเริ่มตั้งแต่ non polar solvent ไล่ไปโดยเพิ่ม polarity ไปเรื่อย ๆ โดยใช้ solvent ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ n-Hexane, Ethyl acetate, Butanol, และ Methanol โดยการหมักใน solvent แต่ละชนิดจะใช้เวลาและจำนวน cycle เท่ากับการเตรียม Ethanolic extract ที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น โดยกาสมุนไพรที่ได้จากการหมัก solvent ก่อนหน้าจะนำไปประเหยเอา solvent ก่อนหน้าออกให้หมดก่อน แล้วจึงหมัก solvent ชนิดต่อไป ทำเช่นนี้จนครบตัวอย่างสมุนไพร ทั้ง 5 ชนิด จะทำให้ได้สารสกัดแยกส่วนทั้งหมด 20 Fractions ดังแสดงในตารางที่ 2-2

4.7 การศึกษาคุณสมบัติเคมีเบื้องต้นของสารสกัดแยกส่วน

โดยนำสารสกัดแยกส่วนที่ได้ทั้ง 20 ชนิด ไปทำการศึกษาคุณสมบัติเคมีเบื้องต้น (Markham, 1982; Harbone, 1973; นันทวัน บุญยะประภัศร, พ.ศ. 2536) ในหัวข้อต่อไปนี้

4.7.1 Chemical coloring reaction test ซึ่งแบ่งเป็น

4.7.1.1 Phenolic and Tannin Test

วิธีนี้ทำโดยนำสารสกัด 100 มิลลิกรัม มาเติมด้วยน้ำร้อน 25 มิลลิลิตร คนจนเย็นแล้วเติม 10% NaCl 1.0 มิลลิลิตร (เพื่อ salt out สารที่ไม่ใช่ tannin ให้ตกตะกอนออกมา) กรอง และ นำ filtrate แบ่ง ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร ดังนี้:-

ตารางที่ 2-2 แสดงสารสกัดแยกส่วนของสมุนไพรที่คัดเลือก

ลำดับที่	สารสกัดแยกส่วนที่ได้
1	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Hexane
2	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Ethyl acetate
3	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Butanol
4	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Methanol
5	สารสกัดใบฝรั่งจาก Hexane
6	สารสกัดใบฝรั่งจาก Ethyl acetate
7	สารสกัดใบฝรั่งจาก Butanol
8	สารสกัดใบฝรั่งจาก Methanol
9	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Hexane
10	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Ethyl acetate
11	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Butanol
12	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Methanol
13	สารสกัดใบทับทิมจาก Hexane
14	สารสกัดใบทับทิมจาก Ethyl acetate
15	สารสกัดใบทับทิมจาก Butanol
16	สารสกัดใบทับทิมจาก Methanol
17	สารสกัดใบรางจืดจาก Hexane
18	สารสกัดใบรางจืดจาก Ethyl acetate
19	สารสกัดใบรางจืดจาก Butanol
20	สารสกัดใบรางจืดจาก Methanol

หลอดที่ 1: เป็นหลอดควบคุม ไม่เติม reagent ใด ๆ

หลอดที่ 2: เติม gelatin 1% 5 หยด

หลอดที่ 3: เติม FeCl_3 1% 5 หยด

หลอดที่ 4: เติม Bromine water 5 หยด

หลอดที่ 5: เติม Lime water 5 หยด

หลอดที่ 6: ทำ Vanillin-HCl test โดยนำสารสกัดระเหยแห้งแล้วเติม 5 หยดของ 1% vanillin in ethanol และเติม 1 หยดของ conc. HCl

การแปลผล

1. กรณีไม่เกิดปฏิกิริยา กับ FeCl_3 เลย แสดงว่า ไม่มี tannin หรือ phenolic compounds
2. กรณีเกิดสีเขียวอมฟ้า หรือเขียวอมดำกับ FeCl_3 และตกตะกอนกับ gelatin แสดงว่ามี tannin กลุ่ม catechol
3. กรณีเกิดสีน้ำเงินเข้มกับ FeCl_3 และตกตะกอนกับ gelatin แสดงว่ามี tannin กลุ่ม pyrogallol หรือ gallic tannin
4. เกิดสีเขียวหรือสีน้ำเงินกับ FeCl_3 แต่ไม่ตกตะกอนกับ gelatin แสดงว่าไม่มี tannin แต่มีสารประกอบ phenolic ชนิดอื่น
5. ถ้าให้ผล negative กับ gelatin และ ไม่ให้สีกับ FeCl_3 แสดงว่า ไม่มี tannin หรือ polyphenol
6. ถ้าให้ผล positive กับ gelatin และให้สีเขียวกับ FeCl_3 และให้ผล positive กับ bromine water, vanillin-HCl test แต่ให้ผล negative กับ Lime water แสดงว่ามี condensed tannin
7. ถ้าให้ผล positive กับ gelatin และให้สีน้ำเงิน-น้ำเงินดำกับ FeCl_3 และให้ผล Negative กับ bromine water, vanillin-HCl test และให้ผล positive กับ lime water แสดงว่ามี hydrolyzable tannin
8. ถ้าให้ผล positive กับทุก test และให้สีน้ำเงินอมเขียวกับ FeCl_3 แสดงว่ามีทั้ง condensed tannin และ hydrolyzable tannin

4.7.1.2 Flavonoid Test

การทดสอบในขั้นตอนนี้ ใช้หลายปฏิกิริยา แล้วนำผลมาประเมินร่วมกัน วิธีต่าง ๆ ที่ใช้ มีดังต่อไปนี้

1) Cyanidin reaction

ขั้นตอนนี้ ทำโดยนำสารสกัด 100 มิลลิกรัม ละลายใน ethanol 10 มิลลิลิตร นำมาใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร และเติม Magnesium เล็กน้อยก่อนหยด conc. HCl ที่ละหยดแต่ไม่เกิน 10 หยด แล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้นใน 1-2 นาที

การแปลผล

ถ้ามี Flavones	จะให้สีส้มถึงสีแดง
ถ้ามี Flavonols	จะให้สีแดงถึงสีแดงเลือนคนก
ถ้ามี Flavanones	จะให้สีแดงเลือนคนกถึงสีม่วงชมพูอ่อน
ถ้ามี Flavanonols	จะให้สีเข้มมากในการทดสอบนี้ ให้ทดสอบซ้ำโดย Pew test

2) Pew test

วิธีนี้เป็นวิธีสำหรับทดสอบ flavanonols หรือ flavonol-3-glycoside ทำโดยนำสารสกัด (สารละลายใน ethanol) จำนวน 1 มิลลิลิตร มาเติม zinc dust 0.5 กรัม แล้วเติม 2N HCl ลงไป 2 หยด และเขย่า 1 นาทีก่อนเติม conc. HCl 10 หยด

การแปลผล

หากเกิดสีแดงเข้มภายใน 2-5 นาที แสดงว่ามี flavanonols or flavonol-3-glycoside ส่วน flavanones หรือ flavonols จะให้สีจางๆ

3) Chalcones and Aurones

วิธีนี้ใช้ทดสอบกับตัวอย่างที่ให้ผล negative ใน Cyaniding reaction test ขั้นตอนที่ทำโดยนำสารสกัดมาและหยดด้วย conc. HCl

การแปลผล

ถ้ามี flavonoids ชนิดใดชนิดหนึ่งใน 2 ชนิด (Chalcones หรือ Aurones) จะปรากฏสีแดงขึ้นทันที

4) ปฏิกริยากับต่าง

ขั้นตอนนี้ทำโดยนำสารสกัดใน ethanol จำนวน 1 มิลลิลิตร มาเติม Ammonia TS ที่ละหยด แล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้น

การแปลผล

ถ้ามี Flavones, Flavonol, Xanthone	จะให้สีเหลือง
ถ้ามี Flavonone	จะให้สีส้มแดง
ถ้ามี Chalcones and Aurones	จะให้สีม่วงทันที
ถ้ามี Flavanonols	จะให้สีน้ำตาล

5) Anthocyanins test

ขั้นตอนนี้ทำโดยนำสารสกัดใน ethanol จำนวน 1 มิลลิลิตรมาเติม 2N HCl 1 หยด ถ้ามี Flavonoids จะให้สีแดง แล้วค่อยๆเติม Ammonia TS ที่ละหยด และสังเกตการเปลี่ยนแปลง

การแปลผล

ถ้ามี Anthocyanins สีจะเปลี่ยนจาก แดง เป็น น้ำเงิน

6) Leucoanthocyanins

ขั้นตอนนี้ทำโดยนำสารสกัดใน ethanol จำนวน 1 มิลลิลิตรมาเติม 2N HCl 2 มิลลิลิตร แล้วต้มใน water bath

การแปลผล

ถ้ามี catechin จะให้สี yellow-brown

ถ้ามี leucoanthocyanins จะให้สีแดง ของ anthocyanins

4.7.1.3 Determination of Total Phenolic Compound

ขั้นตอนนี้ทำโดยดัดแปลงจากวิธีของ Sato และคณะ (1996) โดยนำสารสกัดใน ethanol ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเติมน้ำ 9 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent ลงไป 200 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ 3 นาที ก่อนเติม 2% sodium carbonate (Na_2CO_3) ลงไป 600 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วย shaker นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดหา

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้ Microtiter plate reader วิธีนี้ใช้น้ำเป็น negative control เปรียบเทียบค่าที่ได้กับ Standard Gallic acid (ภาคผนวก-ก)

4.7.2 UV & IR spectroscopic method

ขั้นตอนนี้ทำโดยนำสารสกัดในแต่ละ Solvent ไป scan เพื่อศึกษาการดูดกลืนแสง UV ในช่วง 200-400 nm ส่วน IR ทำการทดลองในช่วง Wavenumber เท่ากับ 400 – 4000 cm^{-1}

4.8 การศึกษาฤทธิ์ Antioxidant ของสารสกัดแยกส่วน

โดยนำสารสกัดแยกส่วนที่ได้ทั้ง 20 ชนิด ไปทำการศึกษาฤทธิ์ Antioxidant โดยใช้ 4 วิธี คือ DPPH Method, ABTS Method, FRAP Method และ Lipid peroxidation Method ทำเช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 4.3

4.9 การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดแยกส่วน

โดยนำสารสกัดแยกส่วนที่ได้ทั้ง 20 ชนิด ไปทำการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ ทำเช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 4.4

4.10 การคัดเลือกตัวอย่างสมุนไพรเพื่อนำไปสกัดแยกสารสำคัญ

โดยทำการประเมินจากผลการทดลองจากส่วนของพืชที่คัดเลือกมาทั้ง 5 ตัวอย่าง โดยพิจารณาจากส่วนของพืชที่ให้ฤทธิ์สูง พืชน้อย หาง่าย จำนวน 1 ชนิด ซึ่งจากการพิจารณาดังกล่าว ทำให้สามารถคัดเลือก ใบฝรั่ง เป็นพืชและส่วนของพืชที่เหมาะสมที่สุด จึงนำตัวอย่างของพืชดังกล่าวไปทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.11 การทดลองเพื่อแยกสารสำคัญออกจากใบฝรั่ง

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

4.11.1 การทดลองเบื้องต้น

ขั้นตอนการแยกสกัดในเบื้องต้นนี้ทำเพื่อหาข้อมูลชี้แนะการแยกสารสำคัญในขั้นตอนต่อไป โดยในขั้นตอนเบื้องต้นนี้ใช้ Column chromatography 3 ชนิด คือ

1. Normal phase column chromatography (NPCC)
2. Reverse phase column chromatography (RPCC)
3. Size-exclusion column chromatography (SECC)

ใน NPCC ได้ใช้ silica gel 60 ทั้งขนาด particle 40-60 micron and 63-200 micron เป็น stationary phase และใช้ mobile phase ตั้งแต่ non polar solvents ไปสู่ polar solvents ดังต่อไปนี้ Hexanes, Hexanes-Ethyl acetate, Ethyl acetate, Ethyl acetate-Methanol และ Methanol

ใน RPCC ได้ใช้ reverse phase silica gel (RP-18) เป็น stationary phase และใช้ mobile phase ตั้งแต่ polar solvents ไปสู่ non-polar solvents ดังต่อไปนี้ Methanol, Ethyl acetate-Methanol, Ethyl acetate, Ethyl acetate-Hexanes, และ Hexanes ตามลำดับ

ใน SECC ได้ใช้ Sephadex LH 20[®] เป็น stationary phase และใช้ mobile phase คือ Methanol-water และ Acetone-water ตามลำดับ ทำการ regenerate column ด้วย Methanol ทุกครั้ง นำ Fraction ที่แยกได้ไปทดสอบ Antioxidant activity โดย ABTS Method และนำไปศึกษา HPLC Pattern ทำโดยใช้ Mobile phase คือ gradient system ระหว่าง acetonitrile (A) และ 0.1%phosphoric acid (B) ดังรายละเอียดในตารางที่ 2-3 จากนั้นทำการรวม fraction ที่ให้ HPLC pattern คล้ายกันเข้าด้วยกัน แล้วทดสอบ Antioxidant activity อีกครั้งหนึ่ง

ตารางที่ 2-3 แสดงรายละเอียดของ mobile phase ที่ใช้กับ HPLC

Time (min)	%A	%B	Flow rate	Injection volumn (µl)
0	10	90	1.00	20
10	10	90	1.00	20
20	20	80	1.00	20
30	30	70	1.00	20
40	40	60	1.00	20
50	50	50	1.00	20

Detector: UV 360 nm.

4.11.2 การแยกสารสำคัญ

การทดลองในขั้นตอนนี้เป็น การแยกสกัดสารสำคัญ โดยใช้ข้อมูลซึ่งนำจากการทดลองเบื้องต้น โดยได้เริ่มจากการนำ Methanol extract ของใบฝรั่ง จำนวน 20 กรัม มาทำการแยกโดยใช้ Flash column chromatography โดยมีรายละเอียดต่อไปนี้

: Cosmosil 75 μ m C18-OPN 300 g.

: Column size: diameter 6 cm, height 25 cm

: Mobile: 5%, 20%, 35%, 50%, 65% and 100% methanol

(1500 ml/solvent, เก็บ 100 ml/flask)

จากนั้นนำแต่ละ Flask ไปทดสอบโดย TLC (RP-18 F_{254s} ; methanol : water; 1:1) แล้วรวม Fraction ที่ให้ TLC pattern คล้ายกัน เข้าด้วยกัน นำสารสกัดที่รวมได้ไปทดสอบฤทธิ์ Antioxidant โดย DPPH Method เลือกสารสกัดส่วนที่ให้ฤทธิ์ดีที่สุด เพื่อทำการแยกในขั้นตอนต่อไป

เนื่องจากผลของ DPPH พบว่า Fraction C, D, และ E มีฤทธิ์สูงตามลำดับ จึงนำทั้ง 3 Fraction มาทำการสกัดแยกสารบริสุทธิ์ ดังต่อไปนี้

การแยกบริสุทธิ์สารสกัด Fraction C

การแยกสารจาก Fraction C เริ่มโดยการใช้ Sephadex column chromatography โดยใช้ส่วนของสารสกัดจำนวน 1.0015 กรัม ในรายละเอียดต่อไปนี้

: Sephadex LH-20 100 g

: Column size: diameter 2.5 cm, height 100 cm

: Mobile: methanol 2,000 ml, acetone:methanol 500 ml; 1:1 and acetone 500 ml

(เก็บ 100 ml/flask)

จากนั้นนำแต่ละ Flask ไปทดสอบโดย TLC (RP-18 F_{254s} ; methanol : water; 1:1) แล้วรวม Fraction ที่ให้ TLC pattern คล้ายกัน เข้าด้วยกัน นำแต่ละสารสกัดที่รวมได้ไปทำการแยกให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Column chromatography ในรายละเอียดต่อไปนี้

: Silica gel 60, 230-400 mesh 10 g

: Column size: diameter 1.0 cm, height 20 cm

: Mobile: hexane:ethyl acetate; 1:1, hexane:ethyl acetate; 3:7, ethyl acetate, ethyl acetate:acetone; 1:1, ethyl acetate:acetone; 3:7, acetone, methanol

(ใช้ 50 ml/solvent; เก็บ 10 ml/flask)

จากนั้นนำแต่ละ Flask ไปทดสอบโดย TLC (RP-18 F_{254s} ; acetone : water : acetic acid; 2:1:0.1; 10% sulfuric acid spraying reagent) แล้วรวม Fraction ที่ให้ TLC pattern คล้ายกัน เข้าด้วยกัน

การแยกบริสุทธิ์สารสกัด Fraction D

การแยกสารจาก Fraction D เริ่มโดยการใช้ Toyopearl HW-40C column chromatography โดยใช้ส่วนของสารสกัดจำนวน 1.8040 กรัม ในรายละเอียดต่อไปนี้

: Toyopearl HW-40C 100 g

: Column size: diameter 1 cm; height 70 cm.

: Mobile: 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 100% methanol

(ใช้ 150 ml/solvent; เก็บ 10 ml/flask)

จากนั้นนำแต่ละ fraction ทดสอบโดย TLC (RP-18 F_{254s} ; methanol : water : acetic acid; 1:1:0.1; 10% sulfuric acid spraying reagent) แล้วรวม Fraction ที่ให้ TLC pattern คล้ายกัน เข้าด้วยกัน นำแต่ละสารสกัดที่รวมได้ไปทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ Column chromatography ในรายละเอียดต่อไปนี้

: ODS column chromatography

: Column size: diameter 1.0 cm, height 20 cm.

: Mobile 5, 15, 25, 50, 100% methano

(เก็บ 10 ml/flask)

จากนั้นนำแต่ละ fraction ทดสอบโดย TLC (RP-18 F_{254s} ; methanol : water : acetic acid; 1:1:0.1; 10% sulfuric acid spraying reagent) แล้วรวม Fraction ที่ให้ TLC pattern คล้ายกัน เข้าด้วยกัน

การแยกบริสุทธิ์สารสกัด Fraction E

การแยกสารจาก Fraction E เริ่มโดยการใช้ Cosmosil 75 μ m C18-OPN column chromatography โดยใช้ส่วนของสารสกัดจำนวน 1.133 กรัม ในรายละเอียดต่อไปนี้

: Cosmosil 75 μ m C18-OPN column

: Column size: diameter 1 cm; height 70 cm.

: Mobile: 20, 30, 40, 50, 100% ethanol

(เก็บ 10 ml/flask)

จากนั้นนำแต่ละ Flask ไปทดสอบโดย TLC (RP-18 F_{254s} ; methanol : water : acetic acid; 1:1:0.1; 10% sulfuric acid spraying reagent) แล้วรวม Fraction ที่ให้ TLC pattern คล้ายกัน เข้าด้วยกัน

นำแต่ละสารสกัดที่รวมได้ไปทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ Column chromatography ในรายละเอียดต่อไปนี

: Cosmosil 75 μ m C18-OPN column chromatography

: Column size: diameter 2.0 cm , height 12 cm.

: Mobile 25, 50, 75 and 100% ethanol

(เก็บ 10 ml/flask)

จากนั้นนำแต่ละ Flask ไปทดสอบโดย TLC (RP-18 F_{254s} ; methanol : water : acetic acid; 1:1:0.1; 10% sulfuric acid spraying reagent) แล้วรวม Fraction ที่ให้ TLC pattern คล้ายกัน เข้าด้วยกัน นำแต่ละสารสกัดที่รวมได้ไปทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ Column chromatography ในรายละเอียดต่อไปนี

: MCI gel column chromatography

: Column size: diameter 1.0 cm , height 53 cm.

: Mobile 30, 40, 50, 60 and 100% methanol

(เก็บ 10 ml/flask)

จากนั้นนำแต่ละ Flask ไปทดสอบโดย TLC TLC (RP-18 F_{254s} ; methanol : water : acetic acid; 6.5:3.5:0.5; 10% sulfuric acid spraying reagent) แล้วรวม Fraction ที่ให้ TLC pattern คล้ายกัน เข้าด้วยกัน นำแต่ละสารสกัดที่รวมได้ไปทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ Column chromatography ในรายละเอียดต่อไปนี

: Toyopearl HW-40C column chromatography

: Column size: diameter 1.0 cm , height 44 cm.

: Mobile 50, 53, 55, 57, 60, 100% methanol and 70% acetone

(เก็บ 10 ml/flask)

จากนั้นนำแต่ละ fraction ทดสอบโดย TLC (RP-18 F_{254s} ; methanol : water : acetic acid; 6:4:0.5; 10% sulfuric acid spraying reagent) เพื่อรวม fraction ที่ให้ผลเหมือนกันเข้าด้วยกัน

4.12 การหาสูตรโครงสร้างของสารสำคัญจากใบฝรั่ง

ในขั้นตอนนี้ได้นำสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้ มาทำการทดลองเพื่อหาสูตรโครงสร้างของสารเหล่านั้น ในการทดลองดังกล่าวนี้จะใช้เครื่องมือต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

4.12.1 Melting point apparatus

โดยอาศัยเครื่อง Yanako melting point apparatus นำสารตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยวางบนเครื่องให้ความร้อนแล้วเพิ่มความร้อนขึ้นเรื่อยๆจนถึงอุณหภูมิที่ทำให้สารเริ่มหลอมจนละลายหมด แล้วบันทึกจากอุณหภูมินั้นๆ

4.12.2 FTIR

โดยอาศัยเครื่อง JASCO FT/IR-230 spectrophotometer โดยนำสารตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยวางบนหลุมหรือที่บรรจุสารของเครื่องแล้วนำ probe จากเครื่องลงมาแตะที่สารแล้วจึงทำการ scan ช่วง $4000-600\text{ cm}^{-1}$

4.12.3 EI-MS

โดยอาศัยเครื่อง JEOL GC mate: EI-MS โดยนำสารตัวอย่างละลายใน methanol จำนวนเล็กน้อย แล้วใส่ในหลอดแก้ว ก่อนนำเข้าเครื่องวัด

4.12.4 $^1\text{H-NMR}$

โดยนำสารตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยละลายใน CD_3OD จำนวนเล็กน้อย แล้วใส่ในหลอดแก้ว ก่อนนำเข้าเครื่องวัด โดยอาศัยเครื่อง $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD สำหรับ compound 1 และ compound 2 และ 600 MHz สำหรับ compound 3)

4.12.5 $^{13}\text{C-NMR}$

โดยนำสารตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยละลายใน CD_3OD จำนวนเล็กน้อย แล้วใส่ในหลอดแก้ว ก่อนนำเข้าเครื่องวัด โดยอาศัยเครื่อง $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, สำหรับ compound 1 และ compound 2 และ 150 MHz สำหรับ compound 3)

4.13 การศึกษาฤทธิ์ Antioxidant ของสารบริสุทธิ์

โดยนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ไปทำการศึกษาฤทธิ์ Antioxidant โดยใช้ 4 วิธี คือ DPPH Method, ABTS Method, และ FRAP Method ทำเช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 4.3

4.14 การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารบริสุทธิ์

โดยนำสารบริสุทธิ์ที่ให้ฤทธิ์ Antioxidant activity ดีที่สุด ไปทำการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ในขั้นตอนนี้ใช้เซลล์ KB-31 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก) และเซลล์ปกติ ทำเช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 4.4

บทที่ 3

ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

ผลการเตรียมสารสกัดหยาบจากตัวอย่างพืชสมุนไพร

จากการคัดเลือกพืชสมุนไพรโดยวิธีต่าง ๆ สามารถเลือกพืชที่นำมาทำวิจัยได้ 26 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1-1 ส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการสกัดในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เช่นพืชบางชนิดใช้เฉพาะส่วนใบ บางชนิดใช้ส่วนของใบและลำต้น บางชนิดใช้ส่วนของเปลือกผลหรือเมล็ด เป็นต้น การเลือกชนิดพืชและส่วนของพืชที่ใช้ในการวิจัยนี้ เลือกมาจาก 3 หลักการ คือ 1) Random sampling คือหาง่าย / มีปริมาณมาก / เป็นของเหลือใช้ 2) Chemotaxonomic approach คือเลือกที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ antioxidant และ 3) Ethnopharmacological information คือได้รับข้อมูลจาก local knowledge ในการนี้จึงได้ส่วนของสมุนไพรมาทำการทดลองทั้งหมด 43 ตัวอย่าง (ดังแสดงในตารางที่ 2-1) เมื่อนำทั้ง 43 ตัวอย่างมาทำการสกัด จึงทำให้ได้ crude extract รวมทั้งสิ้นจำนวน 43 ชนิด ผลของการสกัดพบว่าได้สารสกัดหยาบมีลักษณะใกล้เคียงกันคือ เป็นของแข็งสีเขียวคล้ำหรือน้ำตาลดำ แต่ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้แตกต่างกัน โดยมีค่า % yield อยู่ในช่วง 0.46 – 17.52 % ดังแสดงในตารางที่ 3-1 ซึ่งเรียง % yield ของสารสกัดจากมากไปน้อย จากตารางดังกล่าวพบว่าส่วนพืชสมุนไพรที่ได้สารสกัดหยาบปริมาณสูงที่สุดคือเปลือกผิวของผลมะกรูด โดยให้ปริมาณสารสกัดหยาบถึง 17.52 %

ตารางที่ 3-1 แสดง % yield ของสารสกัดหยาบ

ลำดับที่	ชื่อพืช	ส่วนที่ใช้	น้ำหนัก (กรัม)			%yield*
			พืชสด	พืชแห้ง	สารสกัด	
1	มะกรูด	ผิวผล	90.00	27.00	4.73	17.52
2	ตะไคร้	ลำต้นแห้ง	550.00	100.00	16.37	16.37
3	กล้วย	เปลือกผลสุก	130.22	14.82	2.14	14.44
4	ผักขี้หนาม	ใบ/ลำต้น	190.71	32.32	4.00	12.38
5	เซียงดา	ใบ	500.00	150.00	17.88	11.92
6	ผักเสี้ยว	ใบ	64.59	15.22	1.76	11.56
7	ทับทิม	ใบ	200.00	100.00	11.27	11.27

ลำดับที่	ชื่อพืช	ส่วนที่ใช้	น้ำหนัก (กรัม)			%yield*
			พืชสด	พืชแห้ง	สารสกัด	
8	สระระแห่น	ใบ	62.80	11.50	1.28	11.13
9	เงาะ	เปลือกผล	300.00	100.00	10.68	10.68
10	ตะไคร้	ใบ	325.00	80.00	8.04	10.05
11	โหระพา	ใบ	128.20	22.50	2.21	9.82
12	ลำไย	เมล็ด	265.00	132.08	12.66	9.59
13	ฝรั่ง	ใบ	400.00	200.00	17.40	8.70
14	มะไฟจีน	ใบ	900.00	400.00	34.64	8.66
15	กล้วย	เปลือกดิบ	220.00	50.00	3.83	7.66
16	เพกา	ฝัก	2,800.00	400.00	29.99	7.50
17	มะกรูด	ใบ	700.00	350.00	25.97	7.42
18	มังคุด	เปลือกผล	620.00	400.00	28.85	7.21
19	สระระแห่น	ลำต้น	27.40	5.00	0.37	7.04
20	ฟ้าทลายโจร	ใบ	800.00	300.00	19.45	6.48
21	ทับทิม	เปลือกดิบ	500.00	150.00	9.31	6.21
22	ยี่หระ	ใบ	157.90	52.00	3.21	6.17
23	กระถิน	ใบ	1400.00	300.00	18.26	6.09
24	กระเพรา	ใบ	173.37	42.85	2.59	6.04
25	มะพร้าว	เปลือกใน	670.00	250.00	14.51	5.80
26	ลองกอง	เปลือกผล	126.50	50.25	2.87	5.71
27	โหระพา	ลำต้น	51.40	20.00	0.97	4.85
28	ตะไคร้	เหง้า	400.00	100.00	4.74	4.74
29	ตะไคร้	ลำต้นสด	550.00	-	25.64	4.66
30	ฝรั่ง	ผลดิบ	1,100.00	200.00	9.29	4.65
31	รางจืด	ใบ	1,000.00	200.00	8.93	4.47
32	ทับทิม	เมล็ดดิบ	400.00	100.00	4.46	4.46
33	แมงลักกา	ทั้งต้น	700.00	100.00	4.34	4.34

ลำดับที่	ชื่อพืช	ส่วนที่ใช้	น้ำหนัก (กรัม)			%yield*
			พืชสด	พืชแห้ง	สารสกัด	
34	เขียงดา	ลำต้น	800.00	250.00	9.77	3.91
35	กระเพรา	ลำต้น	80.75	22.76	0.83	3.65
36	ข้าวพู่	ใบ	200.00	80.00	2.45	3.06
37	เสาวรส	เปลือกผล	668.73	105.65	2.75	2.60
38	มะกรูด	ลำต้น	450.00	250.00	4.92	1.97
39	ฟ้าทลายโจร	ลำต้น	650.00	200.00	3.07	1.54
40	แก้วมังกร	เปลือกผล	552.63	58.62	0.82	1.40
41	กระถิน	ฝักอ่อน	800.00	150.00	1.80	1.20
42	ฝรั่ง	ลำต้น	100.00	50.00	0.56	1.12
43	ตะไคร้	ใบสด	325.00	-	1.50	0.46

* คำนวณจากน้ำหนักพืชแห้ง ยกเว้นลำดับที่ 29 และ 43 ที่คำนวณจากน้ำหนักพืชสด

ผลการศึกษาฤทธิ์ Antioxidant ของสารสกัด

ผลการทดลองเมื่อนำสารสกัดทั้ง 43 ชนิด มาทดสอบฤทธิ์ Antioxidant โดยทำการทดลอง 4 วิธี คือ 1) DPPH method, 2) ABTS method, 3) FRAP method และ 4) Lipid peroxidation method โดยค่าชี้วัดฤทธิ์ Antioxidant ของแต่ละวิธี คือ IC_{50} , TEAC, EC, และ AA ตามลำดับ โดยที่ค่า IC_{50} ถ้าต่ำแสดงถึงฤทธิ์ antioxidant สูง ส่วนค่าอื่น ๆ ยิ่งสูงแสดงถึงฤทธิ์ antioxidant ที่ยิ่งแรง ผลการทดลองแสดงค่า IC_{50} ในตารางที่ 3-2 ค่า TEAC แสดงในตารางที่ 3-3 ค่า EC แสดงในตารางที่ 3-4 และ ค่า AA แสดงในตารางที่ 3-5

ตารางที่ 3-2 แสดงฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัดทดสอบโดยวิธี ABTS
(เรียงลำดับตามความแรง)

ลำดับที่	ส่วนของพืช	TEAC (mM/mg)	
		ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1	ฝรั่ง (ใบ)	4.908	0.050
2	ทับทิม (เปลือกผลดิบ)	4.066	0.009
3	ทับทิม (ใบ)	3.366	0.008
4	เงาะ (เปลือกผล)	3.074	0.003
5	มังคุด (เปลือกผลสุก)	3.001	0.016
6	ลำไย (เมล็ด)	2.585	0.002
7	ตะไคร้ (รากแห้ง)	2.307	0.012
8	ฝรั่ง (ลำต้น)	1.955	0.016
9	สระแหน่ (ใบ)	1.844	0.030
10	กล้วย (เปลือกผลดิบ)	1.795	0.038
11	กระถิน (ฝัก)	1.713	0.033
12	รางจืด (ใบ)	1.663	0.011
13	มะพร้าว (เปลือกใน)	1.530	0.044
14	กระเพรา (ใบ)	1.483	0.030
15	ข้าวพุด (ใบ)	1.464	0.020
16	กระถิน (ใบ)	1.430	0.007
17	มะกรูด (ลำต้น)	1.374	0.009
18	ยี่หระ (ใบ)	1.346	0.014
19	มะกรูด (ผิว)	1.202	0.034

ลำดับที่	ส่วนของพืช	TEAC (mM/mg)	
		ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
20	ทับทิม (เมล็ดผลดิบ)	1.184	0.003
21	ผักฮ้วนหมู (ใบ/ลำต้น)	1.062	0.087
22	เชียงดา (ใบ)	0.902	0.052
23	ฝรั่ง (ผลดิบ)	0.898	0.008
24	กล้วย (เปลือกผลสุก)	0.880	0.048
25	โหระพา (ใบ)	0.877	0.010
26	กระเพรา (ลำต้น)	0.877	0.004
27	แมงลักกา (ใบ/ลำต้น)	0.850	0.022
28	โหระพา (ลำต้น)	0.783	0.022
29	มะกรูด (ใบ)	0.781	0.013
30	เชียงดา (ลำต้น)	0.718	0.027
31	แก้วมังกร (เปลือกผล)	0.685	0.021
32	ผักเสี้ยว (ใบ/ลำต้น)	0.673	0.044
33	ฟ้าทะลายโจร (ลำต้น)	0.648	0.047
34	ตะไคร้ (ใบแห้ง)	0.631	0.057
35	เสาวรส (เปลือกผล)	0.591	0.023
36	เพกา (ฝัก)	0.506	0.009
37	มะไฟจีน (ใบ)	0.491	0.011
38	ฟ้าทะลายโจร (ใบ)	0.397	0.022
39	สระแหน่ (ลำต้น)	0.364	0.006
40	ตะไคร้ (ลำต้นแห้ง)	0.324	0.014
41	ตะไคร้ (ใบสด)	0.301	0.016
42	ตะไคร้ (ลำต้นสด)	0.260	0.020
43	ลองกอง (เปลือกผล)	0.207	0.002

ตารางที่ 3-3 แสดงฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัดทดสอบโดยวิธี DPPH
(เรียงลำดับตามความแรง)

ลำดับที่	ส่วนของพืช	IC ₅₀ (mg/mL)*	
		ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1	ทับทิม (เปลือกผลดิบ)	0.003	0.002
2	ทับทิม (ใบ)	0.006	0.002
3	เงาะ (เปลือกผล)	0.006	0.003
4	ลำไย (เมล็ด)	0.010	0.001
5	ฝรั่ง (ใบ)	0.013	0.006
6	มังคุด (เปลือกผลสุก)	0.023	0.007
7	ข้าวพลู (ใบ)	0.031	0.004
8	กล้วย (เปลือกผลดิบ)	0.031	0.009
9	ฝรั่ง (ลำต้น)	0.044	0.008
10	มะพร้าว (เปลือกใน)	0.047	0.005
11	สระแหน่ (ใบ)	0.049	0.002
12	รางจืด (ใบ)	0.051	0.001
13	แมงลักคา (ใบ/ลำต้น)	0.055	0.010
14	กระถิน (ใบ)	0.057	0.019
15	กระถิน (ฝัก)	0.063	0.002
16	ตะไคร้ (ใบสด)	0.073	0.024
17	ผักฮ้วนหมู (ใบ/ลำต้น)	0.074	0.010
18	กระเพรา (ใบ)	0.078	0.011
19	แก้วมังกร (เปลือกผล)	0.084	0.036
20	ตะไคร้ (ใบแห้ง)	0.089	0.008
21	กระเพรา (ลำต้น)	0.094	0.018
22	ฝรั่ง (ผลดิบ)	0.098	0.012

* รายละเอียดตามภาคผนวก-ข

ลำดับที่	ส่วนของพืช	IC ₅₀ (mg/mL)	
		ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
23	สระระแห่น (ลำต้น)	0.102	0.002
24	เสาวรส (เปลือกผล)	0.104	0.014
25	ยี่หระ (ใบ)	0.104	0.017
26	กล้วย (เปลือกผลสุก)	0.105	0.005
27	โหระพา (ใบ)	0.118	0.013
28	ฟ้าทะลายโจร (ใบ)	0.119	0.007
29	ตะไคร้ (รากแห้ง)	0.120	0.012
30	มะกรูด (ใบ)	0.133	0.016
31	ฟ้าทะลายโจร (ลำต้น)	0.135	0.015
32	เชียงดา (ใบ)	0.146	0.031
33	มะไฟจีน (ใบ)	0.170	0.026
34	โหระพา (ลำต้น)	0.177	0.020
35	มะกรูด (ลำต้น)	0.185	0.022
36	เพกา (ฝัก)	0.241	0.012
37	ผักแว่น (ใบ/ลำต้น)	0.251	0.014
38	มะกรูด (ผิว)	0.256	0.011
39	ทับทิม (เมล็ดผลดิบ)	0.307	0.013
40	เชียงดา (ลำต้น)	0.349	0.038
41	ตะไคร้ (ลำต้นแห้ง)	0.423	0.015
42	ตะไคร้ (ลำต้นสด)	0.439	0.016
43	ลองกอง (เปลือกผล)	1.291	0.001

* รายละเอียดตามภาคผนวก-ข

ตารางที่ 3-4 แสดงฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัดทดสอบโดยวิธี FRAP
(เรียงลำดับตามความแรง)

ลำดับที่	ส่วนของพืช	EC (mM/mg)	
		ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1	มังคุด (เปลือกผลสุก)	5.308	0.129
2	ทับทิม (เปลือกผลดิบ)	4.740	0.113
3	ลำไย (เมล็ด)	4.288	0.105
4	ข้าวพุด (ใบ)	4.194	0.279
5	เงาะ (เปลือกผล)	4.139	0.100
6	มะพร้าว (เปลือกใน)	3.574	0.085
7	สะระแหน่ (ลำต้น)	2.860	0.098
8	โหระพา (ลำต้น)	2.604	0.105
9	แมงลัก (ใบ/ลำต้น)	2.496	0.197
10	ทับทิม (ใบ)	2.488	0.279
11	ตะไคร้ (ใบแห้ง)	2.282	0.070
12	ฟ้าทลายโจร (ใบ)	2.134	0.043
13	ลองกอง (เปลือกผล)	1.902	0.096
14	กระเพรา (ใบ)	1.860	0.200
15	ฝรั่ง (ใบ)	1.694	0.117
16	มะไฟจีน (ใบ)	1.596	0.113
17	ฝรั่ง (ลำต้น)	1.531	0.113
18	ยี่หระ (ใบ)	1.493	0.019
19	กล้วยหอม (เปลือกผลสุก)	1.477	0.108
20	กระถิน (ใบ)	1.197	0.029
21	กระถิน (ฝัก)	1.177	0.025
22	สะระแหน่ (ใบ)	1.060	0.025

ลำดับที่	ส่วนของพืช	EC (mM/mg)	
		ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
23	กระเพรา (ลำต้น)	1.040	0.041
24	กล้วย (เปลือกผลดิบ)	1.040	0.108
25	มะกรูด (ใบ)	0.967	0.167
26	มะกรูด (ผิว)	0.936	0.035
27	มะกรูด (ลำต้น)	0.872	0.090
28	ตะไคร้ (รากแห้ง)	0.801	0.070
29	ผักเสี้ยว (ใบ/ลำต้น)	0.748	0.025
30	โหระพา (ใบ)	0.720	0.031
31	รางจืด (ใบ)	0.718	0.038
32	ตะไคร้ (ใบสด)	0.660	0.045
33	ผักฮ้วนหมู (ใบ/ลำต้น)	0.581	0.004
34	ทับทิม (เมล็ดผลดิบ)	0.510	0.009
35	ฟ้าทลายโจร (ลำต้น)	0.500	0.006
36	ฝรั่ง (ผลดิบ)	0.481	0.050
37	เพกา (ฝัก)	0.477	0.033
38	ตะไคร้ (ลำต้นแห้ง)	0.455	0.009
39	เชียงดา (ใบ)	0.427	0.001
40	เชียงดา (ลำต้น)	0.395	0.004
41	แก้วมังกร (เปลือกผล)	0.387	0.010
42	เสาวรส (เปลือกผล)	0.384	0.021
43	ตะไคร้ (ลำต้นสด)	0.323	0.009

ตารางที่ 3-5 แสดงฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัดทดสอบโดยวิธี Lipid peroxidation
(เรียงลำดับตามความแรง)

ลำดับที่	ส่วนของพืช	Lipid peroxidation (% AA)	
		ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1	ทับทิม (ใบ)	94.444	0.123
2	สระแหน่ (ใบ)	94.444	0.097
3	ฟ้าทลายโจร (ลำต้น)	93.333	0.066
4	กระเพรา (ใบ)	91.743	0.113
5	กระถิน (ฝัก)	90.826	0.215
6	ฝรั่ง (ใบ)	90.000	0.141
7	ตะไคร้ (เหง้าแห้ง)	88.991	0.098
8	มะกรูด (ผิว)	88.073	0.219
9	ยี่หระ (ใบ)	87.838	0.157
10	มังคุด (เปลือกผลสุก)	87.838	0.103
11	รางจืด (ใบ)	87.500	0.126
12	ตะไคร้ (ใบแห้ง)	80.734	0.087
13	มะกรูด (ลำต้น)	78.899	0.172
14	ข้าวพดู (ใบ)	78.899	0.210
15	เชียงดา (ใบ)	77.778	0.251
16	ทับทิม (เปลือกผลดิบ)	75.000	0.211
17	เชียงดา (ลำต้น)	73.333	0.302
18	มะไฟจีน (ใบ)	71.622	0.077
19	ทับทิม (เมล็ดผลดิบ)	62.222	0.177
20	เงาะ (เปลือกผล)	62.162	0.223
21	ฝรั่ง (ลำต้น)	56.881	0.278

ลำดับที่	ส่วนของพืช	Lipid peroxidation (% AA)	
		ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
22	ผักเสี้ยว (ใบ/ลำต้น)	55.556	0.244
23	กระถิน (ใบ)	54.545	0.320
24	ตะไคร้ (ลำต้นแห้ง)	54.128	0.378
25	มะกรูด (ใบ)	50.000	0.185
26	ผักฮ้วนหมู (ใบ/ลำต้น)	47.778	0.106
27	ตะไคร้ (ลำต้นสด)	47.706	0.218
28	มะพร้าว (เปลือกใน)	45.946	0.205
29	แก้วมังกร (เปลือกผล)	44.444	0.195
30	โหระพา (ใบ)	41.892	0.187
31	ลำไย (เมล็ด)	37.615	0.162
32	แมงลักคา (ใบ/ลำต้น)	33.028	0.179
33	เสาวรส (เปลือกผล)	32.432	0.218
34	ฝรั่ง (ผลดิบ)	27.778	0.224
35	กระเพรา (ลำต้น)	25.688	0.195
36	เพกา (ฝัก)	20.183	0.099
37	ฟ้าทลายโจร (ใบ)	18.889	0.104
38	ตะไคร้ (ใบสด)	18.349	0.214
39	กล้วย (เปลือกผลสุก)	9.459	0.138
40	ลองกอง (เปลือกผล)	8.108	0.172
41	กล้วย (เปลือกผลดิบ)	4.054	0.111
42	โหระพา (ลำต้น)	4.054	0.200
43	สะระแหน่ (ลำต้น)	2.703	0.174

ผลการศึกษาฤทธิ์ ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay ซึ่งเป็น colorimetric assay (Mosmann, 1983) ใช้หลักการว่าสาร MTT ซึ่งเป็นสีเหลือง จะถูกเปลี่ยนเป็นสาร Formazan ซึ่งมีสีม่วง ใน Mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งสามารถวัดหาปริมาณได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 500 – 600 นาโนเมตร เซลล์ที่ไม่มีชีวิตหรือเซลล์ที่ตายแล้ว ก็จะไม่สามารถเปลี่ยนสีดังกล่าวได้ ดังนั้นวิธีนี้ จึงนิยมใช้ในการตรวจวัดความอยู่รอดของเซลล์ ดังนั้นวิธี MTT assay จึงใช้ตรวจวัดความอยู่รอดของ เซลล์มะเร็ง (Caco-2 cell) และเซลล์ปกติ (PBMC) ในการวิจัยครั้งนี้ เพื่อดูความเป็นพิษของสารสกัด ต่อเซลล์ดังกล่าว โดยการหาค่า IC_{50} ซึ่งค่านี้หมายถึงปริมาณสารทดสอบที่ทำให้เซลล์ตายไป 50 % หากสารสกัดมีพิษต่อเซลล์ใดมาก ก็จะแสดงค่า IC_{50} น้อย ซึ่งตาม Standard National Cancer Institute Criteria (Chen และคณะ (1988); Geran และ Abbott (1972) หากค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างสูงกว่า 40 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ถือว่าสารนั้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ หรือที่ทางกลับกันหากค่า IC_{50} ของสาร ตัวอย่างต่ำกว่า 40 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ถือว่าสารนั้นเป็นพิษต่อเซลล์

เมื่อนำสารสกัดทั้ง 43 ชนิดไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (PBMC) ของคน และ Caco-2 cell ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดส่วนใหญ่ไม่เป็นพิษต่อ PBMC ยกเว้นสารสกัดจากเปลือกมังคุด ใบรางจืด และใบฟ้าทะลายโจร ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ PBMC ได้อย่างชัดเจน โดยมีค่า $IC_{50} = 4.9, 5.3$ และ 8.6 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 3-6 ส่วนผลต่อ Caco-2 cell พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ Caco-2 cell ยกเว้น สารสกัดจากเปลือกมังคุดที่สามารถยับยั้งได้ โดยมีค่า $IC_{50} = 32$ ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3-7

ตารางที่ 3-6 ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (PBMC) ของคน (เรียงลำดับตามความปลอดภัย)

ลำดับที่	พืช/ส่วนของพืช	IC ₅₀ (mcg/ml) *
1	ต้นตะไคร้สด	> 100
2	ต้นตะไคร้แห้ง	> 100
3	ต้นฝรั่ง	> 100
4	ต้นฟ้าทะลายโจร	> 100
5	ต้นสระระแห่น	> 100
6	ต้นโหระพา	> 100
7	ใบตะไคร้แห้ง	> 100
8	ใบทับทิม	> 100
9	ใบฝรั่ง	> 100
10	เปลือกกล้วยดิบ	> 100
11	เปลือกกล้วยสุก	> 100
12	เปลือกแก้วมังกร	> 100
13	เปลือกเงาะ	> 100
14	เปลือกมะพร้าว	> 100
15	เปลือกลองกอง	> 100
16	เปลือกเสาวรส	> 100
17	ผลฝรั่งดิบ	> 100
18	ฝักเพกา	> 100
19	เมล็ดทับทิม	> 100
20	แมงลักคา	> 100
21	รากตะไคร้	> 100
22	ลำต้นผักเชียงดา	> 100

* รายละเอียดตามภาคผนวก-ค

ลำดับที่	พืช/ส่วนของพืช	IC ₅₀ (mcg/ml)
23	ใบกระถิน	100.0
24	เมล็ดลำไย	100.0
25	ผักเสี้ยว	100.0
26	ผักกระถิน	80.0
27	ใบโหระพา	55.0
28	ต้นมะกรูด	51.0
29	ใบกระเพรา	50.0
30	ผิวมะกรูด	47.5
31	เปลือกทับทิม	44.4
32	ต้นกระเพรา	40.0
33	ใบยี่หระ	38.5
34	ผักฮ้วนหมู	37.5
35	ใบเชียงดา	36.8
36	ใบขี้พลู	25.0
37	ใบตะไคร้สด	25.0
38	ใบมะไฟจีน	25.0
39	ใบสะระแหน่	21.9
40	ใบมะกรูด	12.5
41	ใบฟ้าทะลายโจร	8.6
42	ใบรางจืด	5.3
43	เปลือกมังคุด	4.9

* รายละเอียดตามภาคผนวก-ค

ตารางที่ 3-7 แสดงฤทธิ์ต้าน Caco-2 cell ของสารสกัดหยาบ

ลำดับที่	ชื่อพืช / สารที่ทดสอบ	ส่วนที่นำมาทดสอบ	IC ₅₀ (mcg/ml) *
1	ฟ้าทะลายโจร	ลำต้น	-
2	มะไฟจีน	ใบ	-
3	มะกรูด	ใบ	-
4	มะกรูด	ลำต้น	-
5	มะกรูด	ผิวผล	-
6	มะพร้าว	เปลือกใน	-
7	ตะไคร้	ใบสด	-
8	ตะไคร้	ลำต้นสด	-
9	ตะไคร้	รากแห้ง	-
10	ตะไคร้	ใบแห้ง	-
11	ตะไคร้	ลำต้นแห้ง	-
12	ลำไย	เมล็ด	-
13	เชียงดา	ใบ	-
14	ลองกอง	เปลือกผล	-
15	กระถิน	ใบ	-
16	กล้วยหอมสุก	เปลือกผลสุก	-
17	กล้วย	เปลือกผลดิบ	-
18	โหระพา	ใบ	-
19	โหระพา	ลำต้น	-
20	ยี่หระ	ใบ	-
21	กระเพรา	ใบ	-
22	กระเพรา	ลำต้น	-
23	เพกา	ฝัก	-
24	สระแหน่	ใบ	-

* รายละเอียดตามภาคผนวก-ง

ลำดับที่	ชื่อพืช / สารที่ทดสอบ	ส่วนที่นำมาทดสอบ	IC ₅₀ (mcg/ml) *
25	เสาวรส	เปลือกผล	-
26	ฝรั่ง	ใบ	-
27	ฝรั่ง	ลำต้น	-
28	ฝรั่ง	ผลดิบ	-
29	รางจืด	ใบ	-
30	ผักฮ้วนหมู	ใบ/ลำต้น	> 100
31	ฟ้าทะลายโจร	ใบ	> 100
32	เชียงดา	ลำต้น	> 100
33	แก้วมังกร	เปลือกผล	> 100
34	แมงลักคา	ใบ/ลำต้น	> 100
35	กระถิน	ฝัก	> 100
36	ผักเสี้ยว	ใบ	> 100
37	เงาะ	เปลือกผล	> 100
38	ข้าวปลู	ใบ	> 100
39	ทับทิม	ใบ	> 100
40	ทับทิม	เมล็ดผลดิบ	> 100
41	มั่งคุด	เปลือกผลสุก	32
42	ทับทิม	เปลือกผลดิบ	stimulate
43	สระระแห่น	ลำต้น	ND
44	Standard Tamoxifen	-	<5
45	Standard vinblastine sulfate	-	> 100

* รายละเอียดตามภาคผนวก-ง

หมายเหตุ - = no inhibition

ND = not determined

การศึกษาฤทธิ์ Antioxidant ในโครงการนี้ ได้ศึกษาโดยวิธีที่เหมาะสม 4 วิธี ซึ่งแต่ละวิธีสามารถทำนายกลไกการออกฤทธิ์ antioxidant ได้แตกต่างกัน โดยปกติปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายเรา ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ หลายขั้นตอน ซึ่งอาจพอสรุปได้ว่าในตอนแรก (initiation step) เป็นขั้นตอนที่สารในร่างกายถูกกระตุ้นให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) โดยอาศัยตัวเร่งต่าง ๆ เช่น แสง ความร้อน ความเครียด และ trace elements ในร่างกาย อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาต่อไปเรื่อย ๆ เป็นลูกโซ่ (propagation step) ซึ่งจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระจำนวนมากมายเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อนุมูลอิสระเหล่านี้จะเข้าไป oxidized สารต่าง ๆ ในร่างกาย ทำให้เกิดเป็น oxidized intermediate substances ที่มีความรุนแรงสามารถทำลายหรือ oxidize สารอื่นในร่างกาย เช่น ไขมัน (lipid) บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกาย เกิดปฏิกิริยาที่เรียกว่า Lipid peroxidation ซึ่งสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์เหล่านั้นได้

การศึกษาฤทธิ์ Antioxidant โดยใช้วิธี ABTS หรือ DPPH สามารถทำนายกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดว่าสามารถจับหรือกำจัดอนุมูลอิสระซึ่งเป็นตัวต้นเหตุสำคัญของปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้หรือไม่ ส่วนวิธี FRAP จะทำนายกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดได้ว่าสามารถยับยั้งฤทธิ์ของสารพวก oxidized intermediate substances ได้หรือไม่ โดยการเกิดปฏิกิริยา reduction ต่อสารดังกล่าวทำให้ไม่สามารถทำงานต่อไปได้ ส่วนวิธี lipid peroxidation เป็นการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัดที่บริเวณ receptor site โดยตรง

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดทั้ง 43 ชนิดแสดงฤทธิ์ antioxidant แตกต่างกัน และแสดงกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันด้วย เช่นสารสกัดจากใบฝรั่งแสดงฤทธิ์ antioxidant โดยไปยับยั้งอนุมูลอิสระ (ABTS free radical) ได้สูงสุด ในขณะที่มีกลไกการยับยั้ง lipid peroxidation น้อยกว่าสารสกัดจากใบทับทิม, ใบสาระแน, ลำต้นฟ้าทลายโจร, ใบกะเพรา และฝักระถิน ส่วนสารสกัดจากเปลือกมังคุดแสดงฤทธิ์ antioxidant โดยไปต้าน oxidized intermediate product ได้สูงที่สุด (ดูจากค่า EC value มากที่สุด) แต่พบว่ามีกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ABTS free radical) น้อยกว่าสารสกัดจากใบฝรั่ง, เปลือกทับทิม, ใบทับทิม และเปลือกเงาะ เป็นต้น

ดังนั้นในการพิจารณาคัดเลือกส่วนและชนิดพืชสมุนไพรเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป จึงพิจารณาจากกลไกใดกลไกหนึ่งเป็นสำคัญและใช้กลไกอื่นเป็นปัจจัยเสริม กลไกหลักที่ใช้ในการพิจารณาในครั้งนี้คือกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอนุมูลอิสระ ABTS เนื่องจากการศึกษาด้วยวิธี ABTS ทำได้สะดวก รวดเร็ว และแม่นยำกว่าวิธี DPPH (ดูจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) นอกจากนั้นได้ใช้ Criteria อื่น ๆ ร่วมพิจารณาด้วย เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (สารสกัดที่เลือกต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์ หรือเป็นพิษน้อยที่สุด) % yield ของสารสกัด ความยากง่ายในการสกัดและการเตรียมตัวอย่าง รวมถึงความยากง่ายในการจัดหาสมุนไพรเหล่านั้นด้วย เช่นใบฝรั่ง ใบทับทิม และเปลือกผลทับทิม มีฤทธิ์ antioxidant สูง และหาได้ง่าย เนื่องจากพบทั่วไปทางภาคเหนือของประเทศ เก็บได้ตลอด

ฤดูกาล จึงถูกคัดเลือก ส่วนพืชบางชนิดแม้มีฤทธิ์ antioxidant สูง แต่ไม่ถูกเลือก เช่นเปลือกผลมังคุด และเปลือกผลเงาะ เนื่องจากไม่ได้เป็นพืชท้องถิ่น(ทางภาคเหนือ) มีราคาแพงและออกเฉพาะบางฤดู เป็นช่วงสั้น ๆ เช่นช่วงเดือนมิถุนายน – กรกฎาคม เท่านั้น ส่วนลำไยและกล้วยแม้จะเป็นพืชท้องถิ่น (ทางภาคเหนือ) แต่ส่วนที่นำมาใช้สกัดเตรียมได้ยากมาก เช่นเมล็ดลำไยใช้เฉพาะส่วนเปลือกหุ้มเมล็ด (สีน้ำตาลดำ) เท่านั้น ส่วนเปลือกกล้วยใช้เฉพาะส่วนเปลือกนอกสีเขียวเท่านั้น อีกทั้ง % yield ได้น้อย จึงไม่ถูกเลือก

จาก Criteria ดังกล่าวพิจารณาแล้วเห็นว่าส่วนของพืช 5 ชนิดคือ ใบฝรั่ง ใบสาระแน เปลือกผลทับทิม ใบทับทิม และใบรางจืด เป็นส่วนที่เหมาะสมในการนำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ผลการสกัดแยกส่วนของพืชสมุนไพรที่คัดเลือกได้

ส่วนของพืชที่คัดเลือกได้ ทั้ง 5 ชนิด เมื่อนำมาทำการอบแห้งเพื่อเตรียมสกัดแยกส่วน (Fractionation) โดยใช้ solvent ที่มีขั้วต่างกัน ได้แก่ *n*-Hexane, Ethyl acetate, *n*-Butanol และ Methanol เริ่มต้นโดยใช้ผงสมุนไพรแห้ง macerate ใน *n*-Hexane ก่อน ทำการสกัดจนไม่มีสารละลายออกมาในชั้น *n*-Hexane แล้วจึงนำกากแห้งไป macerate ต่อในตัวทำละลายที่มีขั้วเพิ่มขึ้นตามลำดับคือ Ethyl acetate, *n*-Butanol และ Methanol ดำเนินการทำนองเดียวกับที่ทำกับ *n*-Hexane นำ filtrate ของแต่ละชนิดไป ระเหยตัวทำละลายออก ได้สารสกัดทั้งสิ้น 20 ชนิด และ % yield แสดงในตารางที่ 3-8 ซึ่งจากตาราง ดังกล่าวจะเห็นว่าในบรรดา solvent ที่ใช้ทั้ง 4 ชนิด Methanol เป็น solvent ที่ให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด และในบรรดา methanol extract ของพืช/ส่วนของพืชทั้ง 5 ชนิด ส่วนของใบทับทิมให้ปริมาณสาร สกัดมากที่สุด รองลงมาเป็นใบฝรั่ง เปลือกผลทับทิม ใบสาระแน และใบรางจืด ตามลำดับ

ผลการศึกษาสมบัติเคมีเบื้องต้นของสารสกัดสารสกัดแยกส่วน

ผลจากการทดสอบโดยวิธี Phenolic and Tannin Test พบว่าสารสกัดจาก methanol ของพืช / ส่วนของพืช ทั้ง 5 ชนิด มีองค์ประกอบของ tannin ส่วนสารสกัดจาก solvent อื่นอีก 3 ชนิด คือ Hexane, Ethyl acetate, และ Butanol ไม่พบ tannin ดังแสดงในตารางที่ 3-9 จากการศึกษาโดยวิธี Flavonoid Test พบว่าพืช / ส่วนของพืช ทั้ง 5 ชนิด มีสารกลุ่ม flavonoid ในทุก ๆ สารสกัด แต่มีชนิด ของ flavonoid แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3-10 สำหรับการทดสอบหา Total phenolic compounds ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของ Gallic acid (Gallic acid equivalent) จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจาก พืช / ส่วนของพืช ทั้ง 5 ชนิด ที่สกัดจาก Methanol มี Gallic equivalent สูงที่สุด หากเปรียบเทียบกันระหว่าง methanol extract ของพืช / ส่วนของพืช ทั้ง 5

ชนิด พบว่าเปลือกหับทิมและใบหับทิมมีปริมาณ total phenolic compound สูงที่สุด เนื่องจากมีค่า Gallic acid equivalent ที่สูงสุดใกล้เคียงกันคือ 9.198 ± 0.621 และ 9.180 ± 0.273 ตามลำดับ รองลงมา เป็นใบฝรั่งซึ่งมีค่า Gallic acid equivalent เท่ากับ 5.271 ± 0.160 ส่วน methanol extract มีปริมาณ total phenolic compound ต่ำที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3-11

ตารางที่ 3-8 แสดง % Yield ของสารสกัดแยกส่วนของสมุนไพรที่คัดเลือก

Fraction ที่	สารสกัดแยกส่วนที่ได้	% Yield
1	สารสกัดใบสาระแนจาก Hexane	3.67
2	สารสกัดใบสาระแนจาก Ethyl acetate	1.66
3	สารสกัดใบสาระแนจาก Butanol	1.00
4	สารสกัดใบสาระแนจาก Methanol	7.00
5	สารสกัดใบฝรั่งจาก Hexane	1.87
6	สารสกัดใบฝรั่งจาก Ethyl acetate	1.74
7	สารสกัดใบฝรั่งจาก Butanol	1.49
8	สารสกัดใบฝรั่งจาก Methanol	18.94
9	สารสกัดเปลือกผลหับทิมจาก Hexane	1.94
10	สารสกัดเปลือกผลหับทิมจาก Ethyl acetate	1.85
11	สารสกัดเปลือกผลหับทิมจาก Butanol	1.51
12	สารสกัดเปลือกผลหับทิมจาก Methanol	17.03
13	สารสกัดใบหับทิมจาก Hexane	1.75
14	สารสกัดใบหับทิมจาก Ethyl acetate	0.30
15	สารสกัดใบหับทิมจาก Butanol	0.68
16	สารสกัดใบหับทิมจาก Methanol	33.89
17	สารสกัดใบรางจืดจาก Hexane	1.97
18	สารสกัดใบรางจืดจาก Ethyl acetate	1.75
19	สารสกัดใบรางจืดจาก Butanol	0.66
20	สารสกัดใบรางจืดจาก Methanol	2.46

ตารางที่ 3-9 แสดงผล Phenolic and Tannin Test

ลำดับที่	สารสกัดแยกส่วนที่ได้	Expected compounds
1	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Hexane	Other phenolic
2	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Ethyl acetate	Other phenolic
3	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Butanol	Other phenolic
4	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Methanol	Condensed tannin
5	สารสกัดใบฝรั่งจาก Hexane	None
6	สารสกัดใบฝรั่งจาก Ethyl acetate	None
7	สารสกัดใบฝรั่งจาก Butanol	None
8	สารสกัดใบฝรั่งจาก Methanol	Tannin
9	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Hexane	Other phenolic
10	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Ethyl acetate	Other phenolic
11	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Butanol	Other phenolic
12	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Methanol	Tannin
13	สารสกัดใบทับทิมจาก Hexane	None
14	สารสกัดใบทับทิมจาก Ethyl acetate	None
15	สารสกัดใบทับทิมจาก Butanol	None
16	สารสกัดใบทับทิมจาก Methanol	Tannin
17	สารสกัดใบรางจืดจาก Hexane	None
18	สารสกัดใบรางจืดจาก Ethyl acetate	None
19	สารสกัดใบรางจืดจาก Butanol	None
20	สารสกัดใบรางจืดจาก Methanol	Condensed tannin

ตารางที่ 3-10 แสดงผล Flavonoid Test

ลำดับที่	สารสกัดแยกส่วนที่ได้	Expected compounds
1	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Hexane	flavonol, flavone, xanthone
2	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Ethyl acetate	flavonol, flavone, xanthone
3	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Butanol	flavonol, flavone, xanthone
4	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Methanol	flavanonol, flavonol, flavone, xanthone
5	สารสกัดใบฝรั่งจาก Hexane	flavonol, flavone, xanthone
6	สารสกัดใบฝรั่งจาก Ethyl acetate	flavonol, flavone, xanthone
7	สารสกัดใบฝรั่งจาก Butanol	flavonol, flavone, xanthone
8	สารสกัดใบฝรั่งจาก Methanol	flavanonol, flavonol, flavone, xanthone
9	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Hexane	flavonol, flavone, xanthone
10	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Ethyl acetate	flavanonol
11	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Butanol	flavanonol
12	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Methanol	flavanonol
13	สารสกัดใบทับทิมจาก Hexane	flavonol, flavone, xanthone
14	สารสกัดใบทับทิมจาก Ethyl acetate	flavanonol
15	สารสกัดใบทับทิมจาก Butanol	flavanonol
16	สารสกัดใบทับทิมจาก Methanol	flavanonol
17	สารสกัดใบรางจืดจาก Hexane	flavonol, flavone, xanthone
18	สารสกัดใบรางจืดจาก Ethyl acetate	flavonol, flavone, xanthone
19	สารสกัดใบรางจืดจาก Butanol	flavonol, flavone, xanthone
20	สารสกัดใบรางจืดจาก Methanol	flavonol, flavone, xanthone

ตารางที่ 3-11 แสดงผล Total phenolic compounds

ลำดับที่	สารสกัดแยกส่วนที่ได้	Gallic Acid Equivalent (mg/mL)
1	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Hexane	0.924 ± 0.040
2	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Ethyl acetate	1.572 ± 0.090
3	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Butanol	2.016 ± 0.101
4	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Methanol	3.316 ± 0.011
5	สารสกัดใบฝรั่งจาก Hexane	1.619 ± 0.089
6	สารสกัดใบฝรั่งจาก Ethyl acetate	1.810 ± 0.136
7	สารสกัดใบฝรั่งจาก Butanol	1.943 ± 0.019
8	สารสกัดใบฝรั่งจาก Methanol	5.271 ± 0.160
9	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Hexane	2.474 ± 0.091
10	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Ethyl acetate	8.361 ± 0.321
11	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Butanol	8.361 ± 0.321
12	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Methanol	9.198 ± 0.621
13	สารสกัดใบทับทิมจาก Hexane	1.792 ± 0.175
14	สารสกัดใบทับทิมจาก Ethyl acetate	3.723 ± 0.445
15	สารสกัดใบทับทิมจาก Butanol	6.357 ± 0.172
16	สารสกัดใบทับทิมจาก Methanol	9.180 ± 0.273
17	สารสกัดใบรางจืดจาก Hexane	1.066 ± 0.083
18	สารสกัดใบรางจืดจาก Ethyl acetate	1.211 ± 0.073
19	สารสกัดใบรางจืดจาก Butanol	1.672 ± 0.315
20	สารสกัดใบรางจืดจาก Methanol	1.771 ± 0.314
21	BHT	6.946 ± 0.220

ผลการทดลองของ UV Spectroscopy แสดงในตารางที่ 3-12 และรูปที่ 3-1 ถึงรูปที่ 3-5 ส่วนผลของ IR Spectroscopy แสดงในตารางที่ 3-13 ถึงตารางที่ 3-16 และรูปที่ 3-6 ถึง 3-10 ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าสารสกัดส่วนใหญ่สามารถดูดกลืนแสงในช่วง UV ได้ แต่ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน ส่วนผลของ IR Spectroscopy พบว่าสารสกัดของพืช / ส่วนของพืช ทั้ง 5 ชนิด จาก solvent ชนิดเดียวกันให้ผลคล้ายกัน ซึ่งอาจพอสรุปในเบื้องต้นได้ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

UV spectrum ของ Methanol extract ของพืช / ส่วนของพืช ทั้ง 5 ชนิด เกิด 2-3 band ที่ $\lambda_{\max} > 210 \text{ nm}$ แสดงว่าอาจมีสาร aromatic compounds ส่วน IR spectra ของสารสกัดจาก Methanol ของพืช / ส่วนของพืช ทั้ง 5 ชนิด พบว่ามีหมู่ hydroxyl (O-H) เพราะ มี broad band ของ O-H ที่บริเวณ $3500\text{-}2500 \text{ cm}^{-1}$ นอกจากนั้นยังมี peak ที่แสดง C double bond (C=C) ซึ่งอาจเป็น C=C ของ aromatic compound โดยจะพบในช่วง $1650\text{-}1450 \text{ cm}^{-1}$

จากผลของ UV และ IR พิจารณาได้ว่า Methanol extract ของพืช / ส่วนของพืช ทั้ง 5 ชนิด อาจมีสารประกอบในกลุ่มที่มีหมู่ hydroxyl and aromatic compounds

UV spectrum ของ Butanol extract ของพืช / ส่วนของพืช ทั้ง 5 ชนิด เกิด 2-3 band ที่ $\lambda_{\max} > 210 \text{ nm}$ แสดงว่าอาจมีสาร aromatic compounds ส่วน IR spectra ของสารสกัดจาก Butanol ของพืช / ส่วนของพืช 4 ชนิด คือ ใบสาระแน ใบฝรั่ง ใบทับทิม และเปลือกผลทับทิม พบว่ามี IR spectra คล้ายกัน คือ มีหมู่ hydroxyl (O-H) เพราะ มี broad band ของ O-H ที่บริเวณ $3500\text{-}2500 \text{ cm}^{-1}$ นอกจากนั้นยังมี peak ที่แสดง C double bond (C=C) ซึ่งอาจเป็น C=C ของ aromatic compound โดยจะพบในช่วง $1650\text{-}1450 \text{ cm}^{-1}$ ส่วน Butanol extract ของ ใบรางจืดพบว่า IR spectra มีหมู่ C-H ที่บริเวณ $3000\text{-}2850 \text{ cm}^{-1}$ ซึ่งอาจเป็น สารประกอบ hydrocarbon

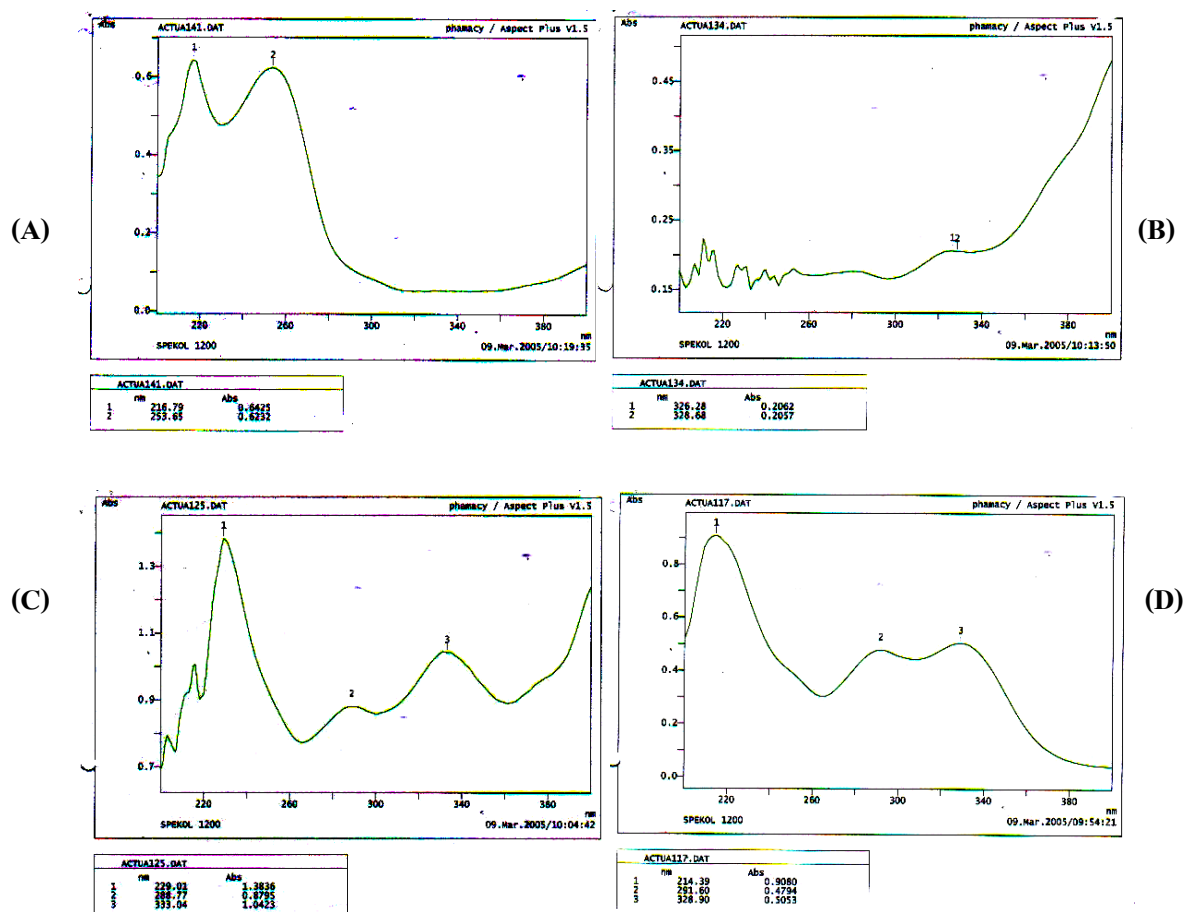
จากผลของ UV และ IR พิจารณาได้ว่า สารสกัดจาก Butanol ของพืช / ส่วนของพืช 4 ชนิด คือ ใบสาระแน ใบฝรั่ง ใบทับทิม และเปลือกผลทับทิมอาจมีสารประกอบในกลุ่มที่มีหมู่ hydroxyl and aromatic compounds แต่สารสกัดจากใบรางจืดอาจเป็น สารประกอบ hydrocarbon

UV spectrum ของ Ethyl acetate extract ของพืช / ส่วนของพืช ทั้ง 5 ชนิด เกิด 1-2 band แสดงว่าอาจมีสาร diene หรือ aromatic compounds ส่วน IR spectra ของสารสกัดจาก Ethyl acetate ของพืช / ส่วนของพืช 4 ชนิด คือ ใบสาระแน ใบฝรั่ง ใบทับทิม และเปลือกผลทับทิม พบว่ามี IR spectra คล้ายกัน คือ มีหมู่ hydroxyl (O-H) เพราะ มี broad band ของ O-H ที่บริเวณ $3500\text{-}2500 \text{ cm}^{-1}$ นอกจากนั้นยังมี peak ที่แสดง C double bond (C=C) ที่บริเวณ 1650 cm^{-1} ซึ่งอาจเป็น C=C ของ aromatic compound โดยจะพบ 2-4 band ในช่วง $1650\text{-}1450 \text{ cm}^{-1}$ ส่วน Ethyl acetate extract ของ ใบรางจืดพบว่า IR spectra มีหมู่ C-H ที่บริเวณ $3000\text{-}2850 \text{ cm}^{-1}$ และ CH_2CH_3 ที่ $1450 \text{ and } 1375 \text{ cm}^{-1}$ ซึ่งอาจเป็น สารประกอบ hydrocarbon

ตารางที่ 3-12 แสดงผล UV absorption

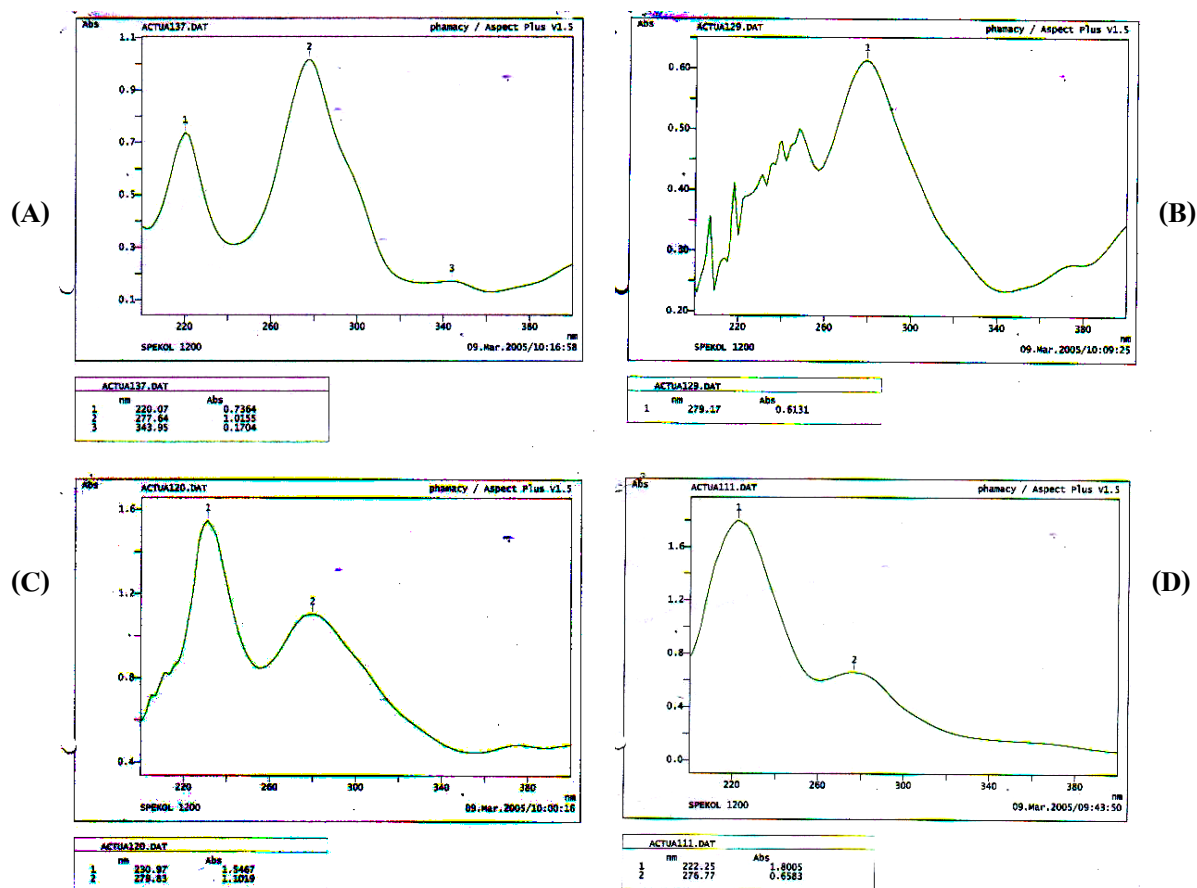
ลำดับที่	ตัวทำละลาย	$\lambda_{\max}$	Absoption
1	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Hexane	216.79	0.6425
		253.65	0.6232
2	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Ethyl acetate	326.28	0.2062
		328.68	0.2057
3	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Butanol	229.01	1.3836
		288.77	0.8795
		333.04	1.0423
4	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Methanol	214.39	0.9080
		21.60	0.4794
		328.90	0.5053
5	สารสกัดใบฝรั่งจาก Hexane	220.07	0.7364
		277.64	1.0155
		343.95	0.1704
6	สารสกัดใบฝรั่งจาก Ethyl acetate	279.17	0.6131
7	สารสกัดใบฝรั่งจาก Butanol	230.97	1.5467
		279.83	1.1019
8	สารสกัดใบฝรั่งจาก Methanol	222.25	1.8005
		276.77	0.6583
9	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Hexane	229.01	1.6418
		266.96	0.5742
10	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Ethyl acetate	264.12	0.8670
11	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Butanol	230.97	1.3789
		262.38	1.0322
12	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Methanol	222.03	1.0901
		262.16	0.7145

ลำดับที่	ตัวทำละลาย	$\lambda_{\max}$	Absorption
13	สารสกัดใบหทัยจาก Hexane	218.97	0.5465
		257.14	0.2701
14	สารสกัดใบหทัยจาก Ethyl acetate	271.76	0.6694
15	สารสกัดใบหทัยจาก Butanol	232.93	1.7534
		273.50	1.3634
16	สารสกัดใบหทัยจาก Methanol	224.65	1.7203
		276.34	0.9411
17	สารสกัดใบรางจืดจาก Hexane	217.01	0.4401
		264.56	0.2132
18	สารสกัดใบรางจืดจาก Ethyl acetate	325.63	0.1785
		375.57	0.3307
19	สารสกัดใบรางจืดจาก Butanol	230.75	1.6700
		272.63	0.9632
		332.82	1.1858
		376.23	1.5233
		399.13	1.9582
20	สารสกัดใบรางจืดจาก Methanol	210.91	0.6445
		285.50	0.2503
		327.81	0.2288



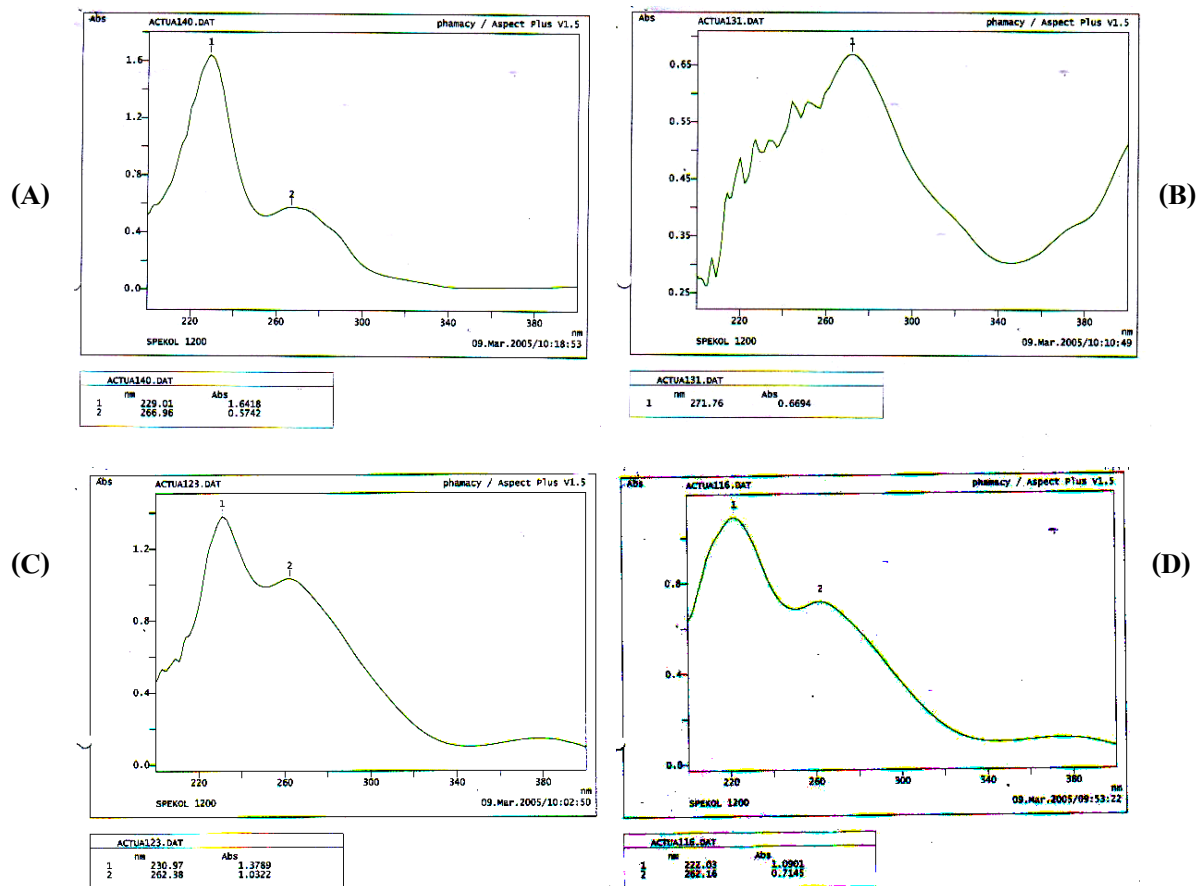
รูปที่ 3-1 แสดง UV spectra ของสารสกัดจากใบสะระแหน่

- (A) สารสกัดจาก *n*-Hexane
- (B) สารสกัดจาก Ethyl acetate
- (C) สารสกัดจาก *n*-Butanol
- (D) สารสกัดจาก Methanol



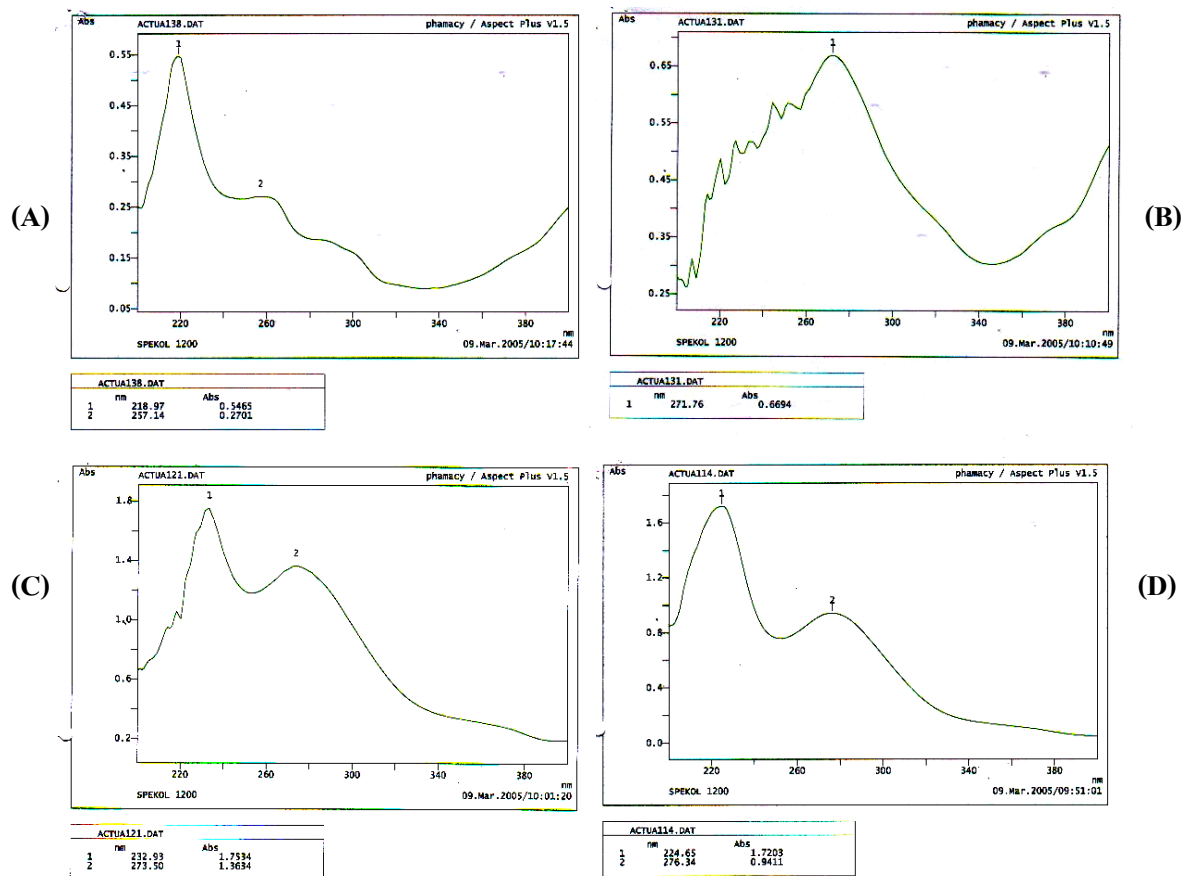
รูปที่ 3-2 แสดง UV spectra ของสารสกัดจากใบฝรั่ง

- (A) สารสกัดจาก *n*-Hexane
- (B) สารสกัดจาก Ethyl acetate
- (C) สารสกัดจาก *n*-Butanol
- (D) สารสกัดจาก Methanol



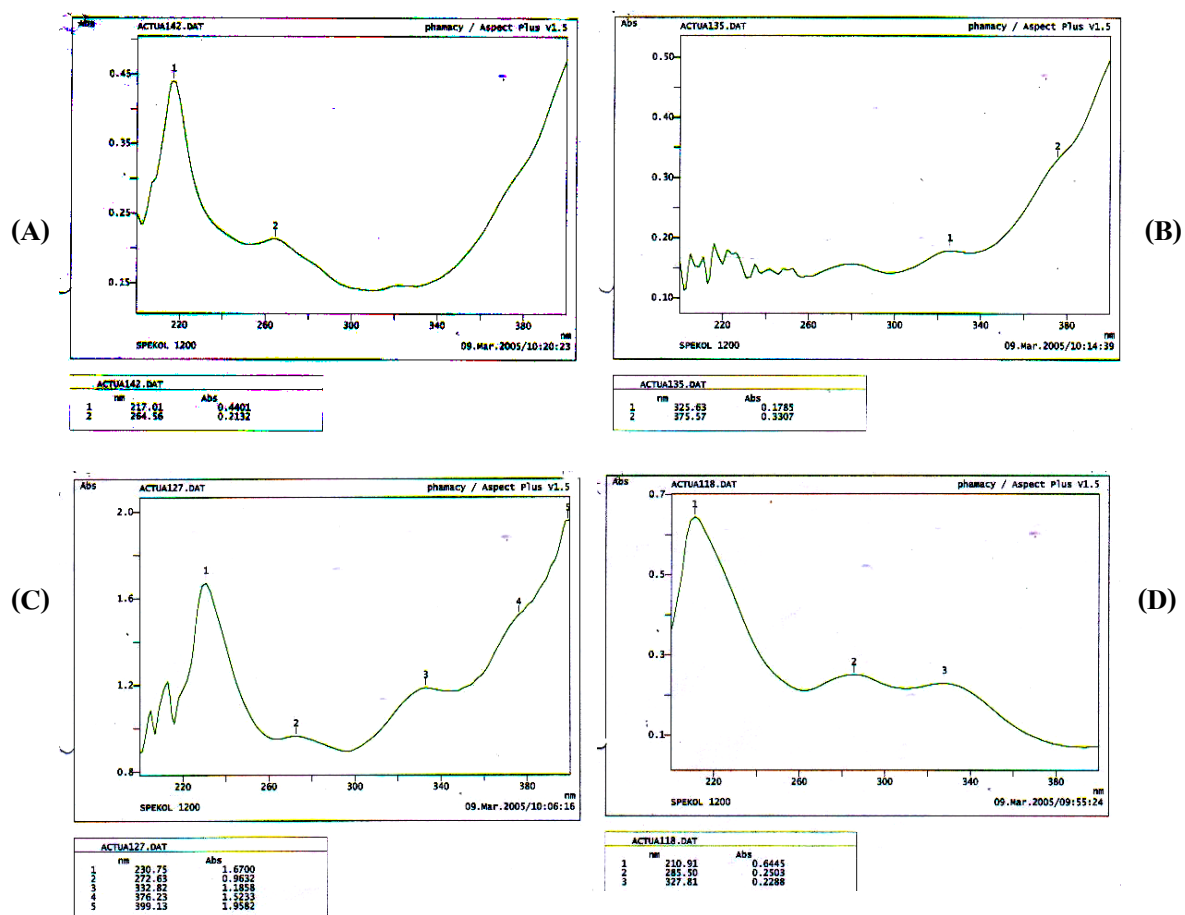
รูปที่ 3-3 แสดง UV spectra ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม

- (A) สารสกัดจาก *n*-Hexane
- (B) สารสกัดจาก Ethyl acetate
- (C) สารสกัดจาก *n*-Butanol
- (D) สารสกัดจาก Methanol



รูปที่ 3-4 แสดง UV spectra ของสารสกัดจากใบทับทิม

- (A) สารสกัดจาก *n*-Hexane
- (B) สารสกัดจาก Ethyl acetate
- (C) สารสกัดจาก *n*-Butanol
- (D) สารสกัดจาก Methanol



รูปที่ 3-5 แสดง UV spectra ของสารสกัดจากใบรางจืด

- (A) สารสกัดจาก *n*-Hexane
- (B) สารสกัดจาก Ethyl acetate
- (C) สารสกัดจาก *n*-Butanol
- (D) สารสกัดจาก Methanol

ตารางที่ 3-13 แสดงตำแหน่งของ IR spectrum ของ Methanol extract

No.	Position on IR spectrum	ใบฝรั่ง	ใบทับทิม	เปลือกผลทับทิม	ใบสระแหน่	ใบรางจืด
1	Alcohol (O-H) at 3600-3300cm ⁻¹	3373.15	3353.62	3353.64	3364.6	3389.71
2	C-H stretching at 3000-2850 cm ⁻¹	2926.01	2900	2900	2926.16	2924.80 and 2853.41
3	Double bond (C=C) at 1650 - 1450 cm ⁻¹	1615.81	1615.81	1614.76	1601.11	1606.11
4	C-H in CH ₂ CH ₃ at 1450 and 1375 cm ⁻¹	—	—	—	—	—

ตารางที่ 3-14 แสดงตำแหน่งของ IR spectrum ของ Butanol extract

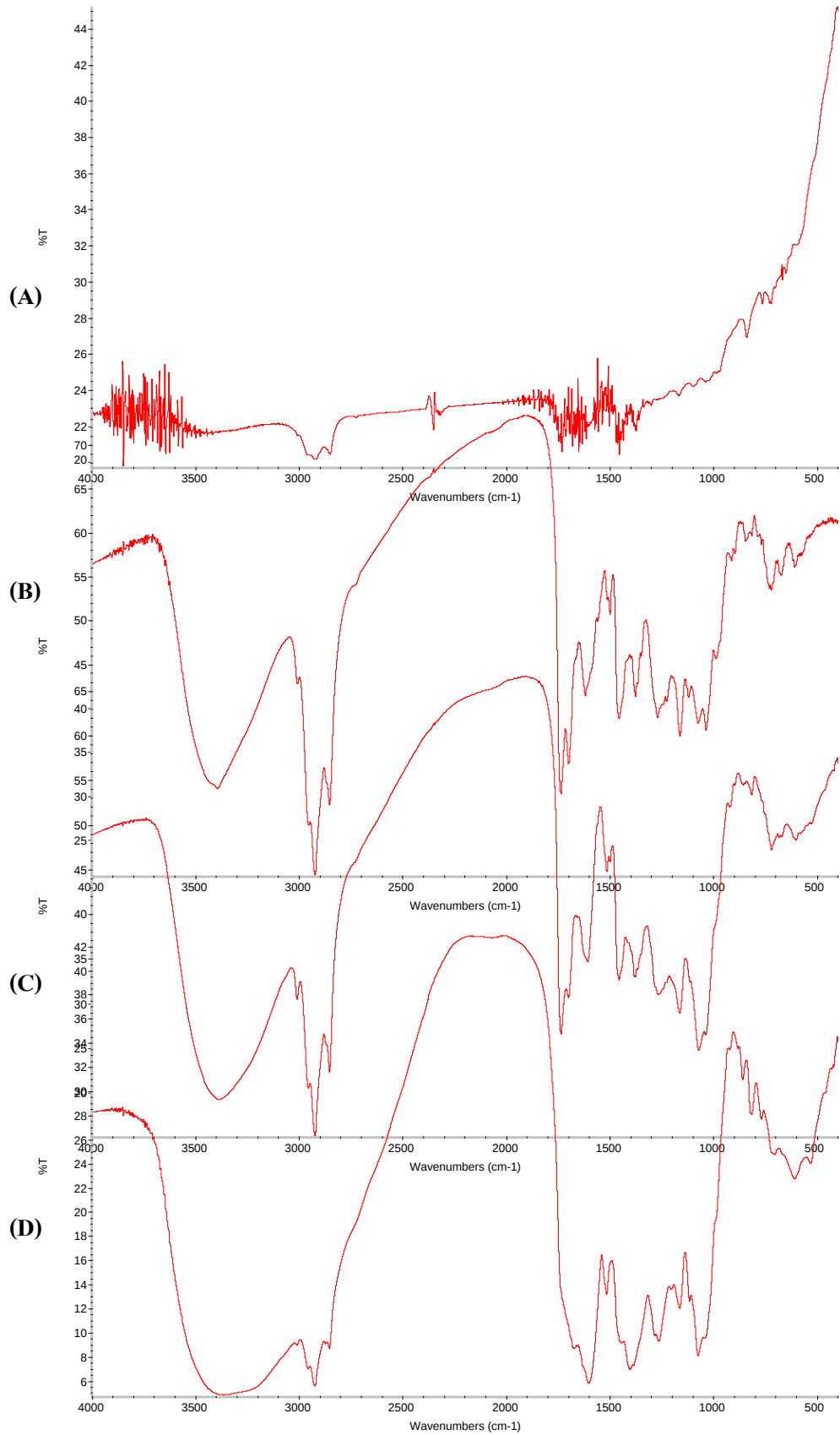
No.	Position on IR spectrum	ใบฝรั่ง	ใบทับทิม	เปลือกผลทับทิม	ใบสาระแน	ใบรางจืด
1	Alcohol (O-H) at 3600-3300cm ⁻¹	3388.81	3388.43	3373.05	3388.67	—
2	C-H stretching at 3000-2850 cm ⁻¹	2926.13	2925.05	2900	2925.57 and 2853.60	2924.1
3	Double bond (C=C) at 1650 - 1450 cm ⁻¹	1615.42	1615.42	1612.49	1608.05	—
4	C-H in CH ₂ CH ₃ at 1450 and 1375 cm ⁻¹	—	—	—	1455.89 and 1382.56	—

ตารางที่ 3-15 แสดงตำแหน่งของ IR spectrum ของ Ethyl acetate extract

No.	Position on IR spectrum	ใบฝรั่ง	ใบทับทิม	เปลือกผลทับทิม	ใบสระแหน่	ใบรางจืด
1	Alcohol (O-H) at 3600-3300cm ⁻¹	3392.59	3399.68	3388.6	3394.83	—
2	C-H stretching at 3000-2850 cm ⁻¹	2925.30 and 2853.06	2925.92	2926.36	2925.51 and 2853.57	2925.2
3	Double bond (C=C) at 1650 - 1450 cm ⁻¹	1615.36	1615.36	1615.69	1618.61	1695.54
4	C-H in CH ₂ CH ₃ at 1450 and 1375 cm ⁻¹	1455.64, 1372.79	—	—	1456.00, 1377.24	1455.25, 1376.47

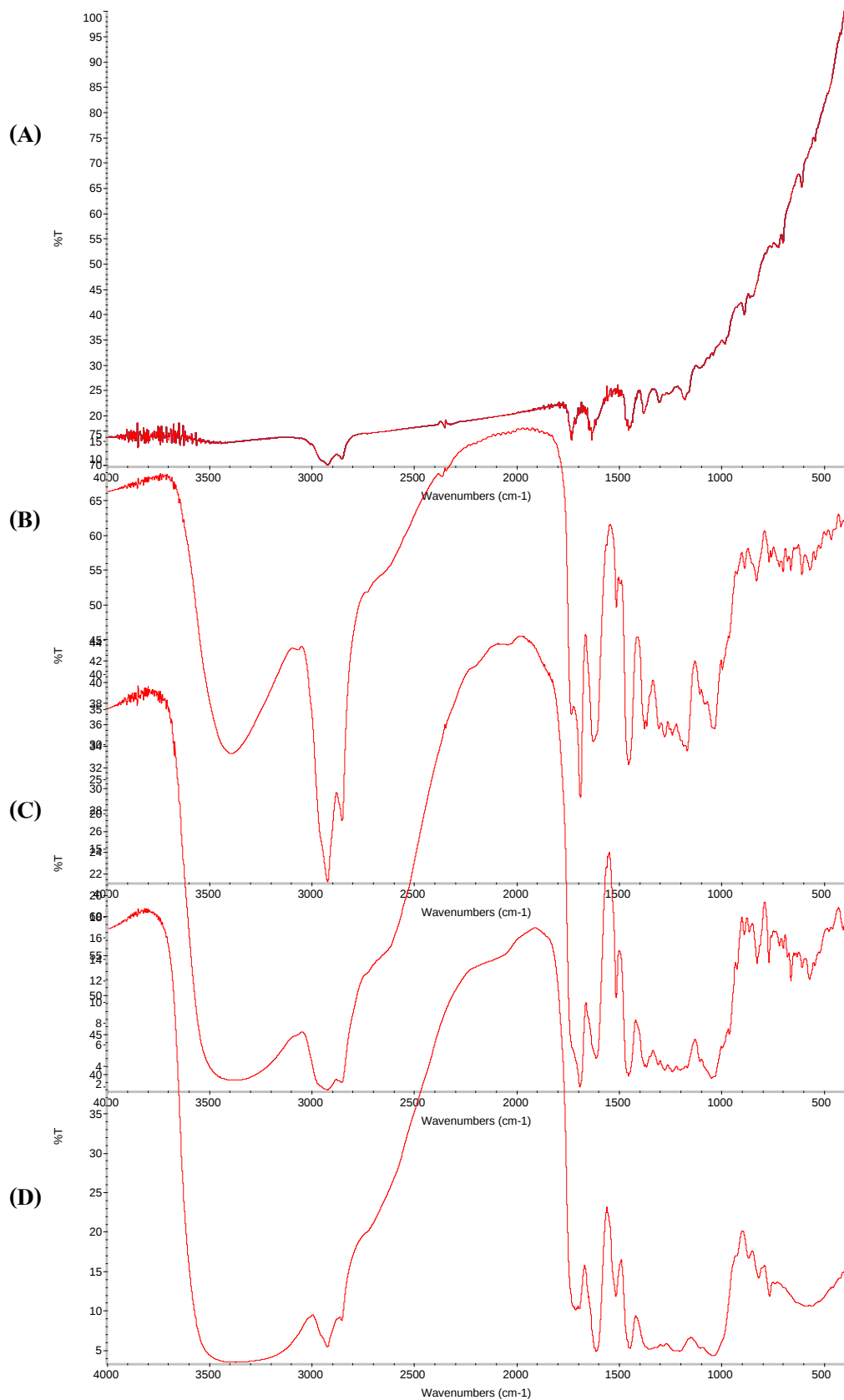
ตารางที่ 3-16 แสดงตำแหน่งของ IR spectrum ของ Hexane extract

No.	Position on IR spectrum	ใบฝรั่ง	ใบทับทิม	เปลือกผลทับทิม	ใบสระแหน่	ใบรางจืด
1	Alcohol (O-H) at 3600-3300cm ⁻¹	—	—	—	—	—
2	C-H stretching at 3000-2850 cm ⁻¹	2923.49	2923.49	2925.14	2922.3	2925.20 and 2853.45
3	Double bond (C=C) at 1650 - 1450 cm ⁻¹	—	—	—	—	—
4	C-H in CH ₂ CH ₃ at 1450 and 1375 cm ⁻¹	1462.33, 1376.92	1462.33, 1376.92	1463.51, 1376.92	—	1454.85, 1376.21



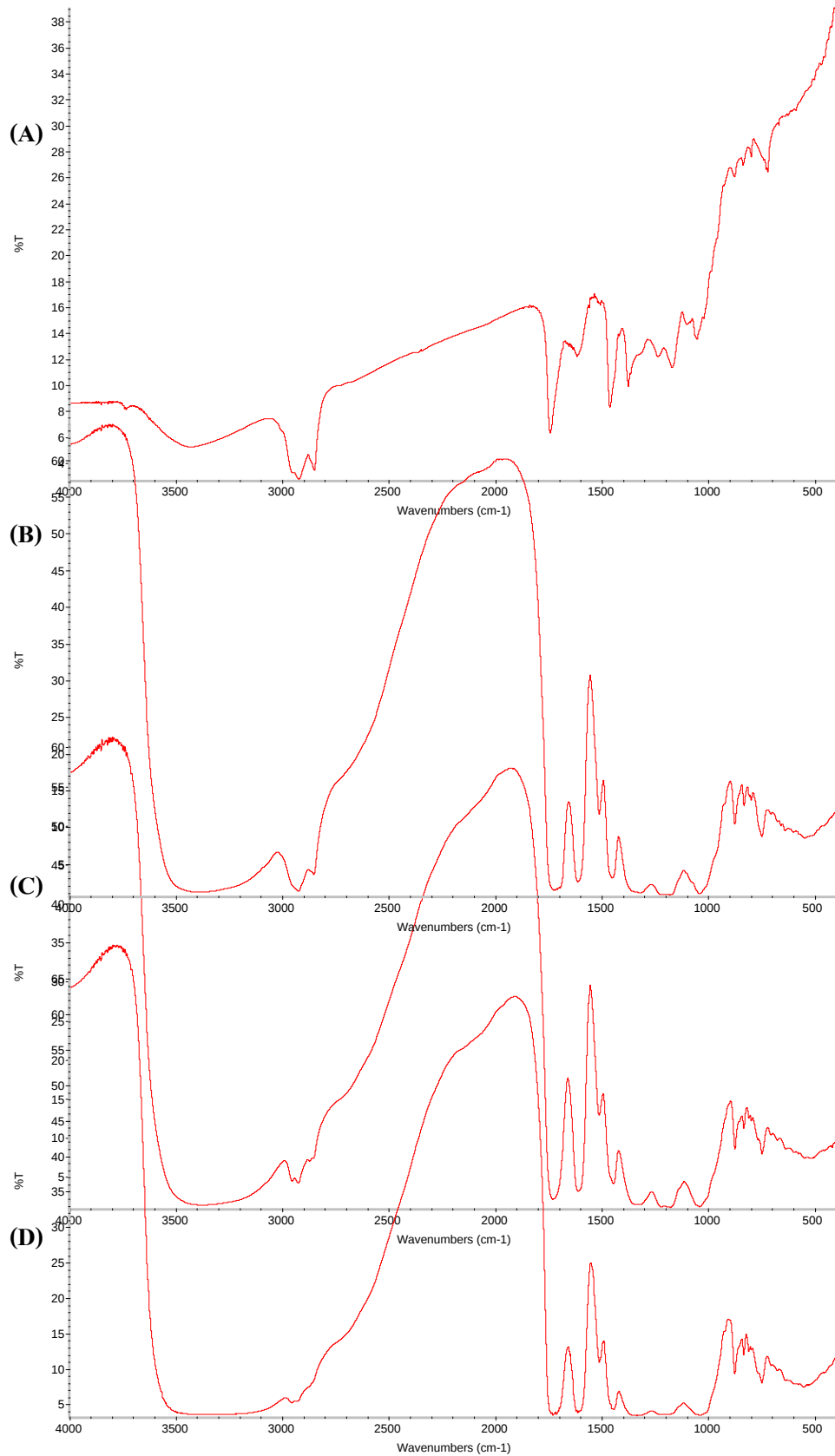
รูปที่ 3-6 แสดง IR spectra ของสารสกัดจากใบสะระแหน่

- | | |
|----------------------------------|------------------------------|
| (A) สารสกัดจาก <i>n</i> -Hexane | (B) สารสกัดจาก Ethyl acetate |
| (C) สารสกัดจาก <i>n</i> -Butanol | (D) สารสกัดจาก Methanol |



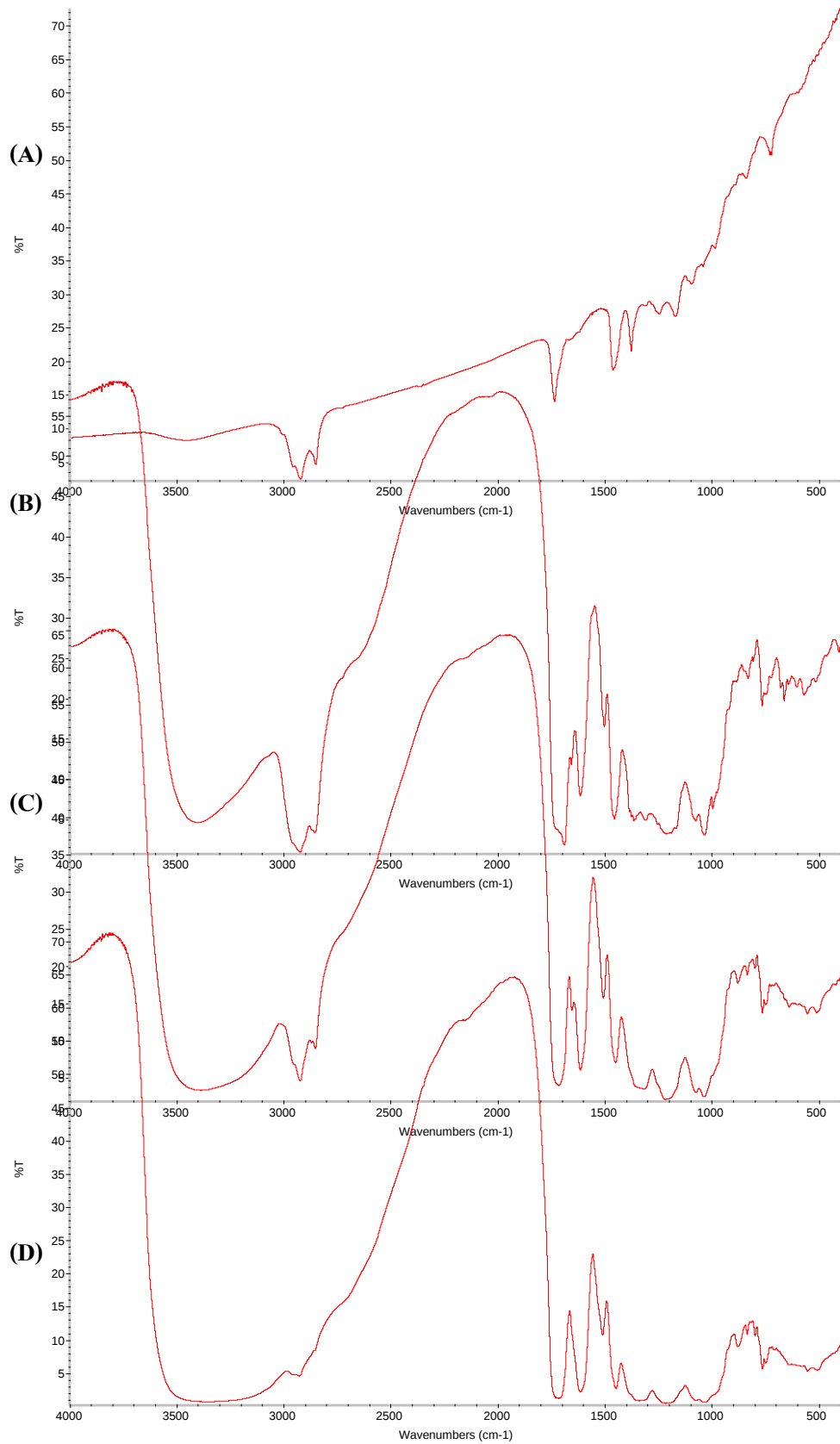
รูปที่ 3-7 แสดง IR spectra ของสารสกัดจากใบฝรั่ง

- (A) สารสกัดจาก *n*-Hexane (B) สารสกัดจาก Ethyl acetate
 (C) สารสกัดจาก *n*-Butanol (D) สารสกัดจาก Methanol



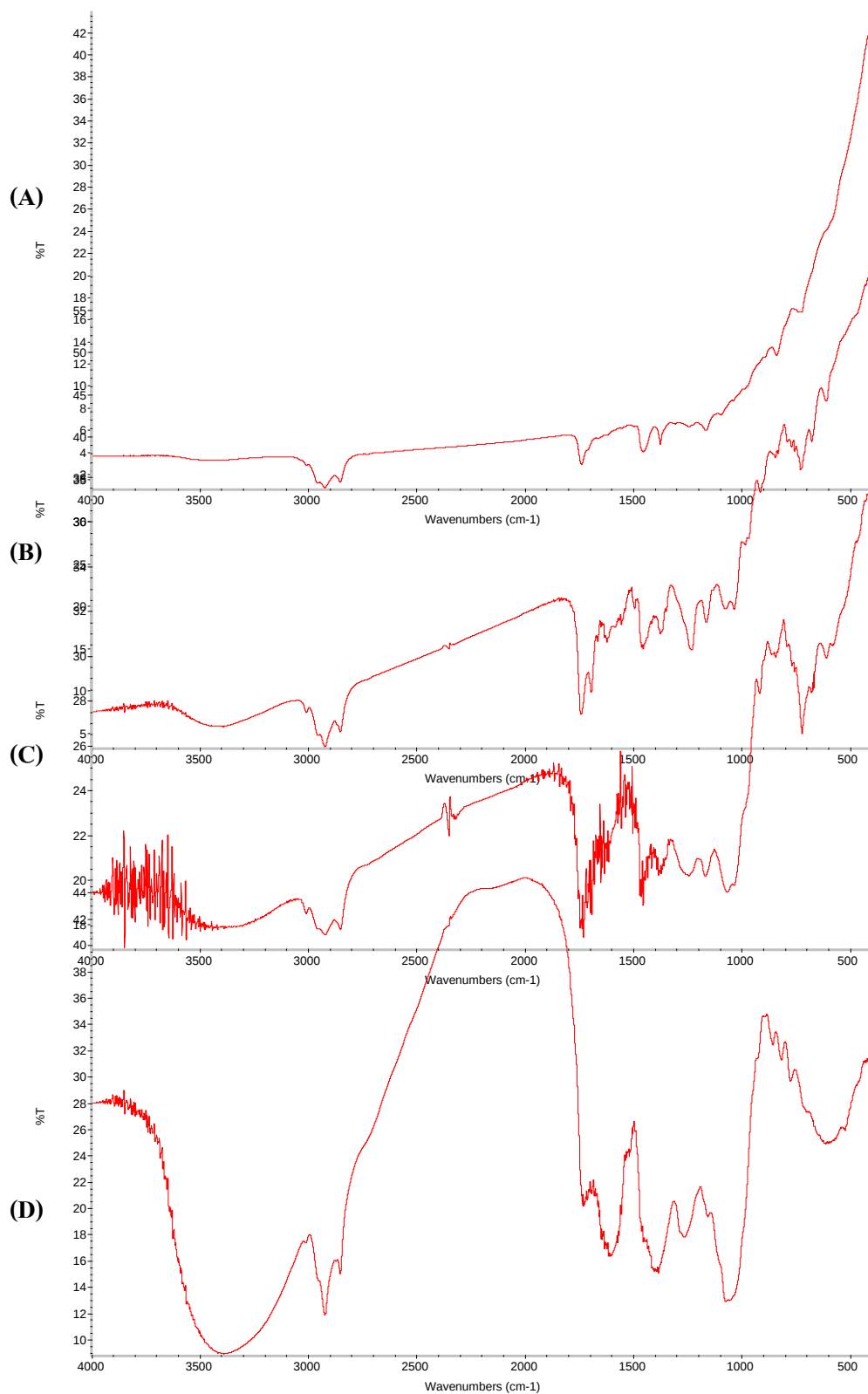
รูปที่ 3-8 แสดง IR spectra ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม

- (A) สารสกัดจาก *n*-Hexane (B) สารสกัดจาก Ethyl acetate
(C) สารสกัดจาก *n*-Butanol (D) สารสกัดจาก Methanol



รูปที่ 3-9 แสดง IR spectra ของสารสกัดจากใบทับทิม

- (A) สารสกัดจาก *n*-Hexane (B) สารสกัดจาก Ethyl acetate
(C) สารสกัดจาก *n*-Butanol (D) สารสกัดจาก Methanol



รูปที่ 3-10 แสดง IR spectra ของสารสกัดจากใบรางจืด

- (A) สารสกัดจาก *n*-Hexane (B) สารสกัดจาก Ethyl acetate
(C) สารสกัดจาก *n*-Butanol (D) สารสกัดจาก Methanol

จากผลของ UV และ IR พิจารณาได้ว่า สารสกัดจาก Ethyl acetate ของพืช / ส่วนของพืช 4 ชนิด คือ ใบสระแหน่ ใบฝรั่ง ใบทับทิม และเปลือกผลทับทิมอาจมีสารประกอบในกลุ่มที่มีหมู่ hydroxyl and aromatic compounds แต่จากใบรางจืดซึ่งอาจเป็น สารประกอบ hydrocarbon

สารสกัดจาก Hexane ของพืช / ส่วนของพืชทั้ง 5 ชนิด มี IR spectra ที่คล้ายกันคือมีหมู่ มีหมู่ C-H ที่บริเวณ $3000-2850\text{ cm}^{-1}$ และ CH_2CH_3 ที่ 1450 and 1375 cm^{-1} ซึ่งอาจเป็น สารประกอบ hydrocarbon ส่วน UV spectrum ของ Hexane extract เกิด 2-3 band แสดงว่าอาจมีสาร aromatic compounds

ผลการศึกษาฤทธิ์ Antioxidant และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดแยกส่วน

การทดสอบฤทธิ์ Antioxidant ของสารสกัดแยกส่วน โดยใช้ 4 วิธี คือ DPPH Method, (ABTS) Method, FRAP Method, และ Lipid peroxidation Method ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3-17 ถึง ตารางที่ 3-20 ตามลำดับ จากตารางผลการทดลองดังกล่าว หากเปรียบเทียบ solvent ที่ใช้พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่ในชั้น Methanol และ Butanol ให้ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ และลด oxidized intermediates ได้ดีที่สุด ตามลำดับ ผลการทดลองโดยวิธี ABTS และ FRAP ได้ผลเหมือนกันและสนับสนุนกัน ส่วนผลจาก DPPH แตกต่างจากสองวิธีดังกล่าวเล็กน้อย แต่โดยสรุปจากทั้ง 3 วิธี คือ ABTS, DPPH และ FRAP แล้วพบว่าสารสกัดจากใบทับทิม ใบฝรั่ง และเปลือกผลทับทิม โดยเฉพาะที่เป็น Methanol extract จัดอยู่ในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และลด oxidized intermediates ได้ดีที่สุด และให้ฤทธิ์แรงกว่า Butylated hydroxytoluene (BHT) ซึ่งเป็น positive control รองลงมาเป็นสารสกัดของพืชเหล่านี้ในชั้น Butanol หากพิจารณาจาก Total phenolic content (ตารางที่ 3-11) อาจพิจารณาได้ว่า Total phenolic content ที่มีอยู่ในสารสกัดมีอิทธิพลอย่างมากต่อฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ และลด oxidized intermediates นี้ ส่วนการยับยั้ง lipid peroxidation นั้นสารสกัดแต่ละชนิดใน solvent แต่ละชนิดให้ฤทธิ์ที่แตกต่างกัน โดยพบว่า Butanol extract ของใบรางจืดมีฤทธิ์สูงที่สุด โดยมี %AA ถึง 98.72% ซึ่งสูงกว่า BHT ส่วนสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ ยับยั้ง lipid peroxidation รองลงมาตามลำดับคือ Hexane extract ของใบสระแหน่, Hexane extract ของใบฝรั่ง, Ethyl acetate extract ของ เปลือกผลทับทิม และ Ethyl acetate extract ของใบทับทิม

เมื่อนำสารสกัดแยกส่วนทั้ง 20 ชนิดมาทดสอบ Cytotoxic ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (PBMC) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3-21 ถึงตารางที่ 3-25 และรูปที่ 3-11 จากผลดังกล่าวสามารถหาค่า IC_{50} ดังแสดงในตารางที่ 3-26 ซึ่งพบว่าใบสระแหน่ (Ethyl acetate extract), ใบทับทิม (Ethyl acetate extract และ Methanol extract), เปลือกผลทับทิม ((Ethyl acetate extract และ Methanol extract), และใบรางจืด (Ethyl acetate extract) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ส่วนสารสกัดจากใบฝรั่งจากทุก ๆ solvent และสารสกัดอื่น ๆ ที่มีค่า IC_{50} มากกว่า 40 ไมโครกรัม / มิลลิตร ถือว่าไม่มีพิษต่อเซลล์ปกติ

ตารางที่ 3-17 แสดงฤทธิ์ Antioxidant ของสารสกัดแยกส่วนโดยวิธี DPPH

ลำดับที่	สารสกัดแยกส่วนที่ได้	IC ₅₀ (mg/mL)
1	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Hexane	0.198 ± 0.019
2	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Ethyl acetate	0.074 ± 0.011
3	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Butanol	0.043 ± 0.009
4	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Methanol	0.014 ± 0.005
5	สารสกัดใบฝรั่งจาก Hexane	0.121 ± 0.027
6	สารสกัดใบฝรั่งจาก Ethyl acetate	0.022 ± 0.001
7	สารสกัดใบฝรั่งจาก Butanol	0.056 ± 0.004
8	สารสกัดใบฝรั่งจาก Methanol	0.002 ± 0.001
9	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Hexane	0.306 ± 0.039
10	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Ethyl acetate	0.046 ± 0.004
11	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Butanol	0.006 ± 0.002
12	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Methanol	0.001 ± 0.001
13	สารสกัดใบทับทิมจาก Hexane	0.049 ± 0.006
14	สารสกัดใบทับทิมจาก Ethyl acetate	0.021 ± 0.001
15	สารสกัดใบทับทิมจาก Butanol	0.035 ± 0.006
16	สารสกัดใบทับทิมจาก Methanol	0.001 ± 0.001
17	สารสกัดใบรางจืดจาก Hexane	0.133 ± 0.057
18	สารสกัดใบรางจืดจาก Ethyl acetate	0.121 ± 0.025
19	สารสกัดใบรางจืดจาก Butanol	0.186 ± 0.041
20	สารสกัดใบรางจืดจาก Methanol	0.031 ± 0.009
21	BHT	0.220 ± 0.005

ตารางที่ 3-18 แสดงฤทธิ์ Antioxidant ของสารสกัดแยกส่วนโดยวิธี ABTS

ลำดับที่	สารสกัดแยกส่วนที่ได้	TEAC (mM/mg)
1	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Hexane	0.523 ± 0.051
2	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Ethyl acetate	2.358 ± 0.058
3	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Butanol	2.391 ± 0.021
4	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Methanol	2.429 ± 0.005
5	สารสกัดใบฝรั่งจาก Hexane	1.061 ± 0.017
6	สารสกัดใบฝรั่งจาก Ethyl acetate	2.647 ± 0.065
7	สารสกัดใบฝรั่งจาก Butanol	2.901 ± 0.023
8	สารสกัดใบฝรั่งจาก Methanol	3.785 ± 0.003
9	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Hexane	2.665 ± 0.012
10	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Ethyl acetate	2.977 ± 0.009
11	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Butanol	3.063 ± 0.013
12	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Methanol	3.660 ± 0.005
13	สารสกัดใบทับทิมจาก Hexane	0.676 ± 0.065
14	สารสกัดใบทับทิมจาก Ethyl acetate	3.644 ± 0.090
15	สารสกัดใบทับทิมจาก Butanol	3.825 ± 0.034
16	สารสกัดใบทับทิมจาก Methanol	4.403 ± 0.009
17	สารสกัดใบรางจืดจาก Hexane	0.490 ± 0.029
18	สารสกัดใบรางจืดจาก Ethyl acetate	1.532 ± 0.089
19	สารสกัดใบรางจืดจาก Butanol	2.009 ± 0.076
20	สารสกัดใบรางจืดจาก Methanol	2.477 ± 0.013
21	BHT	3.3529 ± 0.082

ตารางที่ 3-19 แสดงฤทธิ์ Antioxidant ของสารสกัดแยกส่วนโดยวิธี FRAP

ลำดับที่	สารสกัดแยกส่วนที่ได้	EC (mM/mg)
1	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Hexane	0.368 ± 0.006
2	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Ethyl acetate	0.680 ± 0.010
3	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Butanol	1.095 ± 0.018
4	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Methanol	2.270 ± 0.018
5	สารสกัดใบฝรั่งจาก Hexane	0.713 ± 0.003
6	สารสกัดใบฝรั่งจาก Ethyl acetate	1.146 ± 0.132
7	สารสกัดใบฝรั่งจาก Butanol	1.358 ± 0.032
8	สารสกัดใบฝรั่งจาก Methanol	3.647 ± 0.038
9	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Hexane	1.682 ± 0.076
10	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Ethyl acetate	3.060 ± 0.006
11	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Butanol	3.215 ± 0.141
12	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Methanol	4.373 ± 0.032
13	สารสกัดใบทับทิมจาก Hexane	0.784 ± 0.012
14	สารสกัดใบทับทิมจาก Ethyl acetate	2.776 ± 0.007
15	สารสกัดใบทับทิมจาก Butanol	4.104 ± 0.046
16	สารสกัดใบทับทิมจาก Methanol	4.984 ± 0.027
17	สารสกัดใบรางจืดจาก Hexane	0.427 ± 0.006
18	สารสกัดใบรางจืดจาก Ethyl acetate	0.653 ± 0.001
19	สารสกัดใบรางจืดจาก Butanol	0.712 ± 0.014
20	สารสกัดใบรางจืดจาก Methanol	1.052 ± 0.009
21	BHT	2.928 ± 0.089

ตารางที่ 3-20 แสดงฤทธิ์ Antioxidant ของสารสกัดแยกส่วนโดยวิธี Lipid peroxidation

ลำดับที่	สารสกัดแยกส่วนที่ได้	% AA
1	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Hexane	92.18 ± 0.110
2	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Ethyl acetate	52.03 ± 0.109
3	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Butanol	75.04 ± 0.121
4	สารสกัดใบสะระแหน่จาก Methanol	49.05 ± 0.115
5	สารสกัดใบฝรั่งจาก Hexane	87.74 ± 0.141
6	สารสกัดใบฝรั่งจาก Ethyl acetate	81.46 ± 0.153
7	สารสกัดใบฝรั่งจาก Butanol	24.21 ± 0.101
8	สารสกัดใบฝรั่งจาก Methanol	64.67 ± 0.095
9	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Hexane	39.92 ± 0.105
10	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Ethyl acetate	86.82 ± 0.118
11	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Butanol	73.48 ± 0.096
12	สารสกัดเปลือกผลทับทิมจาก Methanol	51.42 ± 0.164
13	สารสกัดใบทับทิมจาก Hexane	31.32 ± 0.130
14	สารสกัดใบทับทิมจาก Ethyl acetate	80.84 ± 0.118
15	สารสกัดใบทับทิมจาก Butanol	44.21 ± 0.123
16	สารสกัดใบทับทิมจาก Methanol	43.14 ± 0.144
17	สารสกัดใบรางจืดจาก Hexane	46.34 ± 0.097
18	สารสกัดใบรางจืดจาก Ethyl acetate	96.81 ± 0.112
19	สารสกัดใบรางจืดจาก Butanol	98.72 ± 0.120
20	สารสกัดใบรางจืดจาก Methanol	39.95 ± 0.057
21	BHT	97.77 ± 4.21

ตารางที่ 3-21 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบสระแหน่ต่อ PBMC

ความเข้มข้น (mcg/mL)	% Survival			
	<i>n</i> -Hexane	Ethyl acetate	<i>n</i> -Butanol	Methanol
0.00	100.00 ± 6.72	100.00 ± 1.02	100.00 ± 2.15	100.00 ± 2.21
6.25	87.24 ± 0.56	66.86 ± 2.71	92.55 ± 5.69	107.36 ± 1.62
12.50	67.92 ± 9.32	53.06 ± 2.46	83.64 ± 1.29	101.02 ± 4.92
25.00	58.91 ± 3.75	40.43 ± 1.37	63.56 ± 6.64	103.27 ± 3.75
50.00	48.97 ± 2.45	46.15 ± 1.57	57.14 ± 3.78	110.63 ± 12.34
100.00	49.91 ± 1.42	43.39 ± 1.90	66.67 ± 4.14	125.36 ± 3.49

ตารางที่ 3-22 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบฝรั่งต่อ PBMC

ความเข้มข้น (mcg/mL)	% Survival			
	<i>n</i> -Hexane	Ethyl acetate	<i>n</i> -Butanol	Methanol
0.00	100.00 ± 7.06	100.00 ± 5.18	100.00 ± 4.16	100.00 ± 5.79
6.25	99.55 ± 2.51	88.50 ± 4.16	96.38 ± 3.60	97.07 ± 13.96
12.50	96.04 ± 2.45	88.32 ± 5.98	90.44 ± 4.45	109.51 ± 4.46
25.00	107.93 ± 2.55	67.21 ± 3.35	95.57 ± 4.81	115.81 ± 1.83
50.00	96.04 ± 5.17	46.74 ± 1.90	101.41 ± 4.79	143.24 ± 2.49
100.00	99.46 ± 9.86	41.30 ± 3.34	101.91 ± 2.29	157.59 ± 5.13

ตารางที่ 3-23 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมต่อ PBMC

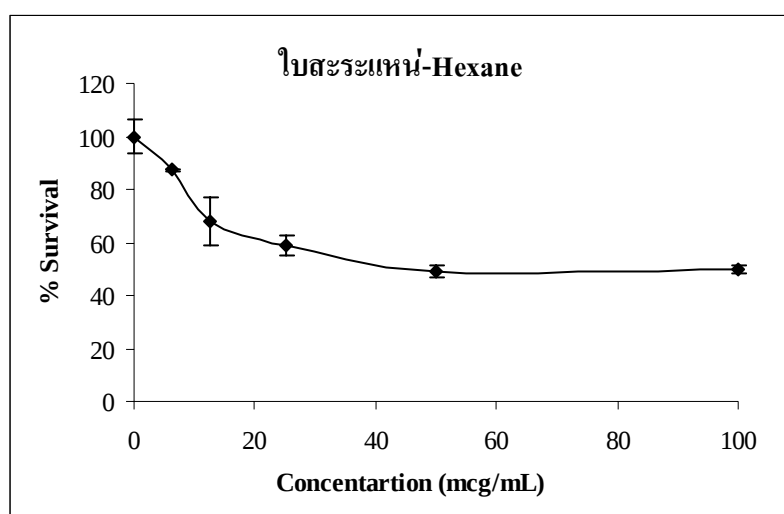
ความเข้มข้น (mcg/mL)	% Survival			
	<i>n</i> -Hexane	Ethyl acetate	<i>n</i> -Butanol	Methanol
0.00	100.00 ± 2.21	100.00 ± 9.80	100.00 ± 7.92	100.00 ± 1.29
6.25	91.06 ± 5.59	101.09 ± 4.50	94.72 ± 4.38	104.95 ± 1.54
12.50	87.04 ± 8.81	99.45 ± 5.75	101.00 ± 4.38	111.43 ± 1.80
25.00	85.40 ± 2.39	101.31 ± 5.21	104.40 ± 2.66	132.59 ± 4.46
50.00	80.11 ± 3.02	110.94 ± 7.65	102.00 ± 10.01	195.73 ± 6.91
100.00	83.21 ± 5.39	137.64 ± 4.33	117.59 ± 12.85	311.77 ± 6.89

ตารางที่ 3-24 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบทับทิมต่อ PBMC

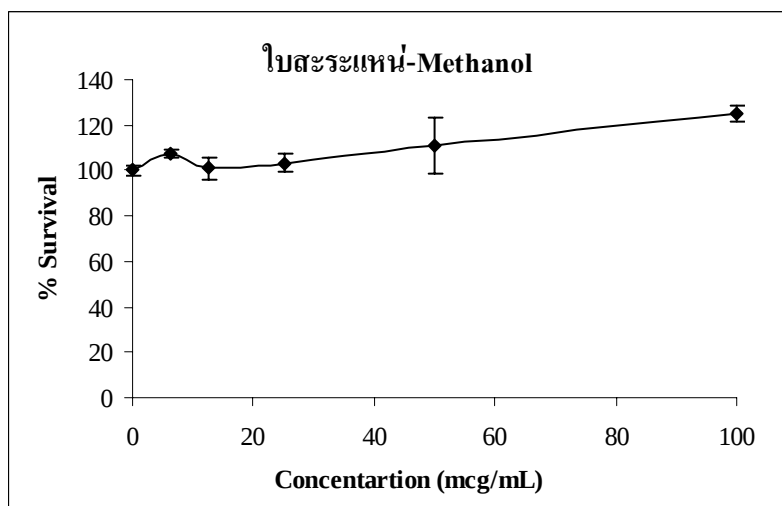
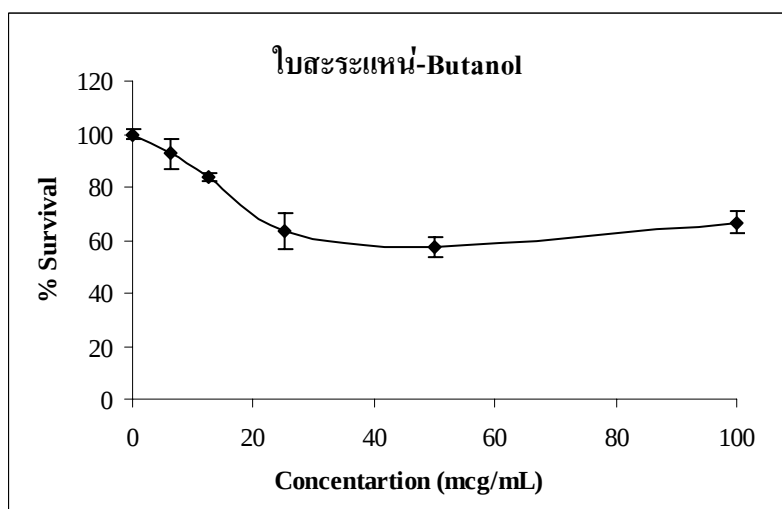
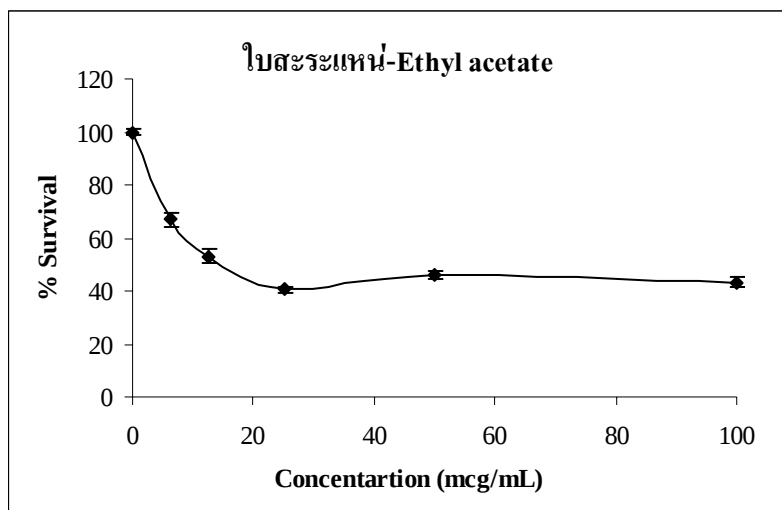
ความเข้มข้น (mcg/mL)	% Survival			
	<i>n</i> -Hexane	Ethyl acetate	<i>n</i> -Butanol	Methanol
0.00	100.00 ± 4.92	100.00 ± 2.06	100.00 ± 3.41	100.00 ± 2.16
6.25	96.24 ± 4.40	88.84 ± 0.67	100.64 ± 1.40	173.33 ± 10.65
12.50	97.81 ± 4.19	70.69 ± 3.34	94.77 ± 2.37	214.83 ± 3.66
25.00	97.76 ± 2.87	46.03 ± 3.43	99.90 ± 7.11	237.41 ± 41.31
50.00	92.10 ± 2.86	23.71 ± 0.22	97.43 ± 3.42	320.68 ± 53.96
100.00	96.00 ± 1.25	9.50 ± 0.50	96.64 ± 6.47	309.66 ± 25.00

ตารางที่ 3-25 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบรางจืดต่อ PBMC

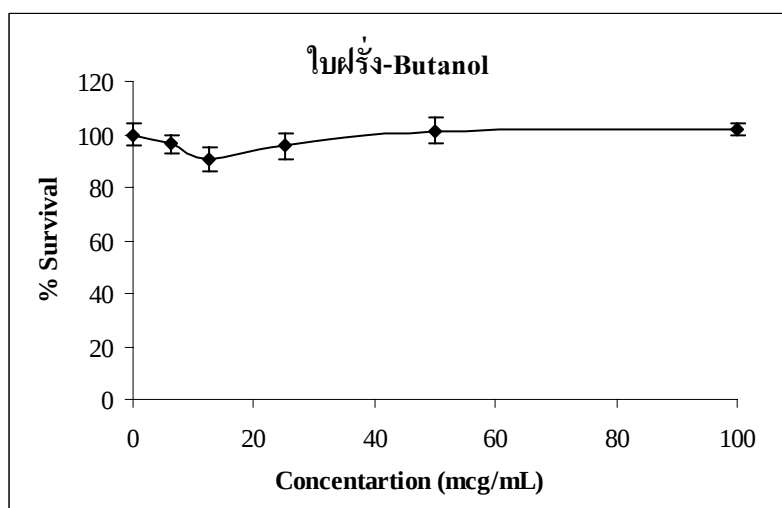
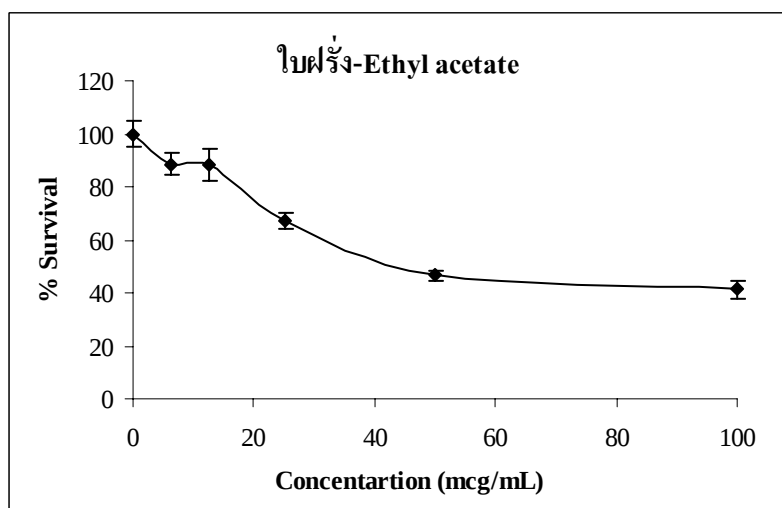
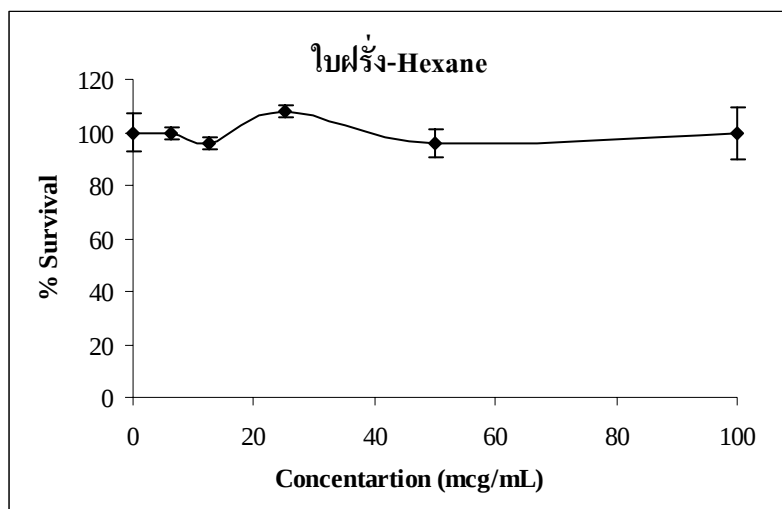
ความเข้มข้น (mcg/mL)	% Survival			
	<i>n</i> -Hexane	Ethyl acetate	<i>n</i> -Butanol	Methanol
0.00	100.00 ± 1.98	100.00 ± 6.60	100.00 ± 2.25	100.00 ± 4.93
6.25	91.37 ± 7.66	31.52 ± 4.94	103.46 ± 4.52	94.43 ± 2.61
12.50	97.75 ± 6.02	48.83 ± 4.87	102.12 ± 5.07	97.57 ± 3.17
25.00	81.99 ± 1.42	26.48 ± 1.41	77.27 ± 6.03	93.91 ± 2.76
50.00	75.05 ± 4.22	10.83 ± 0.89	37.14 ± 0.39	84.52 ± 3.17
100.00	80.49 ± 2.45	7.45 ± 0.53	17.15 ± 0.88	74.26 ± 2.63



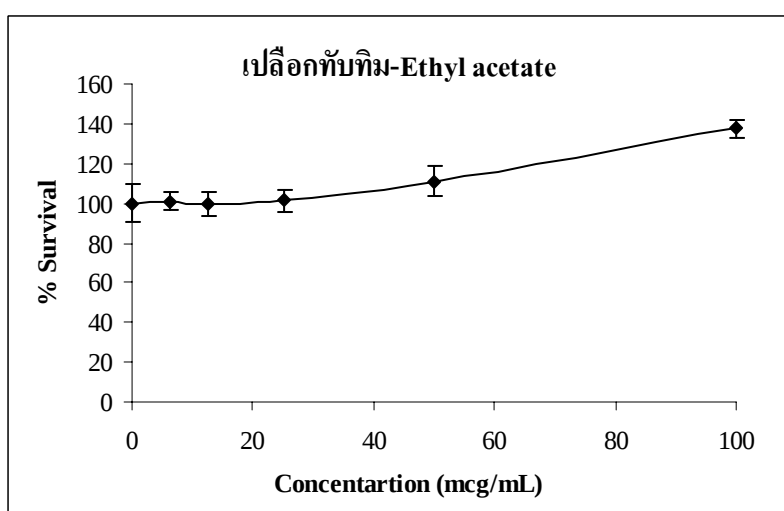
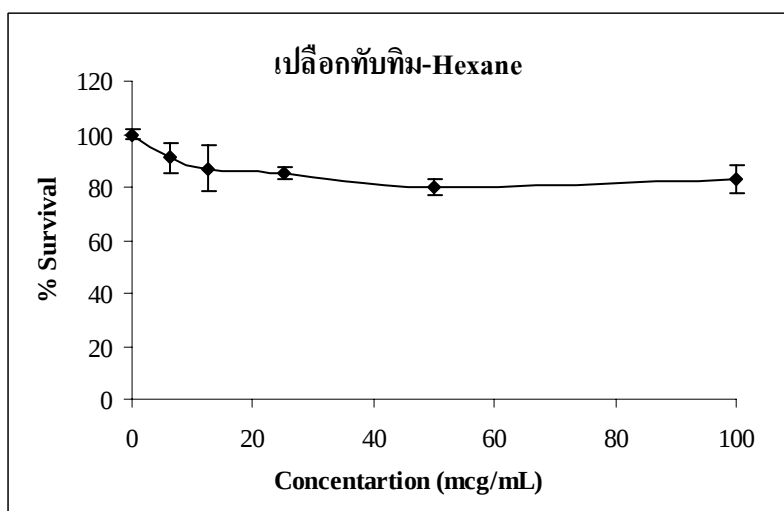
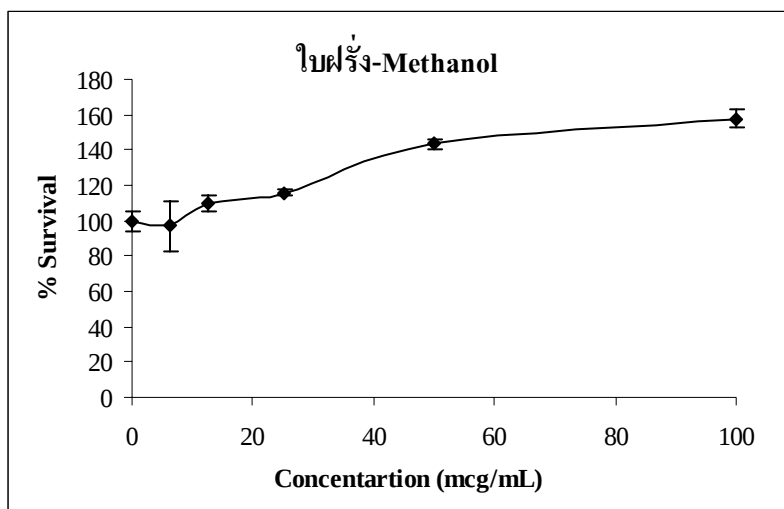
รูปที่ 3-11 แสดง Cytotoxicity ต่อ PBMC ของสารสกัดแยกส่วน



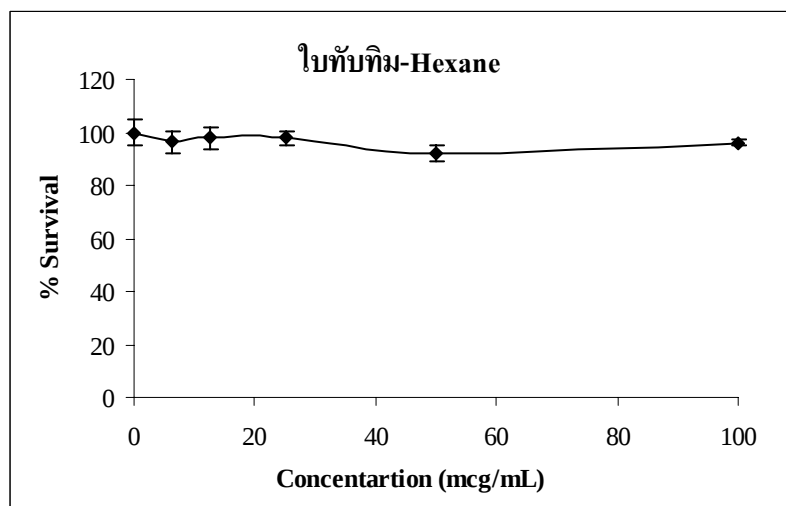
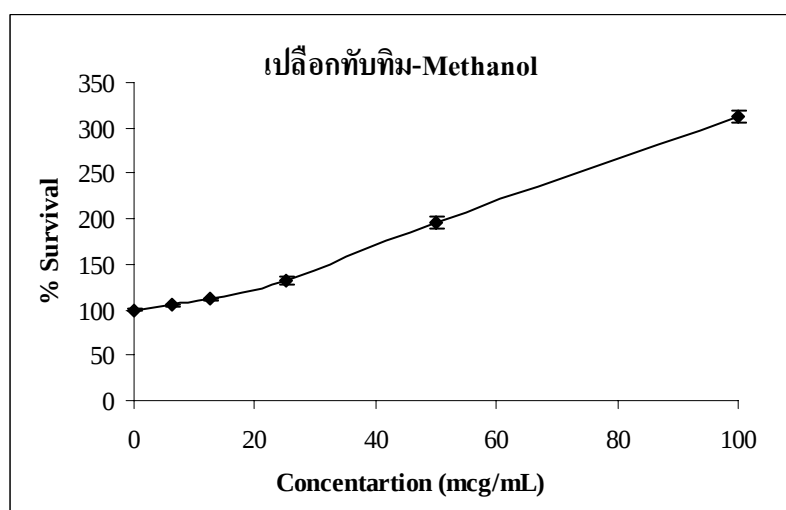
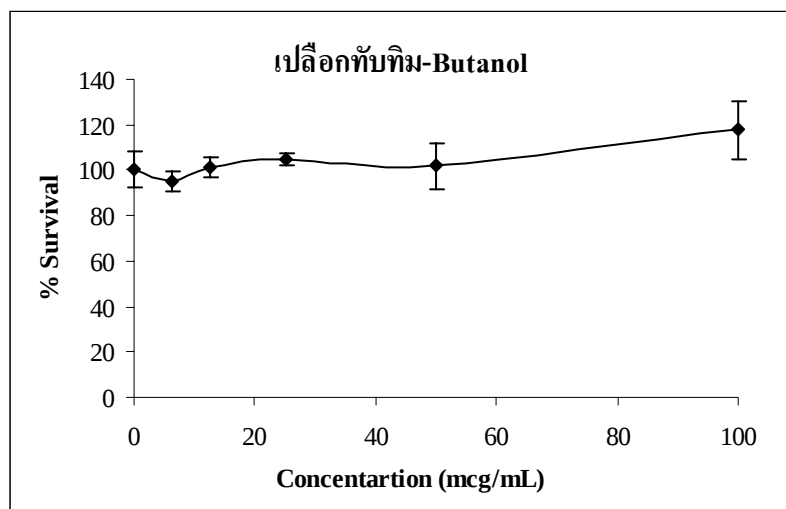
รูปที่ 3-11 (ต่อ)



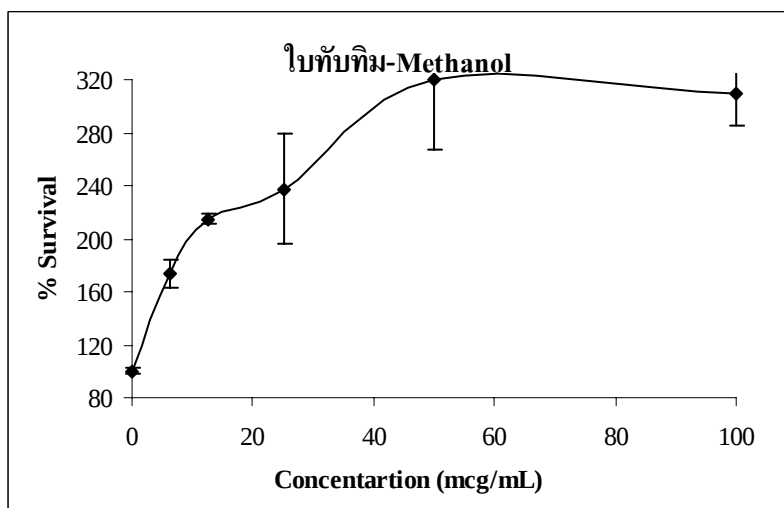
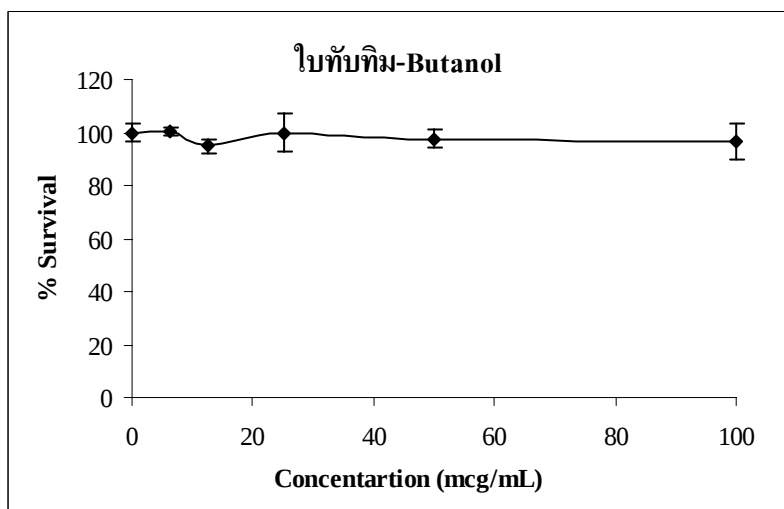
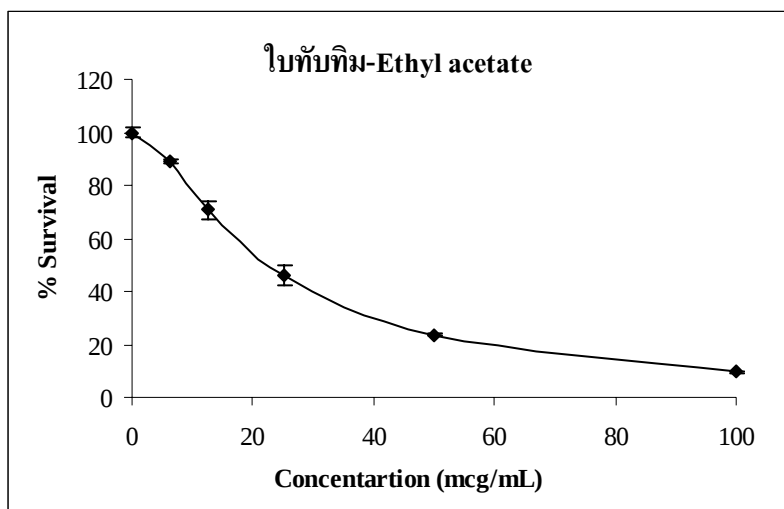
รูปที่ 3-11 (ต่อ)



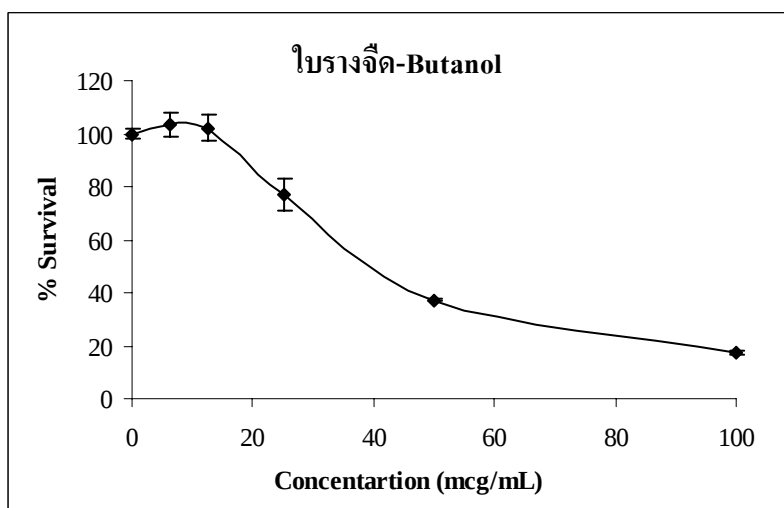
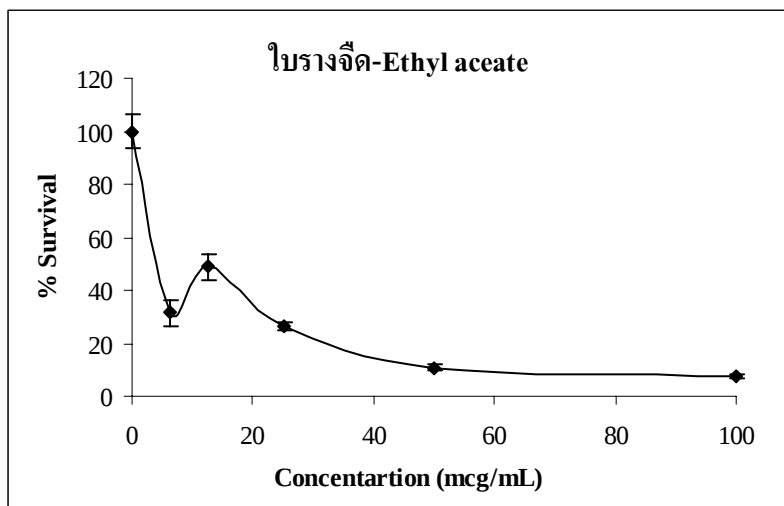
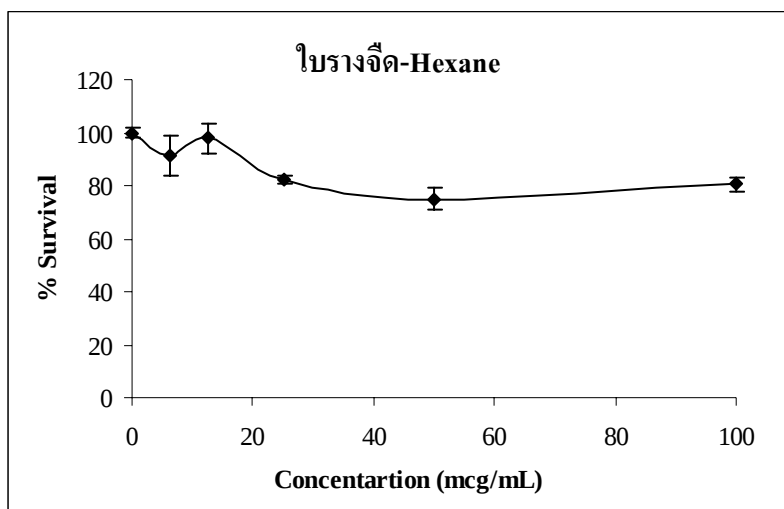
รูปที่ 3-11 (ต่อ)



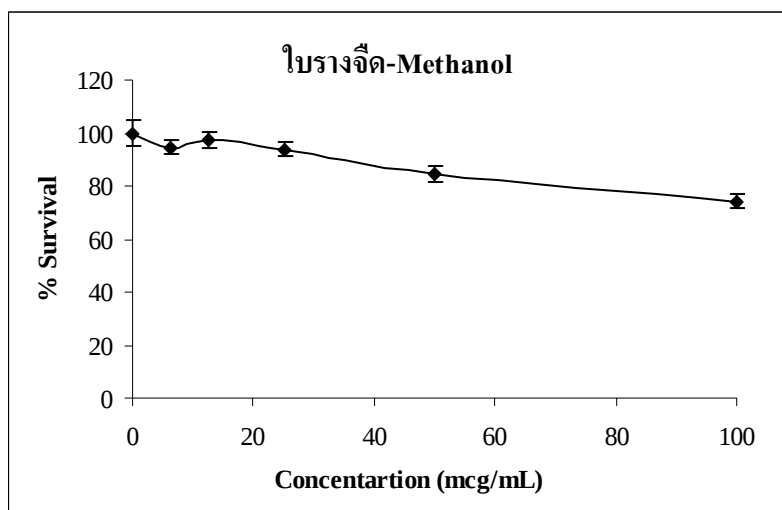
รูปที่ 3-11 (ต่อ)



รูปที่ 3-11 (ต่อ)



รูปที่ 3-11 (ต่อ)



รูปที่ 3-11 (ต่อ)

ตารางที่ 3-26 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดแยกส่วนเมื่อทดสอบ Cytotoxicity ต่อ PBMC

พืช / ส่วนที่ใช้	ค่า IC_{50} (μ g/ml)			
	Hexane	Ethyl acetate	Butanol	Methanol
ใบสะระแหน่	50.00	12.50	>100	>100
ใบฝรั่ง	>100	45.59	>100	กระตุ้น cell growth ที่ความเข้มข้น >50 mcg/mL
ใบทับทิม	>100	25.00	>100	กระตุ้น cell growth ที่ความเข้มข้น <6.25 mcg/mL
เปลือกผลทับทิม	>100	กระตุ้น cell growth ที่ความเข้มข้น >50 mcg/mL	>100	กระตุ้น cell growth ที่ความเข้มข้น >25 mcg/mL
ใบรางจืด	>100	12.5*	41.25	>100

เมื่อนำสารสกัดแยกส่วนทั้ง 20 ชนิดมาทดสอบ Cytotoxic ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2 cell) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3-27 ถึงตารางที่ 3-31 และรูปที่ 3-12 จากผลดังกล่าวสามารถหาค่า IC_{50} ดังแสดงในตารางที่ 3-32 ซึ่งพบว่าสารสกัดจากใบสะระแหน่ (Ethyl acetate extract) มีความเป็นพิษต่อ Caco-2 cell ส่วนสารสกัดอื่น ๆ ซึ่งมีค่า IC_{50} มากกว่า 40 ไมโครกรัม / มิลลิตร ถือว่าไม่มีพิษต่อเซลล์

ตารางที่ 3-27 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบสระแหน่ต่อ Caco-2 cell

ความเข้มข้น (mcg/mL)	% Survival			
	<i>n</i> -Hexane	Ethyl acetate	<i>n</i> -Butanol	Methanol
0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
5.00	103.36 ± 4.21	101.08 ± 0.90	100.89 ± 4.54	101.63 ± 3.49
50.00	101.24 ± 1.93	99.04 ± 0.76	100.24 ± 2.89	99.23 ± 1.04
100.00	100.51 ± 1.95	99.54 ± 1.51	95.18 ± 3.16	98.23 ± 1.42

ตารางที่ 3-28 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบฝรั่งต่อ Caco-2 cell

ความเข้มข้น (mcg/mL)	% Survival			
	<i>n</i> -Hexane	Ethyl acetate	<i>n</i> -Butanol	Methanol
0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
5.00	102.24 ± 2.17	101.70 ± 1.68	95.72 ± 3.24	101.55 ± 1.61
50.00	101.63 ± 1.74	101.66 ± 1.60	93.29 ± 2.41	100.20 ± 0.64
100.00	101.08 ± 2.04	101.05 ± 2.09	92.94 ± 0.66	97.69 ± 0.94

ตารางที่ 3-29 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมต่อ Caco-2 cell

ความเข้มข้น (mcg/mL)	% Survival			
	<i>n</i> -Hexane	Ethyl acetate	<i>n</i> -Butanol	Methanol
0.00	100.00 ± 0.00	ND	ND	100.00 ± 0.00
5.00	97.11 ± 4.28	ND	ND	100.27 ± 5.31
50.00	95.33 ± 1.14	ND	ND	100.20 ± 1.81
100.00	95.64 ± 2.26	ND	ND	100.00 ± 1.28

ตารางที่ 3-30 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบทับทิมต่อ Caco-2 cell

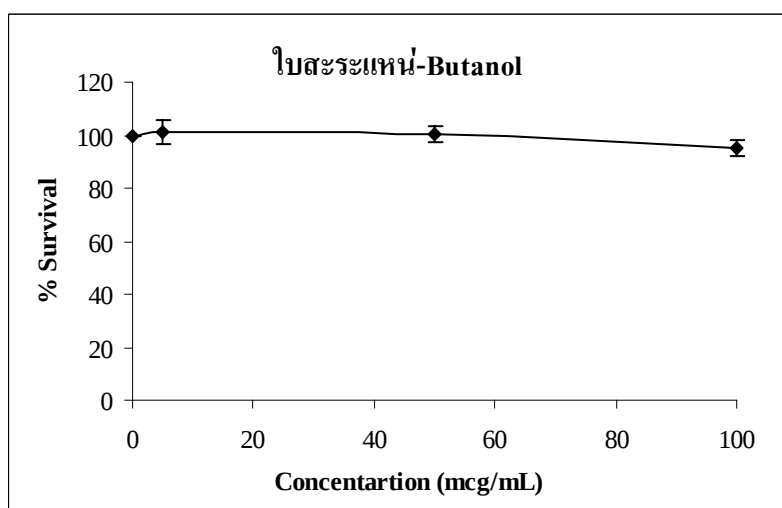
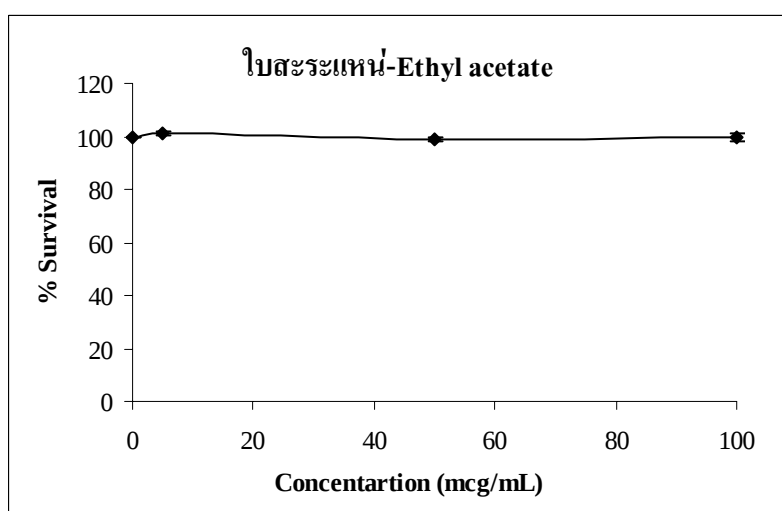
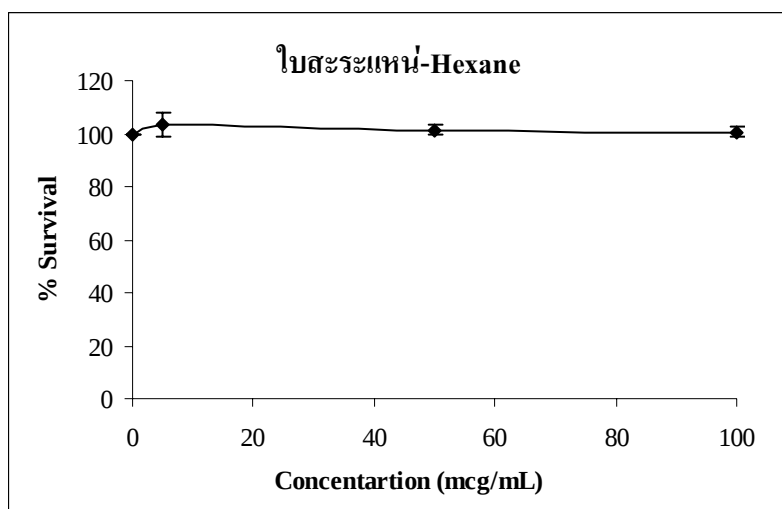
ความเข้มข้น (mcg/mL)	% Survival			
	<i>n</i> -Hexane	Ethyl acetate	<i>n</i> -Butanol	Methanol
0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
5.00	99.58 ± 0.70	100.51 ± 0.48	101.12 ± 0.48	94.10 ± 1.62
50.00	98.75 ± 3.20	99.35 ± 0.57	100.08 ± 0.57	92.94 ± 2.26
100.00	95.80 ± 0.95	99.62 ± 0.81	98.92 ± 0.81	92.05 ± 2.76

ตารางที่ 3-31 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของสารสกัดจากใบรางจืดต่อ Caco-2 cell

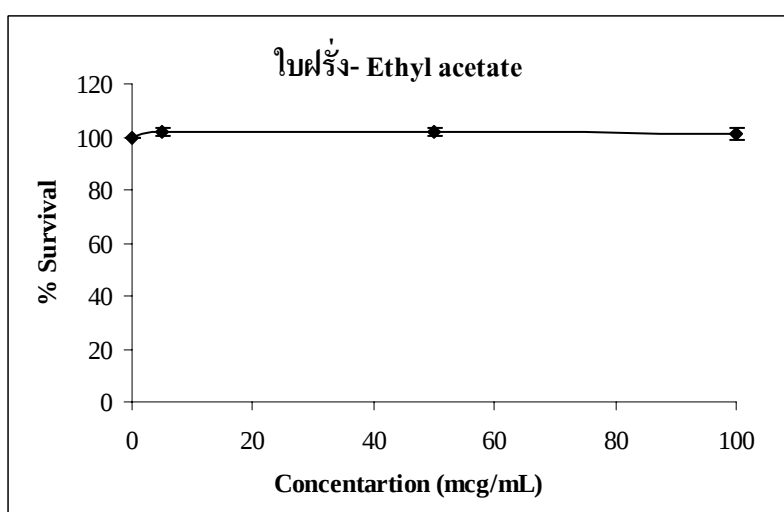
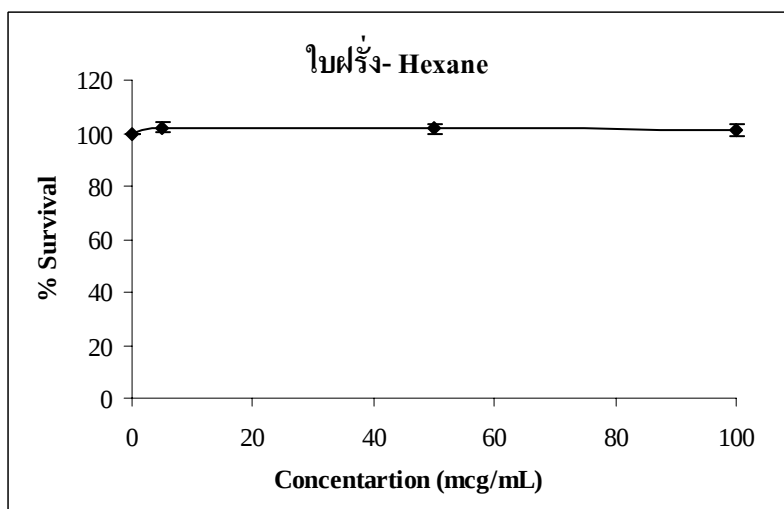
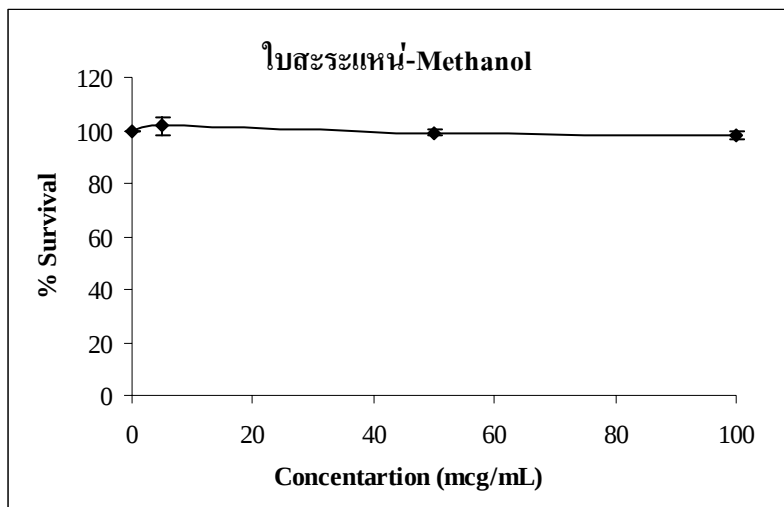
ความเข้มข้น (mcg/mL)	% Survival			
	<i>n</i> -Hexane	Ethyl acetate	<i>n</i> -Butanol	Methanol
0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
5.00	99.27 ± 1.56	101.28 ± 1.05	102.47 ± 2.94	97.15 ± 4.12
50.00	98.50 ± 1.34	101.08 ± 0.64	102.20 ± 0.41	96.41 ± 1.48
100.00	96.61 ± 2.34	99.69 ± 0.70	100.70 ± 0.35	95.45 ± 1.12

ตารางที่ 3-32 แสดงค่า IC₅₀ ของสารสกัดแยกส่วนเมื่อทดสอบ Cytotoxicity ต่อ Caco-2 cell

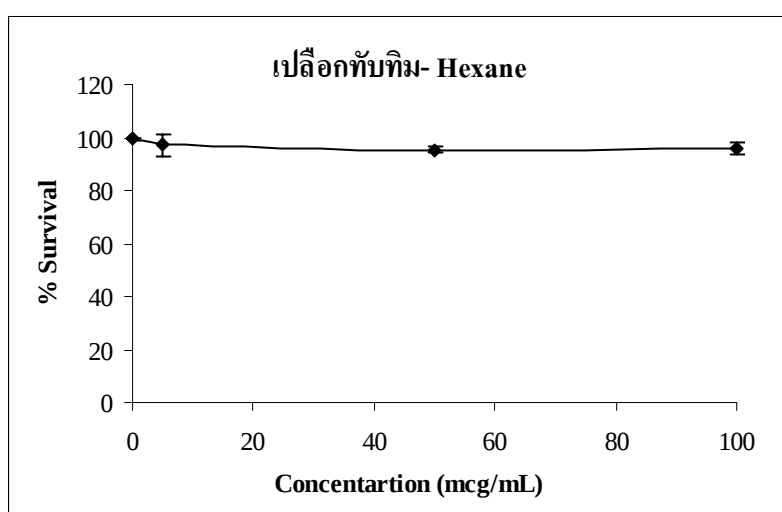
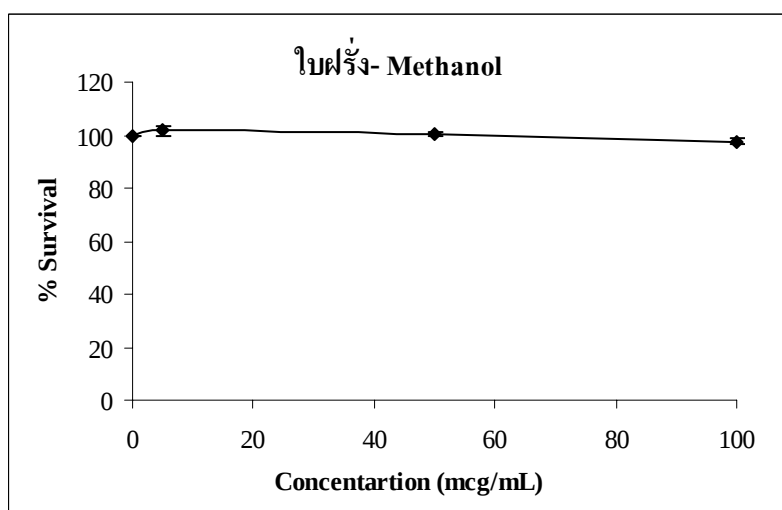
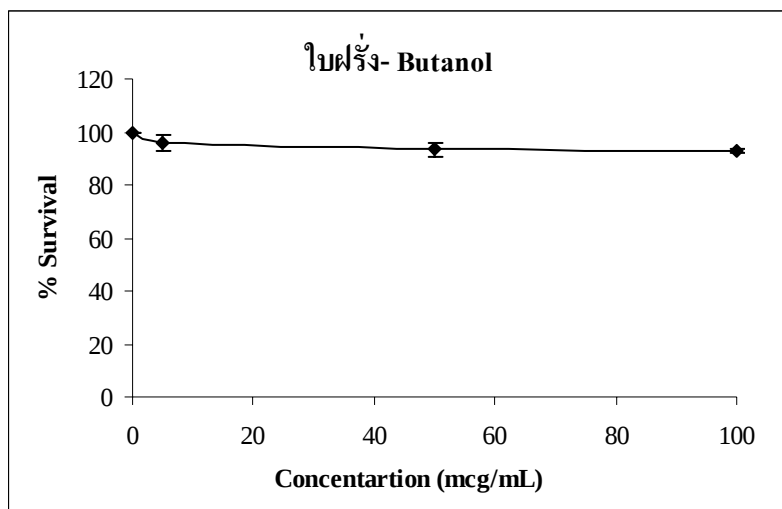
พืช / ส่วนที่ใช้	ค่า IC ₅₀ (mcg/mL)			
	Hexane	Ethyl acetate	Butanol	Methanol
ใบสาระแหน่	>100	12.50	>100	>100
ใบฝรั่ง	>100	>100	>100	>100
ใบทับทิม	>100	>100	>100	>100
เปลือกผลทับทิม	>100	>100	>100	>100
ใบรางจืด	>100	>100	>100	>100



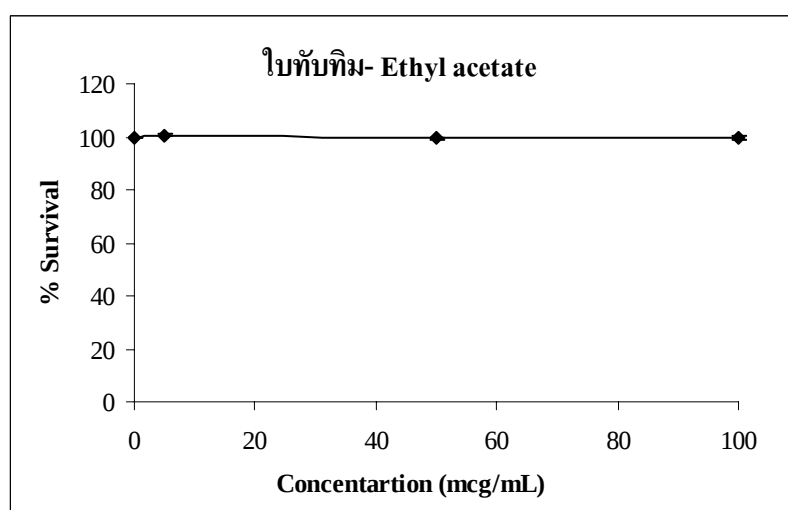
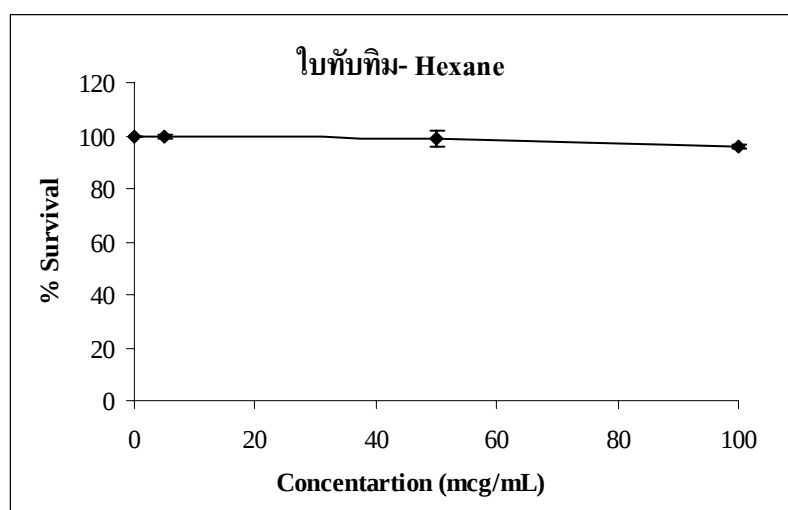
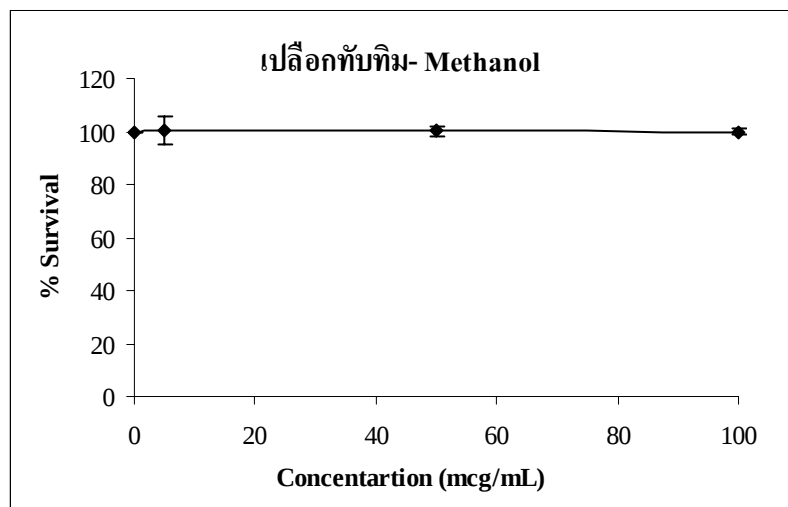
รูปที่ 3-12 แสดง Cytotoxicity ต่อ Caco-2 cell ของสารสกัดแยกส่วน



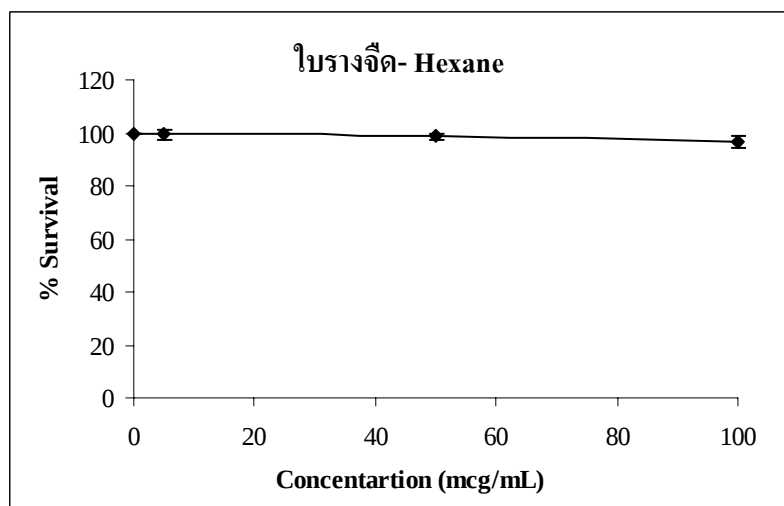
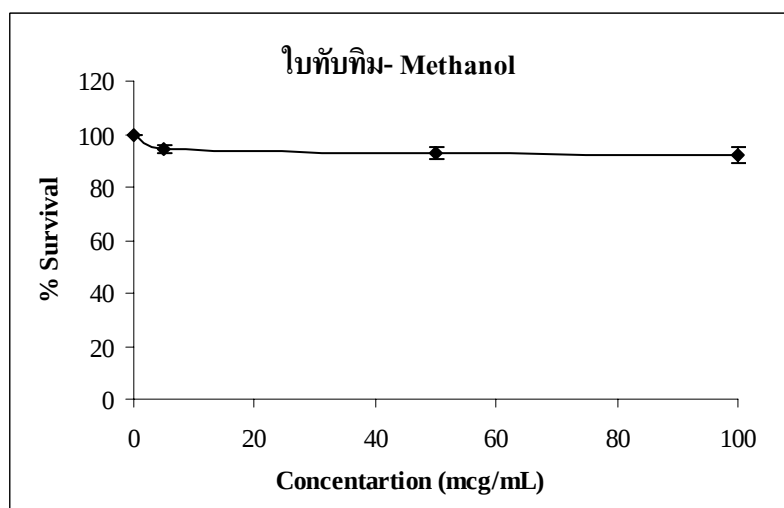
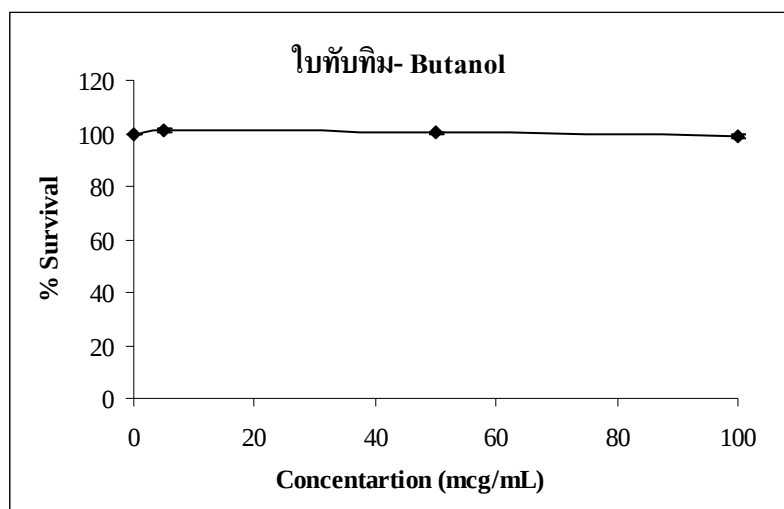
รูปที่ 3-12 (ต่อ)



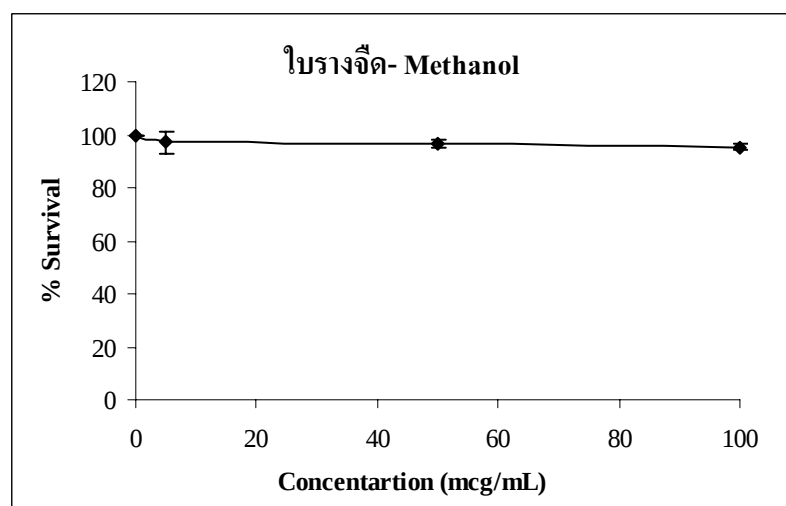
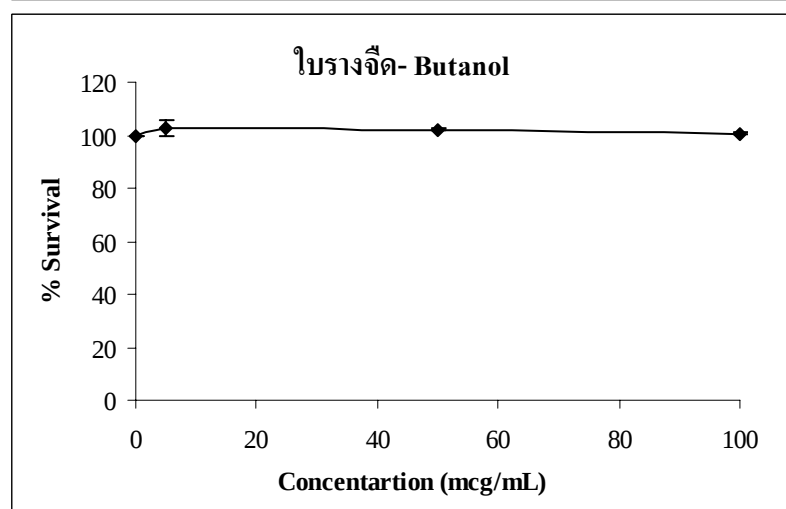
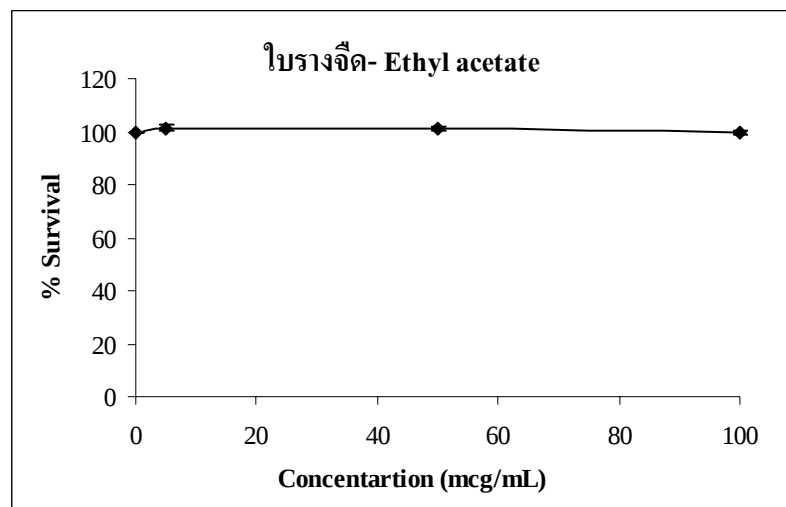
รูปที่ 3-12 (ต่อ)



รูปที่ 3-12 (ต่อ)



รูปที่ 3-12 (ต่อ)



รูปที่ 3-12 (ต่อ)

ผลการคัดเลือกสารสกัดแยกส่วน

จากผลการทดลองสารสกัดแยกส่วนทั้ง 20 ชนิดที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นว่าสารสกัดจากใบฝรั่ง ใบทับทิม และเปลือกผลทับทิม แสดงฤทธิ์ Antioxidation ได้สูงที่สุดและมีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน โดยฤทธิ์ดังกล่าวผ่านกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระและการ reduction สารจำพวก oxidised intermediate substance แต่หากพิจารณาความยากง่ายของถึงการได้มาซึ่งสมุนไพร จะเห็นว่าใบจะหาได้ง่ายและมีปริมาณมากกว่าส่วนของเปลือกผล หากดูจากความเป็นพิษต่อเซลล์ สารสกัดจากใบฝรั่งไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์โดยเฉพาะเซลล์ปกติ ในขณะที่สารสกัดจากใบทับทิมและเปลือกผลทับทิม โดยเฉพาะในชั้น methanol ซึ่งเป็นชั้นที่แสดงฤทธิ์ Antioxidant สูงสุดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ โดยทำให้เกิด stimulation ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกสารสกัดจากใบฝรั่ง ไปให้บริสุทธิ์และแยกหาสารสำคัญรวมทั้งหาสูตรโครงสร้างต่อไป

ผลการสกัดแยกสารสำคัญออกจากใบฝรั่ง

การทดลองเบื้องต้นโดยใช้ Colume chromatography 3 ชนิด คือ NPCC, RPCC และ SECC ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

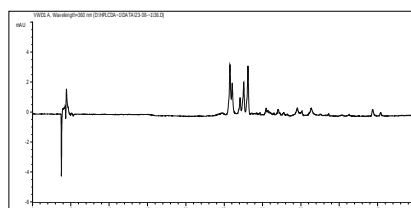
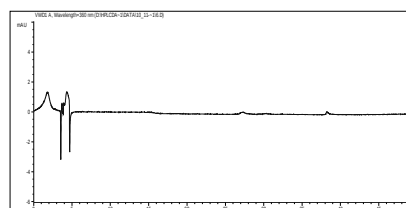
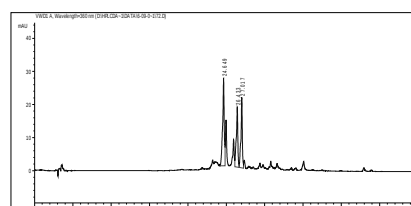
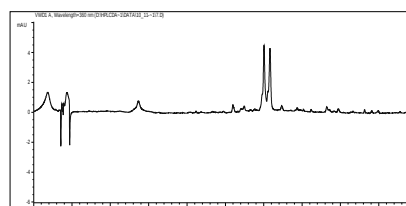
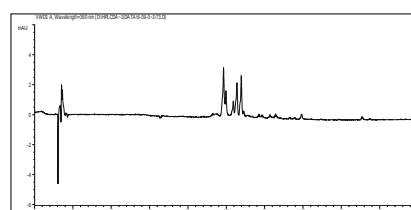
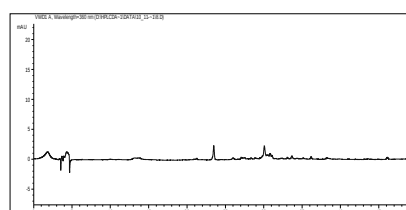
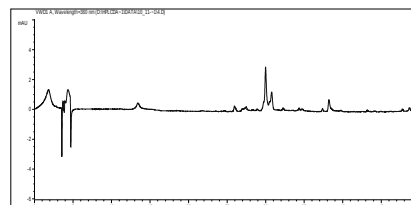
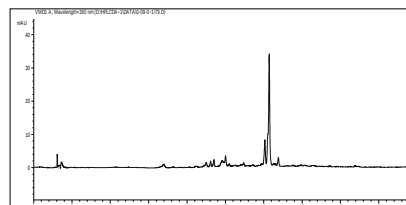
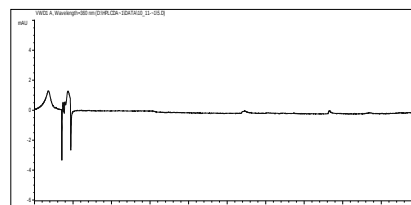
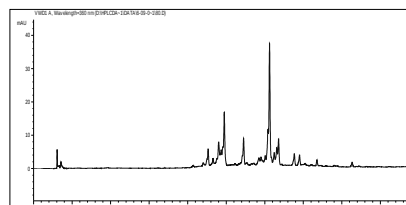
การแยกสารสำคัญด้วย NPCC และ RPCC เป็นการแยกโดยอาศัยหลักการของ polarity จากการทดลองพบว่า การแยกโดยใช้ NPCC โดยมี mobile phase ดังต่อไปนี้ตามลำดับ hexanes-ethyl acetate, ethyl acetate, ethyl acetate-methanol ทำให้สารสกัดเกิดการแยกเป็นแถบสีแต่ไม่ชัดเจน การชะด้วย mobile phase เหล่านี้ไม่สามารถชะแถบสารเหล่านั้นออกมาได้เลย เมื่อเปลี่ยน mobile phase เป็น methanol พบว่ามีแถบสีเขียวเท่านั้นที่ถูกชะลงมาเป็นแถบกว้างเพียงแถบเดียวและไม่มีแถบสีอื่นลงมาได้อีก แสดงว่าสารสกัดน่าจะเป็น polar สูงมากเพราะไม่ถูกชะด้วย non-polar solvents เลย แต่จับกับ silica gel ซึ่งมีความเป็น polar สูง เมื่อเปลี่ยนมาใช้ RPCC และใช้ methanol เป็น mobile phase สารสกัดถูกชะลงมาเป็นแถบกว้างเพียงแถบเดียวและไม่มีแถบสีอื่น แม้ทำการชะต่อจน silica gel เปลี่ยนเป็นสีขาว เป็นการยืนยันว่าสารสกัดมีความเป็น polar สูงมากจนไม่จับกับ stationary phase (RP-18) ซึ่งมีความเป็น non-polar สูง จึงทำให้ไม่สามารถแยกสารได้ด้วย NPCC หรือ RPCC

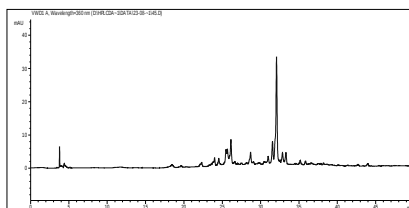
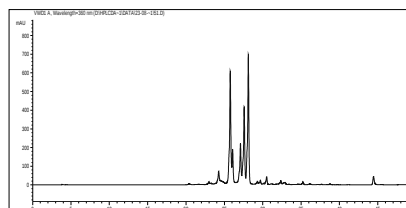
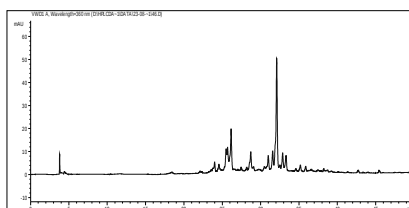
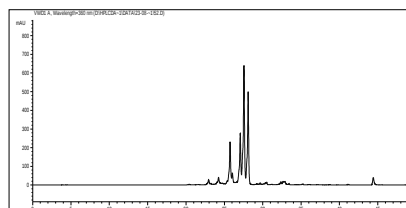
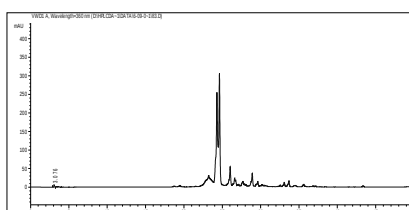
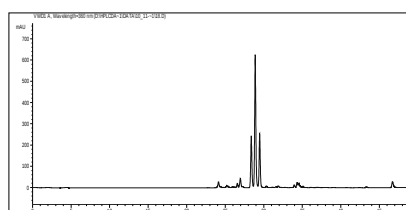
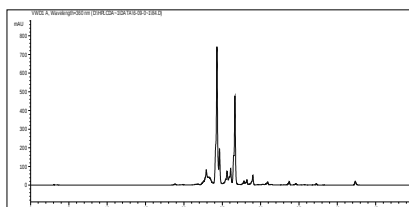
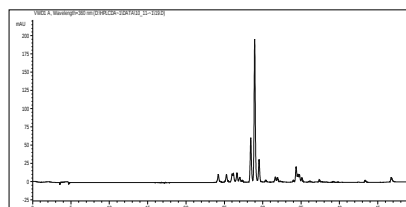
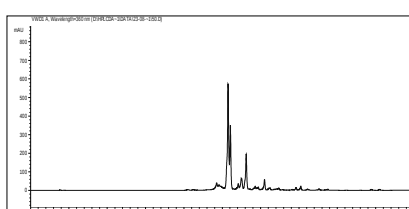
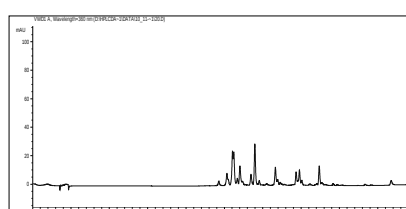
เมื่อทำการทดลองแยกสกัดโดยใช้หลักการของ size exclusion (SECC) คือการแยกสารโดยน้ำหนักและขนาดโมเลกุลของสารสกัดนั้นๆ ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกเป็นแถบสีเริ่มจากสีเหลือง, เขียว และเหลืองอีกครั้งโดยสีจะเข้มข้นตามลำดับ และสามารถเก็บ fractions ต่าง ๆ ได้ 35 fractions นำทั้ง 35 fractions มาทดสอบ Antioxidant activity ด้วยวิธี ABTS พบว่าแต่ละ fraction มีความแรงของฤทธิ์ แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3-33 ดังนั้นจึงนำแต่ละ fraction ไปศึกษา HPLC patterns ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3-13

ตารางที่ 3-33 แสดงค่า TEAC ของ Fraction จาก SECC

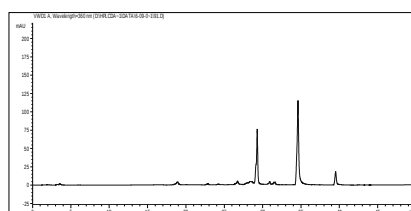
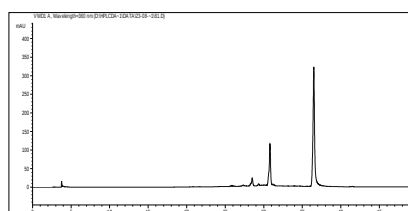
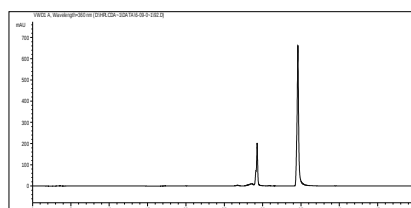
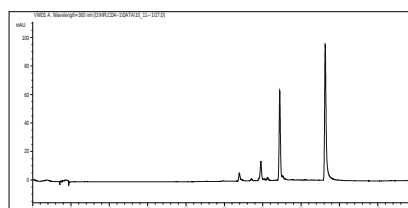
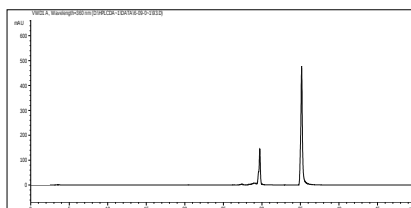
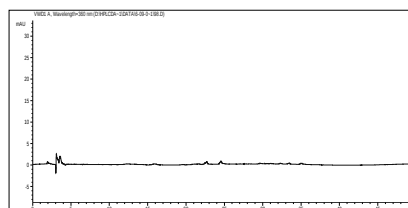
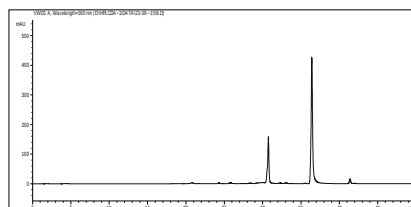
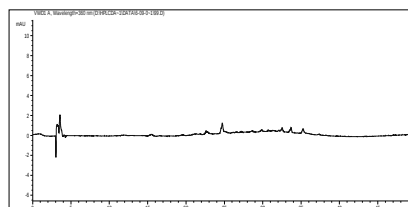
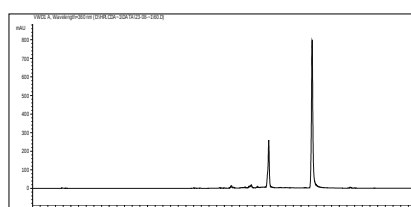
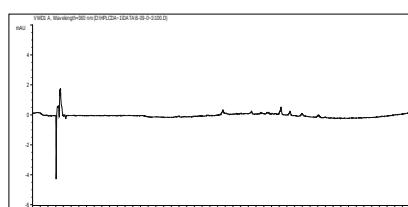
Fraction number	TEAC * (mM/mg)
1	0.662 ± 0.337
2	0.447 ± 0.230
3	0.564 ± 0.376
4	0.617 ± 0.347
5	0.700 ± 0.210
6	0.454 ± 0.139
7	0.183 ± 0.151
8	0.092 ± 0.038
9	0.076 ± 0.049
10	0.179 ± 0.130
11	0.235 ± 0.170
12	0.321 ± 0.201
13	0.349 ± 0.179
14	0.483 ± 0.256
15	0.501 ± 0.196
16	0.478 ± 0.227
17	0.729 ± 0.381
18	0.803 ± 0.340
19	1.319 ± 0.483
20	1.392 ± 0.430
21	2.061 ± 1.583
22	1.594 ± 0.186
23	1.712 ± 0.196
24	0.893 ± 0.572
25	0.595 ± 0.292
26	0.370 ± 0.299
27	2.907 ± 3.708
28	1.250 ± 0.993
29	0.993 ± 0.729
30	2.173 ± 1.080
31	0.654 ± 0.381
32	0.573 ± 0.281
33	0.127 ± 0.138
34	0.208 ± 0.219
35	0.112 ± 0.095

* = Mean ± S.D., n = 3

Fraction number 1**Fraction number 6****Fraction number 2****Fraction number 7****Fraction number 3****Fraction number 8****Fraction number 4****Fraction number 9****Fraction number 5****Fraction number 10****รูปที่ 3-13 แสดง HPLC pattern ของ fraction จาก SECC**

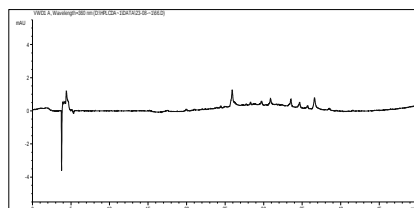
Fraction number 11**Fraction number 16****Fraction number 12****Fraction number 17****Fraction number 13****Fraction number 18****Fraction number 14****Fraction number 19****Fraction number 15****Fraction number 20**

รูปที่ 3-13 (ต่อ)

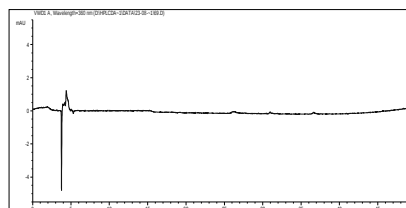
Fraction number 21**Fraction number 26****Fraction number 22****Fraction number 27****Fraction number 23****Fraction number 28****Fraction number 24****Fraction number 29****Fraction number 25****Fraction number 30**

รูปที่ 3-13 (ต่อ)

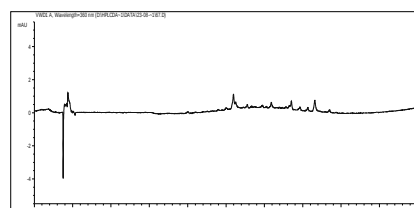
Fraction number 31



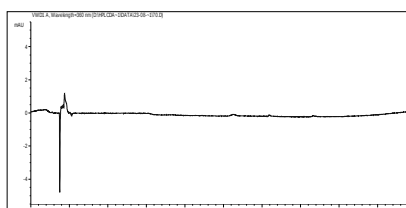
Fraction number 34



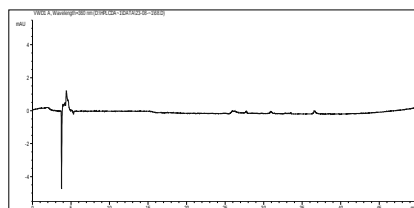
Fraction number 32



Fraction number 35



Fraction number 33



รูปที่ 3-13 (ต่อ)

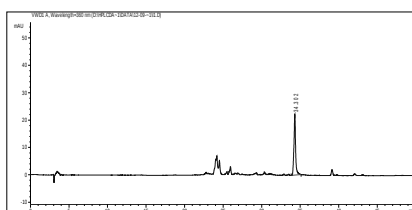
จากลักษณะ HPLC pattern ของทั้ง 35 fractions ได้ทำการรวม fraction ที่ให้ผลคล้ายกัน จาก 35 fraction เหลือ 6 fraction จากนั้นทำการทดสอบ Antioxidant activity โดยวิธี ABTS และศึกษา ลักษณะ HPLC pattern อีกครั้ง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3-34 และรูปที่ 3-14 ตามลำดับ ทั้งนี้ ได้ศึกษาเปรียบเทียบกับ HPLC pattern ของ Quercetin ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 3-15 จาก HPLC pattern ของแต่ละ fraction และ Quercetin ทำให้พิจารณาว่าหนึ่งในสารออกฤทธิ์ในใบฝรั่งมี Quercetin เป็นองค์ประกอบ ส่วนองค์ประกอบอื่นที่มีฤทธิ์ก็อาจมีอยู่เช่นกัน ซึ่งต้องทำการแยกและ Identification ต่อไป

ตารางที่ 3-34 แสดงค่า TEAC ของ Fraction ที่รวมจาก HPLC pattern

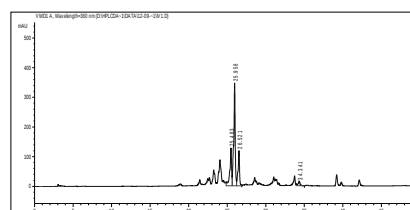
Fraction number	เกิดจากการรวมของ	TEAC* (mM/mg)
I	Fraction number 1-3	0.710 ± 0.004
II	Fraction number 4-8	0.073 ± 0.001
III	Fraction number 9-17	0.047 ± 0.001
IV	Fraction number 18-20	0.563 ± 0.001
V	Fraction number 21-27	0.204 ± 0.001
VI	Fraction number 28-35	0.317 ± 0.003

* = Mean $\pm$ S.D., n = 3

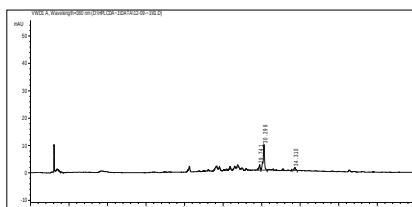
Fraction number I



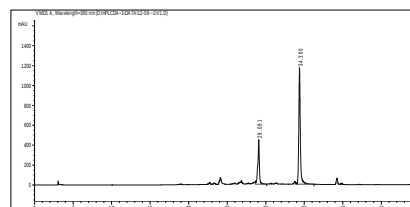
Fraction number IV



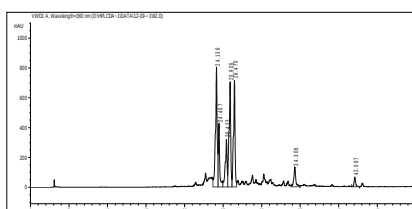
Fraction number II



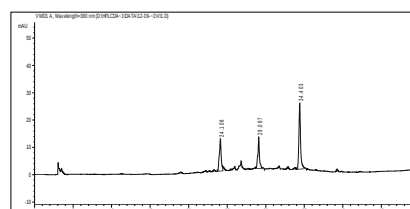
Fraction number V



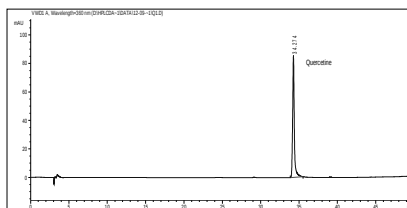
Fraction number III



Fraction number VI



รูปที่ 3-14 แสดง HPLC pattern ของ Fraction ที่รวมได้



รูปที่ 3-15 แสดง HPLC pattern ของ Quercetin

จากผลการทดลองเบื้องต้นจะเห็นว่าสารสำคัญที่ให้ฤทธิ์ Antioxidant activity จากใบฝรั่ง น่าจะเป็นสารจำพวกที่มี polarity ค่อนข้างสูง เช่น Flavonoid Quercetin และจากผลการศึกษา Antioxidant จากสารสกัดต่าง ๆ ของใบฝรั่งพบว่าส่วนของ Methanol extract ให้ฤทธิ์สูงสุด อีกทั้งมี ปริมาณ % Yield มากที่สุด ดังนั้นจึงได้พิจารณานำส่วน Methanol extract ของใบฝรั่งมาทำการทดลอง ในขั้นตอนการสกัดแยกสารสำคัญ โดยใช้ Flash column chromatography ผลการทดลองพบว่า สามารถเก็บ Fraction ได้ทั้งหมด 90 flasks (เก็บ 100 ml/flask) ผลการทดลองหลังจากทำ TLC สามารถนำมารวมกันได้เป็น 6 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3-35 นำทั้ง 6 ตัวอย่างไปทดสอบฤทธิ์ Antioxidant activity โดย DPPH Method พบว่าแต่ละตัวอย่างให้ฤทธิ์ในความแรงที่แตกต่างกัน ดังนี้ $C=D>E>B>F>A$ ดังแสดงในตารางที่ 3-36 แต่พบว่า C สามารถเกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่า D รวมทั้งที่ ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากัน (1 mg/ml) C สามารถลด Absorbance ของ DPPH ได้มากกว่า D โดย $Abs\ C = 0.126$ ส่วน $Abs\ D = 0.216$ ดังนั้นจึงเลือกไปทำตามลำดับคือ สารสกัด C, D, และ E

ตารางที่ 3-35 แสดงการรวม Fraction ที่ได้จากผลของ TLC

สารสกัด	ได้จากการรวม Fraction	ปริมาณที่ได้ (กรัม)
A	Fraction number 1 - 10	4.997
B	Fraction number 11 – 20	0.995
C	Fraction number 21 – 30	1.529
D	Fraction number 31 – 40	2.144
E	Fraction number 41 - 50	1.133
F	Fraction number 51 - 90	4.028

ตารางที่ 3-36 แสดงค่า IC_{50} จาก DPPH Method ของแต่ละตัวอย่าง

สารสกัด	ได้จาการรวม Fraction	IC_{50} (mg/ml)
A	Fraction number 1 - 10	0.0310
B	Fraction number 11 – 20	0.0058
C	Fraction number 21 – 30	0.0043
D	Fraction number 31 – 40	0.0043
E	Fraction number 41 - 50	0.0053
F	Fraction number 51 - 90	0.0129

เมื่อนำสารสกัด C จำนวน 1.0015 กรัม ไปทำการแยกสกัดต่อโดยใช้ Sephadex column chromatography ผลการทดลองพบว่าสามารถเก็บ Fraction ได้ทั้งหมด 30 flasks (เก็บ 100 ml/flask) ผลการทดลองหลังจากทำ TLC สามารถนำมารวมกันได้เป็น 4 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3-37 เมื่อนำแต่ละตัวอย่างไปทำการแยกต่อ พบว่าสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยก C-II ได้ดีที่สุด จึงนำ C II มาทำการแยกเพื่อทำให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป จากผลการทดลองการแยกขั้นตอนต่อไปพบว่าสามารถเก็บ Fraction ได้ทั้งหมด 35 flasks (10 ml/flask) ผลการทดลองหลังจากทำ TLC สามารถนำมารวมกันได้เป็น 3 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3-38 ตัวอย่างที่ C-II-2 ได้ผลจาก TLC เพียง spot เดียว ถือว่าได้สารบริสุทธิ์ เรียกว่า Compound 1 มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน จึงนำไปวิเคราะห์ทาง Spectrophotometry เพื่อหาสูตรโครงสร้างต่อไป

ตารางที่ 3-37 แสดงการรวม Fraction C ที่ได้จากผลของ TLC

สารสกัด	ได้จาการรวม Fraction	ปริมาณที่ได้ (มิลลิกรัม)
C-I	Fraction number 1 – 12	500.50
C-II	Fraction number 13 – 15	48.80
C-III	Fraction number 16 – 23	250.10
C-IV	Fraction number 24 - 30	182.90

ตารางที่ 3-38 แสดงการรวม Fraction C-II ที่ได้จากผลของ TLC

สารสกัด	ได้จากการรวม Fraction	ปริมาณที่ได้ (มิลลิกรัม)
C-II-1	Fraction number 1 – 3	1.70
C-II-2	Fraction number 4 – 10	14.90
C-II-3	Fraction number 11 - 35	30.30

เมื่อนำสารสกัด D จำนวน 1.8040 กรัม ไปทำการแยกสกัดต่อโดยใช้ Toyopearl HW-40C column chromatography ผลการทดลองพบว่าสามารถเก็บ Fraction ได้ทั้งหมด 120 flasks (เก็บ 10 ml/flask) ผลการทดลองหลังจากทำ TLC สามารถนำมารวมกันได้เป็น 7 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3-39 เมื่อนำแต่ละตัวอย่างไปทำการแยกต่อ พบว่าสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยก D-III ได้ดีที่สุด จึงนำ D-III มาทำการแยกเพื่อทำให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป ผลการทดลองพบว่าสามารถเก็บ Fraction ได้ทั้งหมด 30 flasks ผลการทดลองหลังจากทำ TLC สามารถนำมารวมกันได้เป็น 5 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3-40 ตัวอย่างที่ D-III-B ได้ผลจาก TLC เพียง spot เดียว ถือว่าได้สารบริสุทธิ์ เรียกว่า Compound 2 มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน จึงนำไปวิเคราะห์ทาง Spectrophotometry เพื่อหาสูตรโครงสร้างต่อไป

ตารางที่ 3-39 แสดงการรวม Fraction D ที่ได้จากผลของ TLC

สารสกัด	ได้จากการรวม Fraction	ปริมาณที่ได้ (มิลลิกรัม)
D-I	Fraction number 1 – 5	494.80
D-II	Fraction number 6 – 40	289.30
D-III	Fraction number 41 – 64	61.90
D-IV	Fraction number 65 – 78	76.30
D-V	Fraction number 79 – 94	48.80
D-VI	Fraction number 95 - 99	28.30
D-VII	Fraction number 100-120	92.70

ตารางที่ 3-40 แสดงการรวม Fraction D-III ที่ได้จากผลของ TLC

สารสกัด	ได้จากการรวม Fraction	ปริมาณที่ได้ (มิลลิกรัม)
D-III-A	Fraction number 1 – 7	7.60
D-III-B	Fraction number 8 – 9	4.00
D-III-C	Fraction number 10 – 12	3.40
D-III-D	Fraction number 13 – 18	24.60
D-III-E	Fraction number 19 - 30	27.60

เมื่อนำสารสกัด E จำนวน 1.133 กรัม ไปทำการแยกสกัดต่อโดยใช้ Cosmosil 75 μ m C18-OPN column chromatography ผลการทดลองพบว่าสามารถเก็บ Fraction ได้ทั้งหมด 90 flasks ผลการทดลองหลังจากทำ TLC สามารถนำมารวมกันได้เป็น 5 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3-41 เมื่อนำแต่ละตัวอย่างไปทำการแยกต่อ พบว่าสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยก E-II ได้ดีที่สุด จึงนำ E-II มาทำการแยกต่อ ผลการทดลองพบว่าสามารถเก็บ Fraction ได้ทั้งหมด 40 flasks ผลการทดลองหลังจากทำ TLC สามารถนำมารวมกันได้เป็น 3 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3-42 เมื่อนำแต่ละตัวอย่างไปทำการแยกต่อ พบว่าสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยก E-II-B ได้ดีที่สุด นำ E-II-B มาแยกต่อ ผลการทดลองพบว่าสามารถเก็บ Fraction ได้ทั้งหมด 60 flasks ผลการทดลองหลังจากทำ TLC สามารถนำมารวมกันได้เป็น 4 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3-43 เมื่อนำแต่ละตัวอย่างไปทำการแยกต่อ พบว่าสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยก E-II-B-b ได้ดีที่สุด นำ E-II-B-b มาแยกต่อ ผลการทดลองพบว่าสามารถเก็บ Fraction ได้ทั้งหมด 70 flasks ผลการทดลองหลังจากทำ TLC สามารถนำมารวมกันได้เป็น 4 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3-44 ตัวอย่างที่ E-II-B-b-2 ได้ผลจาก TLC เพียง spot เดียว ถือว่าได้สารบริสุทธิ์ เรียกว่า Compound 3 มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน จึงนำไปวิเคราะห์ทาง Spectrophotometry เพื่อหาสูตรโครงสร้างต่อไป

ตารางที่ 3-41 แสดงการรวม Fraction D ที่ได้จากผลของ TLC

สารสกัด	ได้จากการรวม Fraction	ปริมาณที่ได้ (มิลลิกรัม)
E-I	Fraction number 1 – 7	74.50
E-II	Fraction number 8 – 27	691.30
E-III	Fraction number 28 – 50	88.70
E-IV	Fraction number 51 – 70	27.20
E-V	Fraction number 71 - 90	66.00

ตารางที่ 3-42 แสดงการรวม Fraction E-II ที่ได้จากผลของ TLC

สารสกัด	ได้จากการรวม Fraction	ปริมาณที่ได้ (มิลลิกรัม)
E-II-A	Fraction number 1 – 8	23.20
E-II-B	Fraction number 9-- -21	567.50
E-II-C	Fraction number 22 - 40	37.00

ตารางที่ 3-43 แสดงการรวม Fraction E-II-B ที่ได้จากผลของ TLC

สารสกัด	ได้จากการรวม Fraction	ปริมาณที่ได้ (มิลลิกรัม)
E-II-B-a	Fraction number 1 – 14	35.80
E-II-B-b	Fraction number 15 - 30	231.00
E-II-B-c	Fraction number 31 - 38	80.80
E-II-B-d	Fraction number 39 - 60	178.30

ตารางที่ 3-44 แสดงการรวม Fraction E-II-B-b ที่ได้จากผลของ TLC

สารสกัด	ได้จากการรวม Fraction	ปริมาณที่ได้ (มิลลิกรัม)*
E-II-B-b-1	Fraction number 1 – 9	ND
E-II-B-b-2	Fraction number 10 – 13	33.70
E-II-B-b-3	Fraction number 14 – 22	ND
E-II-B-b-4	Fraction number 23 – 70	ND

* ND = not determine

ผลการศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

การศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ ได้ทำการศึกษา Mass spectra, IR spectra, และ NMR spectra ทั้งที่เป็น Proton NMR และ Carbon NMR ของสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด (Compound **1**, **2** และ **3**) นอกจากนั้นยังทำการหา Melting point ของสารดังกล่าวอีกด้วย ผลการทดลองหา Melting point ของสารทั้ง 3 แสดงในตารางที่ 3-45

ผลการทดลองจาก Mass spectra ของ Compound **1**, **2** และ **3** พบว่าสารทั้ง 3 แสดง molecular ion [M^+] peak ที่ 302, 302 และ 464 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3-46 สำหรับ IR spectra ของ Compound **1**, **2** และ **3** แสดงในรูปที่ 3-16 ถึงรูปที่ 3-18 ตามลำดับ จาก spectra ดังกล่าวพบว่าสารทั้ง 3 แสดง vibration peaks ในช่วง wave number ที่อยู่ในช่วงคล้ายกันดังแสดงในตารางที่ 3-47 ซึ่งแสดงว่าภายในโครงสร้างของสารทั้ง 3 มี chromophore ที่สำคัญคล้ายคลึงกัน 4 ชนิด ได้แก่ hydroxyl, carbonyl, aromatic ring และ ether groups

ตารางที่ 3-45 แสดงค่า Melting point ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

Compound	Melting point ($^{\circ}\text{C}$)
1	300 (decompose)
2	300 (decompose)
3	220-225

ตารางที่ 3-45 แสดงผลจาก EI-MS ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

Compound	Molecular ion [M^+] peak
1	302
2	302.
3	464

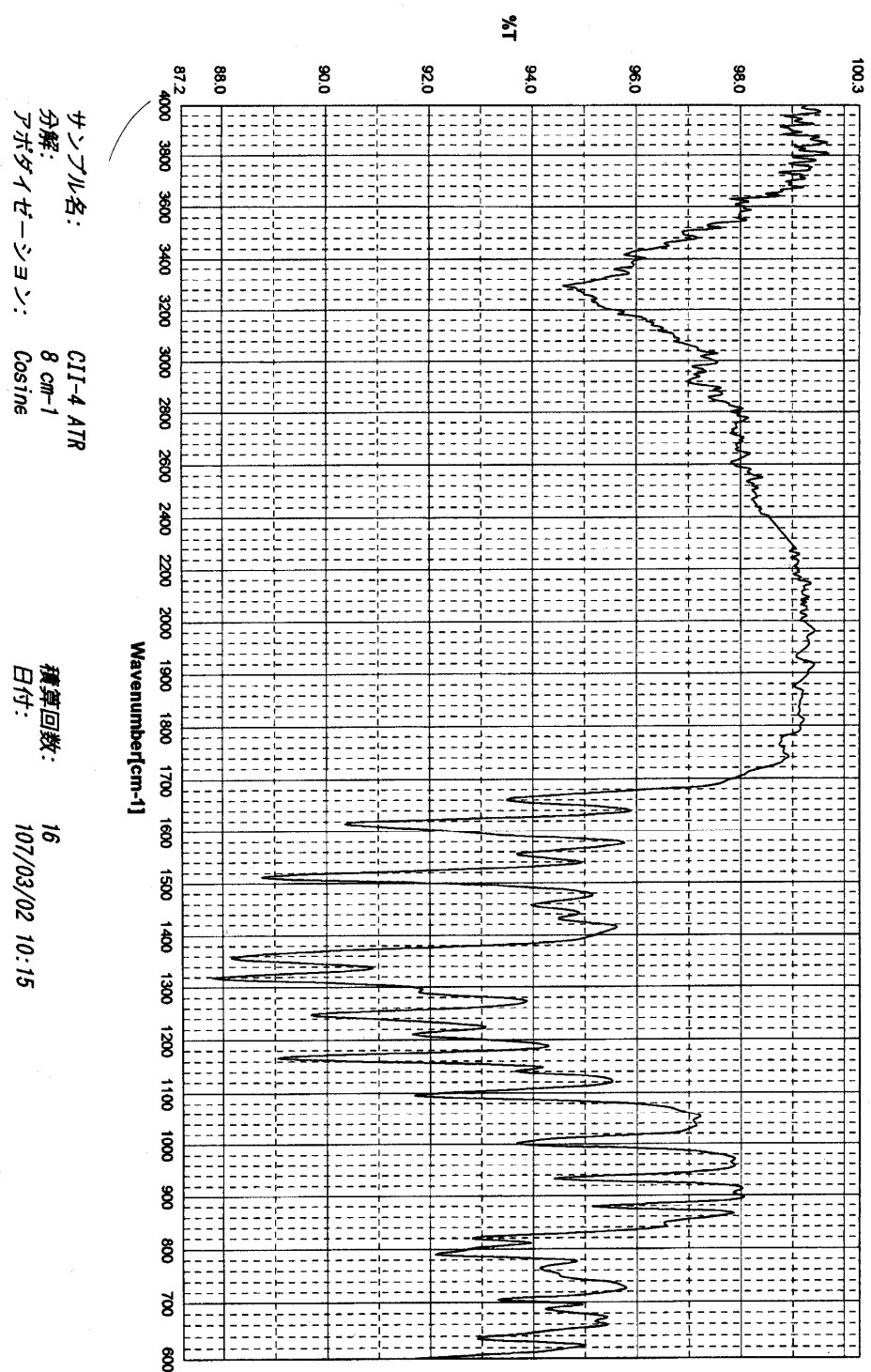
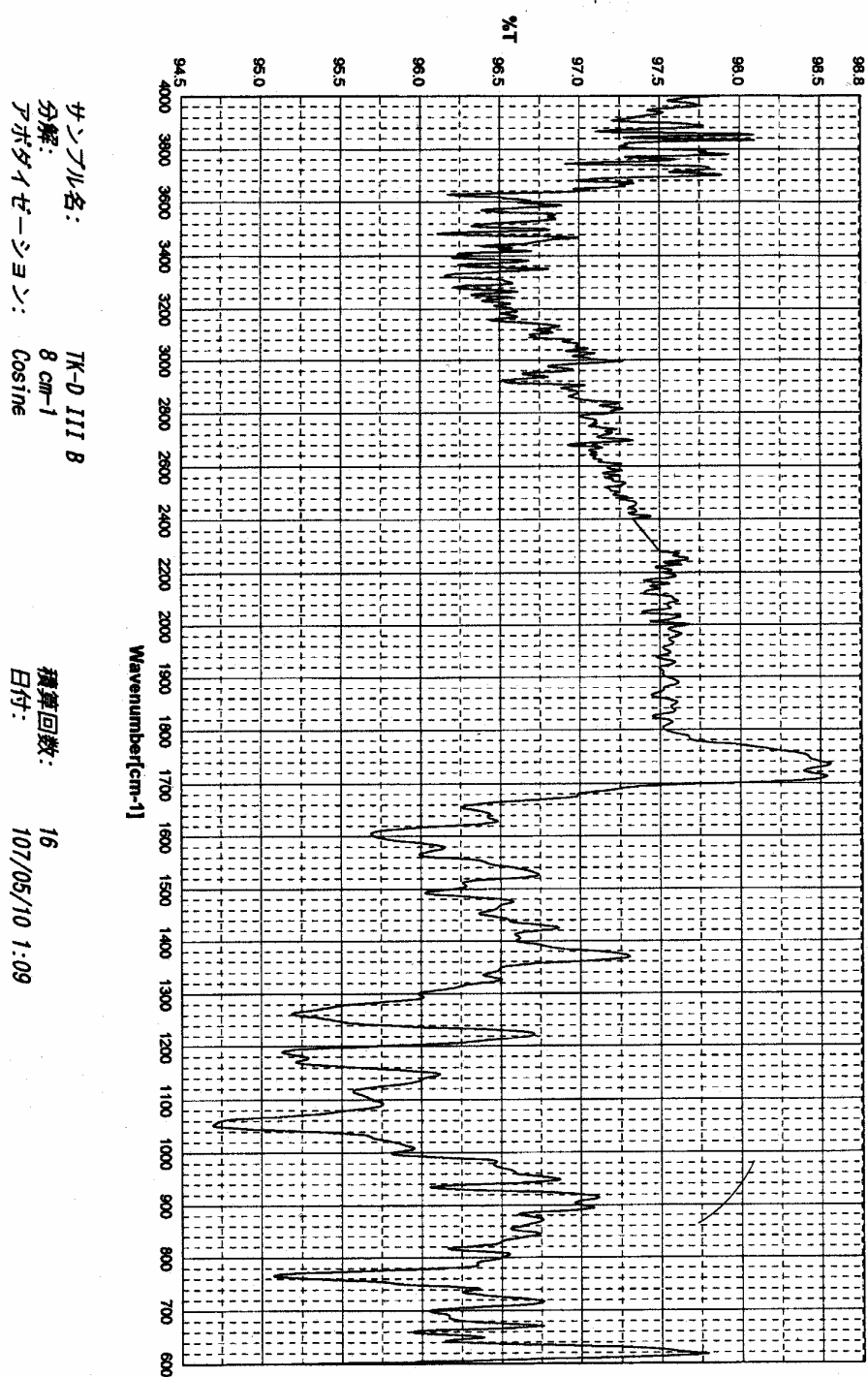
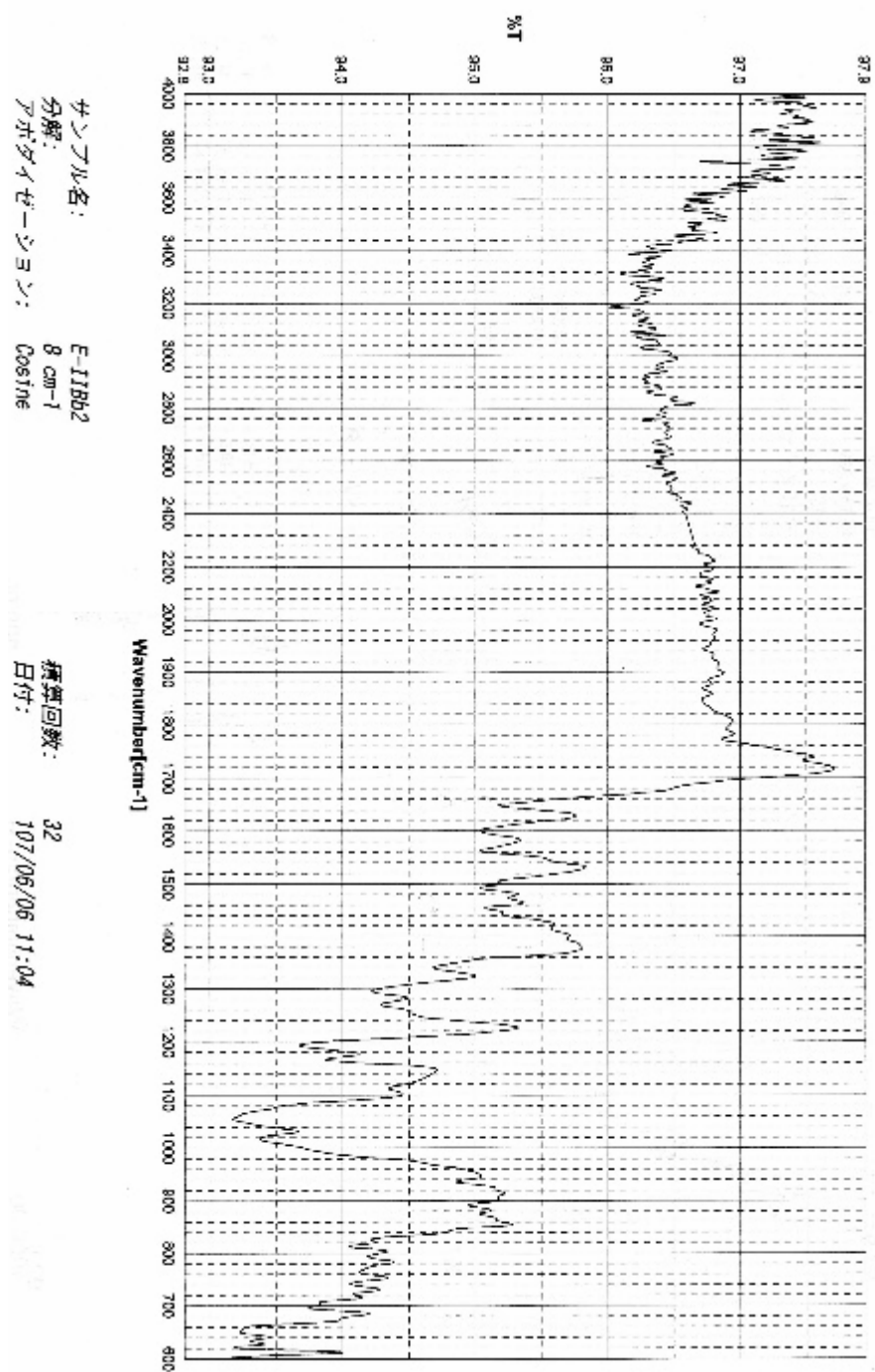


Figure 3-16 แสดง IR spectra ของ Compound 1



3-17 แสดง IR spectra ของ Compound 2
 3-17

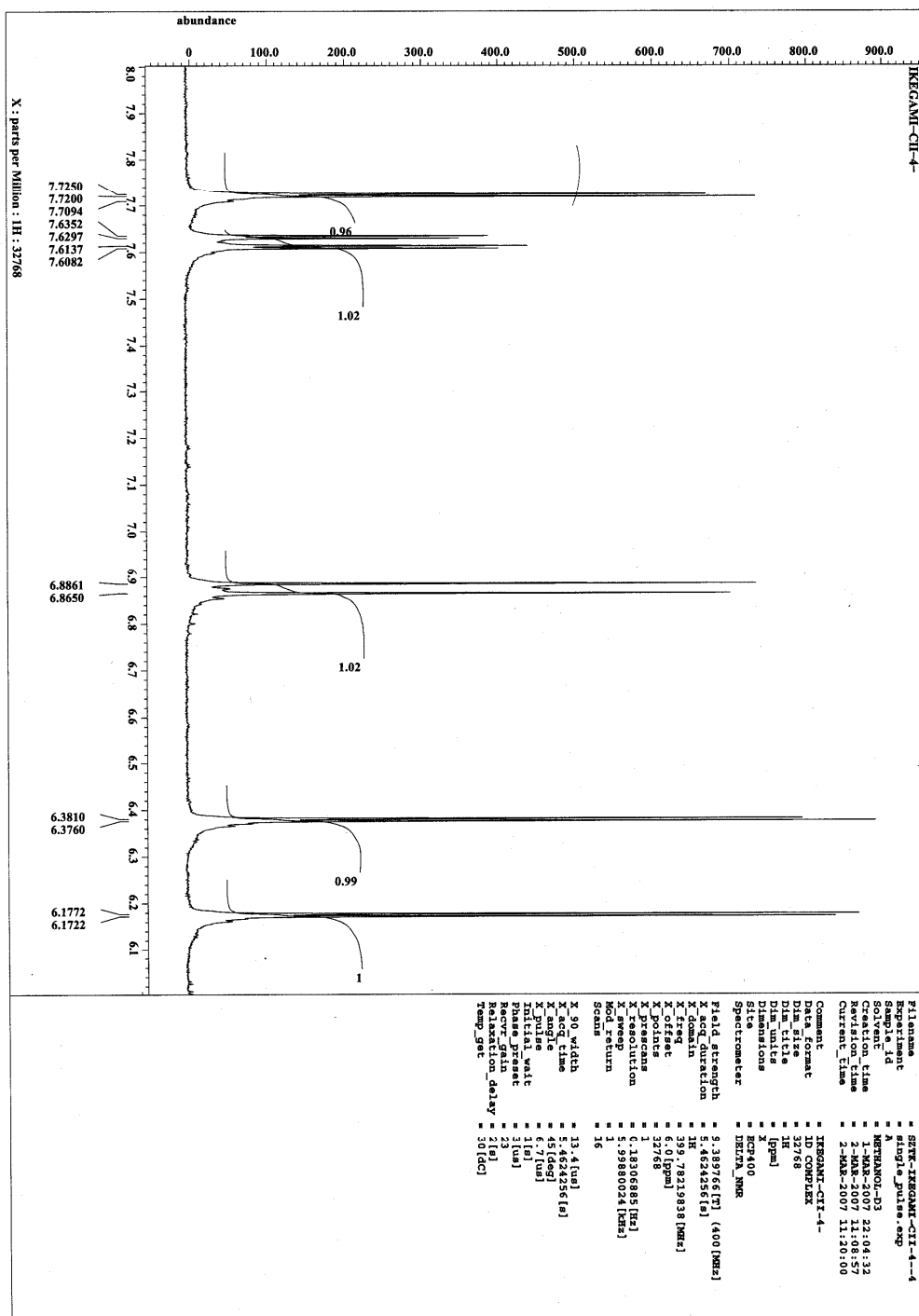


รูปที่ 3-18 แสดง IR spectra ของ Compound 3

ตารางที่ 3-47 แสดง IR absorption band ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

Compound	IR absorption band at (cm ⁻¹)	Expected groups
1	3293.82, 1616.06, 1511.92 and 1166.72	hydroxyl, carbonyl, aromatic ring, ether
2	3484.74, 1604.48, 15263.15, 1052.94	hydroxyl, carbonyl, aromatic ring, ether
3	3739.30, 1648.84, 1562.06, 1492.63, 1295.93, 1054.87, and 622.89	hydroxyl, carbonyl, aromatic ring, ether

เมื่อนำ Compound 1 ไปศึกษาด้วย NMR ผลการทดลองของ ¹H-NMR และ ¹³C-NMR แสดงในรูปที่ 3-19 และรูปที่ 3-20 ตามลำดับ จาก spectra ดังกล่าวพบว่า peaks ของทั้ง ¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของ Compound 1 ตรงกันพอดีกับ peaks ของ Quercetin ที่มีรายงานไว้แล้ว (Arima และ Danno, 2002; Markham และคณะ, 1978) ดังแสดงในตารางที่ 3-48 อีกทั้ง Molecular weight ของ Quercetin ที่คำนวณได้จากสูตร (C₁₅H₁₀O₇) คือ 302.24 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ molecular ion [M⁺] peak ที่ได้จาก mass spectra ของ Compound 1 คือ 302 และ melting point ของ Compound 1 มีค่าใกล้เคียงกับของ Quercetin ในสูตรโครงสร้างของ Quercetin มี chromophore ที่สำคัญทั้ง 4 ชนิดเช่นเดียวกับที่ได้จาก IR spectra ของ Compound 1 ดังนั้นจึงสรุปว่า Compound 1 เป็น Quercetin ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 3-21

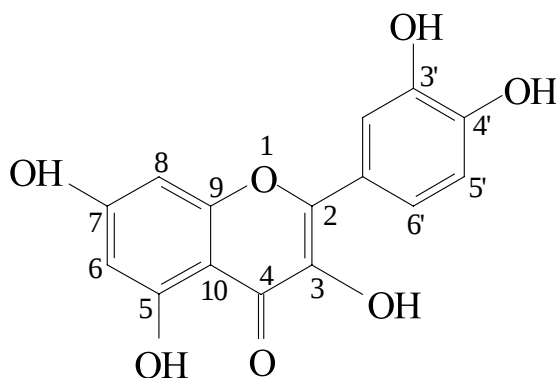


รูปที่ 3-19 แสดง ^1H -NMR ของ Compound 1

ตารางที่ 3-48 แสดง NMR attribution ของ Quercetin และ Compound 1

Attribution	Quercetin *		Compound 1	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
2	146.9		148.9	
3	135.5		137.3	
4	175.8		177.5	
5	160.7		162.6	
6	98.2	6.16 s	99.4	6.17 s
7	163.9		165.7	
8	93.3	6.36 s	94.5	6.37 s
9	156.2		158.4	
10	103.1		104.6	
1'	122.1		124.3	
2'	115.3	7.72 s	116.1	7.72 s
3'	145.0		146.3	
4'	147.6		148.1	
5'	115.6	6.87 d (8.5)	116.3	6.86 d (8.4)
6'	120.0	7.62 d (8.5)	121.8	7.62 d (8.6)

* Arima และ Danno (2002) และ Markham และคณะ (1978)



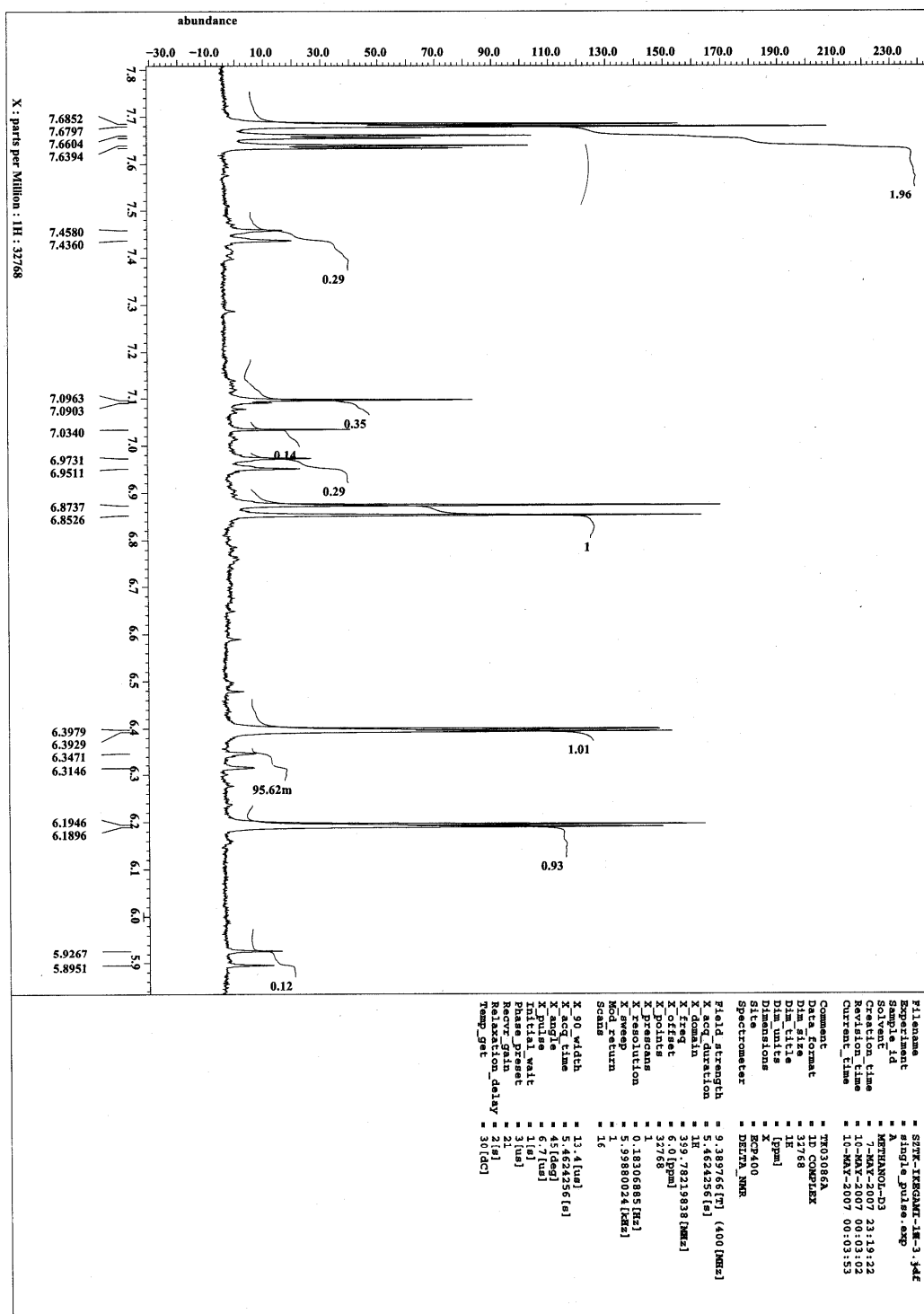
รูปที่ 3-21 แสดงสูตรโครงสร้าง ของ Compound 1

เมื่อนำ Compound 2 ไปศึกษาด้วย NMR ผลการทดลองของ ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR แสดงในรูปที่ 3-22 และรูปที่ 3-23 ตามลำดับ จาก spectra ดังกล่าวพบว่า peaks ของทั้ง ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของ Compound 2 ตรงกันพอดีกับ peaks ของ Morin ที่มีรายงานไว้แล้ว (Markham และคณะ, 1978) ดังแสดงในตารางที่ 3-49 อีกทั้ง Molecular weight ของ Morin ที่คำนวณได้จากสูตร ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$) คือ 302.24 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ molecular ion $[\text{M}^+]$ peak ที่ได้จาก mass spectra ของ Compound 2 คือ 302 และ melting point ของ Compound 2 มีค่าใกล้เคียงกับของ Morin ในสูตรโครงสร้างของ Morin มี chromophore ที่สำคัญทั้ง 4 ชนิดเช่นเดียวกับที่ได้จาก IR spectra ของ Compound 2 ดังนั้นจึงสรุปว่า Compound 2 เป็น Morin ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 3-24

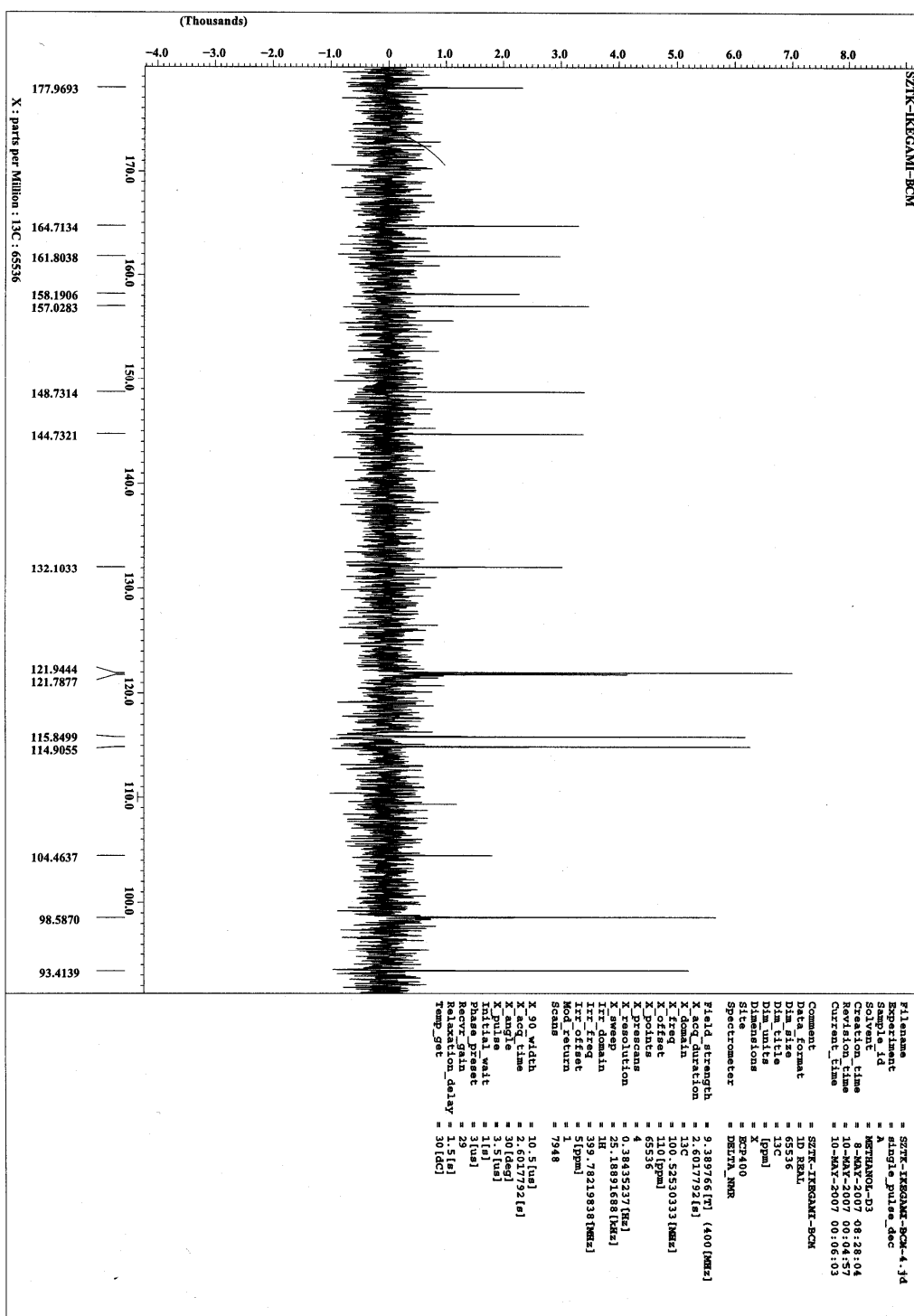
ตารางที่ 3-49 แสดง NMR attribution ของ Morin และ Compound 2

Attribution	Morin*		Compound 2	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
2	157.4		157.0	
3	134.5		132.1	
4	178.7		177.9	
5	104.9		104.4	
6	98.5	6.20 s (2.0)	98.5	6.19 s (2.0)
7	162.1		164.7	
8	93.7	6.39 s (2.0)	93.4	6.39 s (2.0)
9	165.0		161.8	
10	157.8		158.1	
1'	122.0		121.9	
2'	145.1		144.7	
3'	116.2	7.20 s	115.8	7.68 s
4'	149.0		148.7	
5'	114.5	6.85 d (8.0)	114.9	6.87 d (8.4)
6'	122.3	7.58 d (8.0)	121.7	7.63 d (8.4)

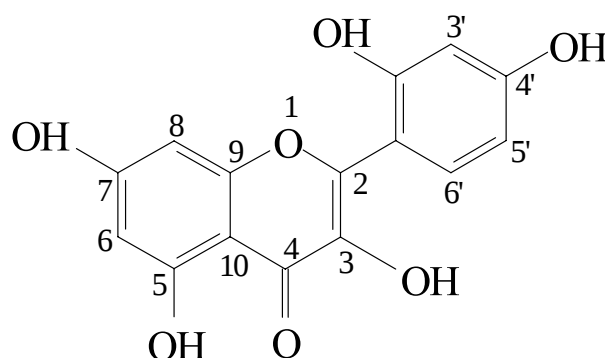
* Markham และคณะ (1978)



รูปที่ 3-22 แสดง ^1H -NMR ของ Compound 2



รูปที่ 3-23 แสดง ^{13}C -NMR ของ Compound 2



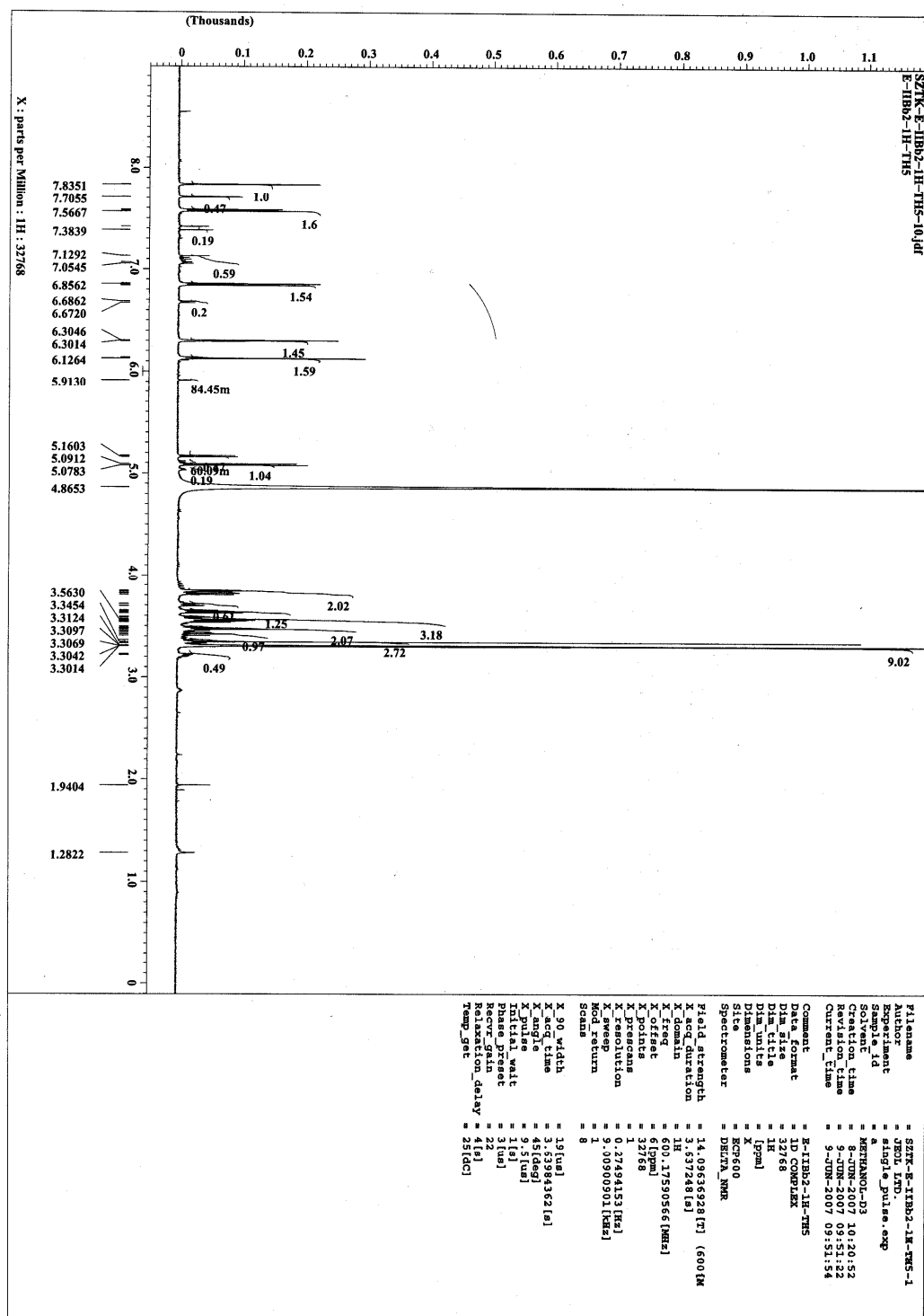
รูปที่ 3-24 แสดงสูตรโครงสร้าง ของ Compound 2

เมื่อนำ Compound 3 ไปศึกษาด้วย NMR ผลการทดลองของ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงในรูปที่ 3-25 และรูปที่ 3-26 ตามลำดับ จาก spectra ดังกล่าวพบว่า peaks ของทั้ง $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ Compound 3 ตรงกันพอดีกับ peaks ของ Quercetin-3-O-glucopyranoside ที่มีรายงานไว้แล้ว (Slimestad และคณะ, 2005) ดังแสดงในตารางที่ 3-50 อีกทั้ง Molecular weight ของ Quercetin-3-O-glucopyranoside ที่คำนวณได้จากสูตร ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$) คือ 464.39 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ molecular ion $[\text{M}^+]$ peak ที่ได้จาก mass spectra ของ Compound 1 คือ 464 และ melting point ของ Compound 3 มีค่าใกล้เคียงกับของ Quercetin-3-O-glucopyranoside ในสูตรโครงสร้างของ Quercetin-3-O-glucopyranoside มี chromophore ที่สำคัญทั้ง 4 ชนิดเช่นเดียวกับที่ได้จาก IR spectra ของ Compound 3 ดังนั้นจึงสรุปว่า Compound 3 เป็น Quercetin-3-O-glucopyranoside ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 3-27

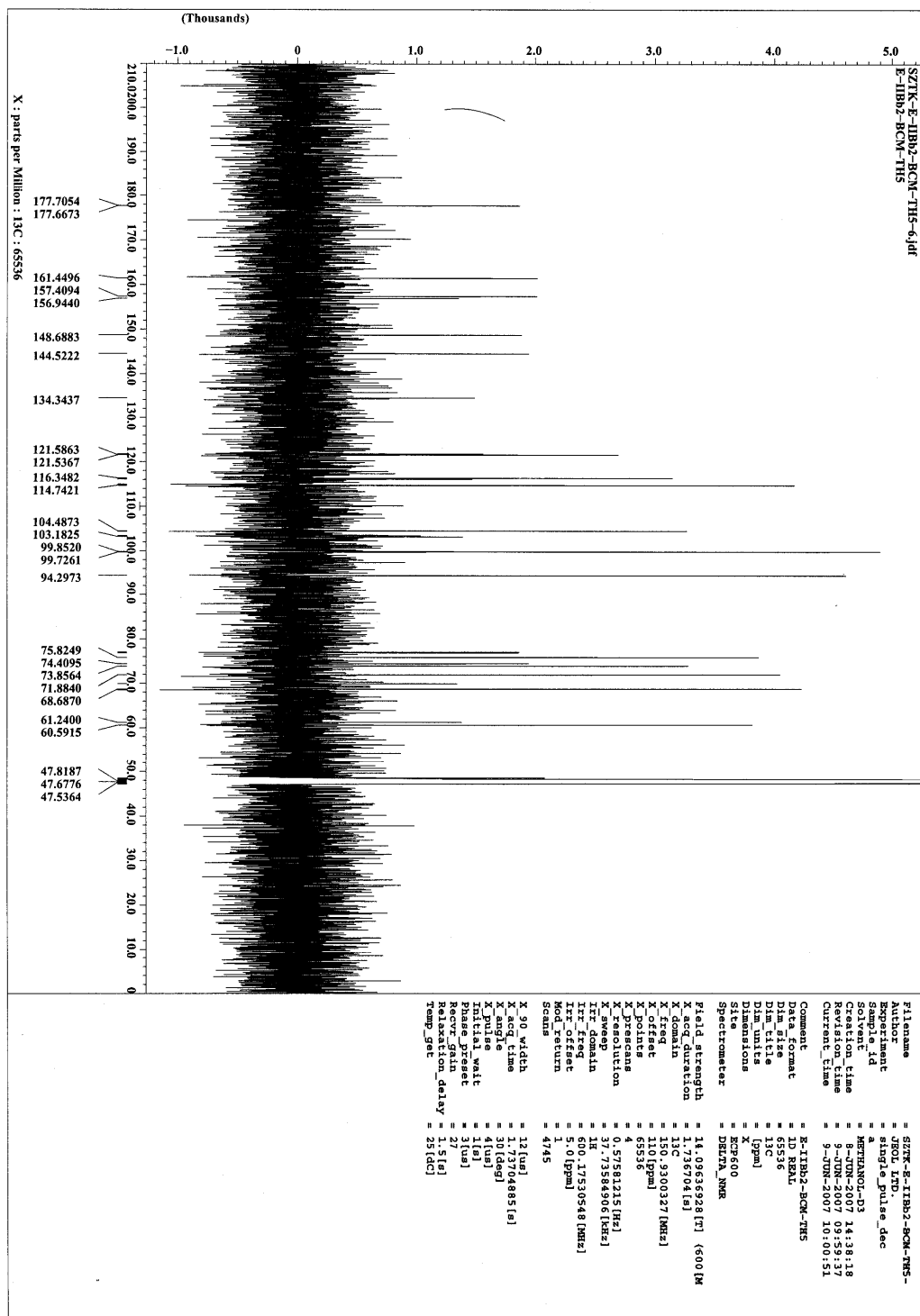
ตารางที่ 3-50 แสดง NMR attribution ของ Quercetin-3-O-glucopyranoside และ Compound 3

Attribution	Quercetin-3-O-glucopyranoside*		Compound 3	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
2	156.5		156.4	
3	133.7		134.4	
4	177.6		177.7	
5	161.3		161.4	
6	98.8	6.20 d (2.2)	99.8	6.13 d (2.0)
7	164.2		165.5	
8	93.6	6.39 D (2.2)	94.2	6.30 d (2.0)
9	156.5		157.4	
10	104.2		104.3	
1'	121.4		121.7	
2'	115.3	7.83 s	116.3	7.83 d (2.2)
3'	144.8		144.5	
4'	148.5		148.6	
5'	116.5	6.85 d (8.5)	114.7	6.86 d (8.5)
6'	121.6	7.58 dd (8.5)	121.5	7.58 dd (8.5)
1''	101.4	5.16 d (7.8)	103.1	5.09 d (7.7)
2''	74.3	3.63 m	73.8	3.55 m
3''	76.8	3.56 m	75.8	3.48 m
4''	70.3	3.84 m	68.6	3.85 m
5''	77.5	3.46 dt (6.4)	77.0	3.42 t (8.7)
6''	61.3	3.53 m	60.5	3.54 m

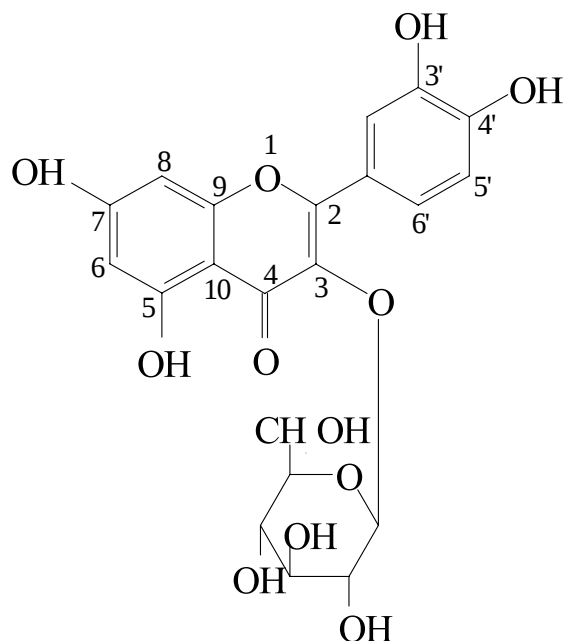
* Slimestad และคณะ, 2005



รูปที่ 3-25 แสดง ^1H -NMR ของ Compound 3



รูปที่ 3-26 แสดง ^{13}C -NMR ของ Compound 3



รูปที่ 3-27 แสดงสูตรโครงสร้าง ของ Compound 3

ผลการศึกษาฤทธิ์ Antioxidant ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

เมื่อนำ Compound 1, 2 และ 3 ไปทำการศึกษาฤทธิ์ Antioxidant เพื่อเปรียบเทียบกัน โดยใช้วิธี DPPH, ABTS และ FRAP Method ผลการทดลองแสดงเป็นค่า EC_{50} , TEAC และ EC ดังแสดงในตารางที่ 3-51 ถึงตารางที่ 3-53 ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์แรงกว่า BHT ซึ่งเป็น positive control โดยหากพิจารณาจากค่า IC_{50} จะเห็นว่า Compound 1 มีฤทธิ์แรงกว่า BHT ถึงประมาณ 180 เท่า ในขณะที่ Compound 2 และ 3 มีฤทธิ์แรงกว่า BHT ประมาณ 40 – 60 เท่า หากพิจารณาจากค่า TEAC จะเห็นว่า Compound 1 มีฤทธิ์แรงกว่า BHT ถึงประมาณ 7 เท่า ในขณะที่ Compound 2 และ 3 มีฤทธิ์แรงกว่า BHT ประมาณ 3 เท่า แต่หากพิจารณาจากค่า EC จะเห็นว่า Compound 1 มีฤทธิ์แรงกว่า BHT ถึง ประมาณ 12 เท่า ในขณะที่ Compound 2 และ 3 มีฤทธิ์แรงกว่า BHT ประมาณ 4 เท่า หากเปรียบเทียบกันระหว่างสารทั้ง 3 ชนิด จึงพอสรุปได้ว่า Compound 1 มีฤทธิ์ antioxidant สูงที่สุด ตามมาห่าง ๆ ด้วย Compound 2 และ 3 ดังนั้นจึงนำ Compound 1 ไปทดสอบขั้นสุดท้ายคือความเป็นพิษต่อเซลล์

ตารางที่ 3-51 แสดงค่า IC_{50} ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบฝรั่ง

Compound	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)*
1	1.20 $\pm$ 0.02
2	5.41 $\pm$ 0.20
3	3.58 $\pm$ 0.05
BHT	220.00 $\pm$ 0.10

* mean $\pm$ SD (n = 3)

ตารางที่ 3-52 แสดงค่า TEAC ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบฝรั่ง

Compound	TEAC (mg/ml)*
1	24.19 $\pm$ 0.06
2	9.93 $\pm$ 0.16
3	9.11 $\pm$ 0.13
BHT	3.35 $\pm$ 0.08

* mean $\pm$ SD (n = 3)

ตารางที่ 3-53 แสดงค่า EC ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบฝรั่ง

Compound	EC (mg/ml)*
1	35.64 $\pm$ 0.24
2	8.55 $\pm$ 0.08
3	7.84 $\pm$ 0.15
BHT	2.86 $\pm$ 0.05

* mean $\pm$ SD (n = 3)

ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Compound 1

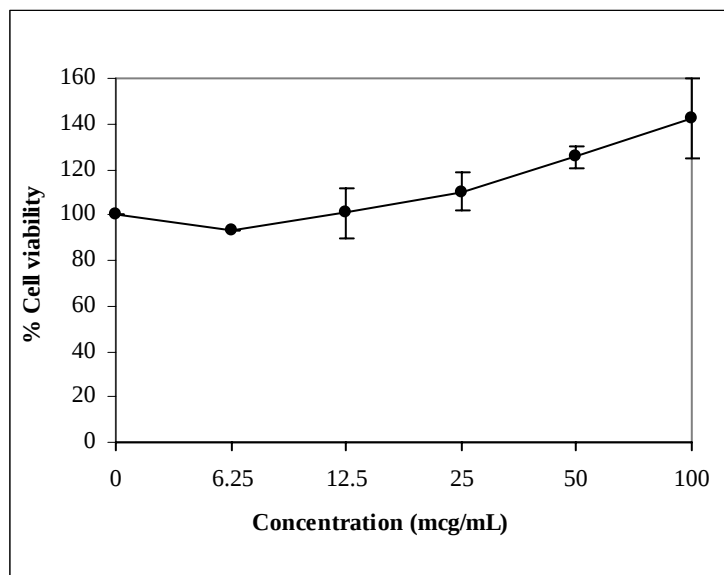
เมื่อนำ Compound 1 ไปทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งเซลล์ปกติ (PBMC) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (KB-31) แสดงในตารางที่ 3-54 และตารางที่ 3-55 ตามลำดับ และเมื่อนำไปพล็อตกราฟ จะได้เส้นกราฟดังรูปที่ 3-28 และ รูปที่ 3-29 ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่า IC₅₀ ของ Compound 1 ต่อทั้ง PBMC และ KB-31 cells มีค่ามากกว่า 100 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร นั่นคือ Compound 1 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และไม่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้

ตารางที่ 3-54 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของ Compound 1 ต่อ PBMC

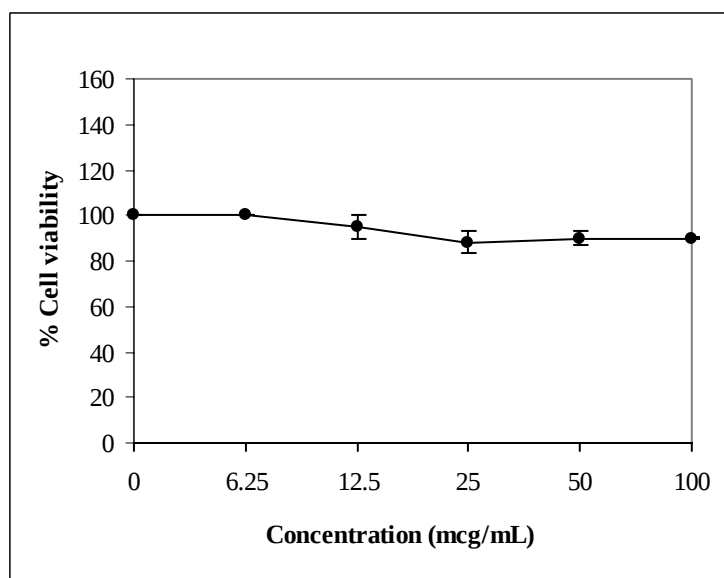
ความเข้มข้น($\mu\text{g/mL}$)	% Cell viability
0.00	100.00 $\pm$ 06.72
6.25	107.44 $\pm$ 11.04
12.50	122.56 $\pm$ 08.36
25.00	125.77 $\pm$ 05.08
50.00	148.45 $\pm$ 17.73
100.00	251.54 $\pm$ 37.68

ตารางที่ 3-55 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของ Compound 1 ต่อ KB-31 cells

ความเข้มข้น($\mu\text{g/mL}$)	% Cell viability
0.00	100.00 $\pm$ 0.15
6.25	100.07 $\pm$ 5.15
12.50	94.74 $\pm$ 4.78
25.00	88.12 $\pm$ 3.37
50.00	90.10 $\pm$ 0.47
100.00	90.06 $\pm$ 2.39



รูปที่ 3-28 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของ Compound 1 ต่อ PBMC



รูปที่ 3-29 แสดงผลการทดสอบ Cytotoxicity ของ Compound 1 ต่อ KB-31 cells

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาพืชสมุนไพร 26 ชนิด บางชนิดใช้เฉพาะส่วนใบ บางชนิดใช้เฉพาะส่วนผล และบางชนิดใช้เฉพาะส่วนลำต้น นอกจากนั้นบางชนิดใช้ส่วนต่าง ๆ มากกว่า 1 ส่วน การเลือกชนิดพืชและส่วนของพืชที่ใช้ในการวิจัยนี้ เลือกมาจาก 3 วิธี คือ 1) Random sampling คือหาง่าย / มีปริมาณมาก / เป็นของเหลือใช้ 2) Chemotaxonomic approach คือเลือกที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ antioxidant และ 3) Ethnopharmacological information คือได้รับข้อมูลจาก local knowledge พบว่า ดังนั้นแม้ว่าพืชสมุนไพรที่สนใจจะมีทั้งหมด 26 ชนิด จึงมีตัวอย่างที่นำมาศึกษาในเบื้องต้นถึง 43 ตัวอย่าง โดยทั้งหมดจะถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ Antioxidant และความเป็นพิษต่อเซลล์ จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบสมุนไพรแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ Antioxidant ในระดับแตกต่างกัน ผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าส่วนใหญ่ไม่เป็นพิษต่อ PBMC ยกเว้นสารสกัดหยาบของเปลือกมังคุด ใบรางจืด และใบฟ้าทะลายโจร ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ PBMC ได้อย่างชัดเจน โดยมีค่า $IC_{50} = 4.9, 5.3$ และ 8.6 mcg/ml ตามลำดับ ส่วนผลต่อ Caco-2 cell พบว่าส่วนใหญ่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ Caco-2 cell ยกเว้นสารสกัดหยาบของเปลือกมังคุดที่สามารถยับยั้งได้ โดยมีค่า $IC_{50} = 32$ mcg/ml

ส่วนของพืช 5 ชนิดคือ ใบฝรั่ง ใบสะระแหน่ เปลือกผลทับทิม ใบทับทิม และใบรางจืด ถูกเลือกเพื่อการศึกษาต่อไป โดยให้ความสำคัญกับสารสกัดหยาบที่ให้ฤทธิ์ Antioxidant สูงเป็นหลัก และพิจารณาความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติ ควบคู่ไปกับความยากง่ายในการเก็บตัวอย่างพืชเป็นรอง ดังนั้นใบรางจืดแม้จะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMC แต่เห็นว่าสารสกัดหยาบใบรางจืดให้ฤทธิ์ Antioxidant สูง และพิจารณาว่าพืชดังกล่าวอาจไม่ใช่จากสาร Antioxidant เนื่องจากเป็นสารสกัดหยาบซึ่งมีสารอื่นปนมามากชนิด จึงได้พิจารณาเลือกมาศึกษาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการทำ Fractionation ซึ่งเรียกสารสกัดที่ได้ว่าสารสกัดแยกส่วน โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ n-Hexane, Ethyl acetate, n-Butanol และ Methanol ทำให้ได้สารสกัดทั้งหมด 20 ส่วน เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านออกซิเดชันพบว่าสารสกัดจากใบทับทิม ใบฝรั่ง และเปลือกผลทับทิม มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดโดยเฉพาะส่วนของสารสกัดที่ได้จาก methanol จากการศึกษาเคมีเบื้องต้นและปริมาณ total phenolic content ในสารสกัดพบว่าสารสกัดทั้งสามนี้มี tannin และ total phenolic content สูงที่สุดเช่นกัน จึงพิจารณาว่าสารประกอบเหล่านั้นที่มีอยู่ในสารสกัดทั้งสามมีอิทธิพลต่อฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ เมื่อนำสารสกัดมา

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารสกัดจากใบทับทิมและเปลือกผลทับทิมมีความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMC ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกสารสกัดจากใบฝรั่งซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ไปทำการแยกสกัดเพื่อหาสารบริสุทธิ์ที่ให้ฤทธิ์ที่สุด

จากการแยกสารบริสุทธิ์ออกจากสารสกัดใบฝรั่ง พบสาร 3 ชนิด เรียกว่า Compound 1, 2 และ 3 เมื่อนำสารทั้งสามไปศึกษาหาสูตรโครงสร้าง พบว่า Compound 1, 2 และ 3 คือ quercetin, morin, และ quercetin-3-O-glucopyranoside เมื่อนำสารทั้ง 3 ชนิดไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า Compound 1 หรือ Quercetin มีฤทธิ์สูงสุด โดยให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแรงกว่าสาร BHT ซึ่งเป็น Chemical Antioxidant ที่นำมาเปรียบเทียบ ถึงมากกว่า 7 เท่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีทดสอบ ส่วนสารอีก 2 ชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวมีค่าน้อยกว่า Compound 1 มาก เมื่อนำ Compound 1 ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ PBMC และ KB-31

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าในบรรดาสมนไพรไทยที่นำมาศึกษาทั้งหมด ฝรั่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด เนื่องจากให้สารที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแรงที่สุด เป็นสารที่ได้มาจากส่วนของใบฝรั่ง เป็นสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง สารดังกล่าวมีชื่อว่า Quercetin

เอกสารอ้างอิง

- Aguiyi, J.C., Obi, C.I., Gang, S.S., Igweh, A.C. 2000. Hypoglycaemic activity of *Ocimum gratissimum* in rats. *Fitoterapia* 71(4), 444-446.
- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 48, 589-601.
- Alzoreky, N., Nakahara, K. 2001. Antioxidant activity of some edible Yemeni plants evaluated by ferrylmyoglobin/ABTS assay. *Food Science and Technology Research* 7(2), 141-144.
- Andersen, L., Adersen, A., Jaroszewski, J.W. 1998. Natural cyclopentanoid cyanohydrin glycosides. Part 17. Cyanogenesis of *Passiflora foetida* *Phytochemistry* 47(6), 1049-1050
- Anroop, B., Bhatnagar, S.P., Ghosh, B., Parcha, V. 2005. Studies on *Ocimum gratissimum* seed mucilage: Evaluation of suspending properties. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 67(2), 206-209.
- Anroop, B., Ghosh, B., Parcha, V., Vasanti, S. 2006. Studies on *Ocimum gratissimum* seed mucilage: Evaluation of binding properties. *International Journal of Pharmaceutics* 325(1-2), 191-193.
- Anthony, S., Abeywickrama, K., Wijeratnam, S.W. 2003. The effect of spraying essential oils of *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon flexuosus* and *Ocimum basilicum* on postharvest diseases and storage life of Embul banana. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 78(6), 780-785.
- Antony, M.S., Han, Y.I., Rieck, R. J., Dawson, L.P. 2000. Antioxidatives Effect of Maillard Reaction Products Formed from Honey at Different Reaction Times. *J. Agric. Food Chem.* 48(9), 3985-3989.
- Arima, H., Danno, G. 2002. Isolation of Antimicrobial Compounds from Guava (*Psidium guajava* L.) and their Structural Elucidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 66 (8), 1727-1730.

- Aritajat, S., Wutteerapol, S., Saenphet, K. 2004. Anti-diabetic effect of *Thunbergia laurifolia* Linn. Aqueous extract. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health (2004), 35 Suppl 2, 53-58.
- Atsuji, M., Hikimoto, K., Yamashita, C., Iwasaki, Y. 1993. Antidiabetic triterpene glycoside and its manufacture from *Gymnema inodorum*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 9 pp.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry 239, 70-76.
- Biju, P.G., Devi, V.G., Lija, Y., Abraham, A. 2007. Protection against selenite cataract in rat lens by drevogenin D, a triterpenoid aglycone from *Dregea volubilis*. Journal of Medicinal Food 10(2), 308-315.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology 28, 25-30.
- Cheel, J., Theoduloz, C., Rodriguez, J., Schmeda-Hirschmann, G. 2005. Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(7), 2511-2517.
- Chen, C.F., Hwang, J.M., Lee, W., Chiang, H.C., Lin, J.C., Chen, H.Y. 1988. Search for antitumor agent for Chinese herbs I. Antitumor screening method. China Medical Journal (Taipei) 41, 177-184.
- Chukwujekwu, J.C., Smith, P., Coombes, P.H., Mulholland, D.A., van Staden, J. 2005. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. Journal of Ethnopharmacology 102(2), 295-297.
- Deshpande, K.V., Patil, M.B. 2001. Antihelmintic property of erythroagglutinins of *Dregea volubilis*. Indian Veterinary Medical Journal 25(4), 385-387
- Deshpande, K.V., Patil, M.B. 2003. Determination of toxicity of *Dregea volubilis* proteins in rats and chicks. Indian Veterinary Medical Journal 27(4), 357-358.
- Dudai, N., Weinstein, Y., Krup, M., Rabinski, T., Ofir, R. 2005. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. Planta Medica 71(5), 484-488.
- Dutta, D., Devi, S.S., Krishnamurthi, K., Kumar, K., Vyas, P., Muthal, P.L., Naoghare, P., Chakrabarti, T. 2007. Modulatory effect of distillate of *Ocimum sanctum* leaf

- extract on human lymphocytes against genotoxicants. *Biomedical and Environmental Sciences* 20(3), 226-234.
- Echeverri, F., Arango, V., Quinones, W., Torres, F., Escobar, G., Rosero, Y., Archbold, R. 2001. Passifloricins, polyketides alpha-pyrone from *Passiflora foetida* resin. *Phytochemistry* 56(8), 881-885.
- Echeverri, F., Cardona, G., Torres, F., Pelaez, C., Quinones, W., Renteria, E. 1991. Ermanin: an insect deterrent flavonoid from *Passiflora foetida* resin. *Phytochemistry* 30(1), 153-155.
- Echeverri, L., Fernando, L., Suarez V., Eugenia, G. 1985. Flavonoids from the surface of *Passiflora foetida* L. (Passifloraceae). *Actualidades Biologicas* (Medellin, Colombia) 14(52), 58-60.
- Elmastas, M., Guecin, I., Oeztuerk, L., Goekce, I. 2005. Investigation of antioxidant properties of spearmint (*Mentha spicata* L.). *Asian Journal of Chemistry* 17(1), 137-148.
- Eriksson, C.E., Na, A. 1995. Antioxidant Agents in Raw Materials and Processed Foods. *Biochem Soc Symp.* 61, 221-234.
- Faria, T.J., Ferreira, R.S., Yassumoto, L., Pinto de Souza, J.R., Ishikawa, N.K., Barbosa, A.M. 2006. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49(6), 867-871.
- Franzios, G., Mirotsoy, M., Hatzia Apostolou, E., Kral, J., Scouras, Z.G., Mavragani-Tsipidou, P. 1997. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(7), 2690-2694.
- Gamez, E.J.C., Luyengi, L., Lee, S.K., Zhu, L.F., Zhou, B.N., Fong, H.H.S., et al. 1998. Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum*. *Journal of Natural Products* 61, 706-708.
- Geidam, Y.A., Ambali, A.G., Onyeyili, P.A. 2007. Preliminary phytochemical and antibacterial evaluation of crude aqueous extract of *Psidium guajava* leaf. *Journal of Applied Sciences* 7(4), 511-514.

- Geran, R.I., Greenberg, N.H., Macdonald, M.M., Schumacher, A.M., Abbott, B.J. 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports* 3(2), 103–105.
- Goel, R.K., Sairam, K. 2002. Anti-ulcer drugs from indigenous sources with emphasis on *Musa sapientum*, *Tamrabhasma*, *Asparagus racemosus* and *Zingiber officinale*. *Indian Journal of Pharmacology* 34(2), 100-110.
- Goel, R.K., Sairam, K., Rao, C.V. 2001. Role of gastric antioxidant and anti-*Helicobacter pylori* activities in antiulcerogenic activity of plantain banana (*Musa sapientum* var. *paradisiaca*). *Indian Journal of Experimental Biology* 39(7), 719-722.
- Gupta, S.K., Srivastava, S., Trivedi, D., Joshi, S., Halder, N. 2005. *Ocimum sanctum* modulates selenite-induced cataractogenic changes and prevents rat lens opacification. *Current Eye Research* 30(7), 583-591.
- Gutierrez, R., Martha, P. Solis, R.V., Baez, E.G., Flores, J.M.M. 2007. Microvascular protective activity in rabbits of triterpenes from *Hylocereus undatus*. *Journal of Natural Medicines* 61(3), 296-301.
- Habaguchi, K., Watanabe, M., Nakadaira, Y., Nakanishi, K., Kiang, A.K., Lim, F.Y. 1968. The full structures of lansic acid and its minor congener, an unsymmetric onoceradienedione. *Tetrahedron Letters* (1968), (34), 3731-3734.
- Harbone, J.B. 1973. *Phytochemical Method*: London: Chapman and Hall.
- Heber, D., Seeram, N.P., Wyatt, H., Henning, S.M., Zhang, Y., Ogden, L.G., Dreher, M., Hill, J.O. 2007. Safety and antioxidant activity of a pomegranate ellagitannin-enriched polyphenol dietary supplement in overweight individuals with increased waist size. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(24), 10050-10054.
- Holloway, D.M., Scheinmann, F. 1975. Phenolic compounds from the heartwood of *Garcinia mangostana*, *Phytochemistry*, Volume 14, Issue 11, November 1975, Pages 2517-2518.
- Hsieh, C.L., Huang, C.N., Lin, Y.C., Peng, R.Y. 2007a. Molecular Action Mechanism against Apoptosis by Aqueous Extract from Guava Budding Leaves Elucidated with Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC) Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(21), 8523-8533.

- Hsieh, C.L., Lin, Y.C., Yen, G.C., Chen, H.Y. 2007b. Preventive effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaves and its active compounds against alpha-dicarbonyl compounds-induced blood coagulation. *Food Chemistry* 103(2), 528-535.
- Hsu, F.L., Chyn, L. 1991. Studies on the tannins from *Euphoria longana* LAM. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China, Part A: Physical Science and Engineering* 15(6), 541-546.
- Imai, H., Osawa, K., Yasuda, H., Hamashima, H., Arai, T., Sasatsu, M. 2001. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint of the growth of pathogenic bacteria. *Microbios* 106(Suppl. 1), 31-39.
- Kanchanapoom, T., Kasai, R., Yamasaki, K. 2002. Iridoid glucosides from *Thunbergia laurifolia*. *Phytochem.* 60(8), 769-771.
- Kasuka, A., Aoyagi, Y., Sugahara, T. 1995. Antioxidant Activity of Fungus *Suillus bovinus*. *J. Food Sci.* 60(5), 1113-1115.
- Kath, R.K., Gupta, R.K. 2006. Antioxidant activity of hydroalcoholic leaf extract of *Ocimum sanctum* in animal models of peptic ulcer. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 50(4), 391-396.
- Kawai, Y. 1990. Hair preparations containing quaternary ammonium salts, siloxanes, and lansic acids. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 5 pp.
- Ketsa, S., Atantee, S. 1998. Phenolics, lignin, peroxidase activity and increased firmness of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact, *Postharvest Biology and Technology*, Volume 14, Issue 1, September 1998, Pages 117-124
- Khalfi, O., Benyoussef, E.H., Yahiaoui, N. 2006. Extraction, analysis and insecticidal activity of spearmint essential oil from Algeria against *Rhyzopertha dominica* (F.). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 9(1), 17-21.
- Khandhar, M., Shah, M., Santani, D., Jain, S. 2006. Antiulcer activity of the root bark of *Oroxylum indicum* against experimental gastric ulcers. *Pharmaceutical Biology* (Philadelphia, PA, United States) 44(5), 363-370.
- Kiang, A.K., Tan, E.L., Lim, F.Y., Habaguchi, K., Nakanishi, K., Fachan, L., Ourisson, G. 1967. Lansic acid, a bicyclic triterpene. *Tetrahedron Letters* (37), 3571-3574.

- Kobayashi, Y., Masamoto, K., Inoue, S., Kodama, H., Nishimura, H., Nogawa, Y. 1988. Skin conditioners containing *Lansium domesticum* extracts, lansic acid or its derivatives. Jpn. Kokai Tokkyo Koho 8 pp.
- Kondo, S., Posuya, P., Kanlayanarat, S. 2001. Changes in physical characteristics and polyamines during maturation and storage of rambutans. *Scientia Horticulturae* 91, 101-109.
- Koul, I.B., Kapil, A. 1994. Effect of diterpenes from *Andrographis paniculata* on antioxidant defense system and lipid peroxidation. *Indian Journal of Pharmacology* 26(4), 296-300.
- Lin, J.H., Tsai, C.C. 1995. Phenolic constituents from the flowers of *Euphoria longana* Lam. *Chinese Pharmaceutical Journal (Taipei)* 47(2), 113-121.
- Liu, X., Zhang, Z., Duan, Y., Liu, Q., Cui, J. 2002. Antioxidant activities of herbs and spices from commercial sources. *Shipin Kexue* 23(1), 143-145.
- Maillard, N.M., Soum, H.M., Boivin, P. and Berset, C. 1996. Antioxidant activity of Barley and Malt: Relationship with Phenolic Content. *Food Sci & Technol.* 29(3), 238-244.
- Manikandan, P., Murugan, R.S., Abbas, H., Abraham, S.K., Nagini, S. 2007. *Ocimum sanctum* Linn. (Holy Basil) Ethanolic Leaf Extract Protects Against 7, 12-Dimethylbenz[a]Anthracene-Induced Genotoxicity, Oxidative Stress, and Imbalance in Xenobiotic-Metabolizing Enzymes. *Journal of Medicinal Food* 10(3), 495-502.
- Manoj, G.P., Thampi, B.S.H., Venugopal, P.M., Leelamma, S. 1999. Influence of dietary fiber from coconut kernel (*cocos nucifera*) on the 1,2-dimethylhydrazine-induced lipid peroxidation in rats, *Journal of Nutritional Biochemistry* 10(9) 555-560.
- Markham, K.R. 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*, New Zealand: Academic Press.
- Markham, K.R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H., Mabry, T.J. 1978. Carbon-13 NMR studies of Flavonoids-III Naturally Occurring Flavonoid Glycosides and their Acylated Derivatives. *Tetrahedron* 34, 1389-1397.

- Masuda, T., Inazumi, A., Yamada, Y., Padolina, W.G., Kikuzaki, H., Nakatani, N. 1991. Constituents of Piperaceae. Part 4. Antimicrobial phenylpropanoids from *Piper sarmentosum*. *Phytochemistry* (1991), 30(10), 3227-3228.
- Meckes, M., Calzada, F., Tortoriello, J., Gonzalez, J.L., Martinez, M. 1996. Terpenoids isolated from *Psidium guajava* hexane extract with depressant activity on central nervous system. *Phytotherapy Research* 10(7), 600-603.
- Milner, P.H., Coates, N.J., Gilpin, M.L., Spear, S.R., Eggleston, D.S. 1996. SB-204900, A novel oxirane carboxamide from *Clausena lansium*. *Journal of Natural Products* 59(4), 400-402.
- Miranda, L.C., Stevens, F.J., Ivanov, V., McCall, M., Frei, B., Deinzer, L.M., Buhler, R.D. 2000. Antioxidant and Prooxidant Actions of Prenylated and Nonprenylated Chalcones and Flavanones in Vitro. *J. Agric. Food Chem.* 48(9), 3876-3884.
- Miranda, S.M., Cintra, G.R., Barros, M.B.S., Mancini-Filho, J. 1998. Antioxidant Activity of The Microalgae *Spirulina maxima*. *J. Med Biol.* 31(8), 1075-1079.
- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55-63.
- Mukhtar, H.M., Ansari, S.H., Bhat, Z.A., Naved, T., Singh, P. 2006. Antidiabetic activity of an ethanol extract obtained from the stem bark of *Psidium guajava* (Myrtaceae). *Die Pharmazie* 61(8), 725-727.
- Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H. 1996. Antitumor promoting activity of glyceroglycolipids. *Bio Industry* 13(5), 28-34.
- Najib, N.A., Rahman, N., Furuta, T., Kojima, S., Takane, K., Ali M.M. 1999. Antimalarial activity of extracts of Malaysian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 64(3), 249-254.
- Nakahara, K., Onishi-Kameyama, M., Ono, H., Yoshida, M., Trakoontivakorn, G. 2001. Antimutagenic activity against Trp-P-1 of the edible thai plant, *Oroxylum indicum* Vent. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65(10), 2358-2360.
- Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S.A., Sayeed, S.A. 2007. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Science* 72(9), M341-M345.

- Ng Tzi, B., Lam Sze, K., Fong Wing, P. 2003. A homodimeric sporamin-type trypsin inhibitor with antiproliferative, HIV reverse transcriptase-inhibitory and antifungal activities from wampee (*Clausena lansium*) seeds. *Biological Chemistry* 384(2), 289-293.
- Njoku, C.J., Asuzu, I.U. 1998. The anthelmintic effects of the leaf extract of *Ocimum gratissimum*. *Phytomedicine* 5(6), 485-488.
- Oboh, G. 2006. Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extract of *Ocimum gratissimum* leaves. *Journal of Pharmacology and Toxicology* 1(1), 47-53.
- Offiah, V.N., Chikwendu, U.A. 1999. Antidiarrhoeal effects of *Ocimum gratissimum* leaf extract in experimental animals. *Journal of ethnopharmacology* 68(1-3), 327-330.
- Ogawa, S., Nakamura, Y., Hamanaka, N., Arai, Y. 1988. Jpn. Kokai Tokkyo Koho 3 pp.
- Ojewole, J.A.O. 2006. Antiinflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rats and mice. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 28(7), 441-446.
- Oonsivilai, R., Cheng, C., Bomser, J., Ferruzzi, M.G., Ningsanond, S. 2007. Phytochemical profiling and phase II enzyme-inducing properties of *Thunbergia laurifolia* Lindl. (RC) extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 114(3), 300-306.
- Ortiz, A.J., Cordero, O.L. 1984. Rambutan (*Nephelium lappaceum*); chemical composition of the fruit and its preservation. *Turrialba* 34(2), 243-246.
- Oxenham, S.K., Svoboda, K.P., Walters, D.R. 2005. Antifungal activity of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Phytopathology* 153(3), 174-180.
- Paganga, G., Miller, N., Rice-Evans, C.A. 1999. The Polyphenolic Content of Fruits and Vegetables and Their Antioxidant Activity. What Does a Serving Constitute? *Free Radic Res.* 30(2), 153-162.
- Panda, N., Mandal, D., Mandal, N.B., Sahu, N.P., Banerjee, S. 2006. Flavonoid and flavone C-glycosides from *Dregea volubilis*. *Natural Product Communications* 1(9), 731-733.
- Panda, N., Mondal, N.B., Banerjee, S. Sahu, N.P., Koike, K., Nikaido, T., Weber, M., Luger, P. 2003. Polyhydroxy pregnanes from *Dregea volubilis*. *Tetrahedron* 59(42), 8399-8403.

- Parmar, H. S., Kar, A. 2007. Protective role of *Citrus sinensis*, *Musa paradisiaca*, and *Punica granatum* peels against diet-induced atherosclerosis and thyroid dysfunctions in rats. *Nutrition Research* 27(11), 710-718.
- Perez, G.R.M., Vargas, S.R., Ortiz, H.Y.D. 2005. Wound healing properties of *Hylocereus undatus* on diabetic rats. *Phytotherapy Research* 19(8), 665-668.
- Peungvicha. P., Thirawarapan, S.S., Temsiririrkkul, R., Watanabe, H., Kumar, P.J., Kadota, S. 1998. Hypoglycemic effect of the water extract of *Piper sarmentosum* in rats. *J. Ethnopharmacol* 60(1), 27-32.
- Pino, J.A., Ortega, A., Rosado, A. 1999. Volatile constituents of guava (*Psidium guajava* L.) fruits from Cuba. *Journal of Essential Oil Research* 11(5), 623-628.
- Piyachaturawat, P., Glinsukon, T., Chanjarunee, A. 1985. Antifertility effect of *Citrus hystrix*. *Journal of ethnopharmacology* 13(1), 105-110.
- Prakash, L. 1997. *Green Tea: The Cheerful Way To Good Health*. Sabinsa Corporation. USA.
- Pramyothin, P., Chirdchupunsare, H., Rungsipipat, A., Chaichantipyuth, C. 2005. Hepatoprotective activity of *Thunbergia laurifolia* Linn extract in rats treated with ethanol: in vitro and in vivo studies. *Journal of ethnopharmacology* 102(3), 408-411.
- Pyo, D., Oo, H.H. 2007. Supercritical fluid extraction of drug-like materials from selected myanmar natural plants and their antimicrobial activity. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 30(3), 377-392.
- Qa'dan, F., Petereit, F., Nahrstedt, A. 2005. Polymeric proanthocyanidins from *Psidium guajava*. *Scientia Pharmaceutica* 73(3), 113-125.
- Rastogi, S., Shukla, Y., Paul, B.N., Chowdhuri, D.K., Khanna, S.K., Das, M. 2007. Protective effect of *Ocimum sanctum* on 3-methylcholanthrene, 7, 12-dimethylbenz (a)anthracene and aflatoxin B1 induced skin tumorigenesis in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 224(3), 228-240.
- Re, R., Pellegrinni, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

- Riaz, M., Khalid, M.R., Hanif, M., Chaudhary, F.M. 1994. Extraction and GC/MS analysis of the essential oil of *Ocimum basilicum*. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research 37(9), 362-364.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. 1996. Antioxidant Activity of Flavonoids as Bioactive Compounds of Foods. Biochem .Soc. Trans. 24 (3), 90-795.
- Roy, M.K., Nakahara, K., Thalang, V.N., Trakoontivakorn, G., Takenaka, M., Isobe, S., Tsushida, T. 2007. Baicalein, a flavonoid extracted from a methanolic extract of *Oroxylum indicum* inhibits proliferation of a cancer cell line in vitro via induction of apoptosis. Pharmazie 62(2), 149-153.
- Saeed, M.A., Khan, Z.D. 1996. Estimation of tannin content in some Pakistani food materials. Journal of Faculty of Pharmacy of Gazi University 13(2), 161-166.
- Saenphet, K., Kantaoop, P., Saenphet, S., Aritajat, S. 2005. Mutagenicity of Pueraria mirifica Airy Shaw & Suvatabandhu and antimutagenicity of *Thunbergia laurifolia* Linn. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 36 Suppl 4, 238-241.
- Samson, J., Sheeladevi, R., Ravindran, R. 2007. Oxidative stress in brain and antioxidant activity of *Ocimum sanctum* in noise exposure. NeuroToxicology 28(3), 679-685.
- Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Schiavini, M.S., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P. 2005. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). Brazilian Archives of Biology and Technology 48(3), 429-436.
- Santos Thiago, C., Marques Maxsuel, S., Menezes Igor, A.C., Dias Kellyane, S., Silva Aline, B.L., Mello Iderjane, C.M., Carvalho Ana, C.S., Cavalcanti Socrates, C.H., Antonioli Angelo, R., Marcal Rosilene, M. 2007. Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice. Fitoterapia 78(5), 333-336.
- Sato, M., Ramarathnam, N., Suzuki, Y., Ohkubo, T., Takeuchi, M., Ochi, H. 1996. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44(1), 37-44.

- Shimizu, K., Ozeki, M., Tanaka, K., Itoh, K., Nakajyo, S., Urakawa, N., Atsuchi, M. 1997. Suppression of glucose absorption by extracts from the leaves of *Gymnema inodorum*. J. Vet. Med. Sci. 59(9), 753-757.
- Shirwaikar, A., Shenoy, R., Udupa, A.L., Udupa, S.L., Shetty, S. 2003. Wound healing property of ethanolic extract of leaves of *Hyptis suaveolens* with supportive role of antioxidant enzymes. Indian Journal of Experimental Biology 41(3), 238-241.
- Slimestad, R., Torskangerpoll, K., Nateland, S.H., Johnnessen, T., Giske, N.H. 2005. Flavonoids from Black Chokeberries, *Aronia Melanocarpa*. Journal of Food Composition and Analysis 18, 61-68.
- Somashekar, S., Saraswati, U., Laxminarayana, U., Nagabhushana, S. 2006. Wound healing activity of *Ocimum sanctum* with supportive role of antioxidant enzymes. Indian Journal of Physiology and Pharmacology 50(2), 163-168.
- Somchit, M.N., Sulaiman, M.R., Ahmad, Z., Israf, D.A., Hosni, H. 2004. Non-opioid anti-nociceptive effect of *Psidium guajava* leaves extract. Journal of Natural Remedies 4(2), 174-178.
- Souliman, A., Hicham, H., Houda, B.N.E., Mohammed, A., Serghini, C.H., Stefano, M., Mariarosaria, N., Elena, B. 2006. Hypolipidaemic activity of aqueous *Ocimum basilicum* extract in acute hyperlipidaemia induced by triton WR-1339 in rats and its antioxidant property. Phytotherapy Research 20(12), 1040-1045.
- Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. 2002. Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus*. Food Chemistry 77(1), 101-106.
- Sudheesh, S., Vijayalakshmi, N.R. 2005. Flavonoids from *Punica granatum* potential antiperoxidative agents. Fitoterapia 76(2), 181-186.
- Takeyama, H., Kanamaru, A., Yoshino, Y., Kakuta, H., Kawamura, Y. Matsunaga, T. 1997. Production of Antioxidant Vitamins, β -Carotene, Vitamin C and Vitamin E by Two – Step Culture of *Euglena gracilis*. Biotechnol & Bioeng. 53(13), 185-190.
- Tangpu, V., Yadav, A.K. 2006. Antidiarrhoeal activity of *Cymbopogon citratus* and its main constituent, citral. Pharmacologyonline 2, 290-298.
- Tennekoon, K.H., Jeevathayaparan, S., Kurukulasooriya, A.P, Karunanayake, E.H. 1991. Journal of Ethnopharmacology 31(3), 283-289.

- Thongsaard, W., Marsden, C.A. 2002. A herbal medicine used in the treatment of addiction mimics the action of amphetamine on in vitro rat striatal dopamine release. *Neuroscience Letters* 329(2), 129-132.
- Tognolini, M., Barocelli, E., Ballabeni, V., Bruni, R., Bianchi, A., Chiavarini, M., Impicciatore, M. 2006. Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sciences* 78(13), 1419-1432.
- Toklu, H.Z., Dumlu, M.U., Sehirli, O., Ercan, F., Gedik, N., Gokmen, V., Sener, G. 2007. Pomegranate peel extract prevents liver fibrosis in biliary-obstructed rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59(9), 1287-1295.
- Trivedi, N.P., Rawal, U.M. 2001. Hepatoprotective and antioxidant property of *Andrographis paniculata* in BHC-induced liver damage in mice. *Indian Journal of Experimental Biology* 39(1), 41-46.
- Ulubelen, A., Topcu, G., Mabry, T.J., Dellamonica, G., Chopin, J. 1982. C-glycosylflavonoids from *Passiflora foetida* var. hispida and *P. foetida* var. hibiscifolia. *Journal of Natural Products* 45(1), 103-105
- Wall, M.M. 2006. Ascorbic acid and mineral composition of longan (*Dimocarpus longan*), lychee (*Litchi chinensis*) and rambutan (*Nephelium lappaceum*) cultivars grown in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis* 19(6-7), 655-663.
- Wiseman, H., Plitzanopoulou, P. O' Reilly, J. 1996. Antioxidant Properties of Ethanolic and Aqueous Extracts of Green Tea Compared to Black Tea. *Biochem Soc Trans.* 24 (3), 390s.
- Wong, K.C., Wong, S.N., Sam, T.W., Chee, S.G. 1998. Volatile constituents of *Clausena lansium* Skeels fruit. *Journal of Essential Oil Research* 10(6), 700-702.
- Wood, J.F., Carter, P.M., Savory, R. 1983. Investigations into the effects of processing on the retention of the carotenoid fractions of *Leucaena leucocephala* during storage, and the effects of processing on mimosine concentration. *Animal Feed Science and Technology* 9(4), 307-17.
- Wybraniec, S., Mizrahi, Y. 2002. Fruit Flesh Betacyanin Pigments in *Hylocereus Cacti*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(21), 6086-6089.

- Yamamura, S., Ozawa, K., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K. 1998. Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry* 48(1), 131-136.
- Yoshimura, S., Narita, H., Hayashi, K., Mitsuhashi, H. 1983. Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants. LVI. Isolation of new antitumor-active glycosides from *Dregea volubilis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 31(11), 3971-3983.
- Yoshimura, S., Narita, H., Hayashi, K., Mitsuhashi, H. 1985. Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants. LIX. The structures of five new glycosides from *Dregea volubilis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 33(6), 2287-2293.
- Yu, T.W., Xu, M., Dashwood, R.H. 2004. Antimutagenic activity of spearmint. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 44(5), 387-393.
- Zielinski, H., Kozłowska, H. 2000. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Cereal Grains and Their Different Morphological Fractions. *J. Agric. Food Chem.* 48(6), 2008-2016.
- นันทวัน บุญยะประกฤษ. พ.ศ. 2536. ยาและผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากธรรมชาติ. หน้า 87-98. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

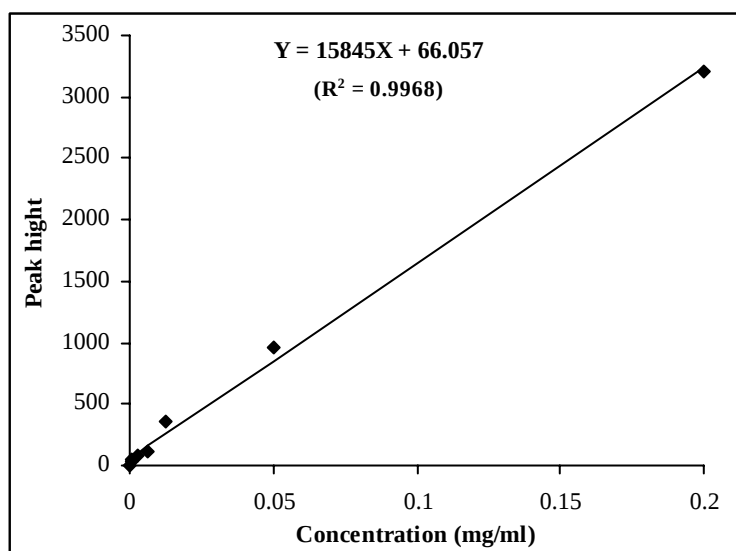
ภาคผนวก-ก

Standard Curve ของ Gallic Acid

วิธีทำ

1. เตรียมสารละลาย Standard Gallic acid 20 mg% w/v ในน้ำ
2. เจือจางด้วยน้ำ เพื่อให้ได้ Standard Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0.0005, 0.001, 0.0025, 0.00625, 0.0125, 0.05 mg/ml นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC แล้วหาค่าความสูงของ peak โดย UV detector ที่ 280 nm

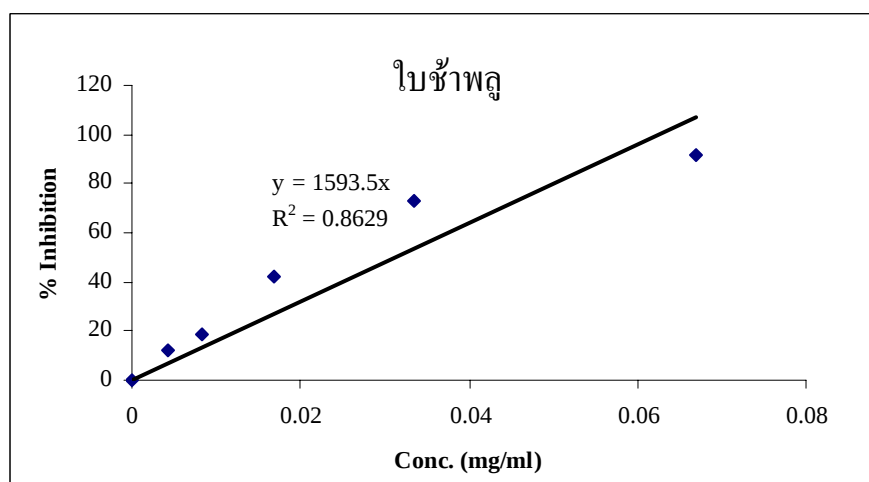
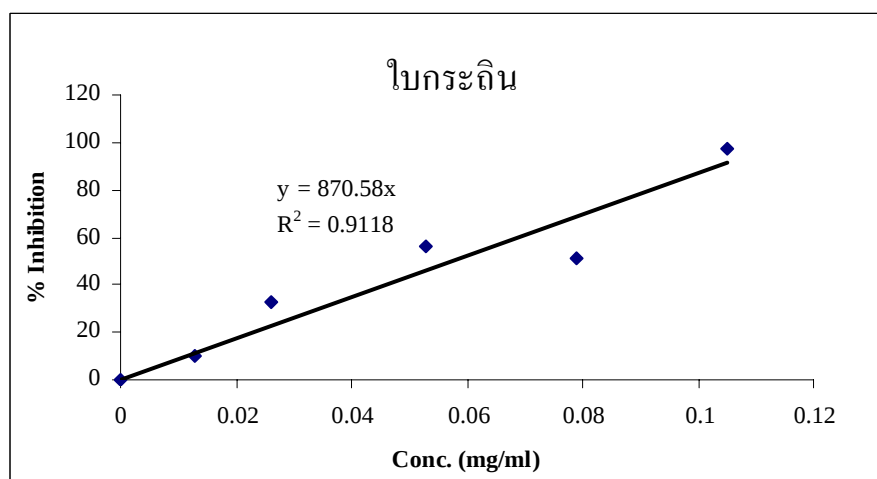
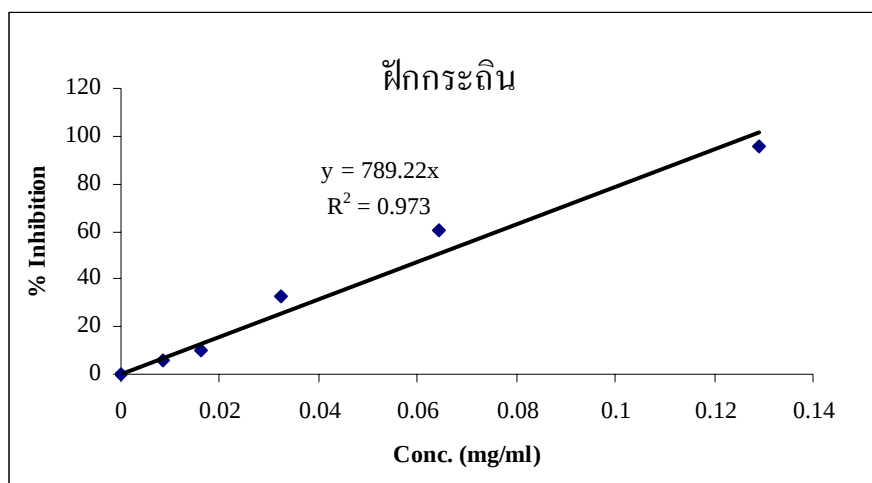
ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าความสูงของ peak ที่ 280 nm			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	Average
0.00000	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00050	29.59	32.12	30.53	30.75
0.00100	41.38	39.78	41.13	40.76
0.00250	74.28	73.05	73.29	73.54
0.00625	121.37	124.63	117.54	121.18
0.01250	355.66	368.35	365.70	363.24
0.05000	960.80	956.81	947.24	954.95
0.20000	3187.53	3227.50	3208.63	3207.89

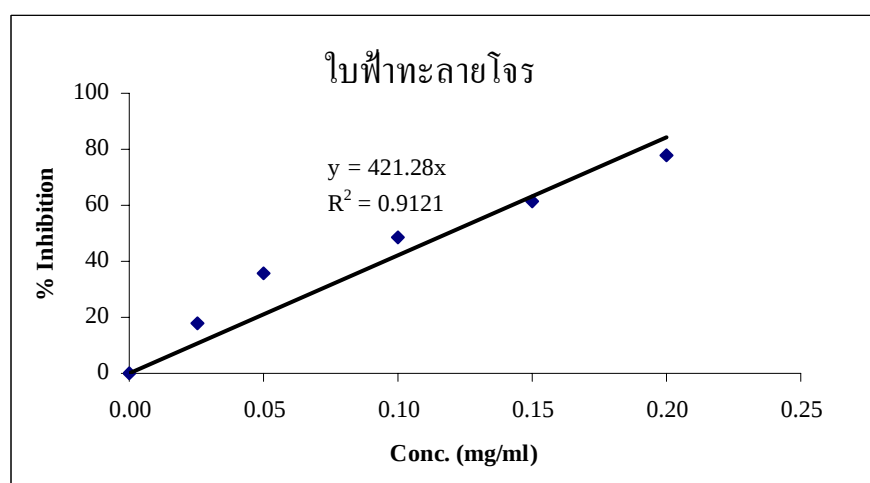
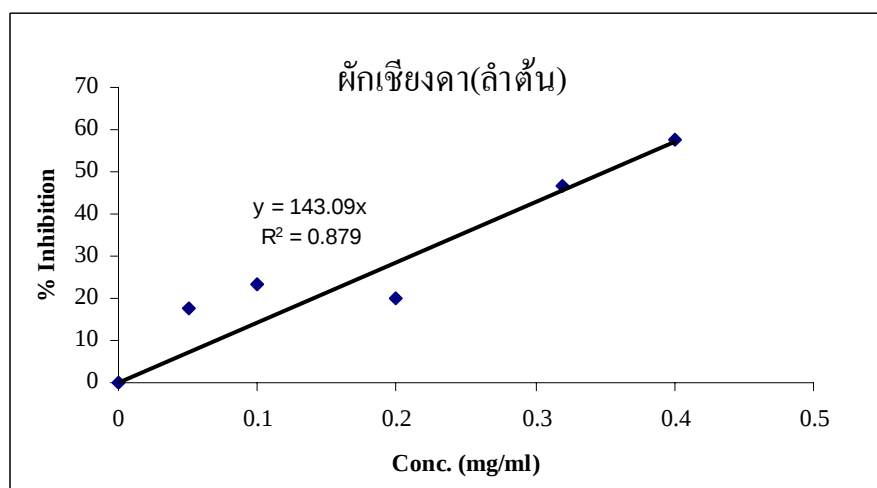
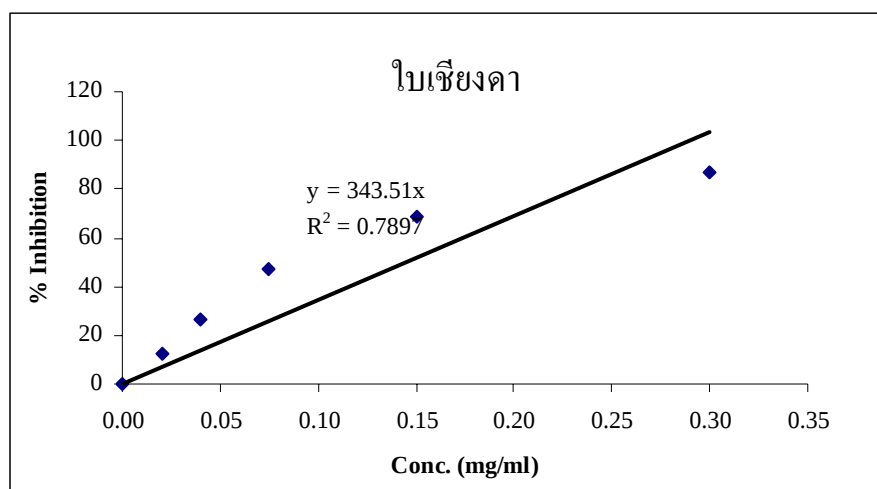


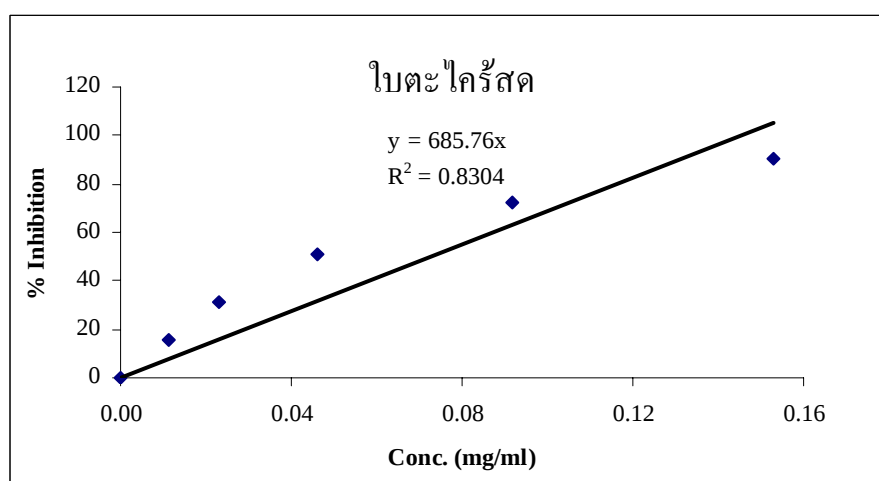
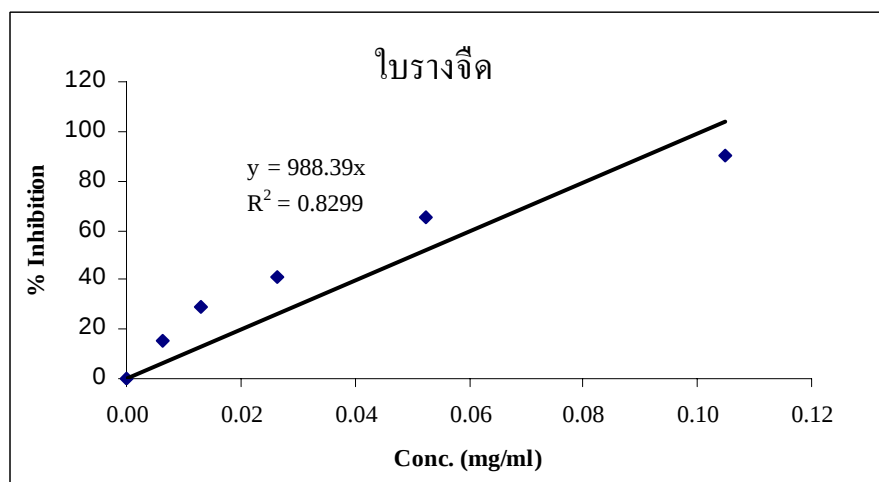
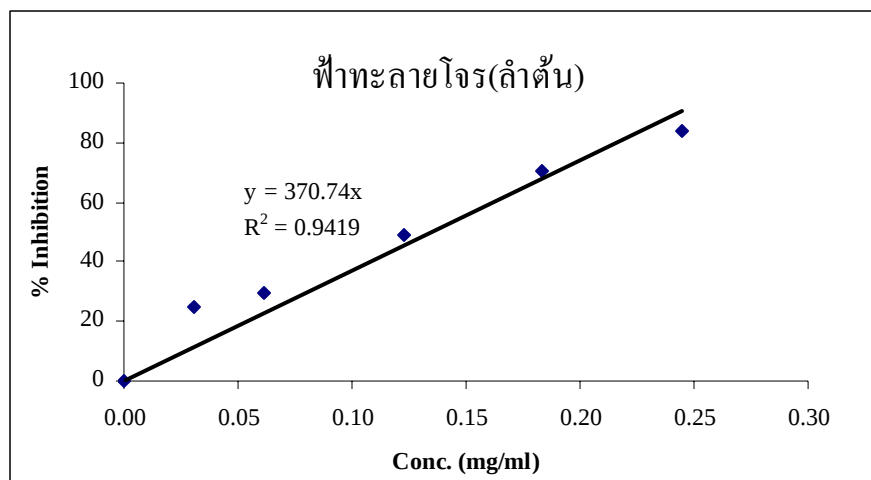
รูปแสดง Standard curve ของ Gallic acid

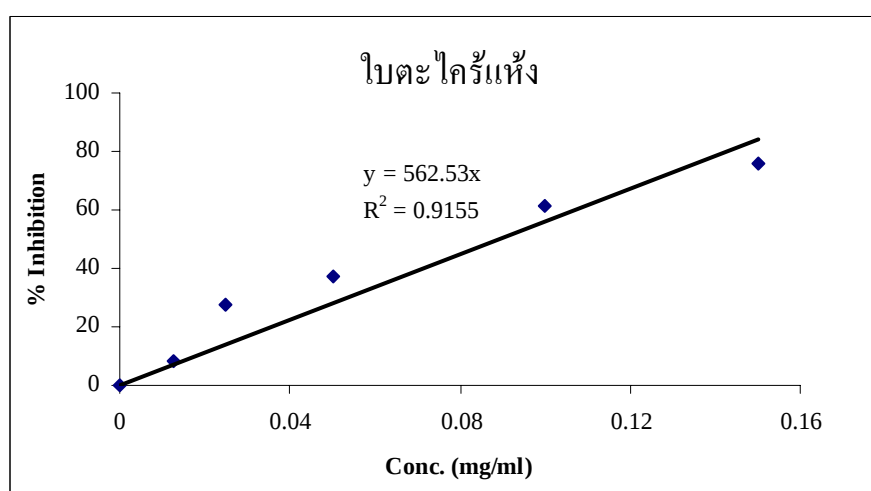
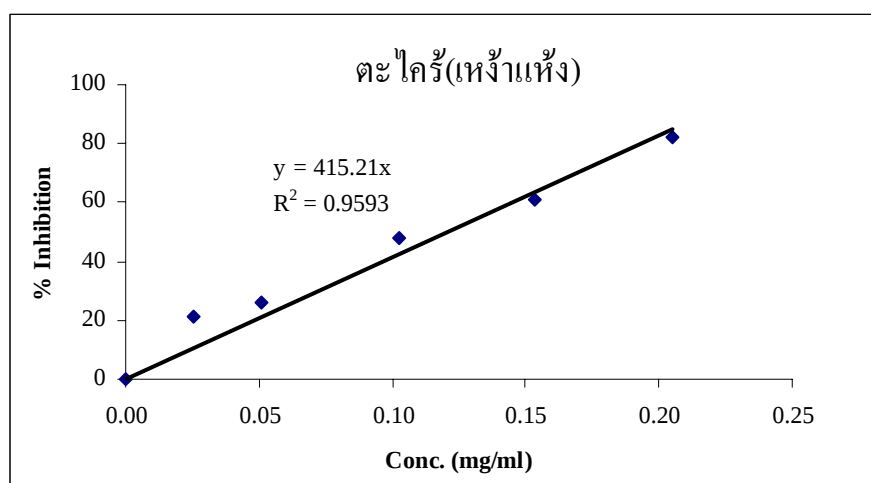
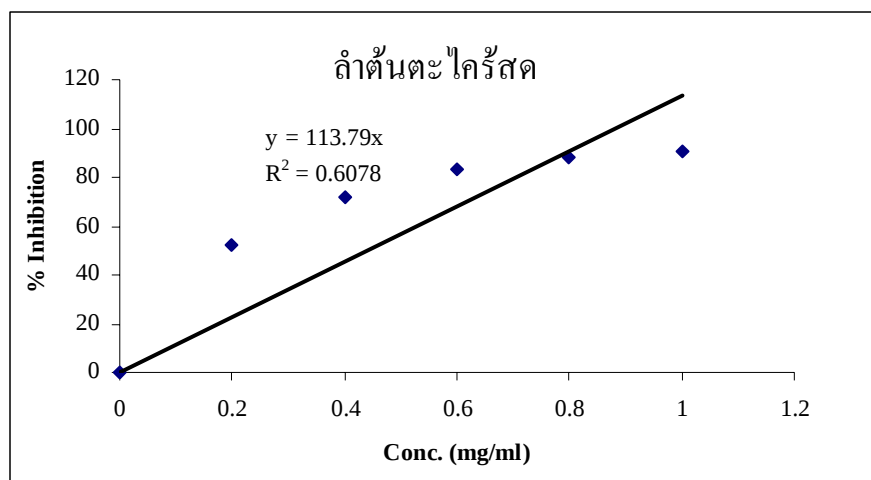
ภาคผนวก - ข

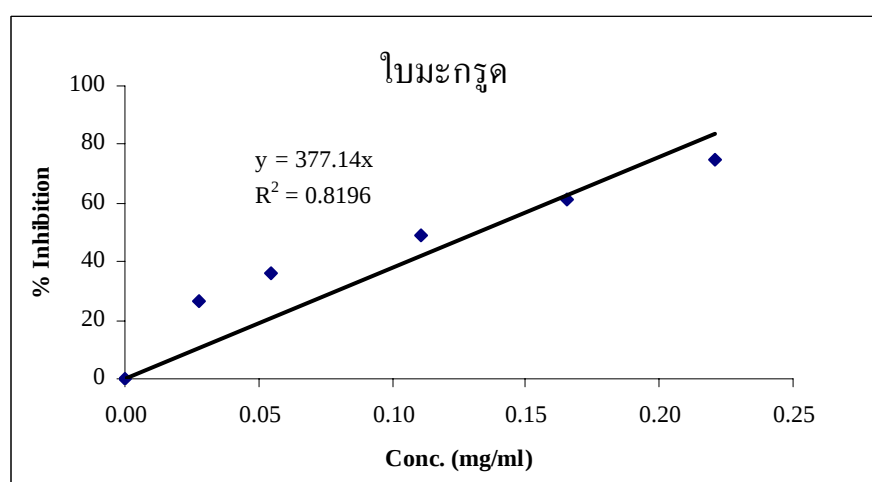
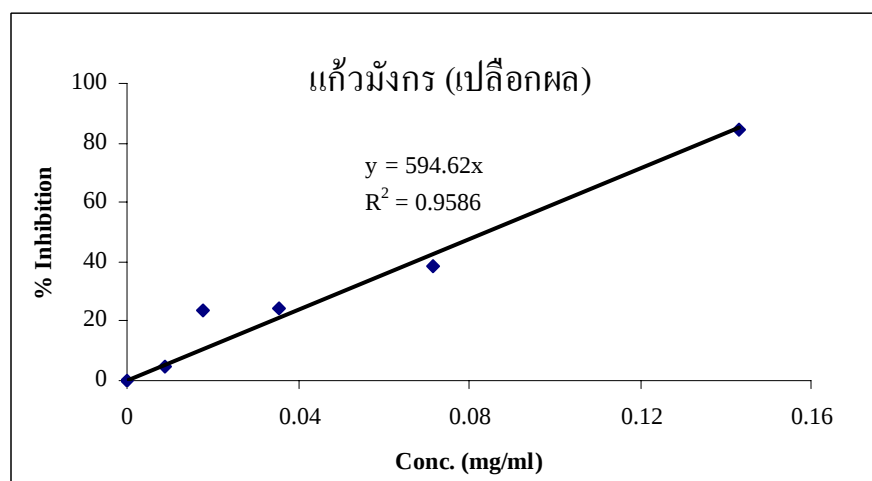
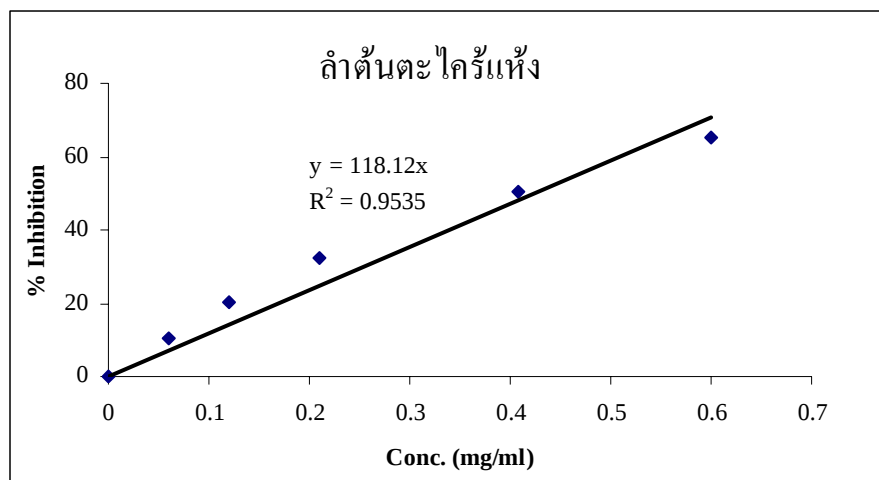
ผลการศึกษาศาสตร์กั๓ทั้ง 43 ตัวอย่างโดย DPPH Method

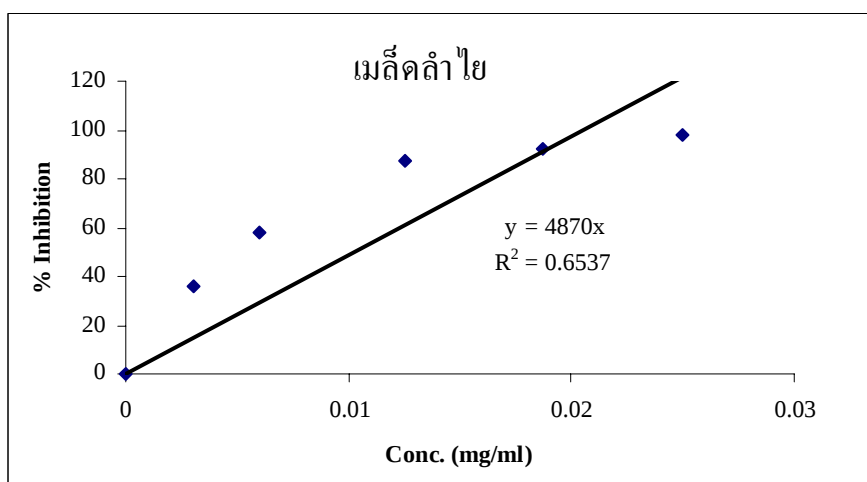
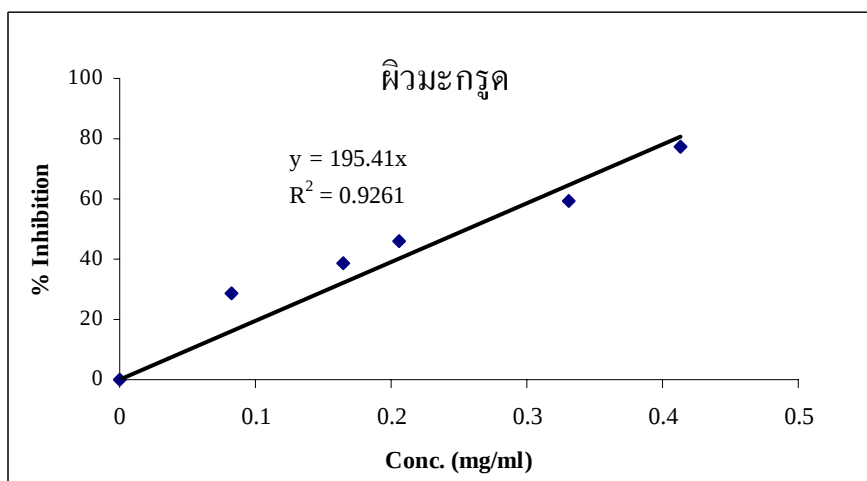
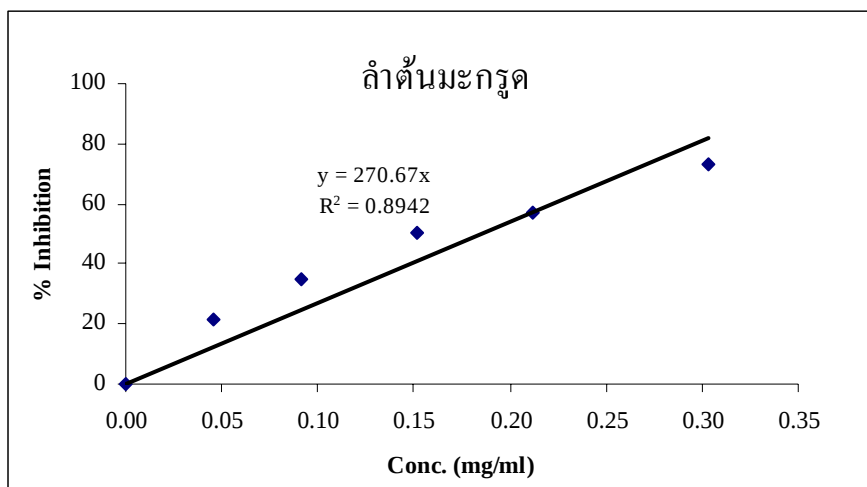


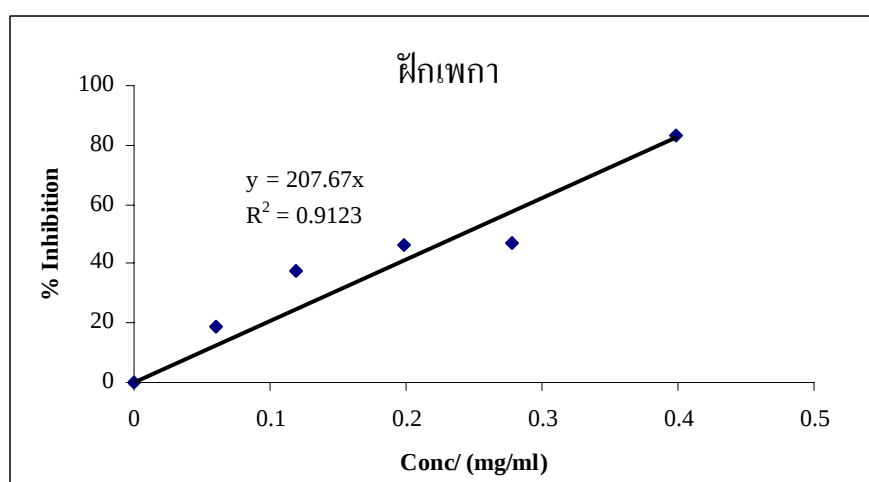
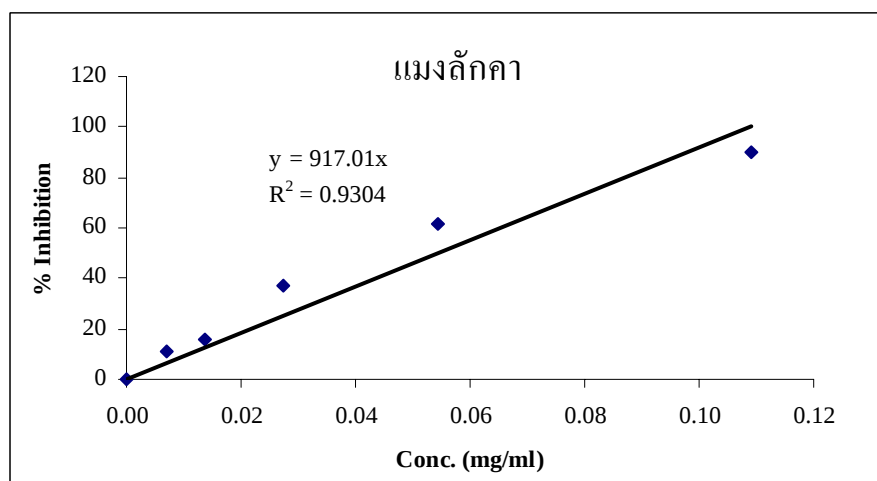
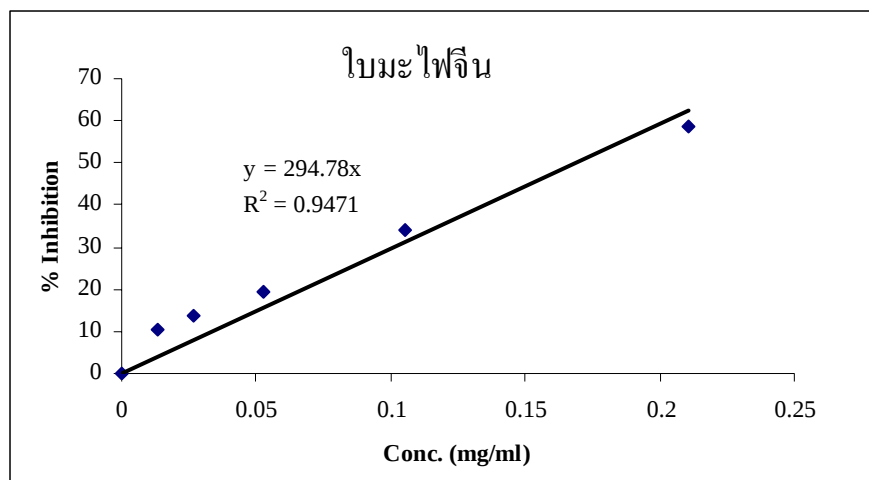


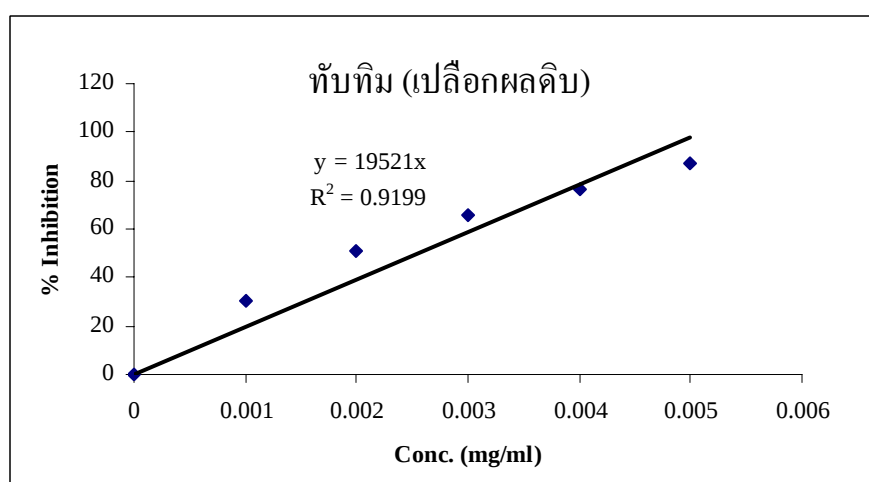
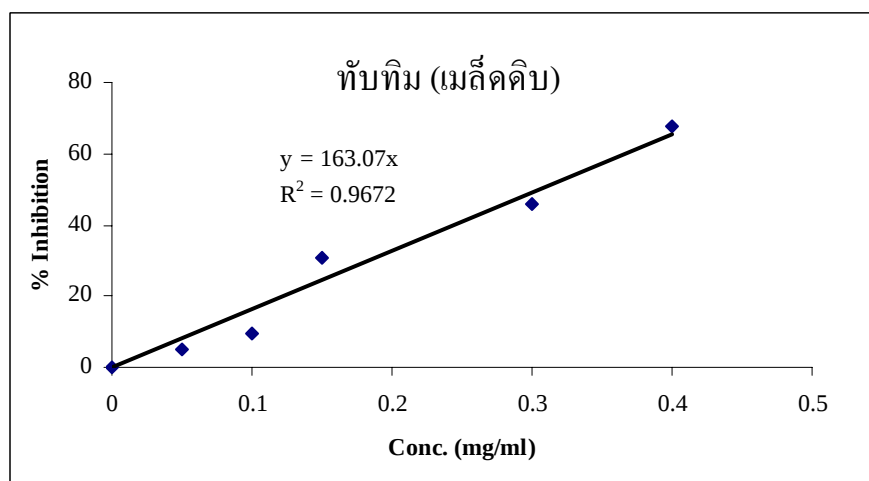
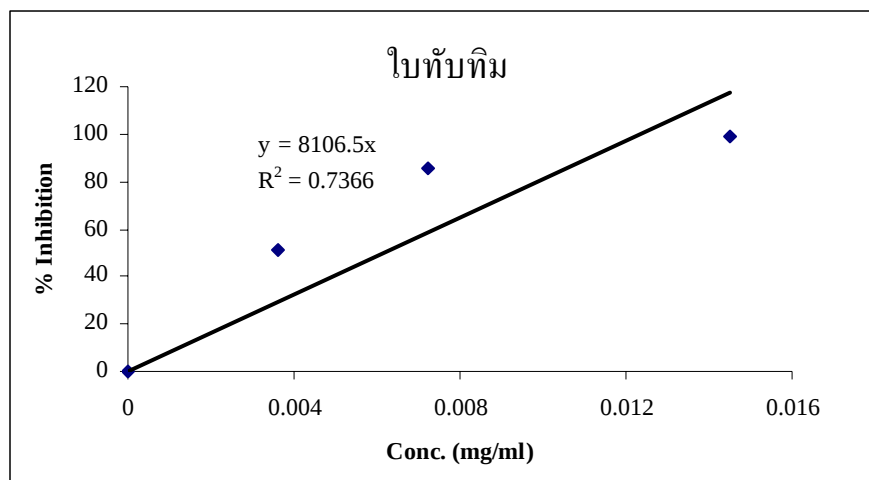


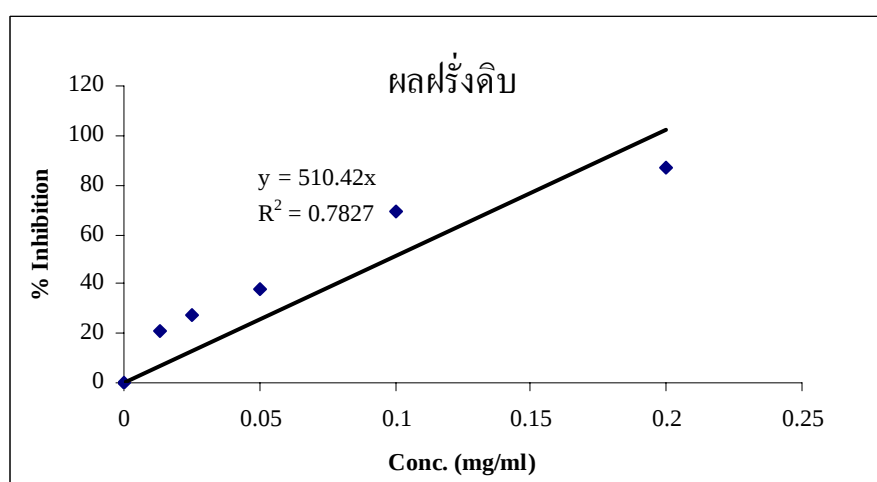
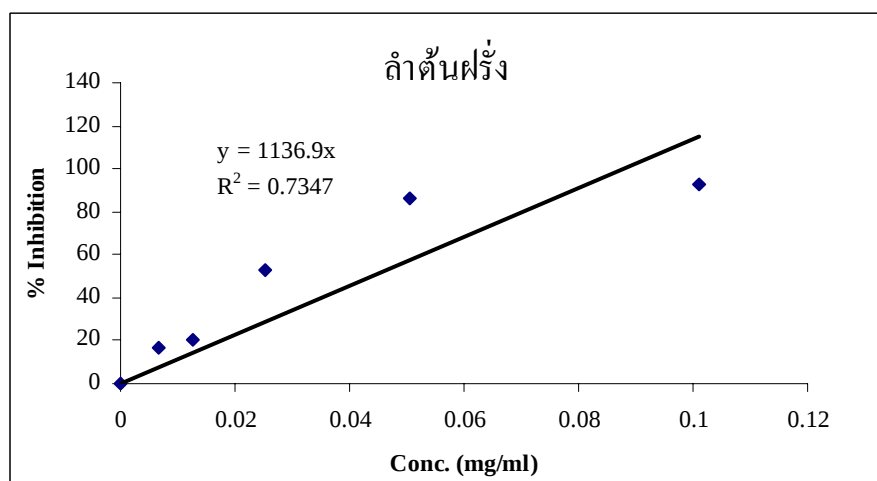
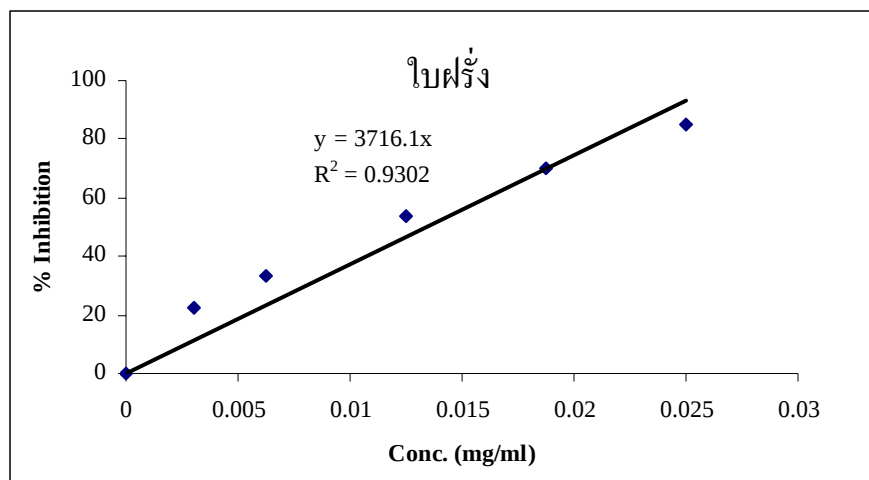


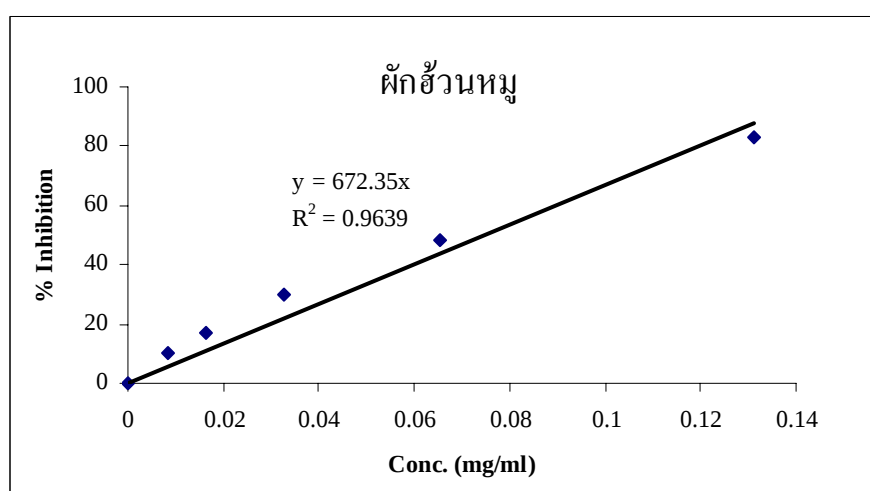
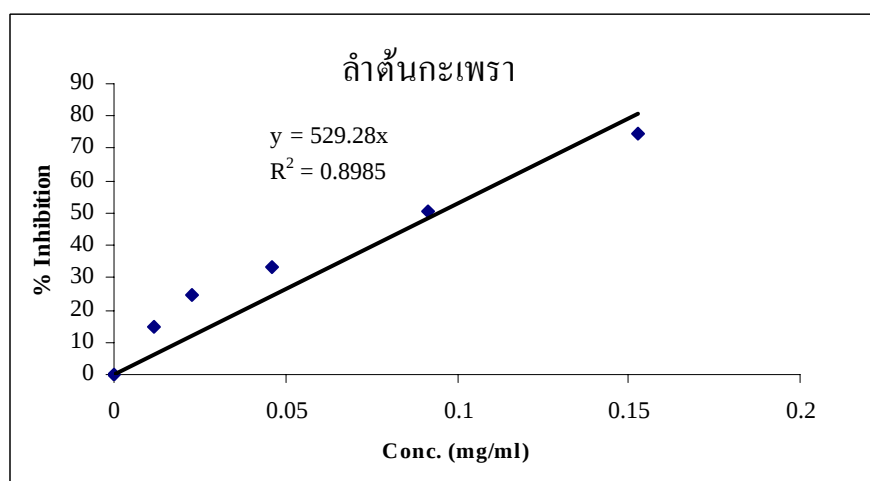
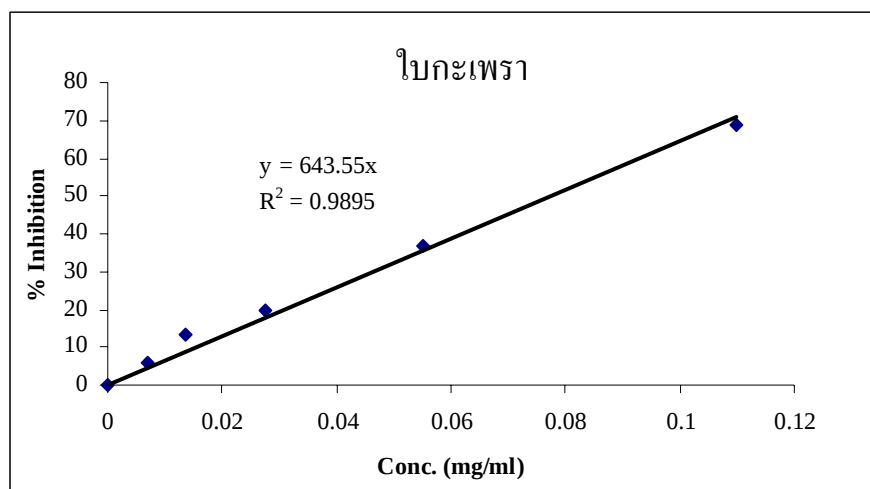


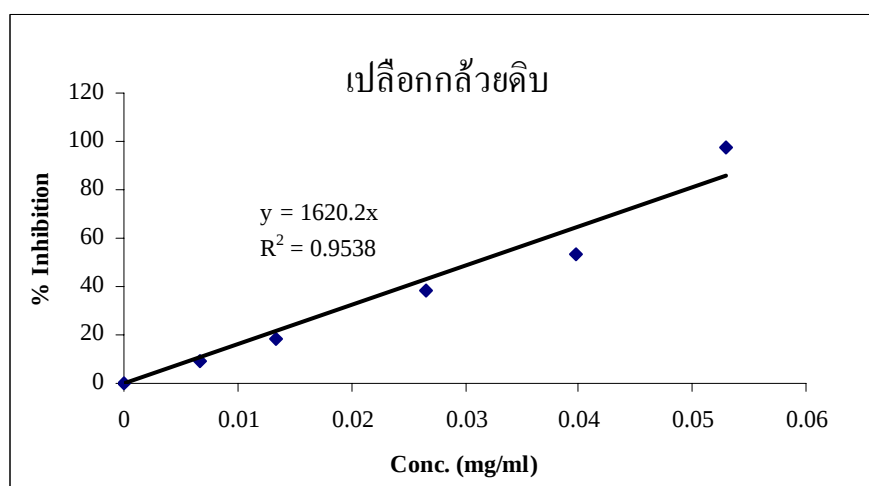
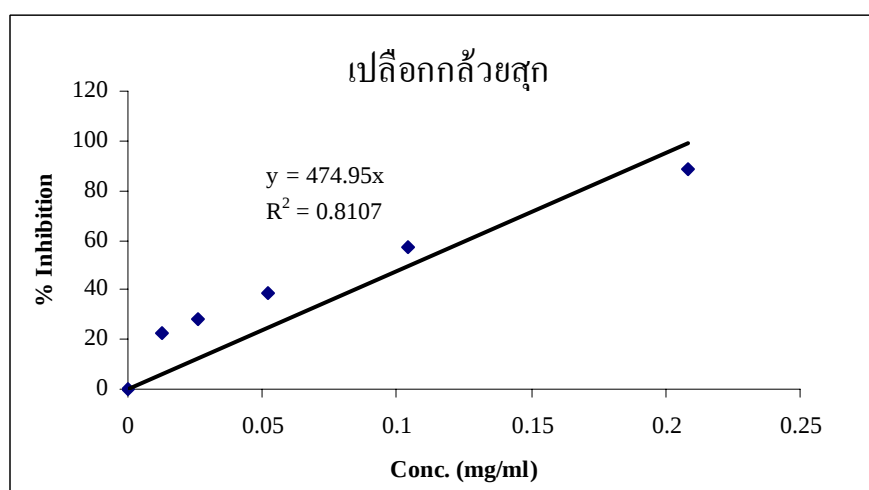
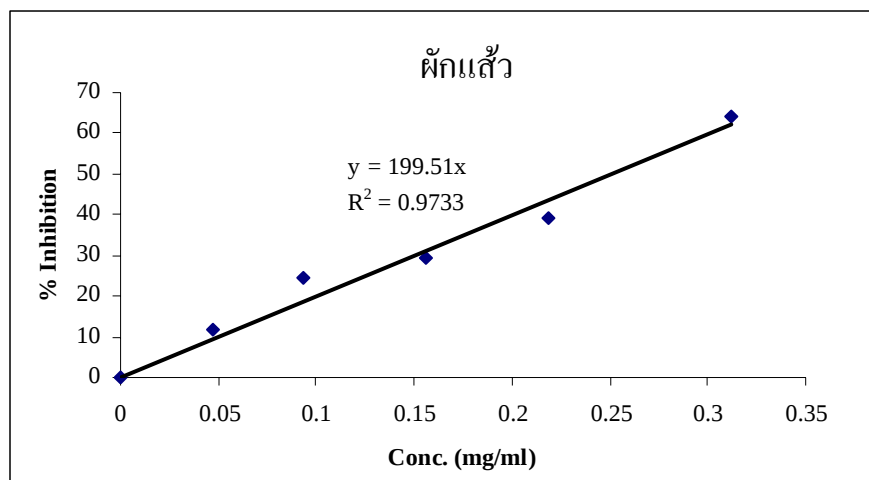


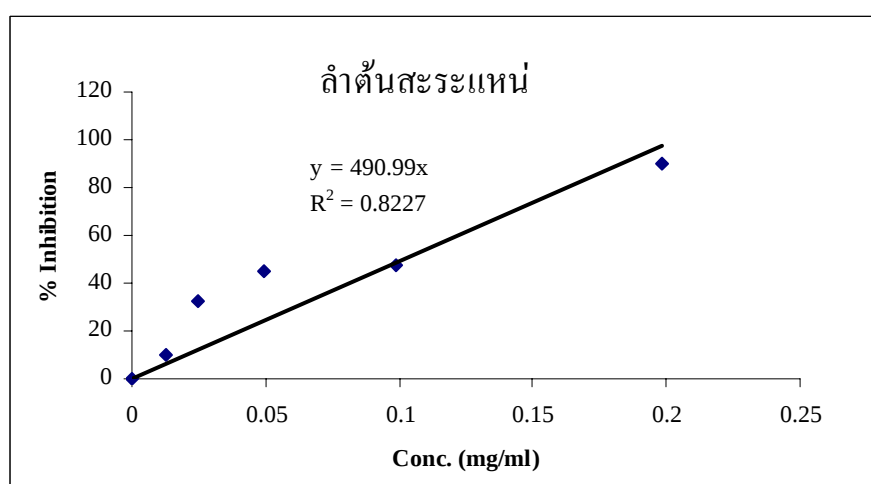
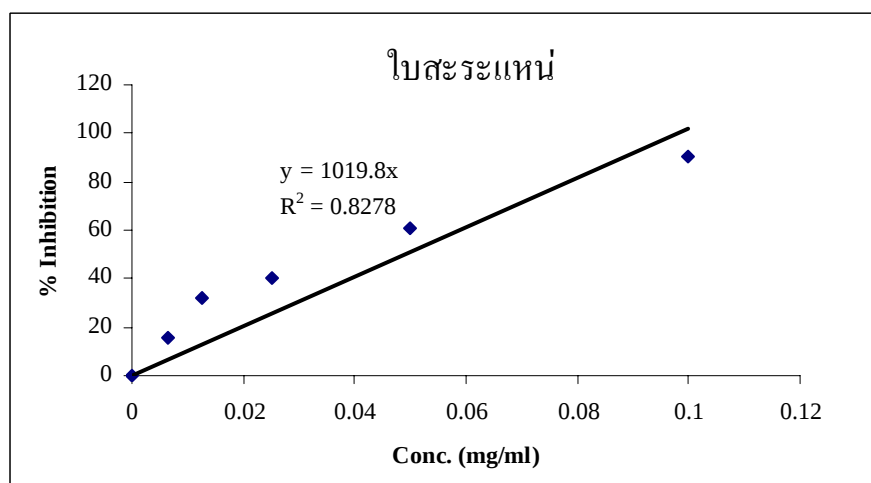
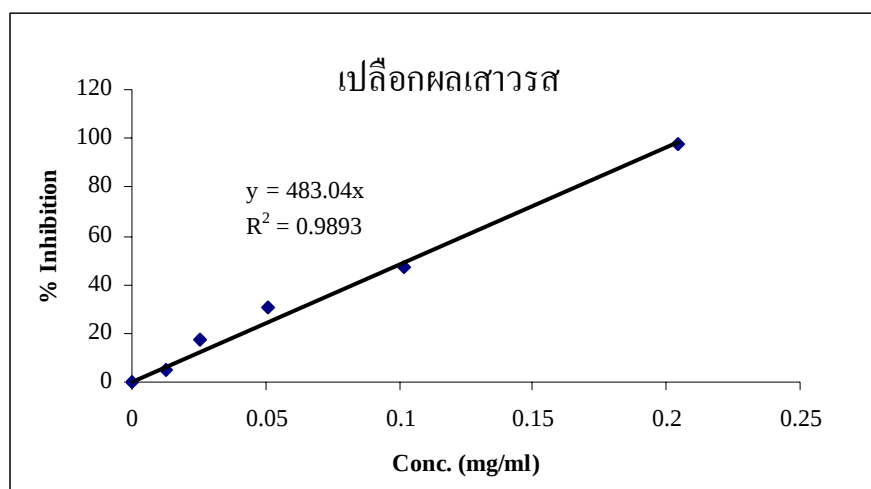


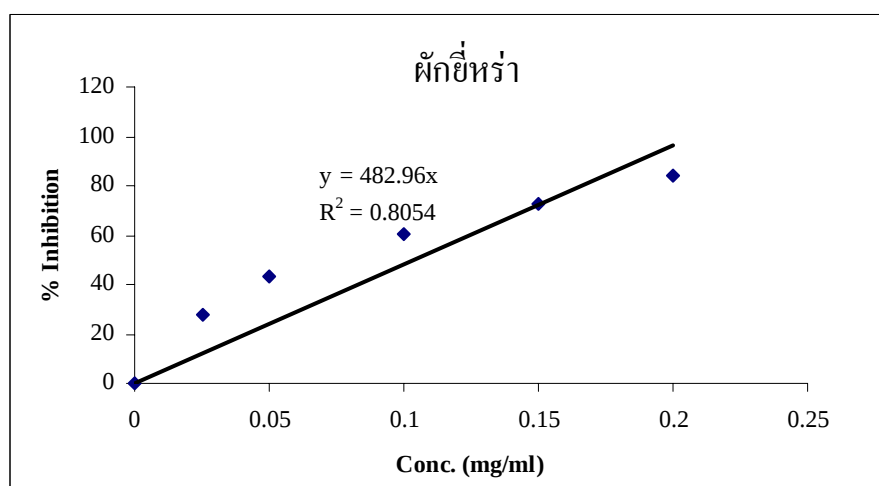
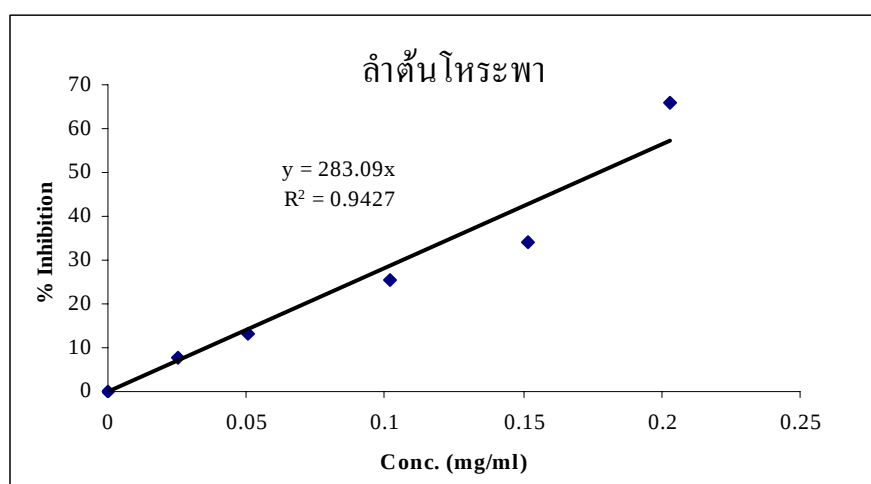
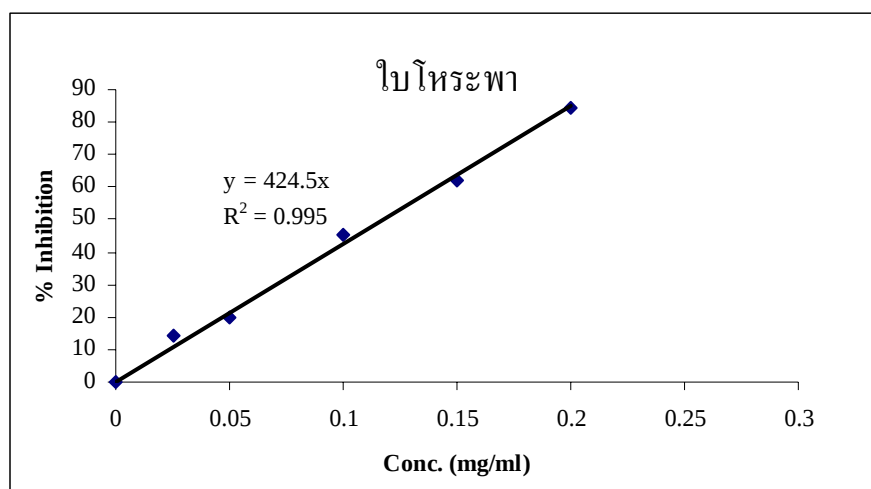


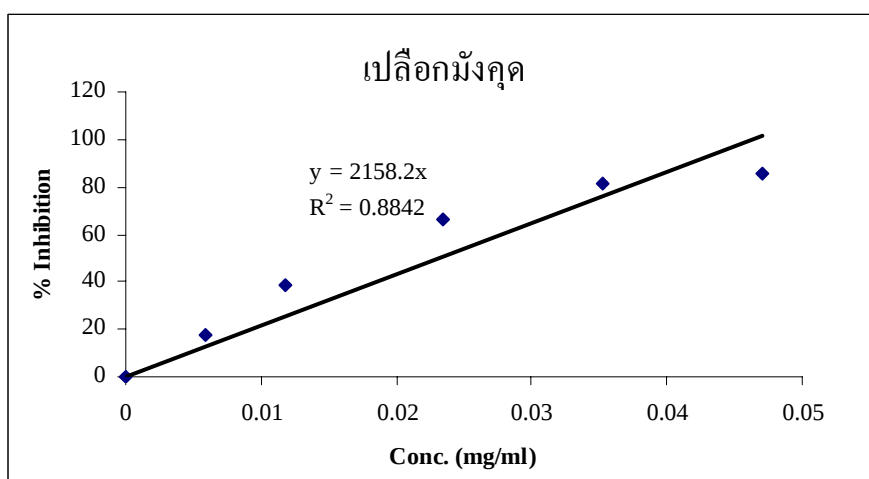
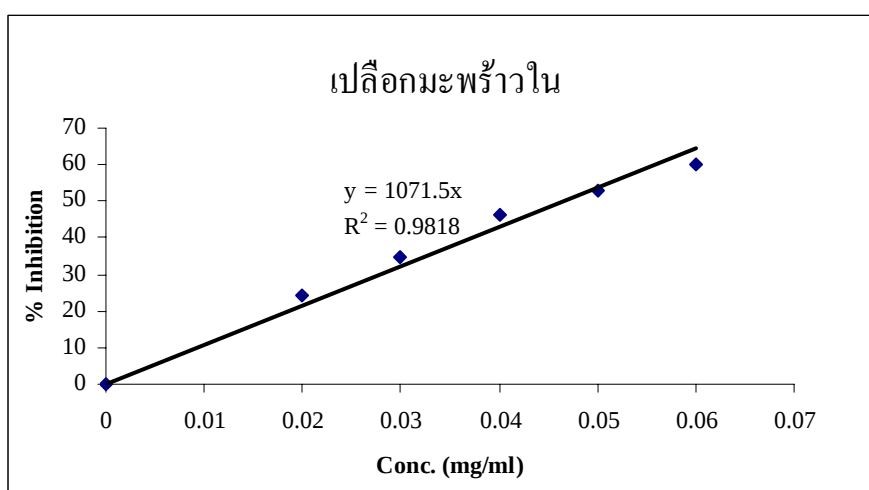
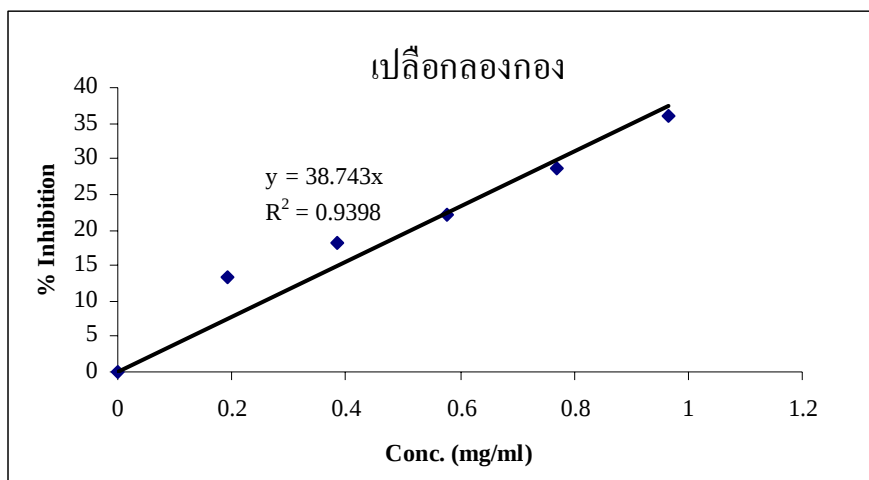


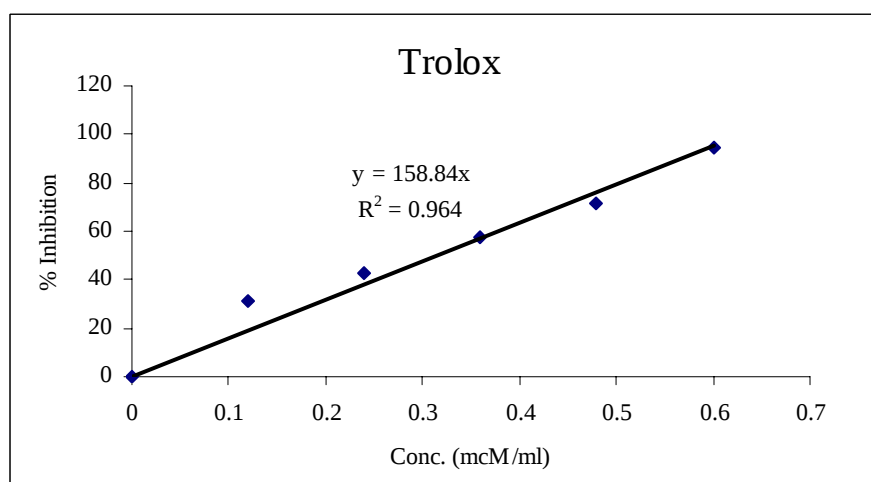
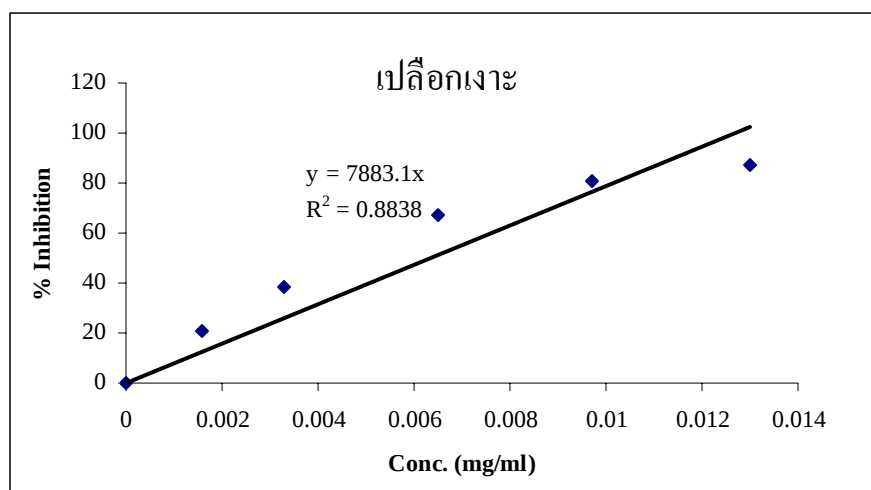








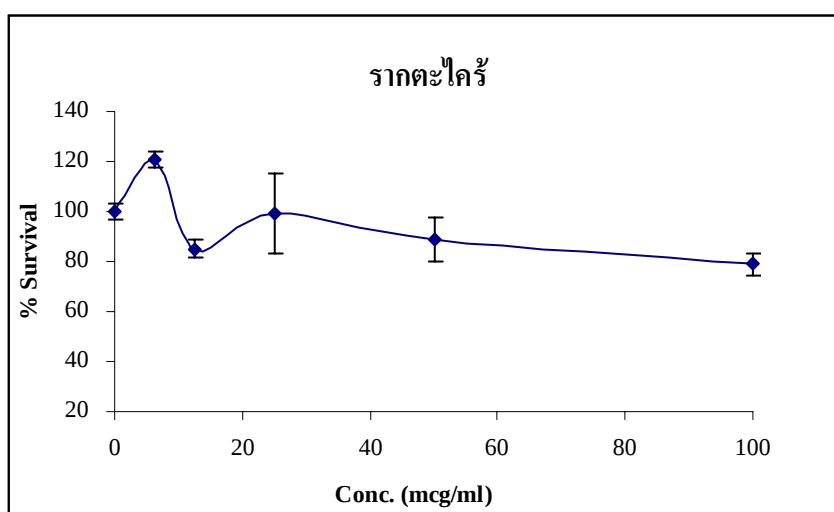
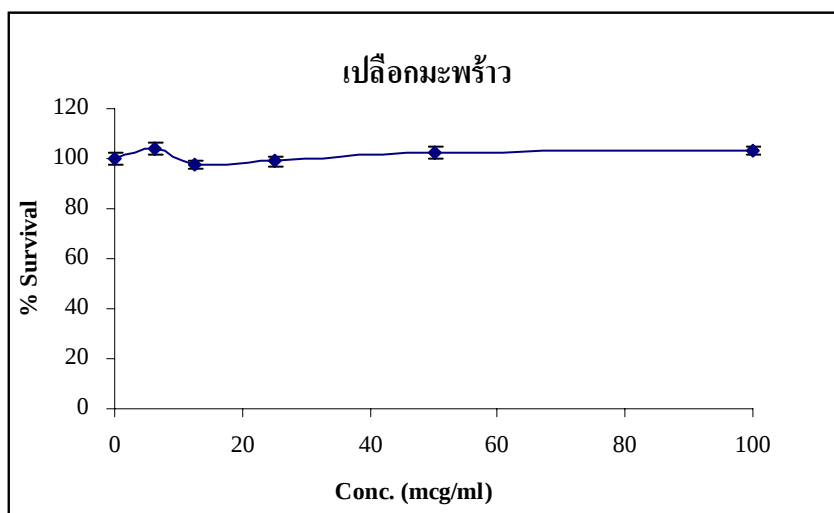
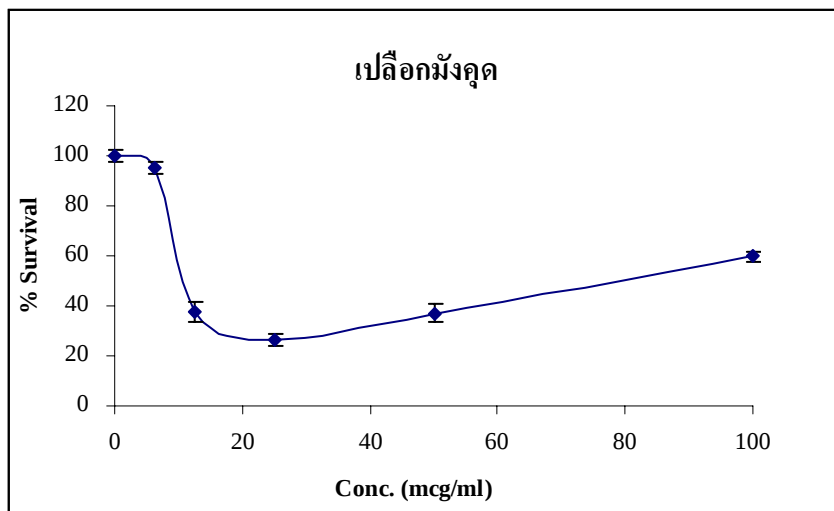


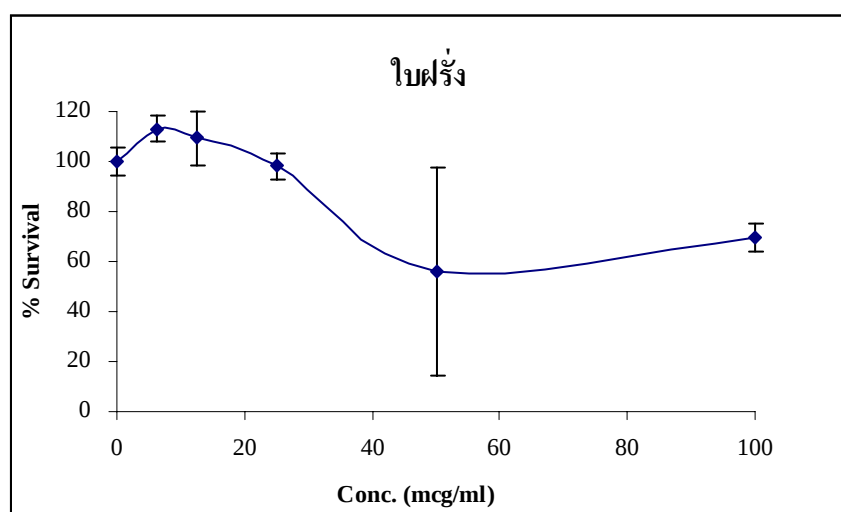
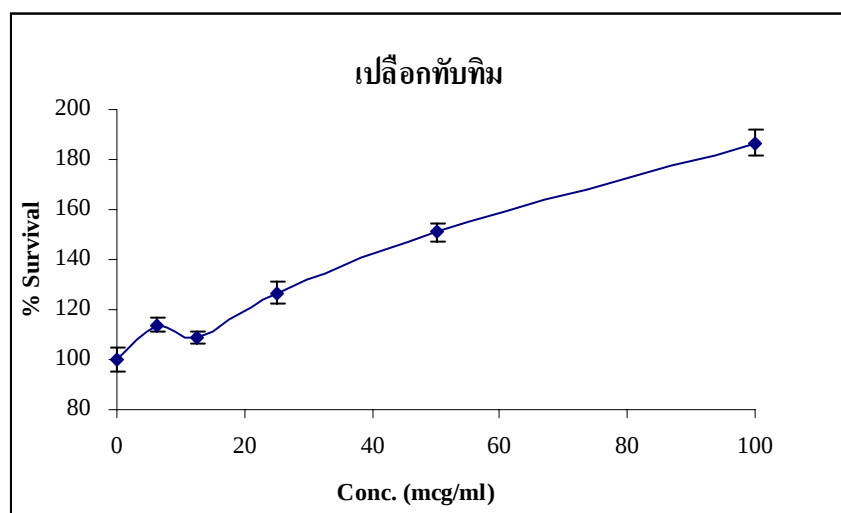
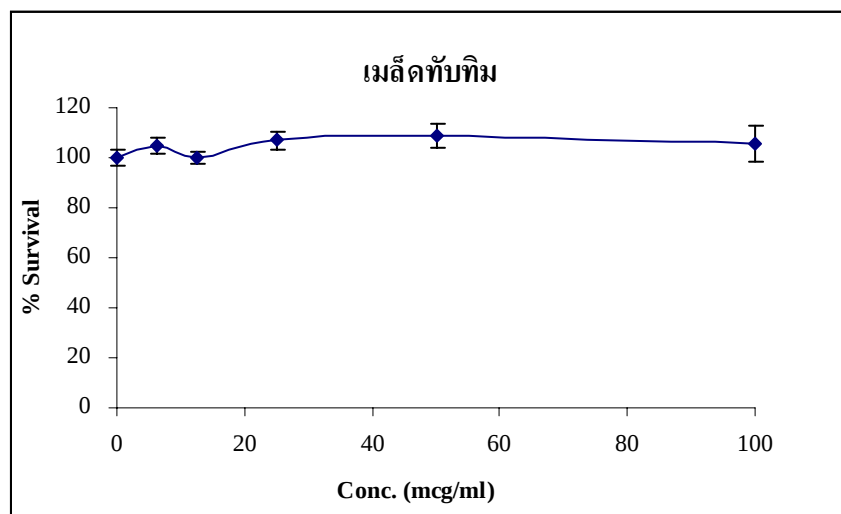


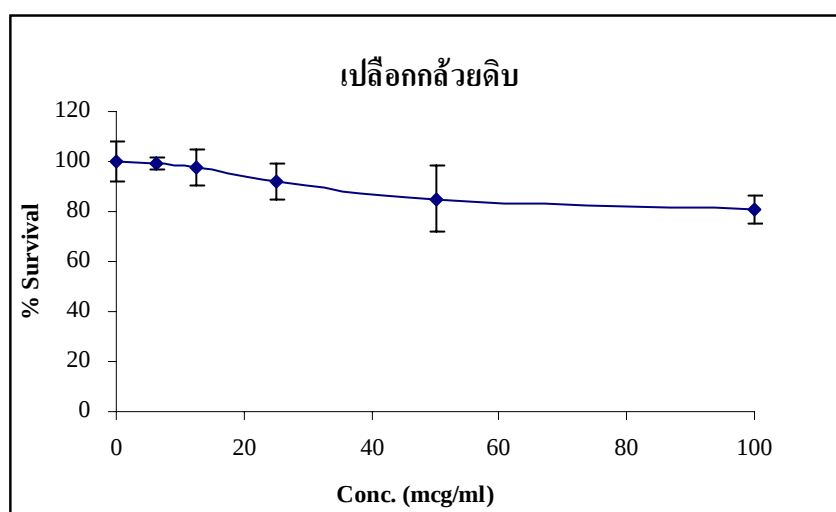
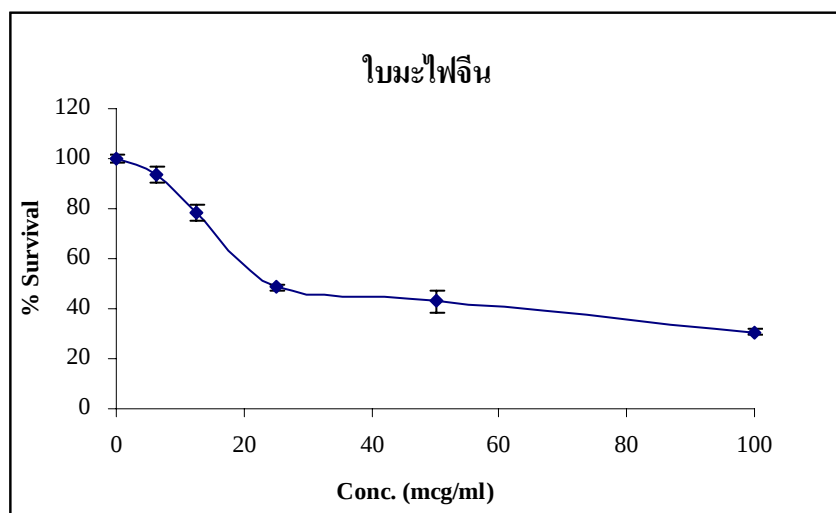
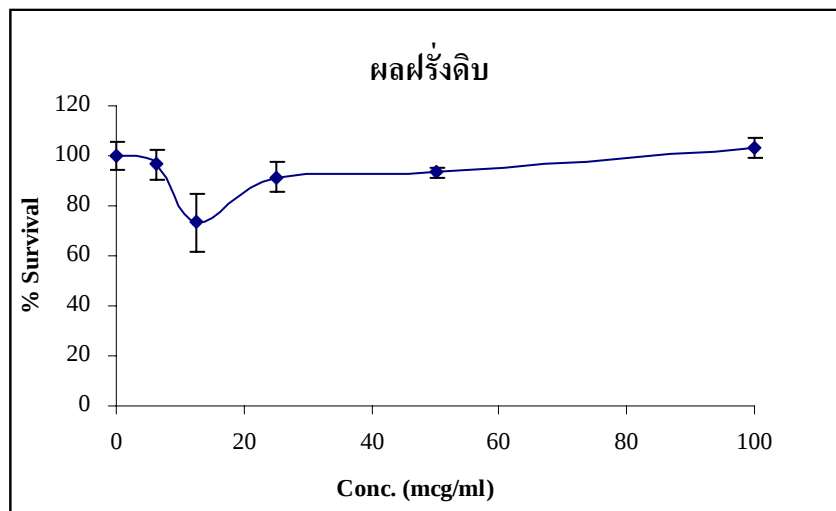
หมายเหตุ Trolox เป็น Positive Control

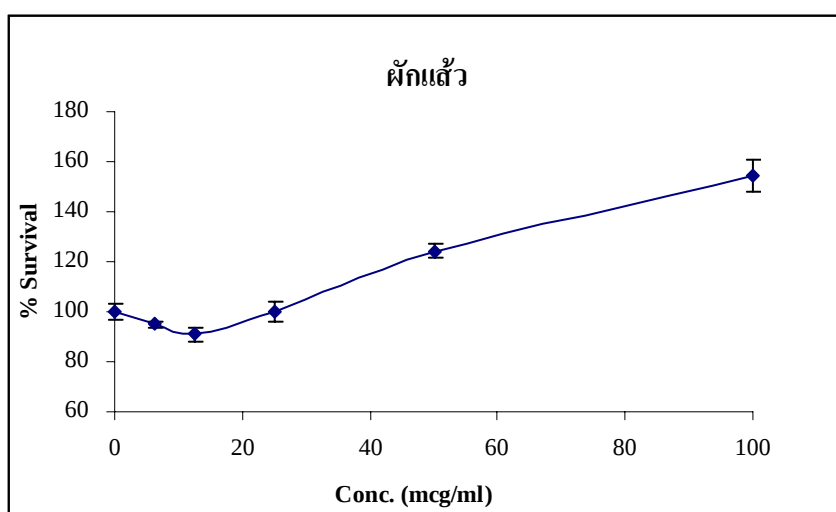
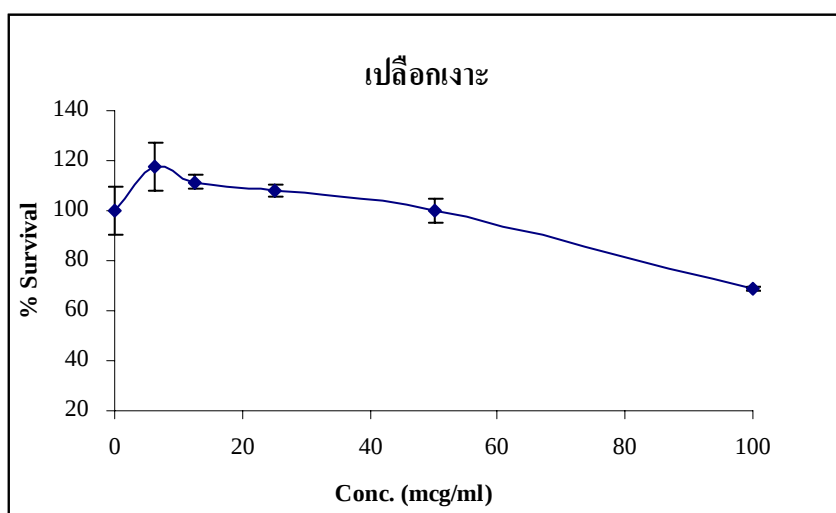
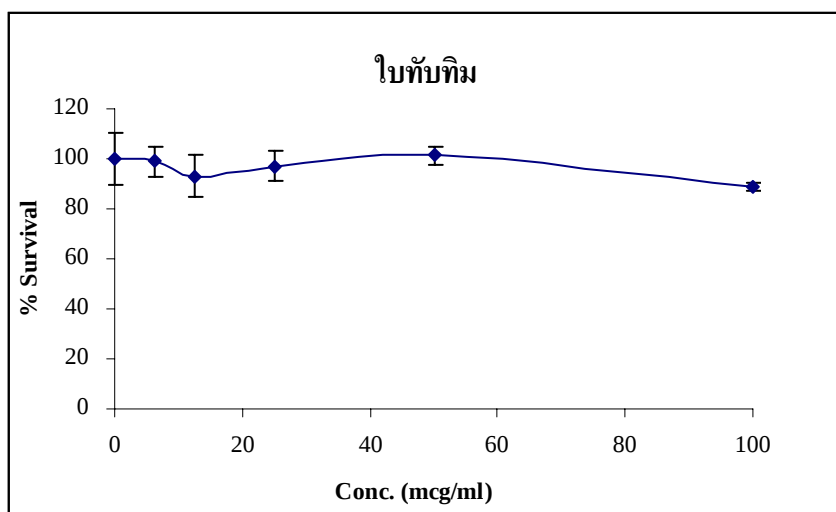
ภาคผนวก - ก

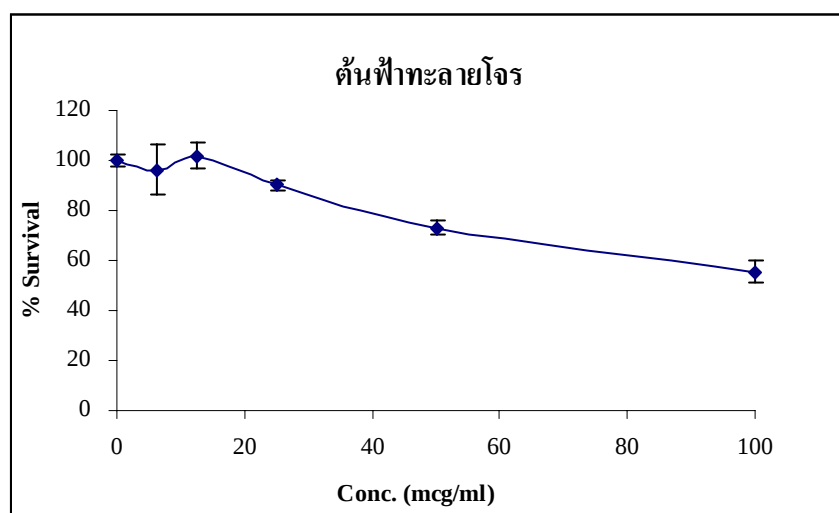
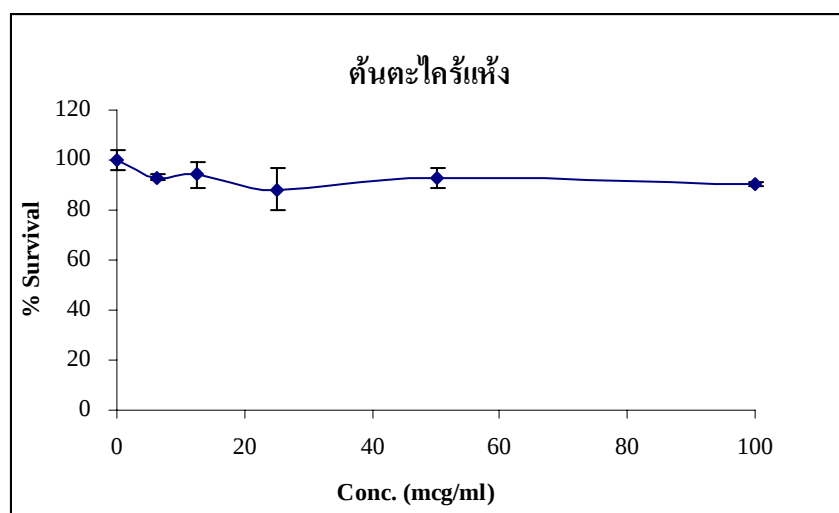
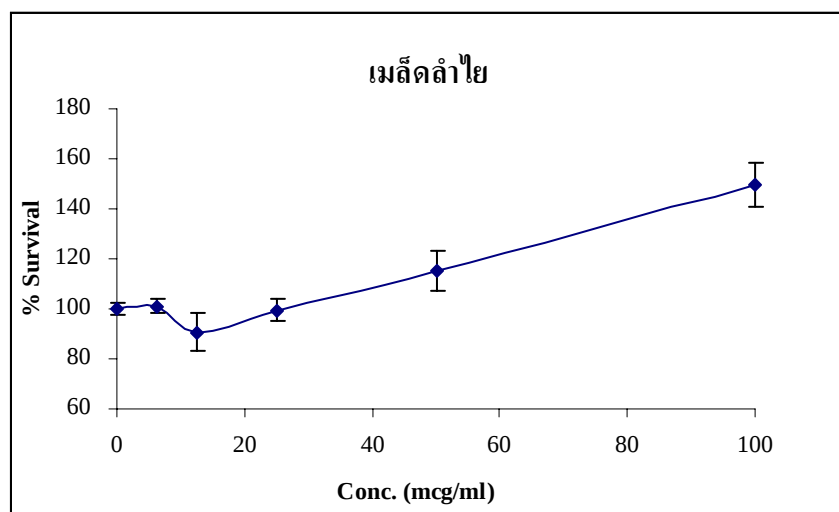
ผลการศึกษา Cytotoxicity ต่อ PBMC
ของสารสกัดทั้ง 43 ตัวอย่าง

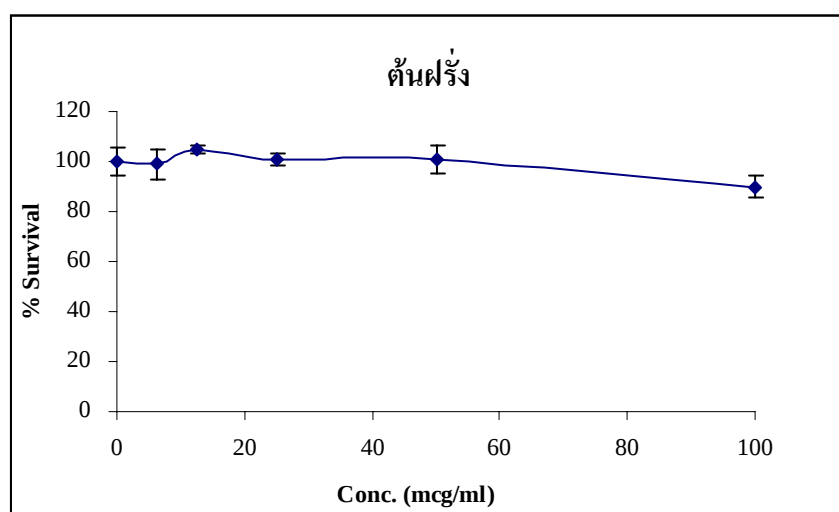
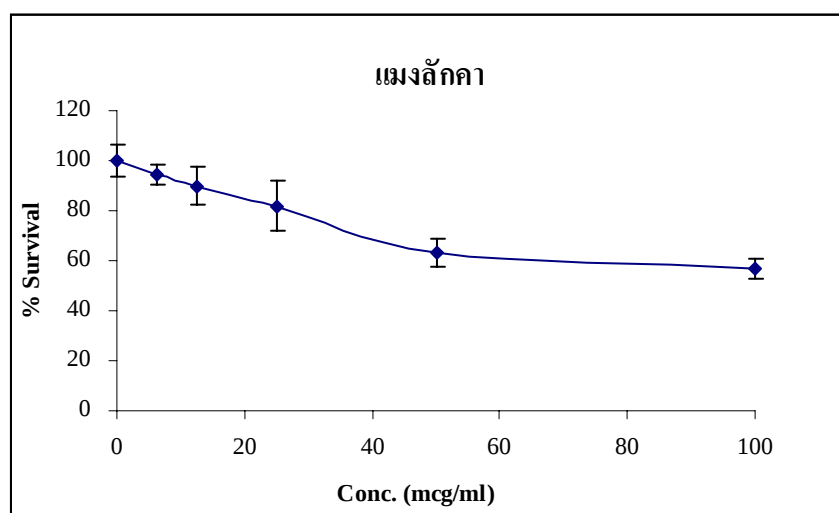
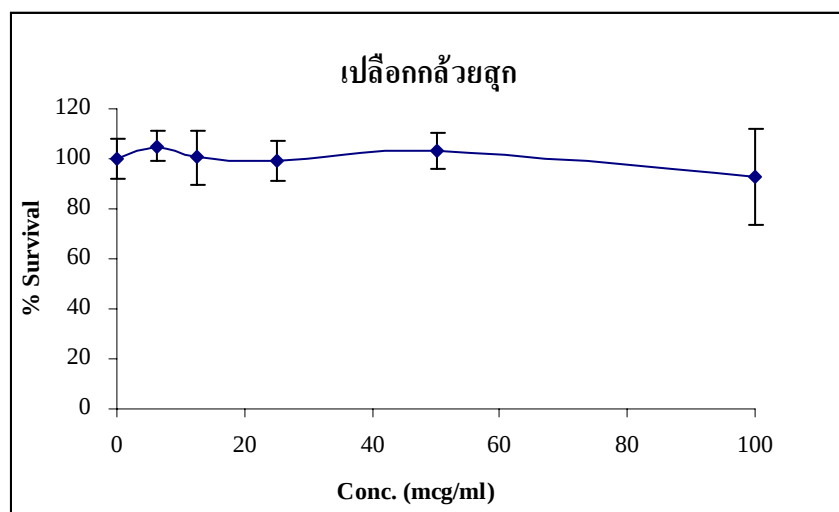


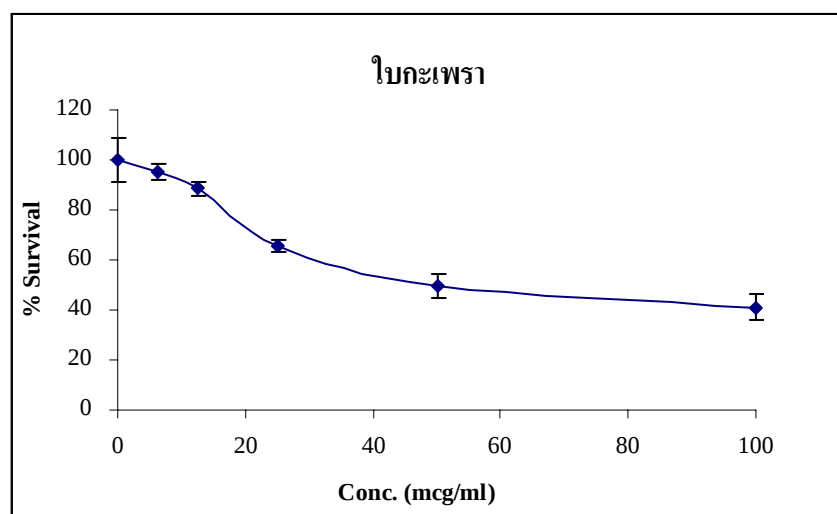
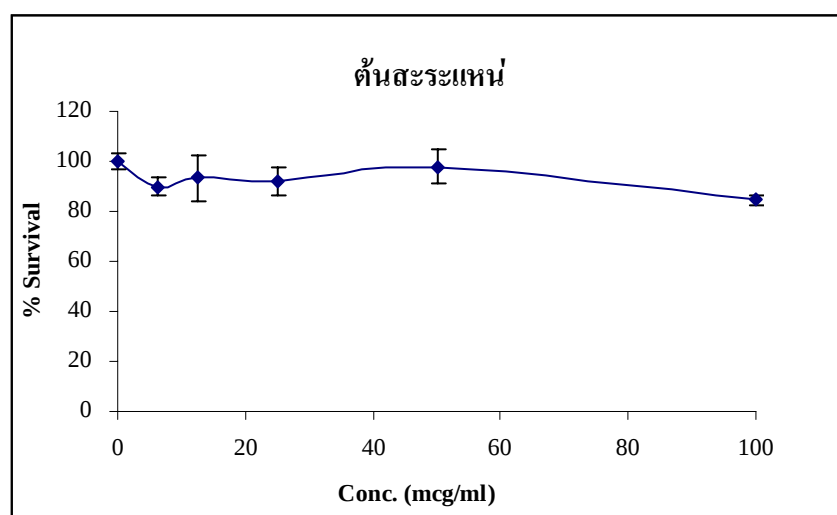
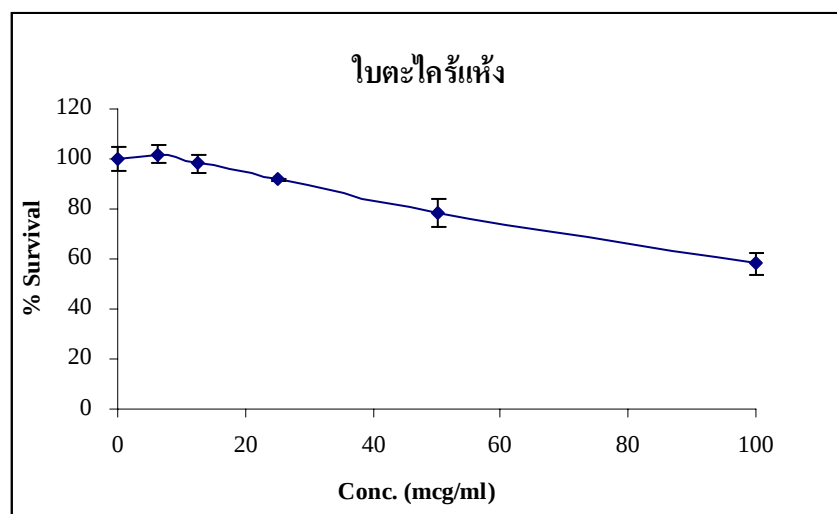


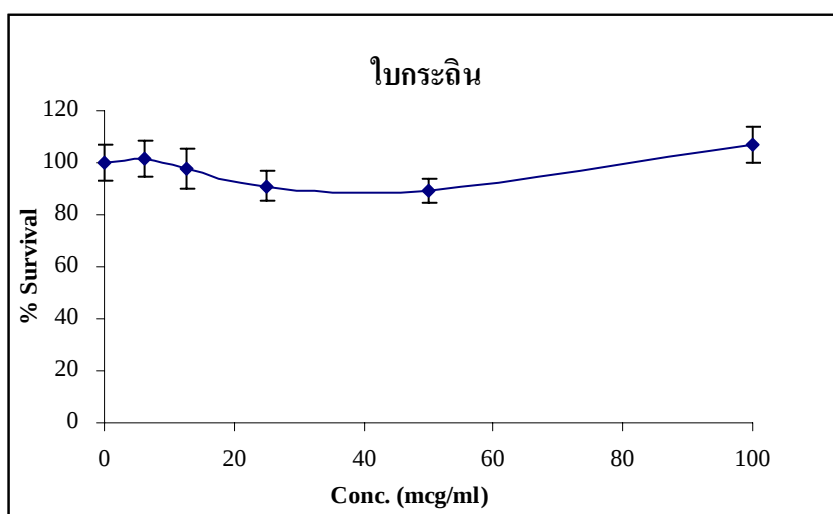
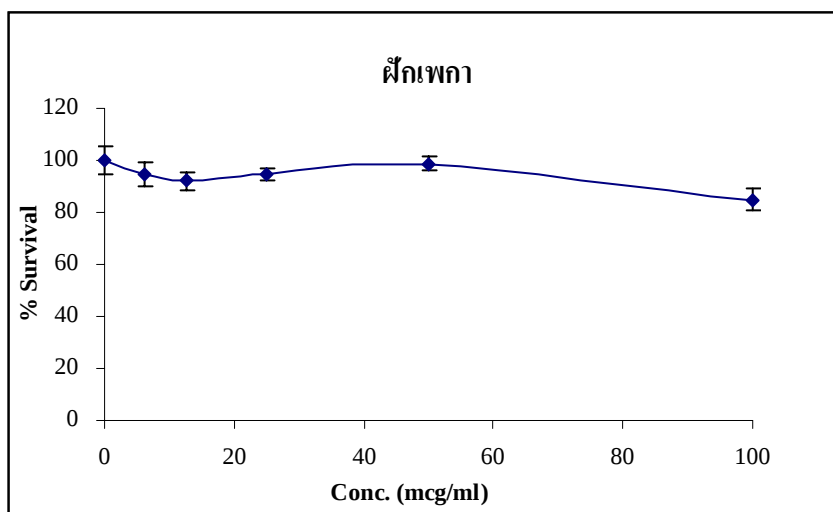
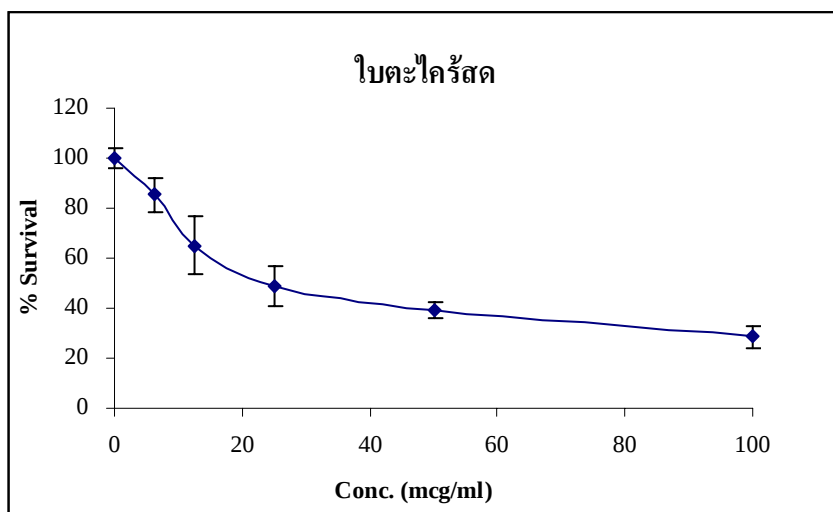


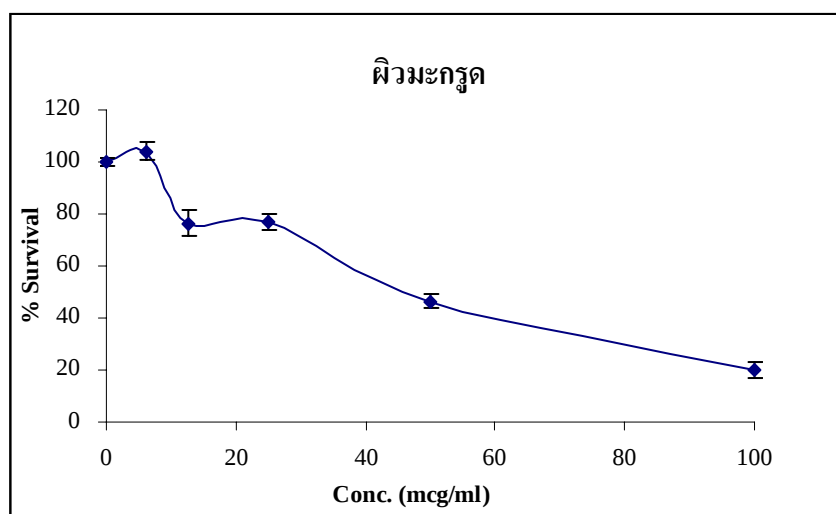
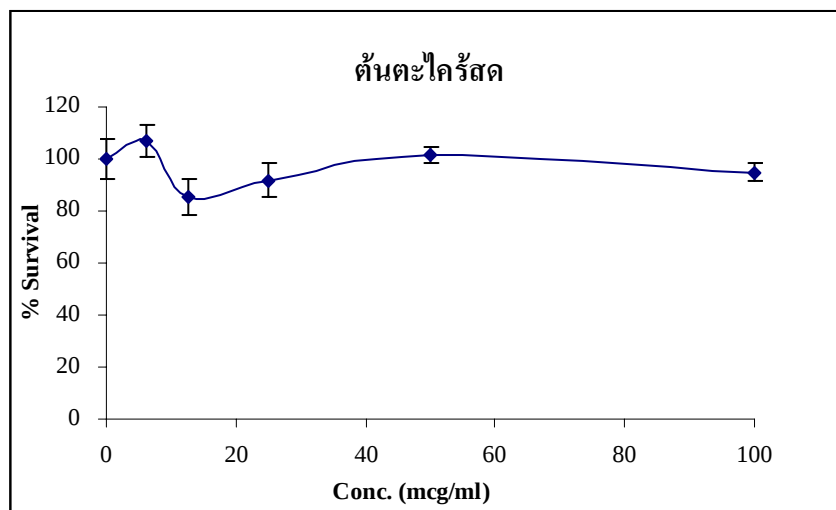
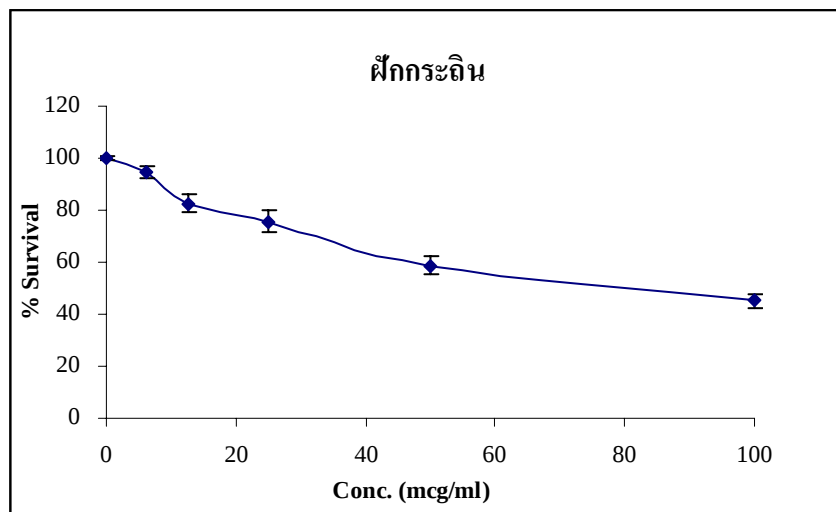


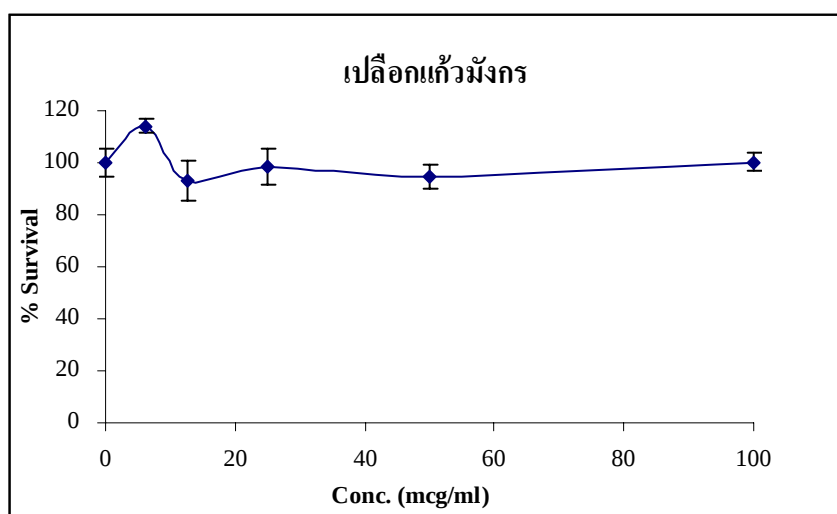
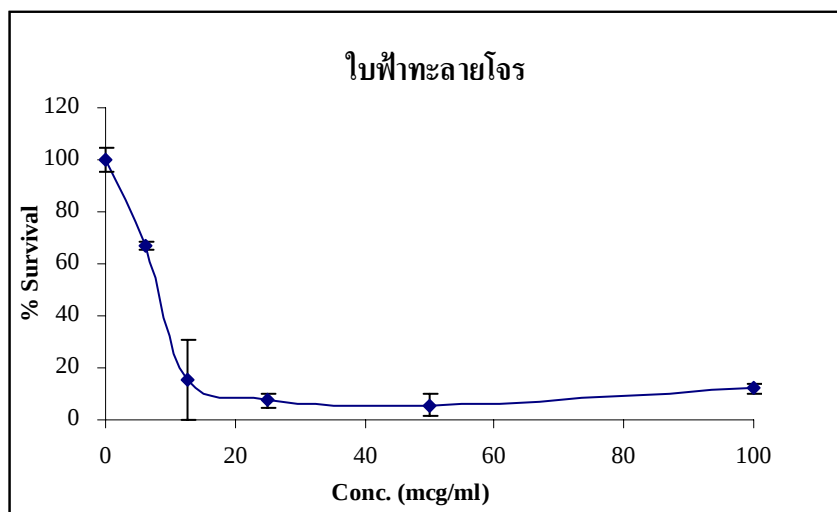
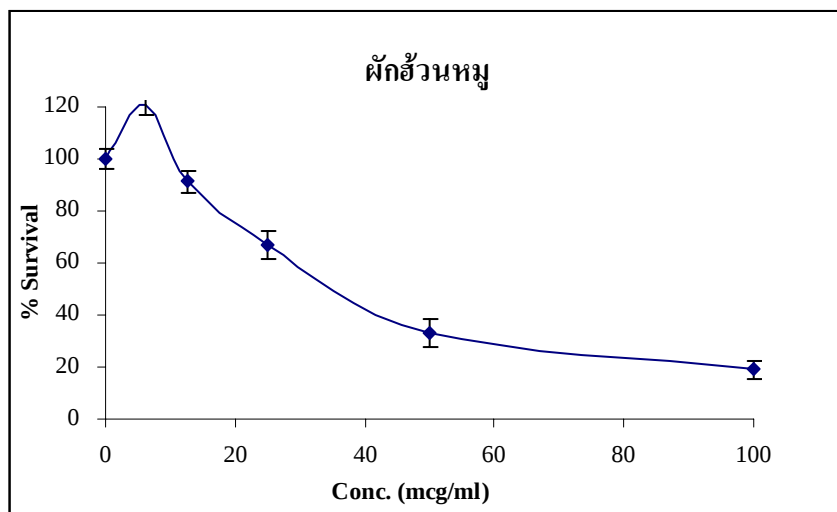


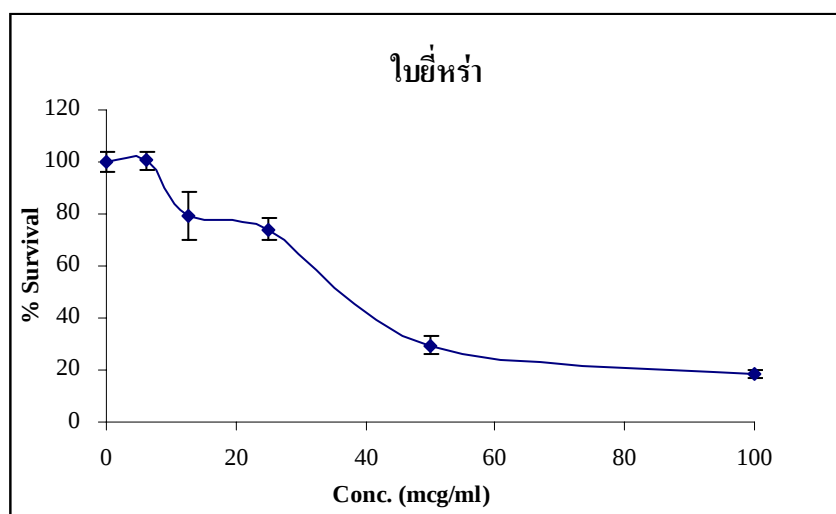
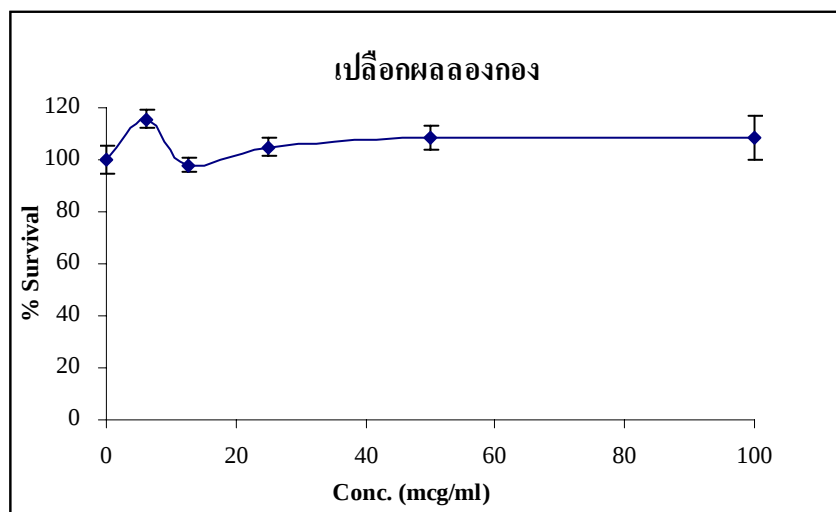
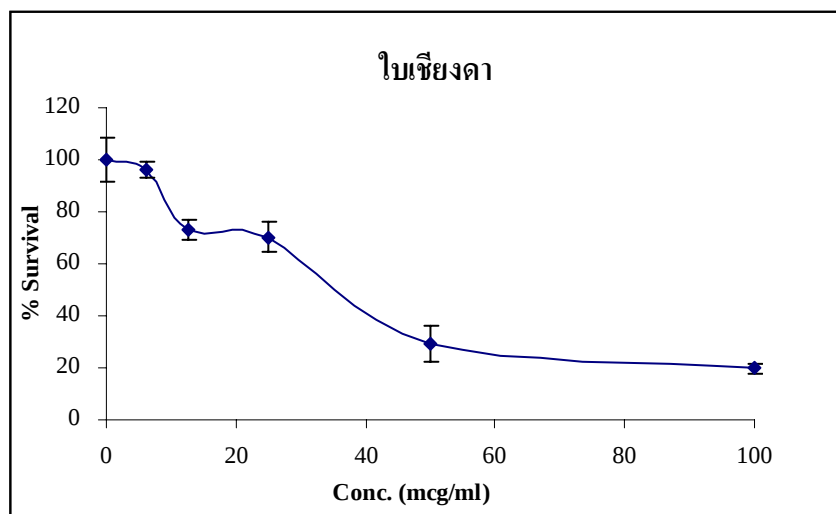


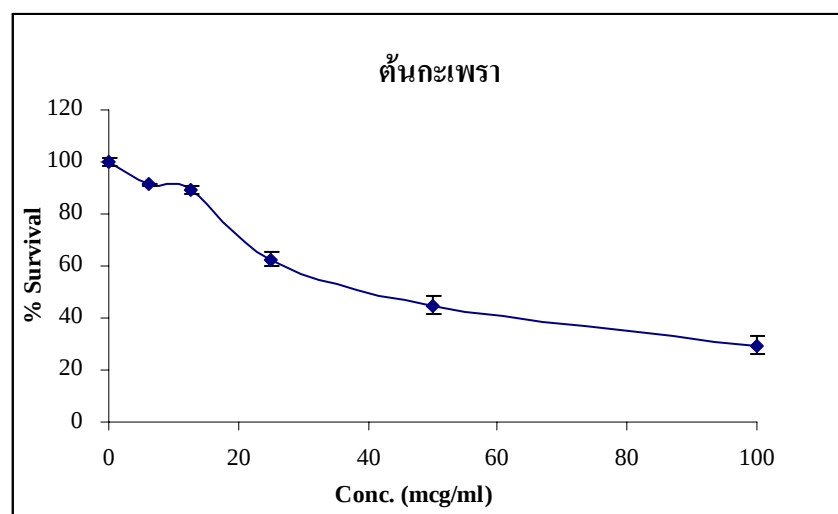
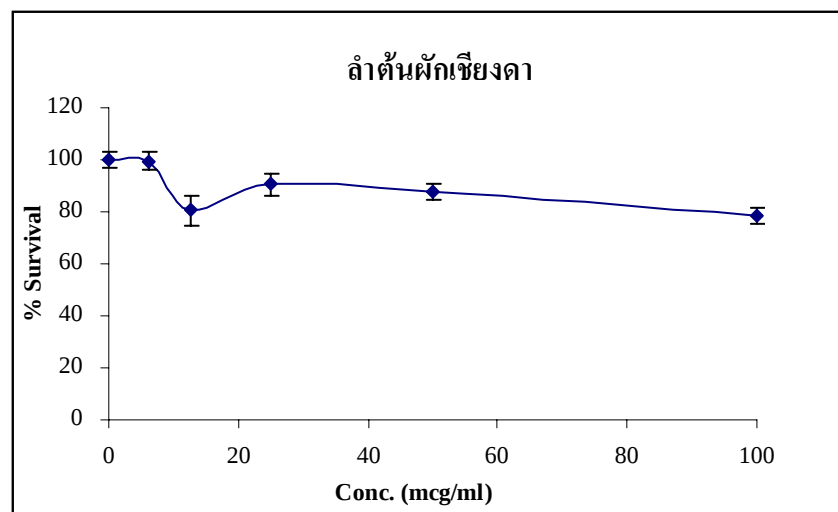
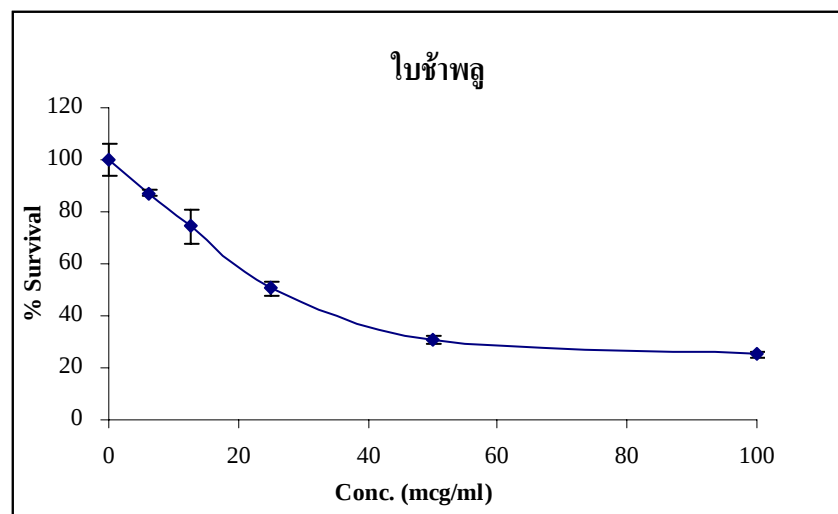


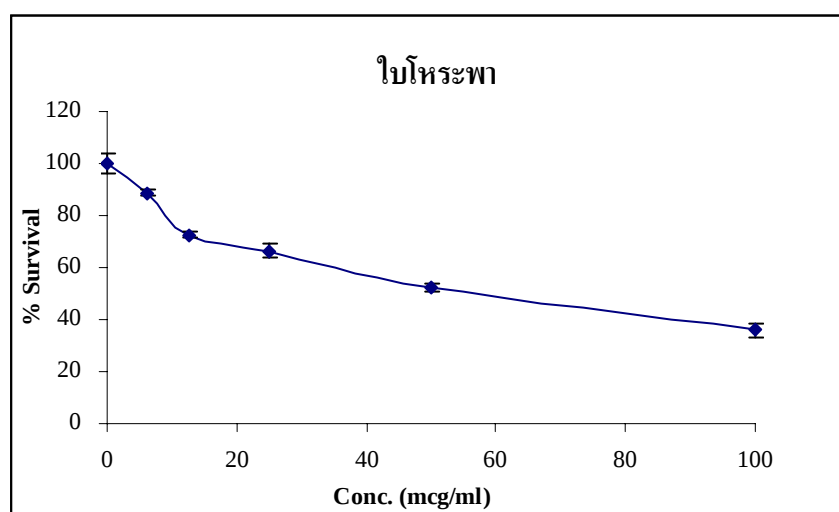
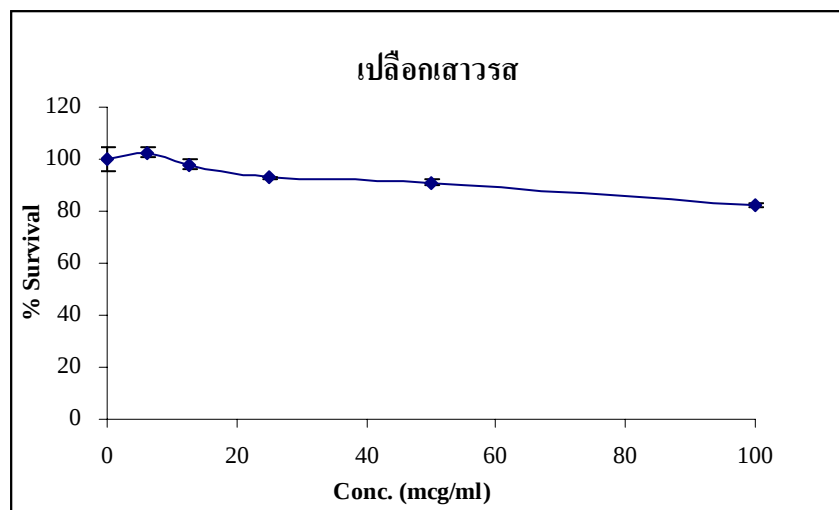
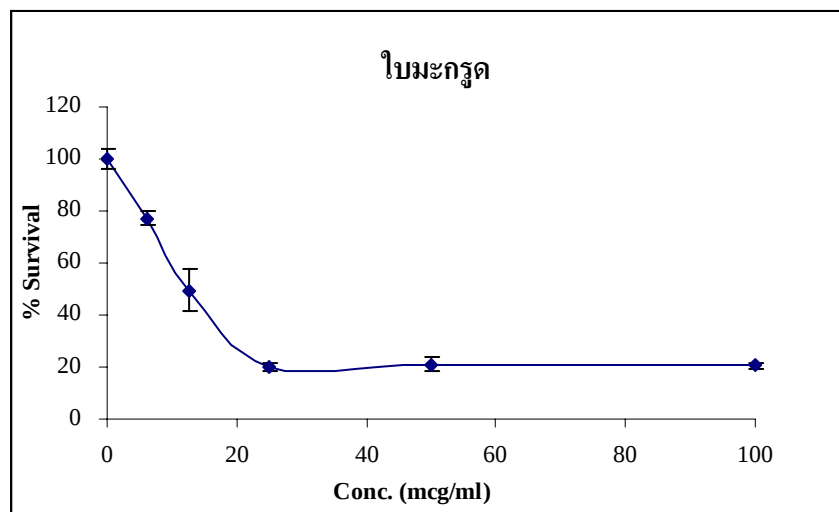


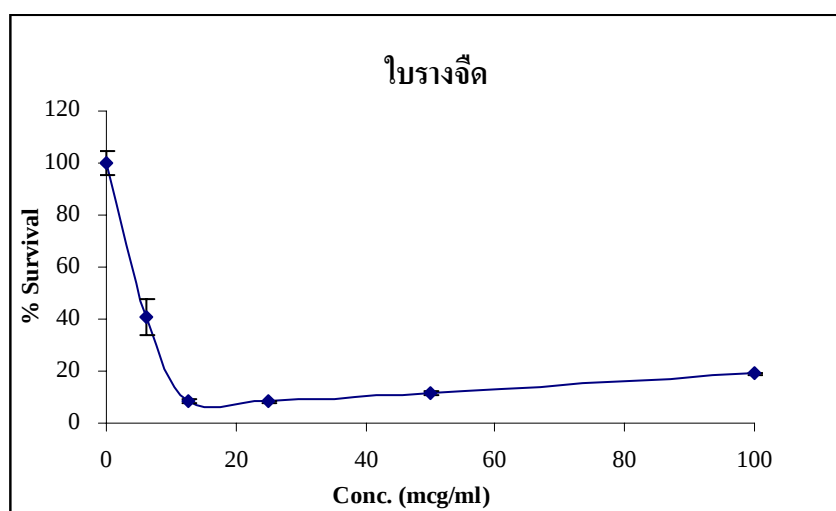
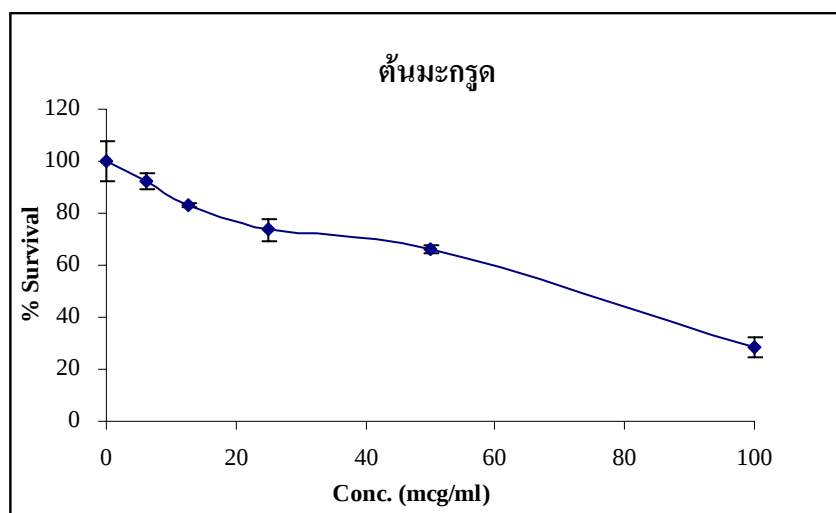


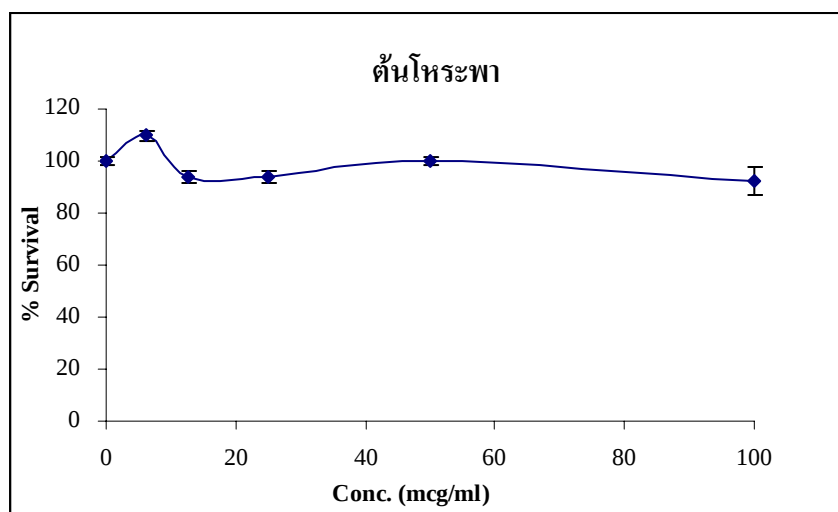
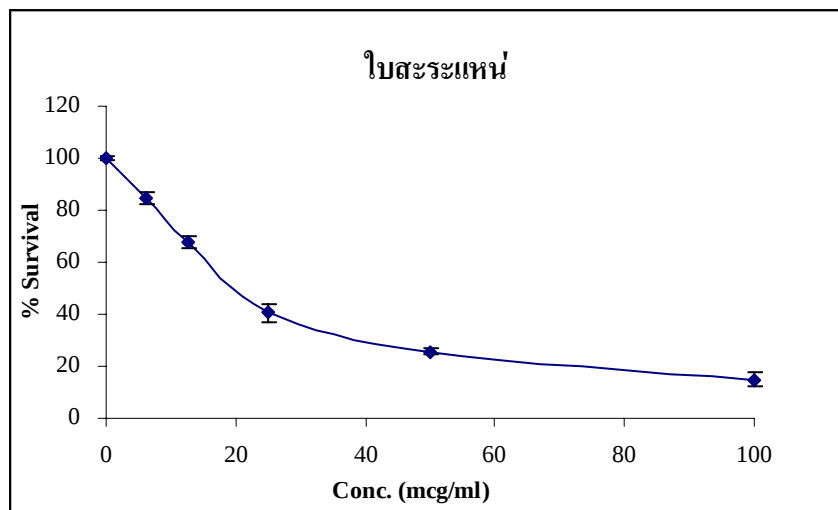






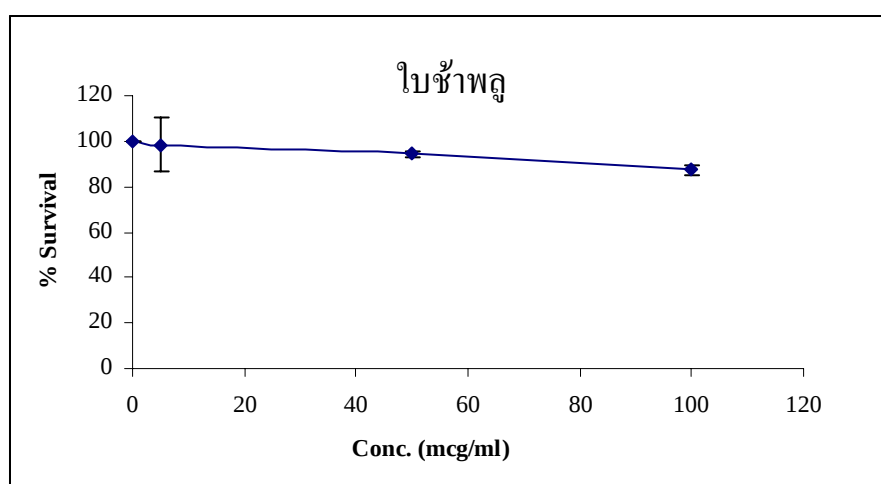
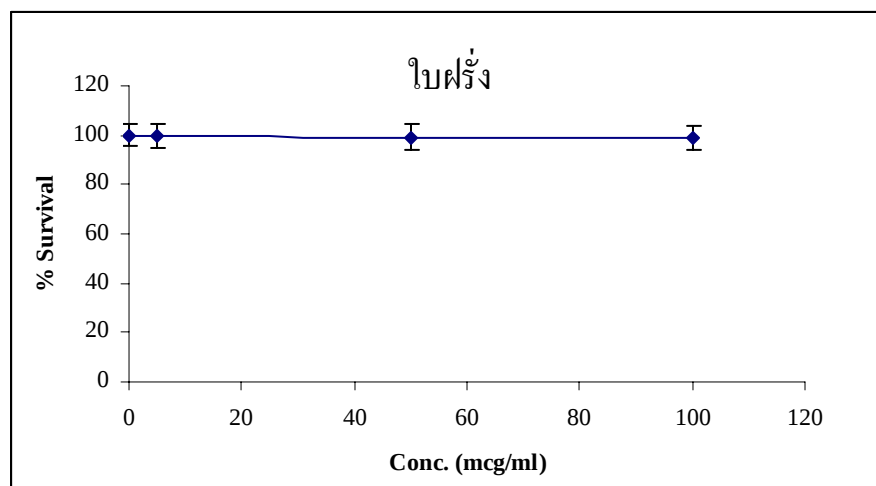
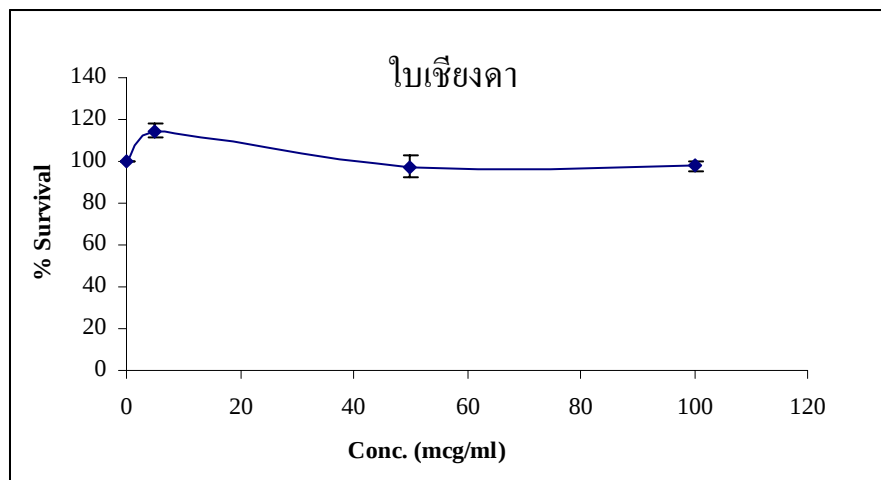


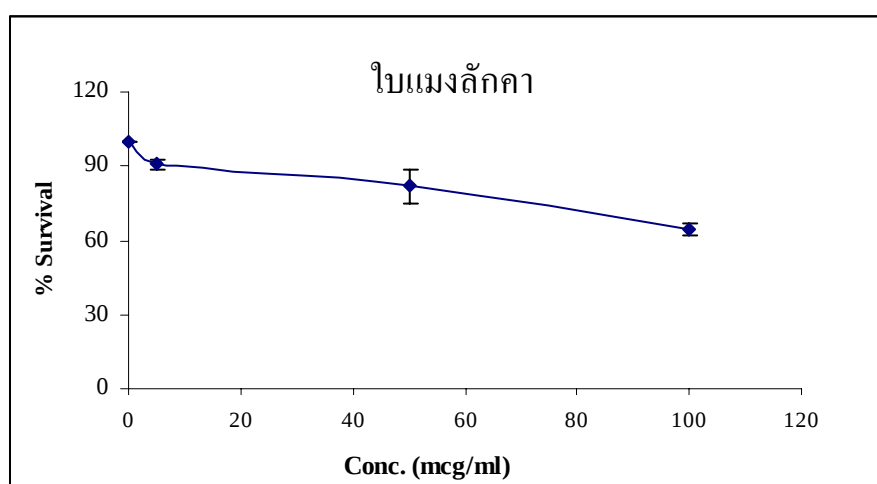
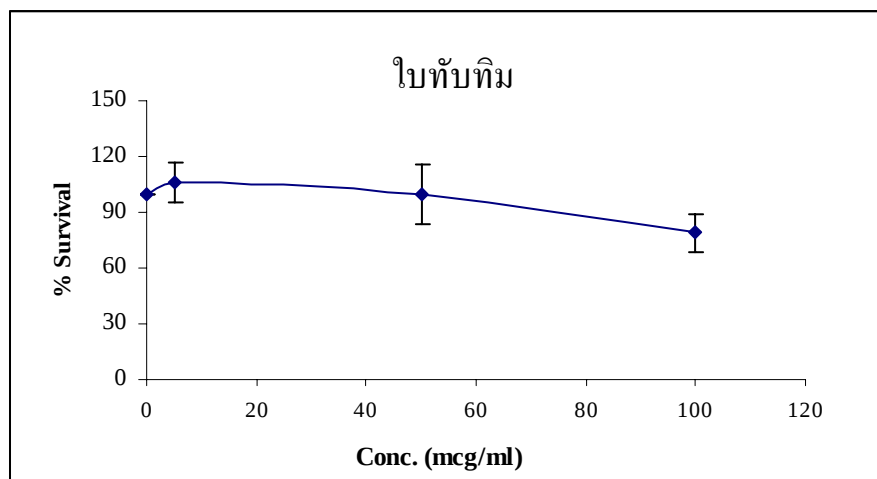
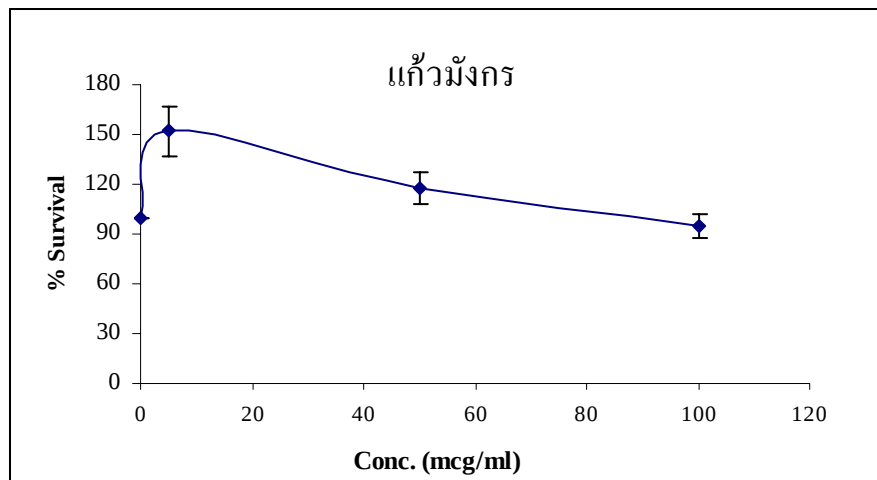


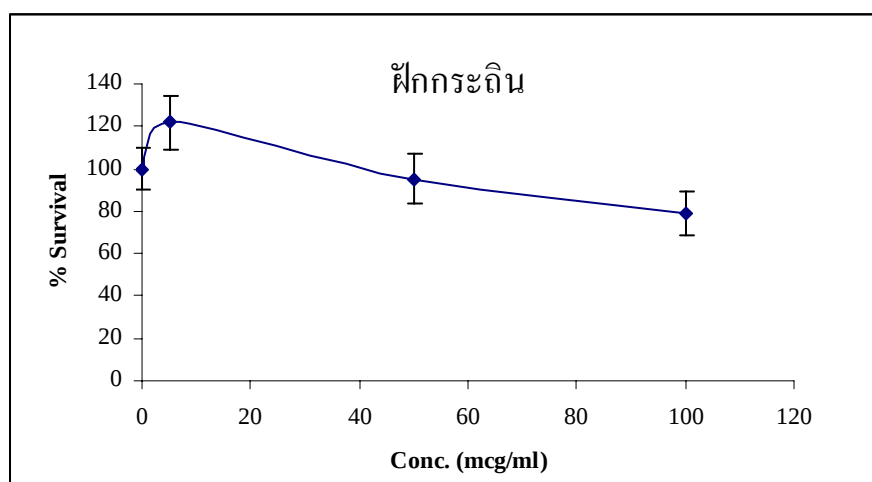
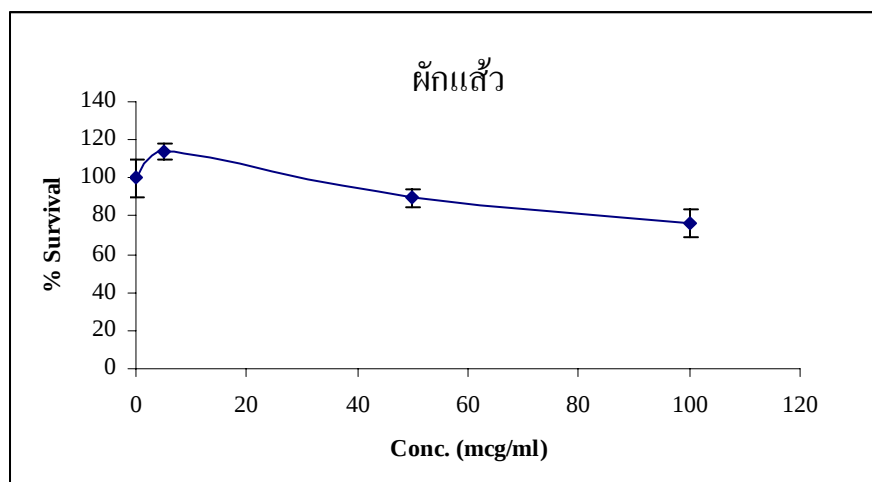
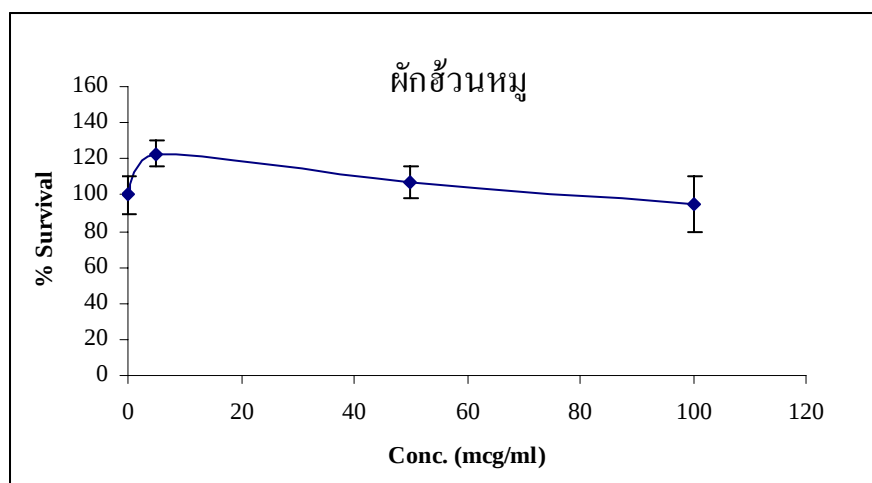


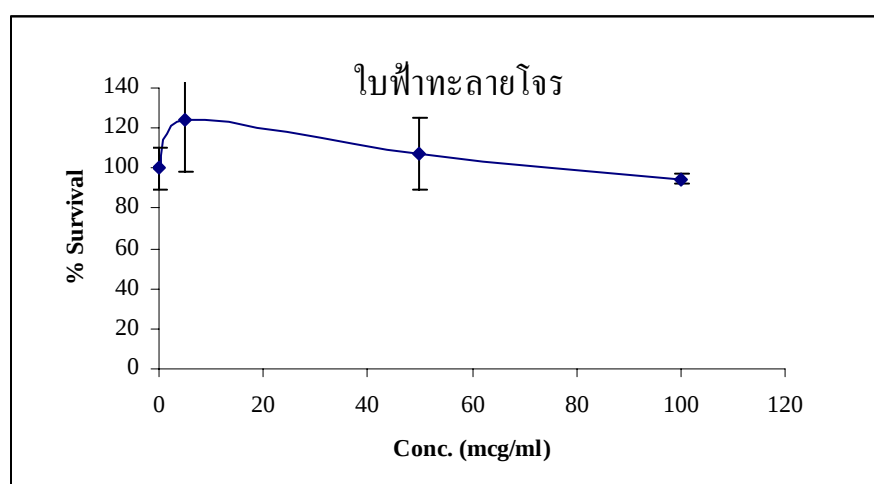
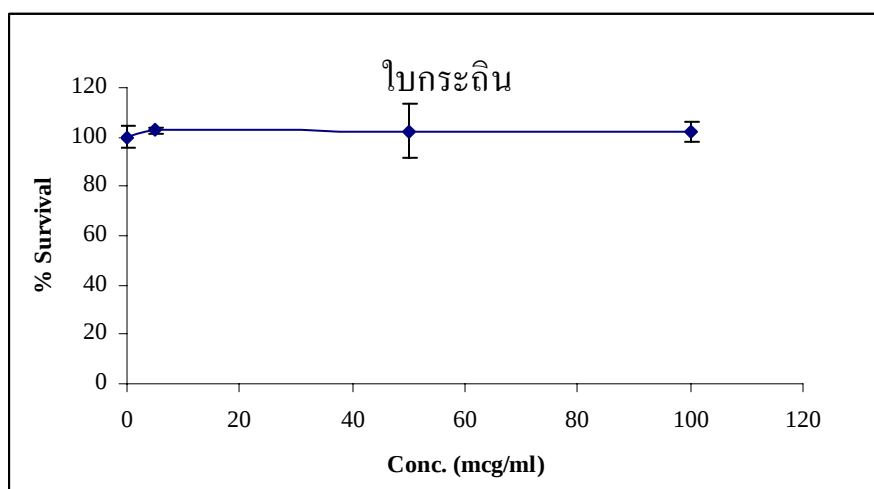
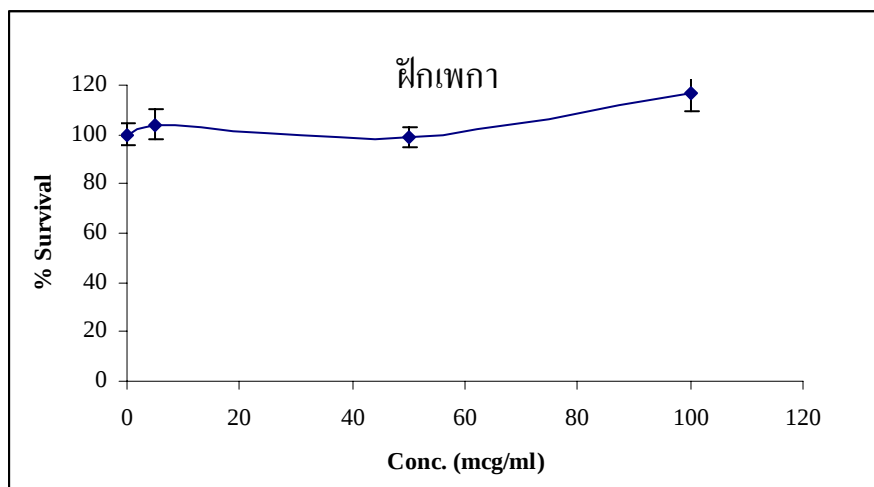
ภาคผนวก - ง

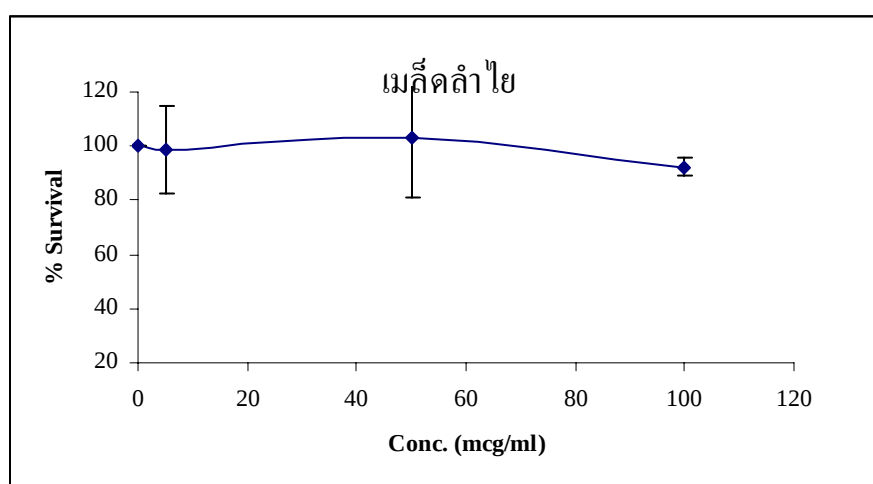
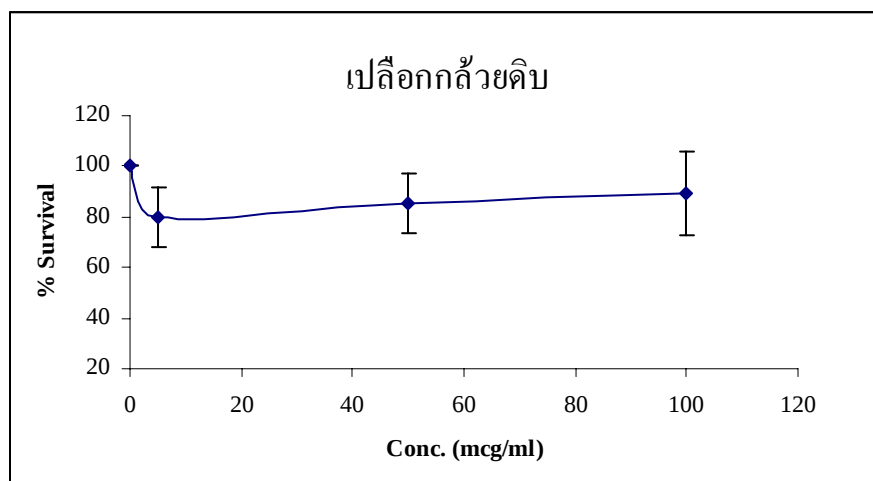
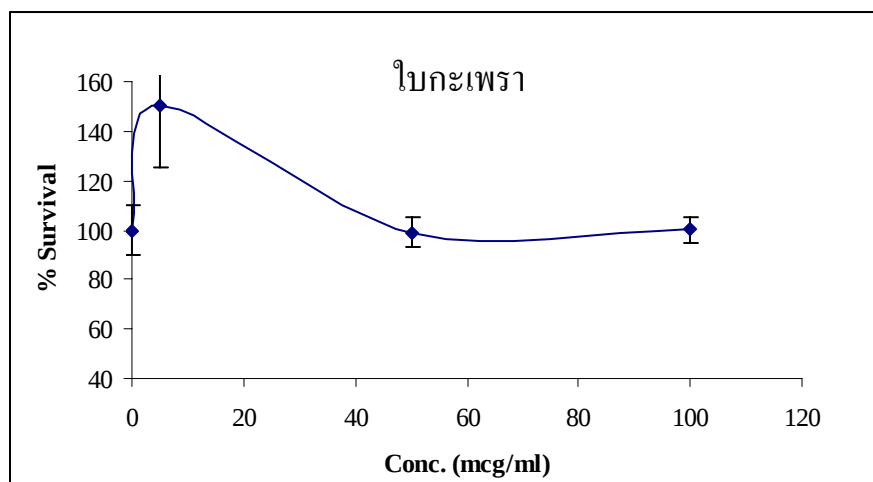
ผลการศึกษา Cytotoxicity ต่อ Caco-2 ของสารสกัดทั้ง 43 ตัวอย่าง

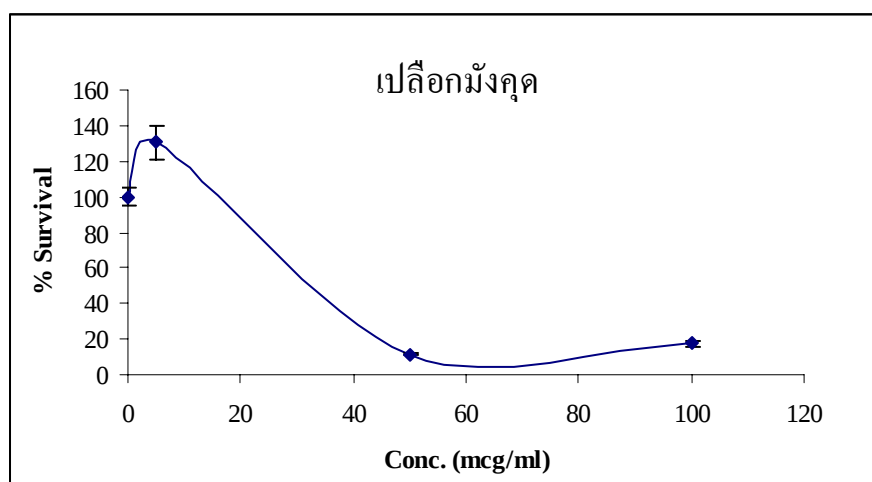
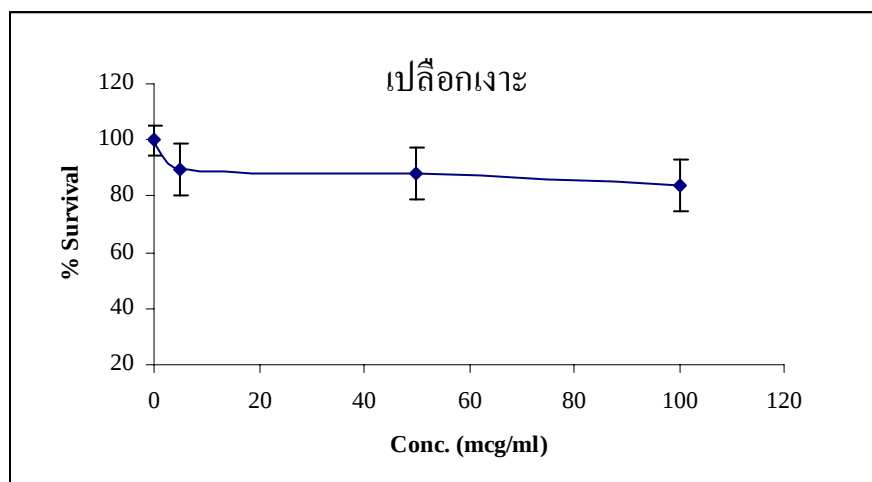
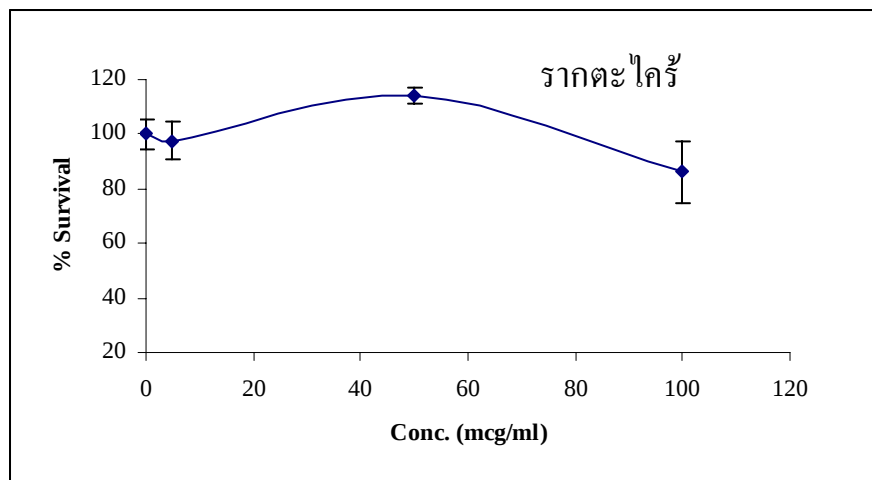


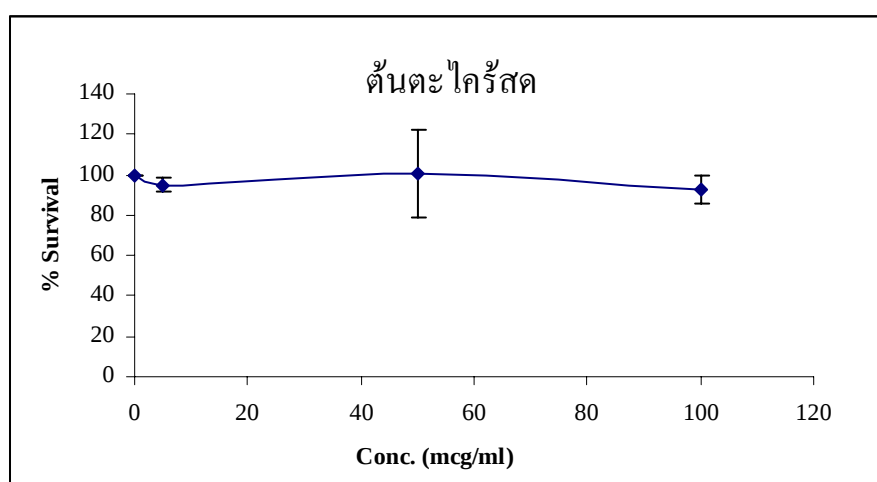
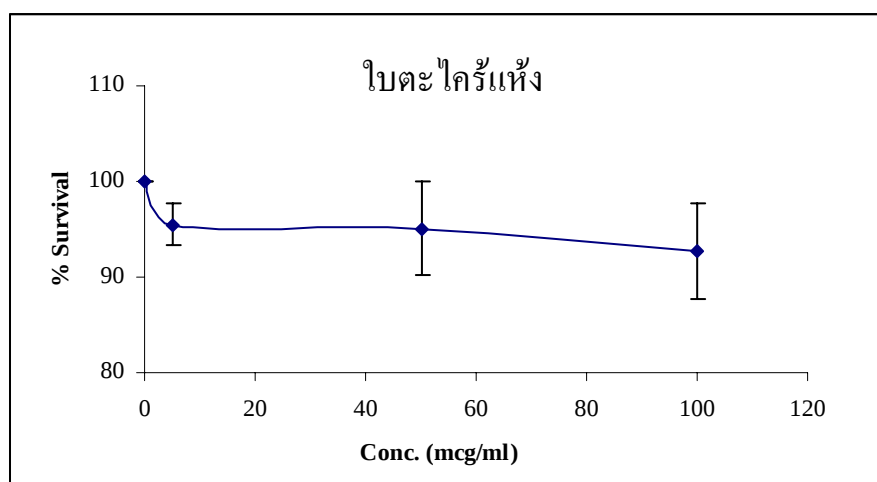
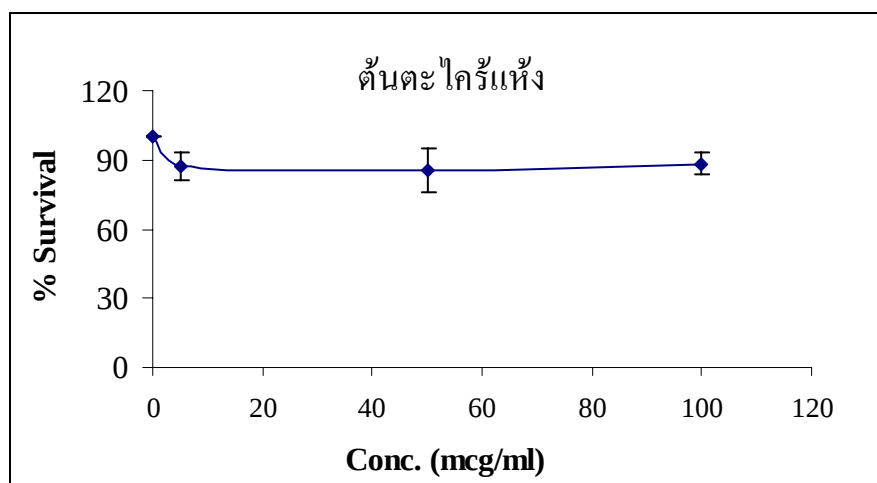


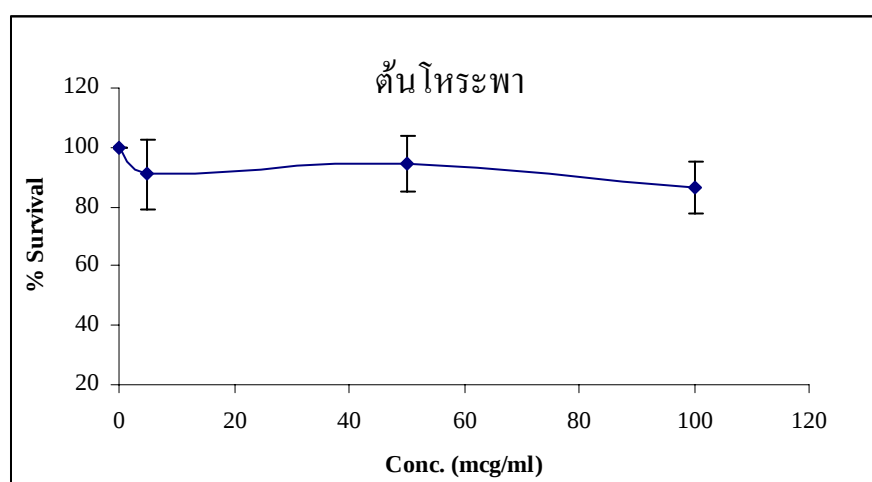
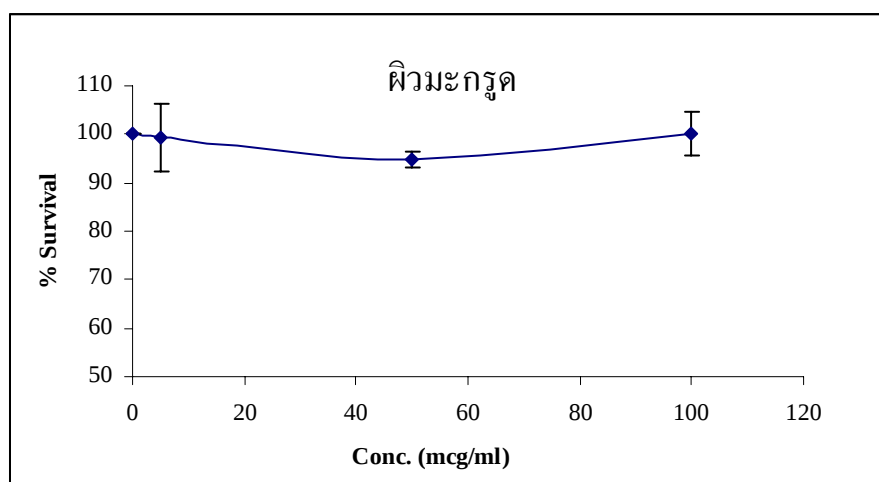
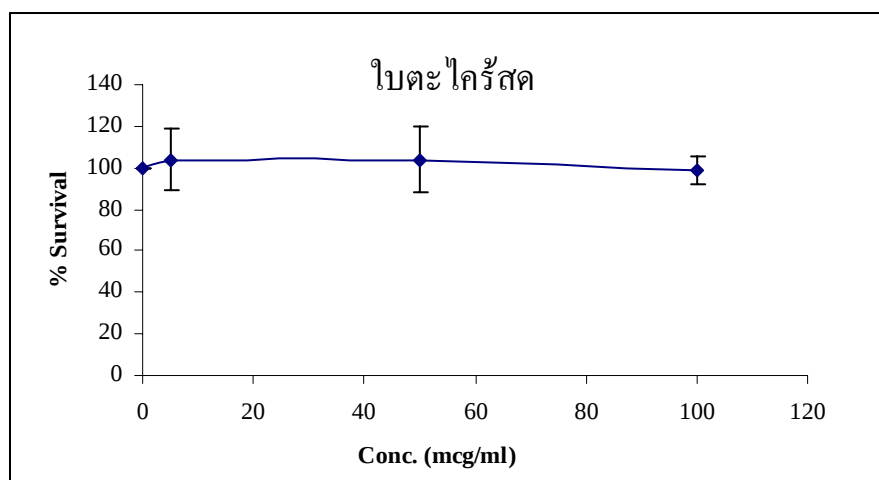


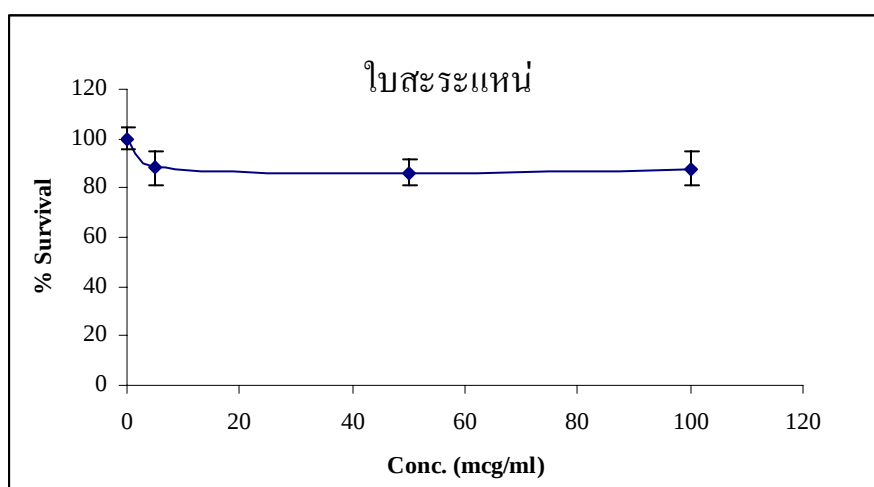
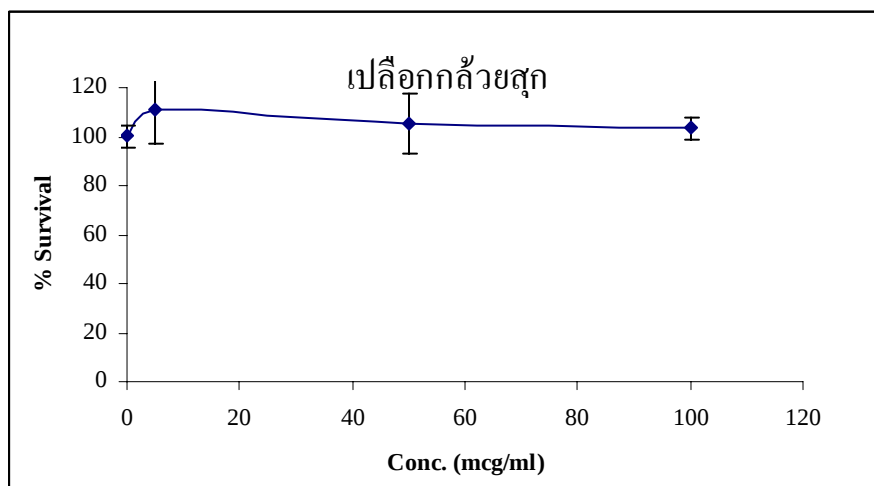
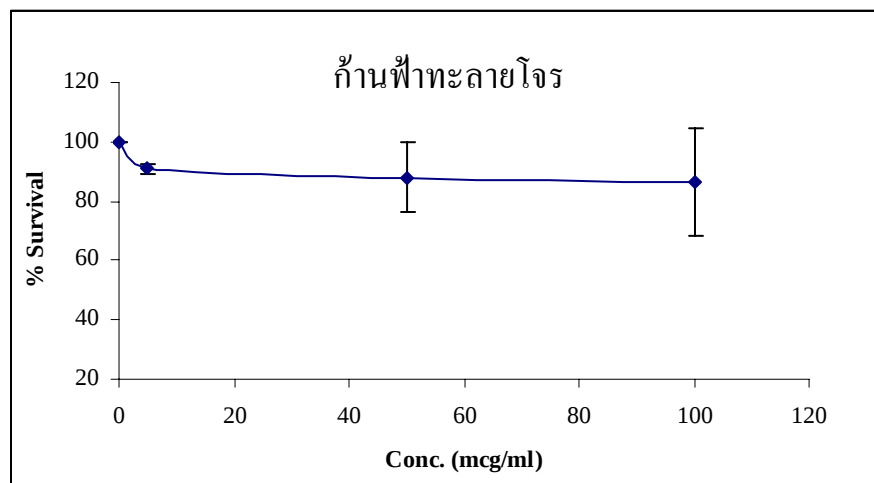


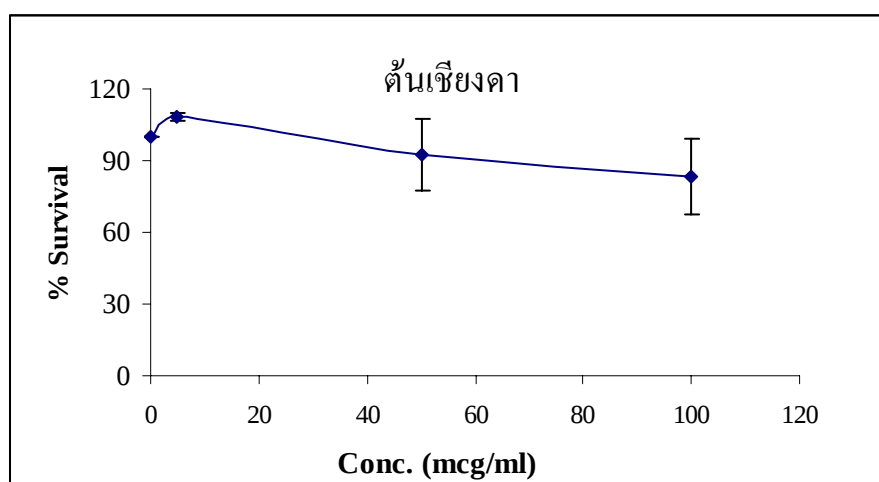
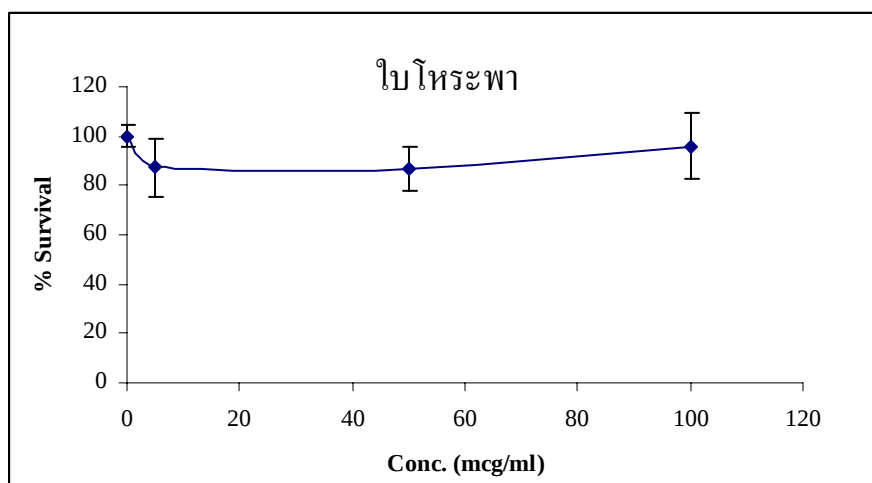
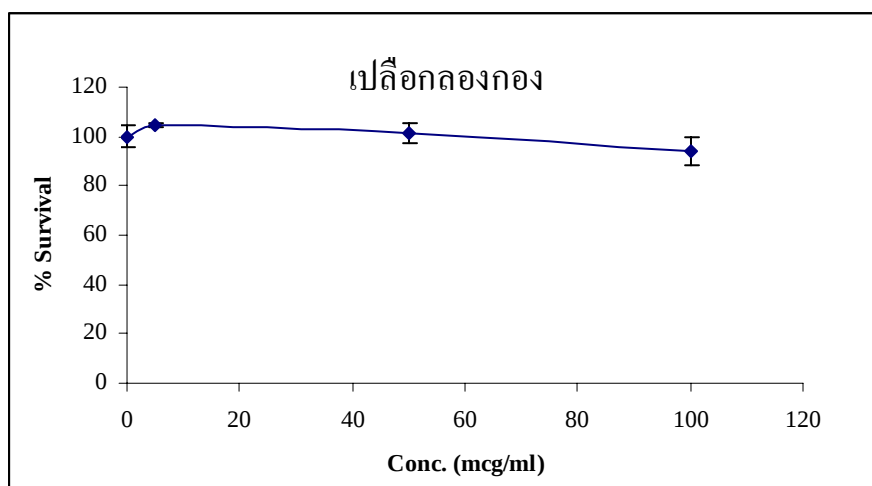


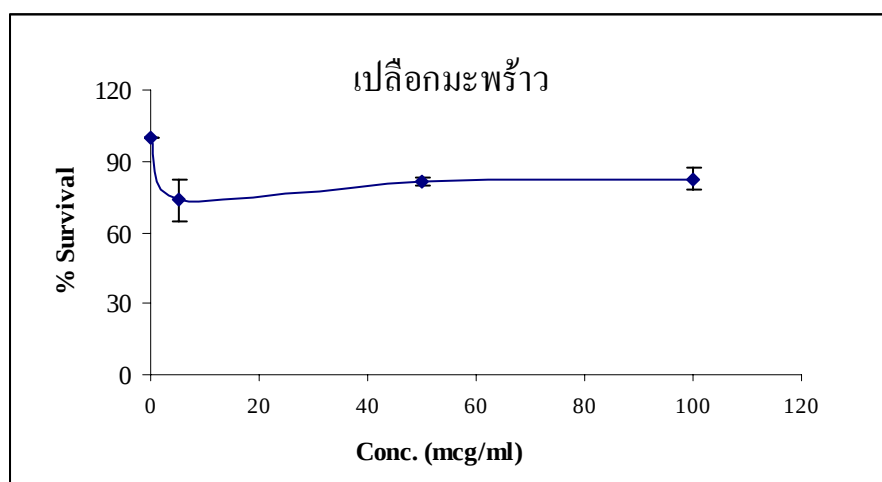
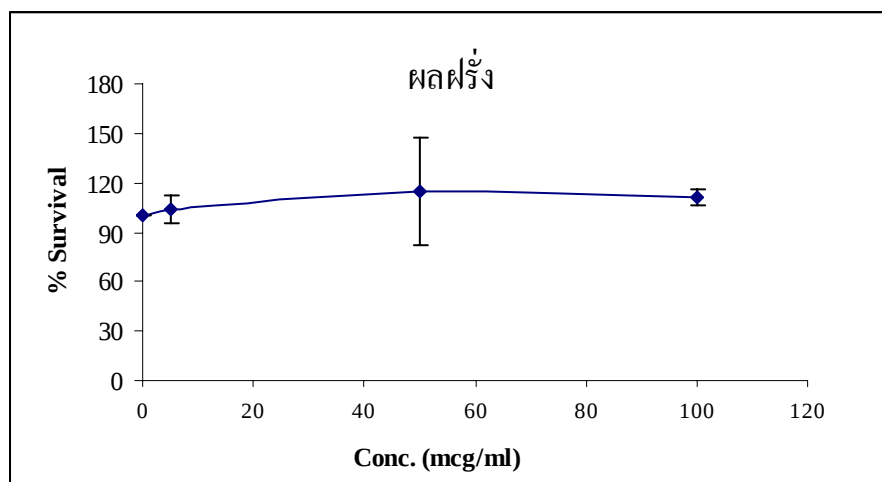
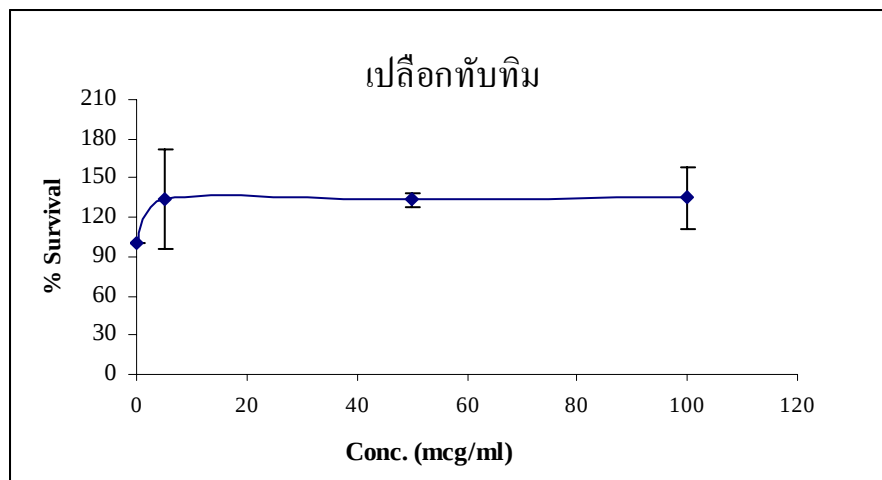


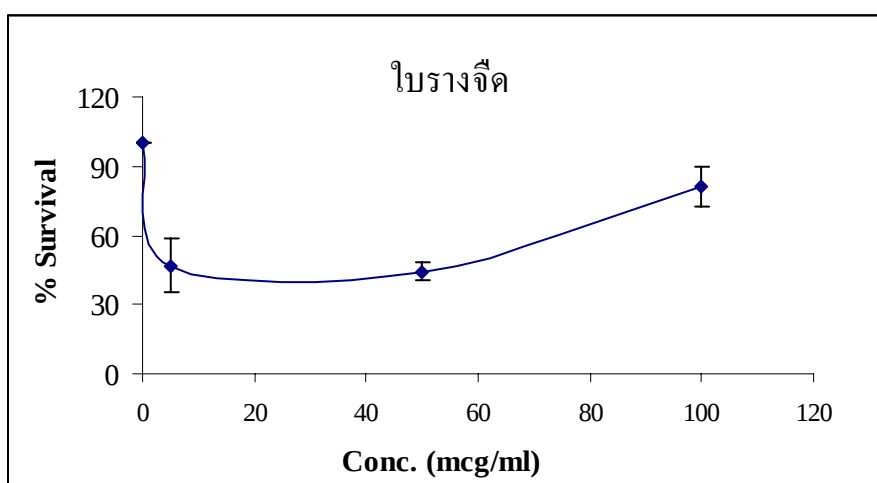
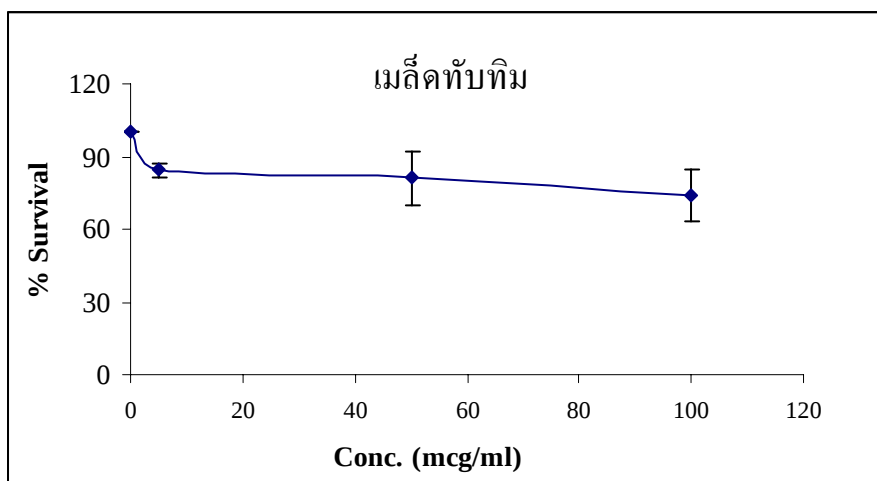
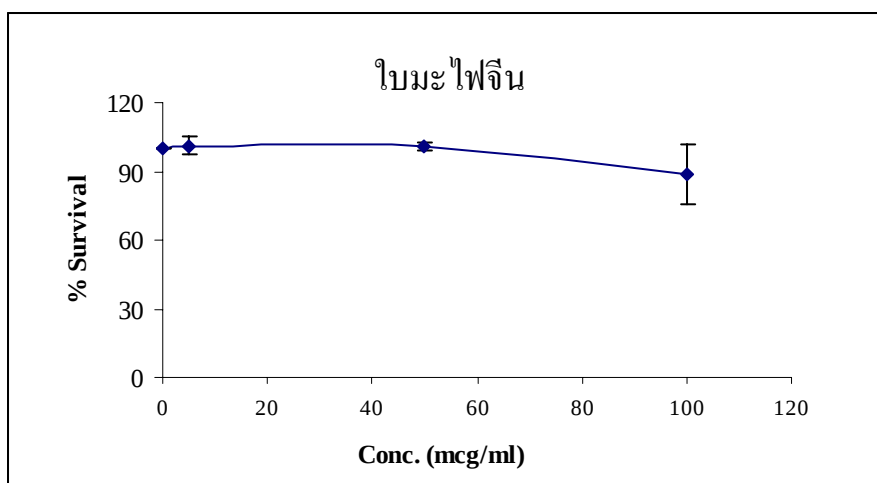


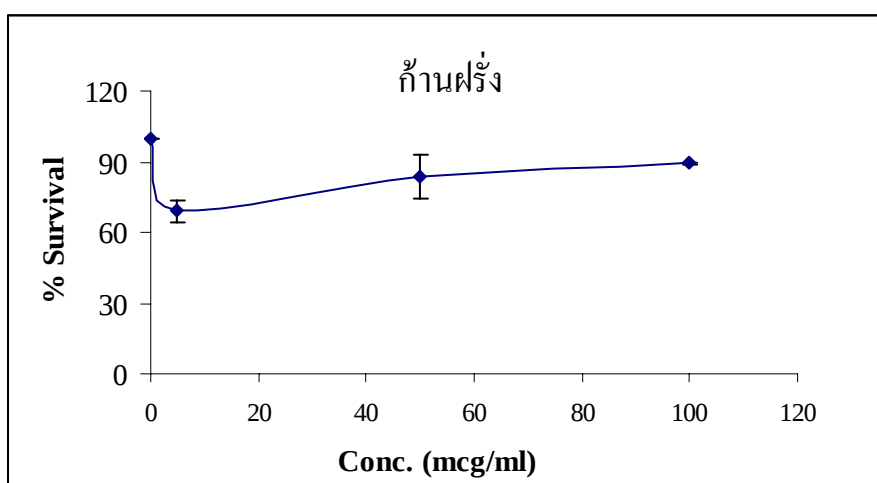
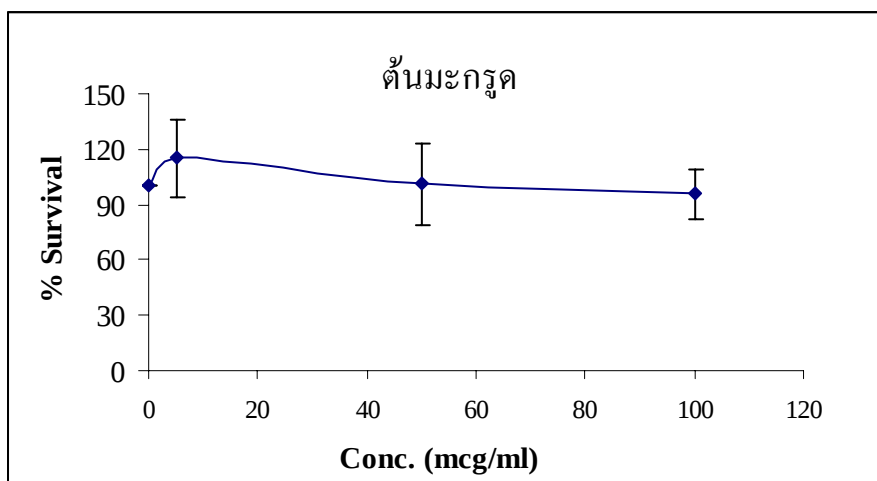
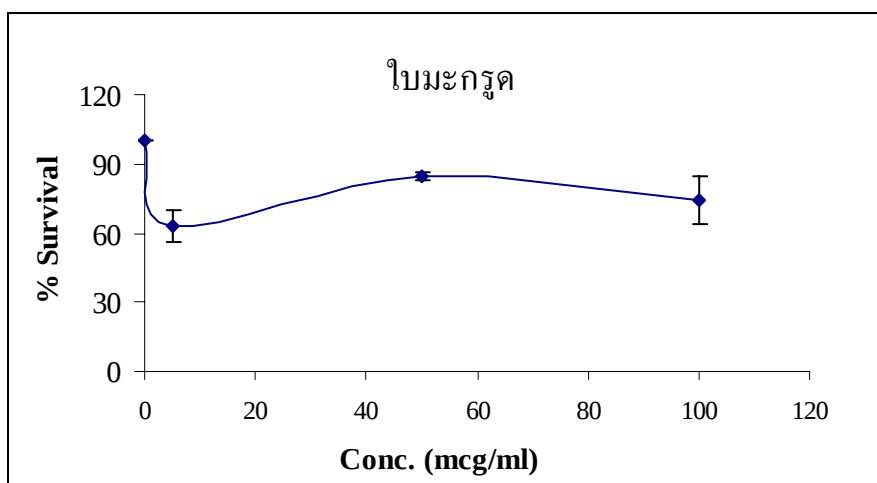


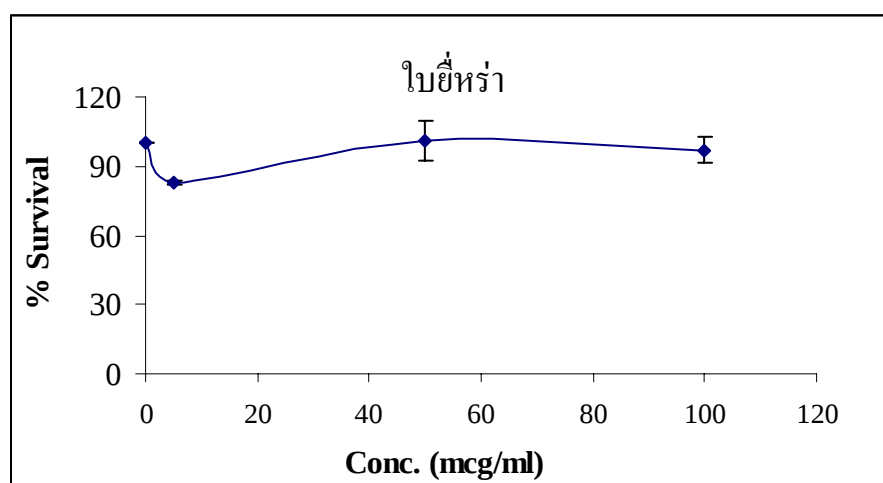
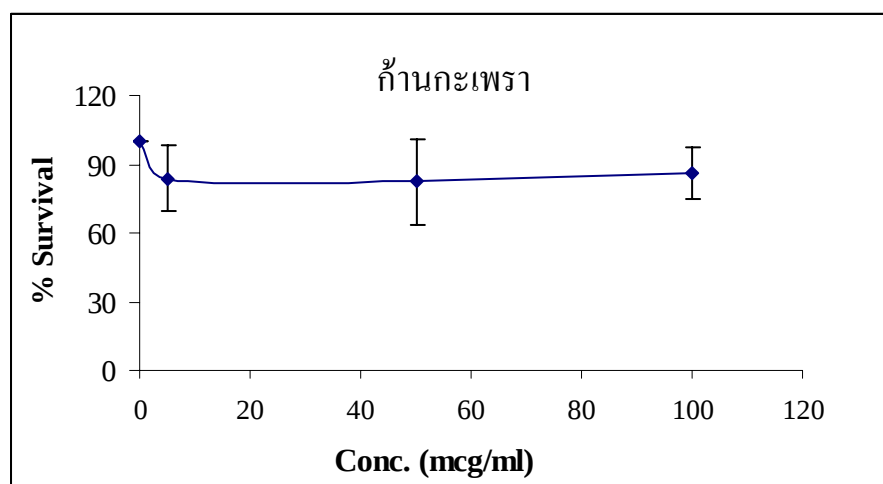
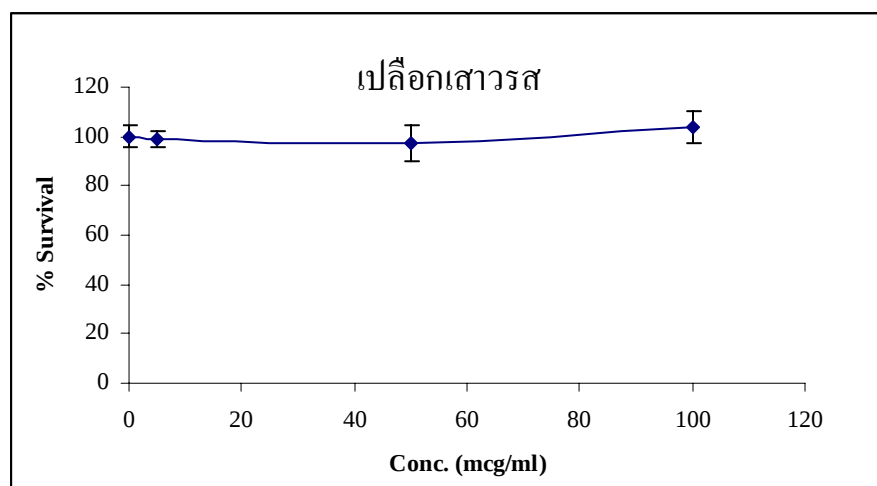


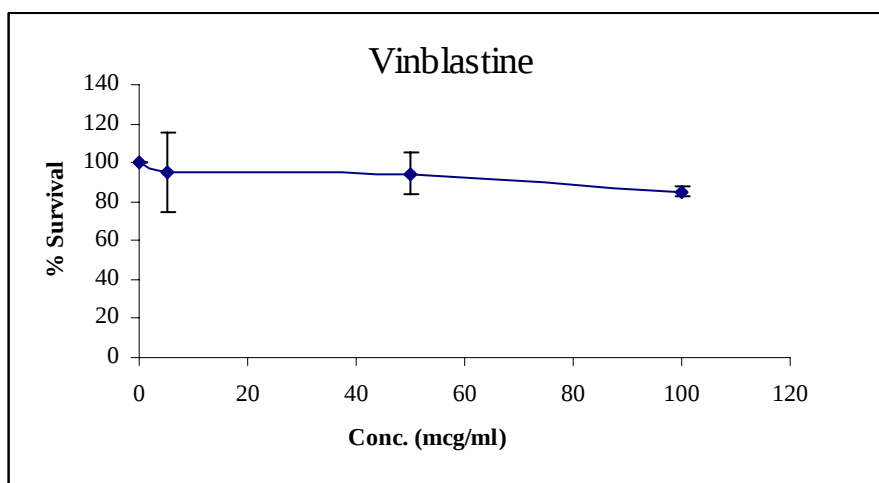
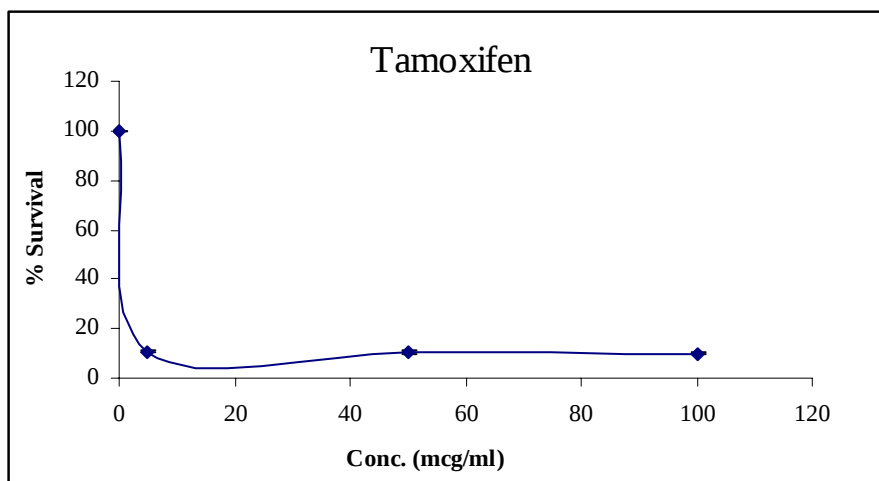












หมายเหตุ

ใช้ Tamoxifen และ Vinblastine เป็น Positive Control

ภาคผนวก - จ

Reprint

เรื่อง

Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of
certain fruit peels



Volume 103, issue 2, 2007

ISSN: 0308-8146

FOOD CHEMISTRY

Managing Editor

G.G. Birch

Editors

P.M. Finglas

J.P. Roozen

F. Shahidi

Available online at

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

This article was originally published in a journal published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract

Suganya Tachakittirungrod, Siriporn Okonogi *, Sombat Chowwanapoonpohn

Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Suthep Road, Chiang Mai 50200, Thailand

Received 30 March 2006; received in revised form 1 June 2006; accepted 14 July 2006

Abstract

The ethanol extracts from 24 samples plant species commonly found in Thailand were investigated and compared on their antioxidant activity by ABTS assay. The ethanol extract from the leaves of guava (*Psidium guajava*) showed the highest antioxidant capacity with the TEAC value of 4.908 ± 0.050 mM/mg, followed by the fruit peels of rambutan (*Nephelium lappaceum*) and mangosteen (*Garcinia mangostana*) with the TEAC values of 3.074 ± 0.003 and 3.001 ± 0.016 mM/mg, respectively. The further investigation of guava leaf extracts from different solvents; *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, and methanol, was examined using ABTS and FRAP assays. The total phenolic content was done by Folin–Ciocalteu reaction. The results indicated that the methanol fraction possessed the highest antioxidant activity, followed by the butanol and ethyl acetate fractions, respectively. The hexane fraction showed the lowest antioxidant activity. The results demonstrated that the mechanism of antioxidant action of guava leaf extracts was free radical scavenging and reducing of oxidized intermediates. The phenolic content in guava leaf fraction played a significant role on the antioxidant activity via reducing mechanisms.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Antioxidant activity; Extract; ABTS; FRAP; Phenolic content; Guava

1. Introduction

It is well known that reactive oxygen species (ROS) formed in vivo, such as superoxide anion, hydroxyl radical and hydrogen peroxide, are highly reactive and potentially damaging transient chemical species. Tissue damage resulting from an imbalance between ROS-generating and scavenging systems has been implicated in the pathogenesis of a variety of disorders, including degenerative disorders of the CNS, such as Alzheimer's disease, cancer, atherosclerosis, diabetes mellitus, hypertension, AIDS and aging (Halliwell & Gutteridge, 1998; Mantle, Eddeb, & Pickering, 2000).

Antioxidant refers to a compound that can delay or inhibit the oxidation of lipids or other molecules by inhibiting the initiation or propagation of oxidative chain reactions and which can thus prevent or repair damage done to

the body's cells by oxygen. They act by one or more of the following mechanisms: reducing activity, free radical-scavenging, potential complexing of pro-oxidant metals and quenching of singlet oxygen. Epidemiological studies have shown that many phytonutrients of fruits and vegetables might protect the human body against damage by ROS. The consumption of natural antioxidant phytochemicals was reported to have potential health benefits (Di Carlo, Mascolo, Izzo, & Capasso, 1999; Pulido, Bravo, & Saura-Calixto, 2000; Sumino, Sekine, Ruangrunsi, Igarashi, & Ikegami, 2002). In recent years, there has been a considerable interest in finding natural antioxidants from plant materials. The antioxidant phytochemicals from plants, particularly flavonoids and other polyphenols, have been reported to inhibit the propagation of free radical reactions, to protect the human body from disease (Kinsella, Frankel, German, & Kanner, 1993; Terao & Piskula, 1997), and to retard lipid oxidative rancidity (Duthie, 1993). In addition, the use of synthetic antioxidants has

* Corresponding author. Tel.: +66 53 944 311; fax: +66 53 278 708.
E-mail address: sirioko@chiangmai.ac.th (S. Okonogi).

been questioned because of their toxicity (Valentao et al., 2002). Therefore, there have been numerous researches on these bioresources to seek for potential natural and possibly economic and effective antioxidants to replace the synthetic ones.

Thailand, as a tropical country, shows an amazing diversity of plant species. Some of them have long been used as traditional medicines. Many of them were reported to have various desirable activities (Okonogi & Murakoshi, 1994; Okonogi, Murakoshi, & Sekine, 1993; Sekine et al., 1993). In the present study, we collected 24 plant species that were commonly found in the northern region of Thailand. The ethanol crude extracts from the interesting parts, such as the leaf, the stem, the fruit pulp and the fruit peel, were evaluated and compared for their antioxidant activities. The plant whose ethanol crude extract showed the highest antioxidant potential was further evaluated for its mechanism of antioxidant activity and phenolic content.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Gallic acid, 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), butylated hydroxytoluene (BHT), quercetin (QCT), ferric chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), and potassium persulfate were from Sigma (MO, USA). β -Carotene and 2,4,6-tri(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ) were from Fluka Chemicals (Buchs, Switzerland). Trolox was from Aldrich

Chemical Company (Steinheim, Germany). Ethanol, methanol, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, and hydrochloric acid were from Merck (Darmstadt, Germany). All other reagents were of the highest quality grade available.

2.2. Plant material

Twenty four plant species were collected during April and September from the northern region of Thailand. Some of them are not indigenous to the area but grow wild in Thailand. The collection sources of plant samples were different. Some were harvested from the plant gardens, the others were purchased from local markets, as shown in Table 1. Voucher specimens of certain plants were deposited in the Herbarium of the Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University. The interesting parts of plant samples were carefully separated and cut into small thin pieces and dried at 50 °C for 2 days. The dried plant samples were ground into fine powder and stored in a vacuum desiccator at 4 °C for further study.

2.3. Preparation of extracts

2.3.1. Ethanol crude extracts

The dried powder of each plant sample was extracted by maceration with ethanol (100 g dried power sample/500 ml of 95% ethanol) for 48 h ($\times 3$) at room temperature. The filtrates of each time were pooled and the solvent was removed under vacuum at 45 °C using a rotary evaporator. The obtained crude extracts were stored in a desiccator at

Table 1
The details of plants used in this study

Scientific name	Local name	English name	Family	Main traditional uses
<i>Andrographis paniculata</i> ^a	Fa-talai-chon	–	Acanthaceae	Antipyretic
<i>Clausena lansium</i> ^a	Ma-fai-jin	–	Rutaceae	–
<i>Citrus hystrix</i> ^a	Ma-krut	Lime	Rutaceae	Carminative
<i>Cocos nucifera</i> ^a	Ma-prao	Coconut	Palmae	Antimicrobial
<i>Cymbopogon citratus</i> ^a	Ta-krai	Lemon grass	Gramineae	Antibacterial
<i>Dregea volubilis</i> ^a	Puck-huan-muu	–	Asclepladaceae	–
<i>Garcinia mangostana</i> ^a	Mung-kut	Mangosteen	Guttiferae	Antidiarrhea
<i>Gymnema inodorum</i> ^a	Chiang-da	–	Asclepladaceae	Antihyperglycemia
<i>Hylocereus undatus</i> ^b	Kaew-mang-korn	Dragon Fruit	Cactaceae	–
<i>Hyptis suaveolens</i> ^a	Mang-luk-ka	Wild spikenard	Labiatae	Antibacterial
<i>Lansium domesticum</i> ^b	Long-kong	Lansium	Meliaceae	–
<i>Leucaena leucocephala</i> ^a	Ka-tin	Leucaena	Leguminosae	Relieves diarrhea
<i>Marsdenia glabra</i> ^b	Puck-saew	–	Asclepladaceae	Antipyretic
<i>Mentha cordifolia</i> ^a	Sa-ra-nae	Kitchen mint	Labiatae	Carminative
<i>Musa sapientum</i> ^b	Kloay	Banana	Musaceae	Antitumor
<i>Nephelium lappaceum</i> ^b	Ngo	Rambutan	Sapindaceae	–
<i>Ocimum basilicum</i> ^a	Ho-ra-pa	Basil	Labiatae	Carminative
<i>Ocimum gratissimum</i> ^b	Yee-ra	Tree basil	Labiatae	Carminative
<i>Ocimum sanctum</i> ^b	Ka-prao	–	Labiatae	Carminative
<i>Oroxylum indicum</i> ^a	Pae-ka	Damocles tree	Bignoniaceae	–
<i>Passiflora foetida</i> ^b	Sao-wa-rood	Passion fruit	Plasifloraceae	–
<i>Piper sarmentosum</i> ^a	Cha-plu	–	Piperaceae	Carminative
<i>Psidium guajava</i> ^a	Fa-rang	Guava	Myrtaceae	Antidiarrhea
<i>Thunbergia laurifolia</i> ^a	Rang-cherd	–	Thunbergiaceae	Antipyretic

^a Plant samples were harvested from medicinal gardens.

^b Plant samples were harvested from local markets.

4 °C. These ethanol crude extracts were subjected to ABTS assay for comparison of their antioxidant activities.

2.3.2. Fractionation of extracts

The dried powder plant sample whose ethanol crude extract showed the highest potential antioxidant activity after the comparison test by ABTS assay was selected and macerated in hexane for 48 h (×3) at room temperature. The residue after the third filtration was dried at room temperature for 24 h to ensure hexane was completely removed. The dried residue was further macerated in another three solvents as follows; ethyl acetate, butanol and methanol, respectively, in the same manner as hexane. The filtrates of the same solvent were pooled together. The solvent was removed under vacuum at 45 °C using a rotary evaporator. The extracts obtained from each solvent were kept in a desiccator at 4 °C for further study.

2.4. ABTS assay

This was done by using the ABTS free radical decolorization assay developed by Re et al. (1999) with some modification. Briefly, the pre-formed radical monocation of ABTS was generated by reacting ABTS solution (7 mM) with 2.45 mM potassium persulfate ($K_2S_2O_8$). The mixture was allowed to stand for 15 h in the dark at room temperature. The solution was diluted with ethanol to obtain the absorbance of 0.7 ± 0.2 units at 750 nm. The plant extracts were separately dissolved in ethanol to yield a concentration of 1 mg/ml. An aliquot of 20 μ l of ethanolic test solution of each sample was added to 180 μ l of ABTS free radical cation solution. The absorbance, monitored for 5 min, was measured spectrophotometrically at 750 nm using a microtitre plate reader. All measurements were performed in triplicate. The free radical-scavenging activity of each sample was expressed as trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), which was obtained by comparing the absorbance change at 750 nm in a reaction mixture containing a sample of plant extract or test material with that containing trolox. This index is defined as the millimolar concentration of a trolox solution whose antioxidant capacity is equivalent to 1.0 mg of the extract (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald, & Robards, 2002). BHT and QCT were used as positive controls.

2.5. Determination of the reducing power

The reducing power was determined by using a ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay described by Benzie and Strain (1996) with some modification. Briefly, the FRAP reagent contained 2.5 ml of 10 mM TPTZ solution in 40 mM HCl plus 2.5 ml of 20 mM $FeCl_3$ and 25 ml of 0.3 M acetate buffer, pH 3.6, was freshly prepared. The extracts were dissolved in ethanol at a concentration of 1 mg/ml. An aliquot of 20 μ l test of solution was mixed with 180 μ l of FRAP reagent. The absorption of the reaction mixture was measured at 595 nm by a microtitre plate

reader. Ethanolic solutions of known Fe(II) concentration, in the range of 50–500 μ M ($FeSO_4$), were used as calibration curve. The reducing power was expressed as equivalent concentration (EC). This parameter was defined as the concentration of antioxidant having a ferric reducing ability equivalent to that of 1 mM $FeSO_4$. BHT and QCT were used as positive controls.

2.6. Determination of total phenolic content

Total phenolic content was analyzed, using the Folin–Ciocalteu method described by Sato et al. (1996) with some modification. Briefly, the plant extract was dispersed in ethanol to yield 1 mg/ml of test solution. An aliquot of 1 ml of test solution was diluted with 9 ml of distilled water. Afterwards, 200 μ l Folin–Ciocalteu reagent and 600 μ l of 2% sodium carbonate were added. The mixture was allowed to stand for 2 h at room temperature before the absorbance was measured spectrophotometrically at 750 nm. Gallic acid was used as the standard for the calibration curve. Total phenolic content of the sample was expressed as gallic acid equivalent concentration (mg/ml).

3. Results and discussion

3.1. General

The antioxidant activity of plants is mainly contributed by the active compounds present in them. The amount of such compounds deposited in each part of the plant is usually different. In this study, 34 samples from 24 plant species, as shown in Table 1, were investigated for their antioxidant activity. The crude ethanol extracts of these samples were used for comparison of their antioxidant powers. The percentage yields of these ethanol crude extracts are presented in Table 2. They ranged from 1.12% to 17.52%. The fruit peel of *Citrus hystrix* gave the highest percentage yield whereas the stem of guava gave the lowest.

Several methods have been used for evaluation of the antioxidant activity of plants. Those are DPPH $\cdot$ -scavenging assay (Gamez et al., 1998), ABTS decolorization (Re et al., 1999), FRAP method (Benzie & Strain, 1996; Pulido et al., 2000), and β -carotene bleaching model (Dapkevicius, Venskutonis, Van Beek, & Linssen, 1998; Hidalgo, Fernandez, Quilhot, & Lissi, 1994; Jayaprakasha, Singh, & Sakariah, 2001). Free radicals are a major cause of the propagation stage of the oxidation process. The high potential for scavenging of free radicals could inhibit spreading of oxidation. Hence, the comparative study, to seek for the highest potential antioxidant from the ethanol crude extracts was carried out by a free radical-scavenging method, using ABTS as free radical. This is an excellent method for determining the antioxidant activity of a broad diversity of substances, such as hydrogen-donating antioxidants or scavengers of aqueous phase radicals and of chain-breaking antioxidants or scavengers of lipid peroxyl

Table 2
The percentage yields and TEAC values of ethanol extracts

Plants	Part used	Yield (%) (w/w)	TEAC (mM/mg) ^a
<i>Andrographis paniculata</i>	Leaf	6.48	0.397 ± 0.022
	Stem	1.54	0.648 ± 0.047
<i>Clausena lansium</i>	Leaf	8.66	0.491 ± 0.011
<i>Citrus hystrix</i>	Leaf	7.42	0.781 ± 0.013
	Fruit peel	17.52	1.20 ± 0.034
<i>Cocos nucifera</i>	Fruit peel	5.80	1.53 ± 0.044
<i>Cymbopogon citratus</i>	Leaf	10.05	0.631 ± 0.057
	Stem	16.37	0.324 ± 0.014
<i>Dregea volubilis</i>	Leaf and stem	12.38	1.06 ± 0.087
<i>Garcinia mangostana</i>	Fruit peel	7.21	3.00 ± 0.016
<i>Gymnema inodorum</i>	Leaf	11.92	0.902 ± 0.052
	Stem	3.91	0.718 ± 0.027
<i>Hylocereus undatus</i>	Fruit peel	1.40	0.685 ± 0.021
<i>Hyptis suaveolens</i>	Leaf and stem	4.34	0.850 ± 0.022
<i>Lansium domesticum</i>	Fruit peel	5.71	0.507 ± 0.002
<i>Leucaena leucocephala</i>	Leaf	6.09	1.43 ± 0.007
	Pod	1.20	1.71 ± 0.033
<i>Marsdenia glabra</i>	Leaf	11.56	0.673 ± 0.044
<i>Mentha cordifolia</i>	Leaf	11.13	1.84 ± 0.030
	Stem	7.04	0.364 ± 0.006
<i>Musa sapientum</i>	Fruit peel	7.66	1.80 ± 0.038
<i>Nephelium lappaceum</i>	Fruit peel	10.68	3.07 ± 0.003
<i>Ocimum basilicum</i>	Leaf	9.82	0.877 ± 0.010
	Stem	4.85	0.783 ± 0.022
<i>Ocimum gratissimum</i>	Leaf	6.17	1.35 ± 0.014
<i>Ocimum sanctum</i>	Leaf	6.04	1.48 ± 0.030
	Stem	3.65	0.877 ± 0.004
<i>Oroxylum indicum</i>	Pod	7.50	0.506 ± 0.009
<i>Passiflora foetida</i>	Fruit peel	2.60	0.591 ± 0.023
<i>Piper sarmentosum</i>	Leaf	3.06	1.46 ± 0.020
<i>Psidium guajava</i>	Leaf	8.70	4.91 ± 0.050
	Stem	1.12	1.96 ± 0.016
	Fruit pulp	4.65	0.898 ± 0.008
<i>Thunbergia laurifolia</i>	Leaf	4.47	1.66 ± 0.011

^a Values represent means ± SD (n = 3).

radicals (Rice-Evans, Miller, Bolwell, Bramley, & Pridham, 1995; Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996; Robert et al., 1999).

3.2. Antioxidant activity of the ethanol crude extracts

The results of primary screening of antioxidant activity of all ethanol crude extracts were expressed as TEAC value, as shown in Table 2. This value represented the mM trolox equivalents/mg extract. The antioxidant activities of the samples ranged widely from 0.324 to 4.91 mM trolox equivalents/mg extract. The leaves of guava (*Psidium guajava*) showed the highest antioxidant activity with a TEAC value of 4.91 ± 0.050 mM trolox equivalents/mg extract, followed by the fruit peels of rambutan (*Nephelium lappaceum*) and mangosteen (*Garcinia mangostana*) with TEAC values of 3.07 ± 0.003 and 3.00 ± 0.016 mM trolox equivalents/mg extract, respectively. The stem of *Cymbopogon citratus* showed the lowest antioxidant activity among the plant samples included in this study with the TEAC value of 0.324 ± 0.014 mM trolox equivalents/mg extract. When the leaf and the stem of each plant sample were compared,

it was found that all plant extracts from the leaf exhibited higher antioxidant activity than did those from the stem. The extract from fruit peels also had a wide ranging antioxidant activity of 0.507–3.07 mM trolox equivalents/mg extract, depending on plant species. Among the fruit peel samples, the pericarp of rambutan showed the highest antioxidant capacity whereas that of *Lansium domesticum* showed the lowest. Of the 34 samples we analyzed, three showed extremely high antioxidant activity (TEAC values were above 3.0), 12 showed high antioxidant activity (TEAC values were below 3.0 but above 1.0), 15 showed moderate antioxidant activity (TEAC values were below 1.0 but above 0.5), and four showed low antioxidant activity (TEAC values were below 0.5). Within the extremely high antioxidant activity group, the leaves of guava exhibited the highest potential. According to the results from the ABTS assay, we could expect that one of the antioxidant mechanisms of guava leaf extract was via free radical-scavenging action. This result corresponded with the data reported by Qian and Nihorimbere (2004), even if different antioxidative test systems were used. In our study, three parts of the guava plant were examined for their antioxidant activities. The results showed that the antioxidant activities of each part were obviously different. Guava leaves showed the highest activity with the TEAC value of 4.91 ± 0.050 mM trolox equivalents/mg extract, whereas the stem and the fruit pulp were much lower with TEAC values of 1.96 ± 0.016 and 0.898 ± 0.008 mM trolox equivalents/mg extract, respectively. Therefore, the dried powder of guava leaves was selected for further investigation.

3.3. Antioxidant activity of guava leaf extracts

3.3.1. General

Qian and Nihorimbere (2004) reported that the extracts of guava leaves with 50% aqueous ethanol (1:10) ratio showed much higher antioxidant activities than did those with water. This suggested that the polarity of the active components in guava leaves was lower than water. As the polarity of methanol was slightly lower than water, this was considered to be one of the most suitable solvents for this extraction. On the other hand, the antioxidant activities of the guava leaf extracts from other lower polarity solvents, such as *n*-hexane, ethyl acetate and *n*-butanol, has not yet been reported elsewhere. Therefore, in this experiment the antioxidant activity of guava leaves was further studied by using several kinds of solvents for maceration, of different polarities: *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol and methanol, respectively. The extracts from each solvent were subjected to the ABTS test and FRAP assay. These two methods represented different mechanisms of antioxidant action. A sample possessing ABTS free radical-scavenging activity indicated that its mechanism of action was as a hydrogen donor and terminated the oxidation process by converting free radicals to more stable products, whereas a compound exhibiting a positive result in the FRAP assay was an electron donor and it terminated

the oxidation chain reaction by reducing the oxidized intermediates into the stable form.

3.3.2. ABTS scavenging activity

The TEAC values of guava leaves extracted from different solvents are shown in Fig. 1. All extracts possessed free radical-scavenging activity but at different levels. The highest activity was obtained from the methanol extract, with the TEAC value of 3.79 ± 0.003 mM trolox equivalents/mg extract, followed by the butanol extract and ethyl acetate extract with the TEAC values of 2.90 ± 0.023 and 2.65 ± 0.065 mM trolox equivalents/mg extract, respectively. The activities of the latter two fractions were above 70% of the methanol extract. The hexane extract exhibited the lowest scavenging action with the TEAC value of 1.06 ± 0.017 mM trolox equivalents/mg extract which was below 30% of the methanol extract. The antioxidant activity of the methanol extract was higher than that of the two positive controls, BHT and QCT, whereas the other two high activity fractions were a little lower. It was considered that the methanol fraction of guava leaves was a good source of potent natural antioxidant activity. Its high TEAC value, indicated that the mechanism of antioxidant action of this fraction was as a hydrogen donor and it could terminate the oxidation process by converting free radicals to the stable forms.

3.3.3. FRAP reducing power

The principle of the FRAP method is based on the reduction of a ferric-tripyridyltriazine complex to its ferrous colored form in the presence of antioxidants. The reducing power property indicates that the antioxidant compounds are electron donors and can reduce the oxidized intermediates of the lipid peroxidation process, so that they can act as primary and secondary antioxidants (Yen & Chen, 1995). Fig. 2 shows the reducing power of guava leaf extracts from different solvents. All extracts had reducing power but not at the same level. The result

clearly indicated that the methanol extract of guava leaves had the highest reducing power with the EC value of 3.65 ± 0.038 mM/mg extract. This was much higher than that of BHT but a little lower than QCT. The ethyl acetate and butanol extracts showed lower activity with EC values of 1.15 ± 0.132 and 1.36 ± 0.032 mM/mg extract, respectively, which were about 31–37% that of the methanol extract. The lowest reducing property was obtained from the hexane fraction. From this point of view, it was confirmed that the methanol fraction of guava leaves possessed the potent antioxidant compounds. According to its high EC value, it could be considered that compounds in the methanol fraction were good electron donors and could terminate oxidation chain reactions by reducing the oxidized intermediates into the stable form.

3.4. Correlation of TEAC and EC values of guava leaf extracts

Fig. 3 shows a relationship between free radical-scavenging activity, as TEAC value, and the reducing power, as EC value, of guava leaf fractions extracted by four solvents with different polarities. It was clearly seen that the higher the polarity of solvent used in the extraction process, the higher was the antioxidant activity obtained. This led to the consideration that the most antioxidant active compounds in guava leaves should be of high polarity. The correlation between the two mechanism parameters (TEAC and EC values) was quite poor ($R^2 = 0.68$). This suggested that antioxidant components, existing in each fraction, possessed different predominant mechanisms of action. Moreover, the non-linear relationship between the two mechanism parameters might be due to other effects involving the nature of the active compounds existing in the guava leaves and their synergistic effects. Several antioxidants from plants have been reported to be polyphenolic compounds. Further study on phenolic content in each guava leaf fraction would be beneficial, leading to more

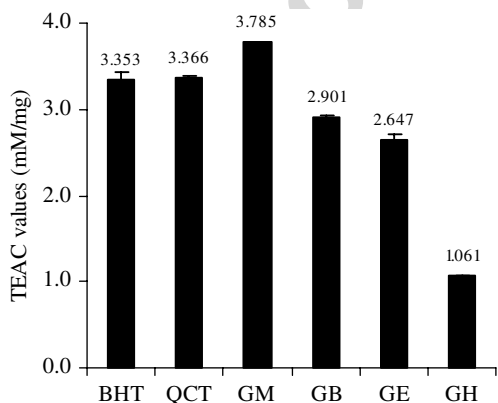


Fig. 1. Free radical-scavenging activity of guava leaf extracts from methanol (GM), butanol (GB), ethyl acetate (GE), and hexane (GH) in comparison with those of butylated hydroxyl toluene (BHT) and quercetin (QCT).

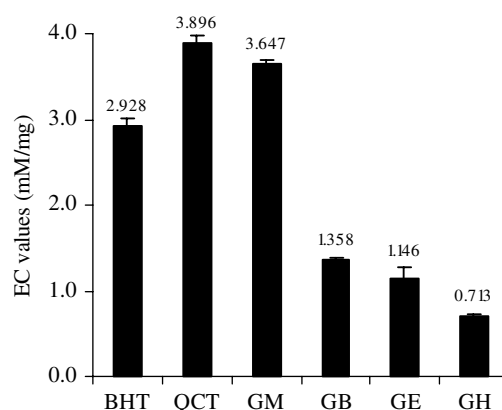


Fig. 2. Reducing power of guava leaf extracts from methanol (GM), butanol (GB), ethyl acetate (GE) and hexane (GH) in comparison with those of butylated hydroxyl toluene (BHT) and quercetin (QCT).

understanding of the active compounds related to their mechanism of action.

3.5. Total phenolic content

The total phenolic content of guava leaf fractions was reported as gallic acid equivalent concentration (mg/ml). The results showed that guava leaf fractions contained a mixture of phenolic compounds at different levels according to the polarity of solvent used in the extraction process, in the following order: methanol > butanol > ethyl acetate > hexane, as shown in Fig. 4. Plant-derived phenolic compounds are well known to exhibit antioxidant activity through a variety of mechanisms, including free radical-scavenging, lipid peroxidation and chelating of metal ions (Shahidi, 1997, chap. 11). Figs. 5 and 6 show the correlation between the phenolic content of the guava leaf fractions from different solvents, equivalent to gallic acid concentration vs. free radical-scavenging activity as TEAC

values and reducing power as EC values, respectively. It was obvious that the phenolic content in the extracts showed a much higher correlation with reducing power ($R^2 = 0.98$) than with the radical-scavenging activity ($R^2 = 0.56$). It could be estimated that the phenolic compounds present in the guava leaves played an important role in antioxidant activity, directly through the mechanism of reduction of oxidized intermediates in the chain reaction. The leaf of guava has been reported to contain many different kinds of phenolic compounds. Matsuo, Hananure, Shimoi, Nakamura, and Tomita (1994) identified (+)-gallocatechin from the methanol extract and demonstrated that it had an antimutagenic action against UV-induced mutation in *Escherichia coli*. Huang and Zhang (2004) reported that the major components in the ethanol extract of guava leaves included triterpenic acids, carbohydrates and polyphenols. Liang, Quian, and Yao (2005) analyzed several polyphenolic compounds from the leaves of guava by HPLC-UV analysis and HPLC mass spectrometry. It was reported that these were gallic acid, quercetin, procatechuic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, kaempferol and ferulic acid. From the two flavonoids

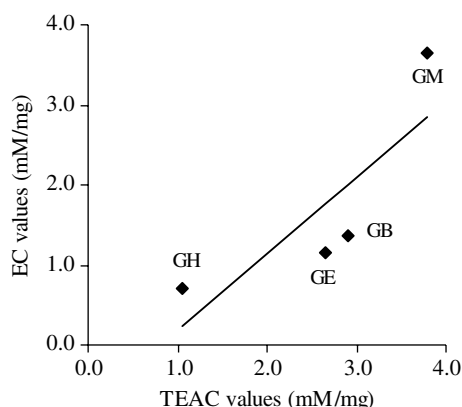


Fig. 3. Correlation of TEAC and EC values of guava leaf extracts from methanol (GM), butanol (GB), ethyl acetate (GE) and hexane (GH).

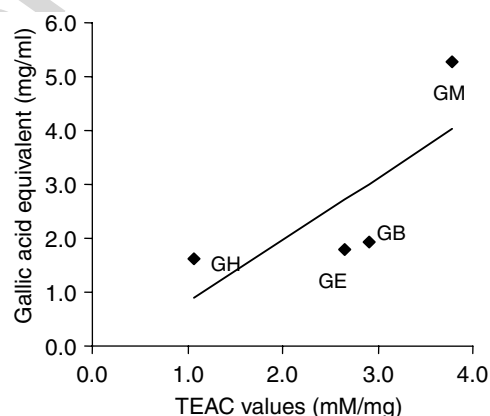


Fig. 5. Correlation of TEAC values and phenolic contents of guava leaf extracts from methanol (GM), butanol (GB), ethyl acetate (GE) and hexane (GH).

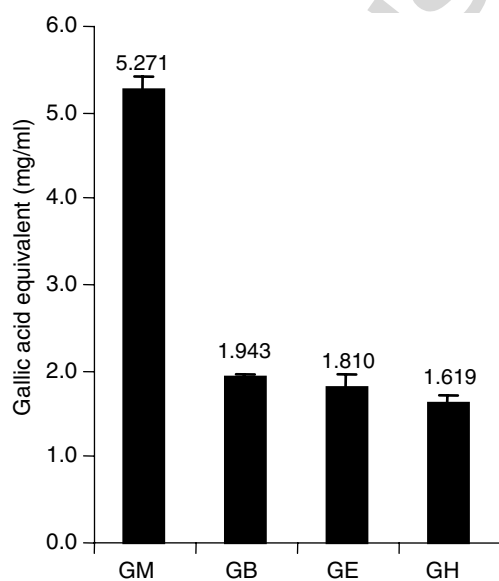


Fig. 4. Total phenolic contents of guava leaf extracts from methanol (GM), butanol (GB), ethyl acetate (GE) and hexane (GH).

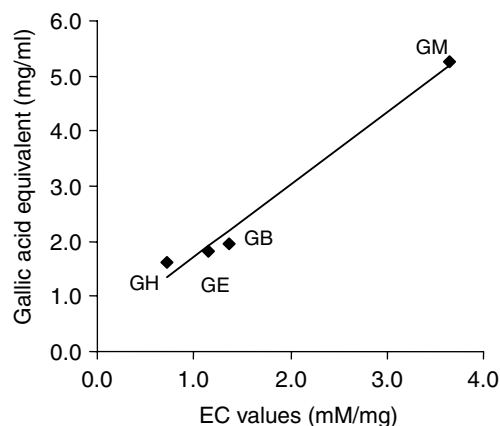


Fig. 6. Correlation of EC values and phenolic contents of guava leaf extracts from methanol (GM), butanol (GB), ethyl acetate (GE) and hexane (GH).

(quercetin and kaempferol), four flavonoid glycosides (quercetin 3-*O*- α -L-arabinoside, quercetin 3-*O*- β -D-glucoside, quercetin 3-*O*- β -D-galactoside and kaempferol-glycoside) were identified. According to their polyphenolic functional groups whose polarity was similar to that of methanol, these active compounds could be completely dissolved in the solvent. These compounds were supposed to play an important role in the antioxidant activity of guava leaves. The lower correlation between TEAC values and the phenolic contents in guava leaves indicated that not only the phenolic compounds were involved in the antioxidant activity through this pathway. There might be some effects involving other active compounds. Although many known compounds were identified, it is not known how much they contributed to the antioxidant activity present in the guava leaves. This present study suggests possible synergistic or competitive antioxidant action among such active compounds. Therefore, further study should be carried out to identify the predominant compounds of the guava leaves with respect to their mechanisms and synergistic actions.

4. Conclusions

Our data have demonstrated the wide range of antioxidant activity among different species and parts of the plants commonly found in Thailand. Among these, guava leaves showed the highest antioxidant activity. Further evaluation of guava leaves, using different solvents has demonstrated that the highest antioxidant activity was in the methanol fraction. The high antioxidant activity of such extracts was attributed to radical-scavenging and reducing mechanisms. The results demonstrated that the phenolic contents existing in guava leaf fractions play an important role in the antioxidant activity directly through the reducing activity mechanism, with some mutual action among the active compounds through free radical-scavenging activity.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support of the RGJ Grant and the DBR-MC Grant awarded by the Thailand Research Fund.

References

- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183–198.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A., & Linssen, P. H. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 140–146.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65, 337–353.
- Duthie, G. G. (1993). Lipid peroxidation. *European Journal of Clinical Nutrition*, 47(11), 759–764.
- Gamez, E. J. C., Luyengi, L., Lee, S. K., Zhu, L. F., Zhou, B. N., Fong, H. H. S., et al. (1998). Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum*. *Journal of Natural Products*, 61(5), 706–708.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1998). *Free radicals in biology and medicine*. London: Oxford University Press.
- Hidalgo, M. E., Fernandez, E., Quilhot, W., & Lissi, E. (1994). Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry*, 37, 1585–1587.
- Huang, J., & Zhang, Z. (2004). Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the chemical components in the ethanol extract of guava leaves. *Zhongshan Daxue Xuebao Ziran Kexueban*, 43(6), 117–120.
- Jayaprakasha, G. K., Singh, K. K., & Sakariah, K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73, 285–290.
- Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B., & Kanner, J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, 47, 85–89.
- Liang, Q., Quian, H., & Yao, W. (2005). Identification of flavonoids and their glycosides by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. *European Journal of Mass Spectrometry*, 11(1), 93–101.
- Mantle, D., Eddeb, F., & Pickering, A. T. (2000). Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 47–51.
- Matsuo, T., Hananure, N., Shimoi, K., Nakamura, Y., & Tomita, I. (1994). Identification of (+)-galocatechin as a bio-antimutagenic compound in *Psidium guajava* leaves. *Phytochemistry*, 36(4), 1027–1029.
- Okonogi, S., & Murakoshi, I. (1994). Discovery and utilization of dermatological products from medicinal plants in Thailand. Part II: an evidence for utilization of the essential oil from *Anisomeles indica*. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(4), 169–176.
- Okonogi, S., Murakoshi, I., & Sekine, T. (1993). The development of dermatological products from some Thai medicinal plants. Part I: family Labiatae. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17, 117–123.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396–3402.
- Qian, H., & Nihorimbere, V. (2004). Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *Journal of Zhejiang University Science*, 5(6), 676–683.
- Re, R., Pellegrinni, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 26(9/10), 1231–1237.
- Rice-Evans, C., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375–383.
- Rice-Evans, C., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933–956.
- Robert, R. E., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Sato, M., Ramarathnam, N., Suzuki, Y., Ohkubo, T., Takeuchi, M., & Ochi, H. (1996). Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 37–44.
- Sekine, T., Arai, Y., Ikegami, F., Fujii, Y., Shindo, S., Yanagisawa, T., et al. (1993). Isolation of camelliaside C from "tea seed cake" and

- inhibitory effects of its derivatives on arachidonate 5-lipoxygenase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41(6), 1185–1187.
- Shahidi, F. (1997). Natural antioxidants. An overview. In F. Shahidi (Ed.), *Natural antioxidants, chemistry, health effects and applications* (pp. 1–11). Champaign, IL: AOCS Press.
- Sumino, M., Sekine, T., Ruangrungsi, N., Igarashi, K., & Ikegami, F. (2002). Ardisphenols and other antioxidant principles from the fruits of *Ardisia colorata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50(7), 1484–1487.
- Terao, J., & Piskula, M. K. (1997). Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes. In C. A. Rice-Evans & L. Packer (Eds.), *Flavonoids in health and disease* (pp. 277–295). New York: Marcel Dekker.
- Valentao, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Bastos, M. (2002). Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4989–4993.
- Yen, G. C., & Chen, H. Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(1), 27–32.

ภาคผนวก - น

Reprint

เรื่อง

Antioxidant Active Principles Isolated from
***Psidium guajava* Grown in Thailand**

Antioxidant Active Principles Isolated from *Psidium guajava* **Grown in Thailand**

Suganya Tachakittirungrod¹, Fumio Ikegami², and Siriporn Okonogi^{1*}

¹Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand

²Center for Environment, Health and Field Sciences, Chiba University, Japan

Abstract

Antioxidant active compounds were isolated from methanol crude extracts of the leaves of Guava (*Psidium guajava* L.) grown in Thailand. The isolated compounds were screened for their *in vitro* antioxidant activity by a DPPH free radical scavenging assay. Results indicate that three isolated compounds contribute importantly to the antioxidant activity of guava leaves, providing a scientific basis for the use of this plant in traditional medicine. Their structures were determined on the basis of spectroscopic and chemical methods. The most active compound was found to be quercetin along with two flavonoid compounds, quercetin-3-O-glucopyranoside and morin. The isolated quercetin, quercetin-3-O-glucopyranoside and morin showed significant scavenging activity with IC₅₀ of 1.20±0.02, 3.58±0.05 and 5.41±0.20 µg/ml, respectively.

Keywords

Guava, *Psidium guajava*, Flavonoid, Antioxidant activity

Introduction

Free radicals are produced in normal and/or pathological cell metabolism. Oxidation is essential to many living organisms for the production of energy to fuel biological processes. However, the uncontrolled production of oxygen derived free radicals is involved in the onset of many diseases such as cancer, rheumatoid arthritis, cirrhosis and arteriosclerosis as well as in degenerative processes associated with aging. Exogenous chemical and endogenous metabolic processes in the human body or in the food system might produce highly reactive free radicals, especially oxygen derived radicals, which are capable of oxidizing biomolecules, resulting in cell death and tissue damage [1]. In recent years, there has been increasing evidence that reactive oxygen species (ROS) are associated with pathological conditions such as atherosclerosis [2] and carcinogenesis [3], as well as with aging [4]. Thus, a lot of attention has focused on dietary antioxidants which may have a potential for therapeutic use and prevention of these diseases. Investigations into the health maintaining properties of plants have resulted in the identification of a wide array of bioactive compounds in plants that include flavonoids, phenolics, limonoids, carotenoids, coumarins, phytosterols, etc. Based on recent research, several compounds from fruits and vegetables were found to possess anticarcinogenic and antioxidant activities [5]. Furthermore, flavonoids and

carotenoids have also been shown to inhibit cancer cell proliferation in vitro [6]. Antioxidant activity by scavenging of reactive oxygen species is important in preventing potential damage to cellular components such as DNA, proteins, and lipids. In the course of screening for antioxidants in Thai medicinal plants, the methanol extract of the leaves of Guava showed a scavenging activity toward ABTS free radical decolorization assay and Ferric reducing power (FRAP) assay [7]. Guava (*Psidium guajava* L., Myrtaceae) leaves have been used in folk medicine of Thailand as an antidiarrheal [8] and antidysenteric; externally, they have been used as a deodorant of mouth odor [9]

The aim of this work was to determine the active principles from leaves of guava grown in Thailand, and to assess their antioxidant properties.

Experimental

Materials and physicochemical study

Melting points were determined on a Yanako melting point apparatus. IR spectra were recorded with a JASCO FT/IR-230 spectrophotometer. NMR spectra were recorded on a JEOL JNM- α 400 spectrometer (400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C). Chemical shifts are shown as δ values, using tetramethylsilane (TMS) as an internal reference. Column chromatography was carried out on Cosmosil 75 μm C₁₈-OPN (Nacalai Tesque), Sephadex LH-20 (GE Healthcare Biosciences AB), Silica gel 60 (230-400 mesh) (Merck), Toyopearl-HW40C (Tosoh Co.) and MCI-gel CHP-20P (Mitsubishi Co.). TLC was performed on pre-coated RP-18 F₂₅₄ (0.25 mm)

(Merck), and spots were detected by UV (254 nm) and by 10% H₂SO₄ spraying reagent followed by heating. Water was deionized and purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). All other chemicals used were of the highest commercial grade available, purchased from Wako Pure Chemical Industries.

Plant material

The dried leaves of *P. guajava* were collected at Chiang Mai Province, Thailand. A voucher specimen is deposited in the herbarium, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Thailand.

Extraction and isolation

The dried leaves of *P. guajava* (800 g) were partitioned by successive extraction with *n*-hexane, EtOAc, *n*-butanol and MeOH to give *n*-hexane fraction (15.0 g), EtOAc fraction (13.9 g), *n*-butanol fraction (11.9 g) and MeOH fraction (151.5 g), respectively.

The antioxidant activity of the resulting fractions was determined by the use of the DPPH method. The highly active methanolic fraction (20 g) was subjected to silica gel column chromatography (Cosmosil C₁₈-OPN, 75 µm, 6.0 cm i.d. x 40 cm) and eluted with MeOH of increasing polarities with water (5 to 100% MeOH). The volume of each collected fraction was 100 ml to give 6 fractions (A, B, C, D, E, and F). High antioxidant activity was found in fraction C, D and E. The highly active fraction C (1.0 g) was re-chromatographed over a Sephadex LH-20 column (2.5 cm i.d. x 100

cm) with MeOH, acetone:MeOH (1:1) and acetone. The most active fraction obtained (48.8mg) was then subjected to silica gel column chromatography (Silica gel 60, 230-400 mesh, 1.0 cm i.d. x 20 cm) and eluted with *n*-hexane:EtOAc, EtOAc, EtOAc:acetone, acetone and MeOH to yield compound **1** (14.9 mg) from *n*-hexane:EtOAc (3:7) fraction.

Fraction D (1.804 g) was chromatographed over Toyopearl HW-40C (1.0 i.d.x70 cm) with aqueous MeOH (5, 10, 20, 30, 50, 70, and 100%) and 70% aqueous acetone. The 10% MeOH eluate (61.90 mg) was separated to Cosmosil 75µm C18-OPN (1.0 i.d.x20 cm) and eluted with 5, 15, 25, 50, and 100% MeOH to yield compound **2** (4.0 mg).

Fraction E (1.133 g) was chromatographed over Cosmosil 75µm C18-OPN (2.3 i.d.x13 cm) and eluted with 20, 30, 40, 50, and 100% ethanol. The 30% ethanol eluate (691.30 mg) was re-chromatographed over Cosmosil 75 µm C18-OPN (2.0 i.d.x12 cm) and eluted with 25, 50, 75, and 100% ethanol. The 50% ethanol eluate (567.50 mg) was subjected to column chromatography over MCI-gel (1.0 i.d x 53 cm) with 30, 40, 50, 60, and 100% MeOH to give four factions. The second fraction (231 mg) was re-chromatographed over Toyopearl HW-40C and eluted with 50, 53, 55, 57, 60, and 100% MeOH and 70% acetone to yield compound **3** (33.7 mg).

Free Radical-Scavenging Activity Assay

DPPH radical scavenging is considered a good in vitro model and is widely used to conveniently assess antioxidant efficacy. In its radical form, DPPH free radical has

an absorbance at 515 nm which disappears when DPPH is reduced by an antioxidant compound or a radical species to become a stable diamagnetic molecule. As a result, the color changes from purple to yellow [9]. This color change is taken as an indication of the hydrogen donating ability of the tested compounds.

The DPPH radical scavenging activity of the samples was estimated according to the methods of Brand-Williams et al., 1995 [9] and Gamez et al., 1998 [10] with some modification. Samples in MeOH (100 μ l) were added to a solution of DPPH radical in MeOH (200 μ M, 100 μ l), and the reaction mixture was left to stand for 30 min at room temperature in the dark. The scavenging activity of samples was estimated by measuring the absorption of the mixture at 515 nm, which reflects the amount of DPPH radical remaining in the solution. The scavenging activity was expressed as the IC₅₀, the concentration of samples required for scavenging 50% of DPPH radical in the solution.

Results and Discussion

Phenolic compounds are the major group that contributes to the antioxidant activity of vegetables, fruits, cereals and other plant based materials. In our previous work, different solvents were used for the extraction of phenolic compounds from guava leaves and we have reported [7] that a methanol extract gave high antioxidant activities from 24 samples of plant species commonly found in Thailand. Therefore, in the present study, the bioactive compounds from guava leaves were isolated and the chemical structures were identified.

The dried leaves of *P. guajava* were extracted sequentially with *n*-hexane, EtOAc, *n*-butanol and MeOH in order to identify the fraction with the highest antioxidant activity. As reported previously, the methanolic fraction gave the highest scavenging activity. The methanolic fraction was then fractionated and purified according to the antioxidant test. The active purified principles were analyzed for their chemical structures by IR, ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, MS analyses and in comparison with the data of authentic quercetin [10-12], morin [13] and quercetin-3-*O*-glucopyranoside [14-15]. Results revealed the three active principles as compound 1, compound 2, and compound 3 as follows.

Compound 1 was obtained as a pale yellow powder of melting point 300°C (decomposed) and EI-MS m/z : 302 $[\text{M}]^+$. IR absorption band at 3293.82, 1616.06, 1511.92 and 1166.72 were consistent with the presence of hydroxyl, carbonyl, aromatic ring and ether groups respectively. The proton and carbon NMR of this compound were shown in Fig 1 and 2, respectively. The ^1H -NMR (400MHz, CD_3OD): δ 6.17 (1H, s, H-6), 6.37 (1H, s, H-8), 6.86 (1H, d, $J=8.4$, H-5'), 7.62 (1H, d, $J=8.6$, H-6'), 7.72 (1H, s, H-2'). The ^{13}C -NMR (100MHz, CD_3OD): δ 94.58 (C-8), 99.41 (C-6), 104.69 (C-10), 116.18 (C-2'), 116.39 (C-5'), 121.85 (C-6'), 124.32 (C-1'), 137.37 (C-3), 146.38 (C-3'), 148.19 (C-4'), 148.93 (C-2), 158.41 (C-9), 162.67 (C-5), 165.72 (C-7), 177.50 (C-4). From these results, compound 1 was considered quercetin and its chemical structure is shown in Fig 3.

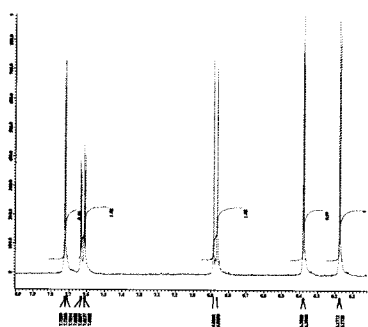


Fig. 1 ^1H NMR spectrum of compound 1

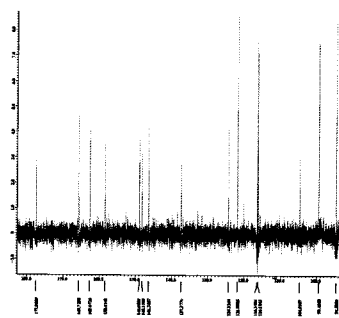


Fig. 2 ^{13}C NMR spectrum of compound 1

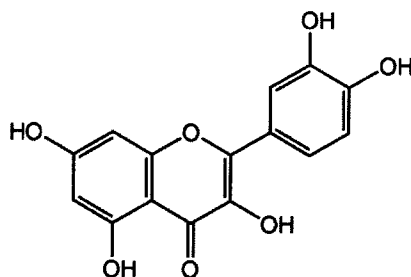


Fig. 3 Chemical structure of compound 1

Compound **2** was obtained as a yellow powder of melting point 300°C (decomposed) and EI-MS m/z : 302 $[\text{M}]^+$. IR absorption bands at 3484.74, 1604.48, 15263.15, 1052.94. were consistent with the presence of hydroxyl, carbonyl, aromatic ring and ether groups respectively. The proton and carbon NMR of this compound were shown in Fig 4 and 5, respectively. The ^1H -NMR (400MHz, CD_3OD): δ 6.19 (1H, s, H-6), 6.39 (1H, s, H-8), 6.87 (1H, d, H-5'), 7.63 (1H, d, H-6'), 7.68 (1H, s, H-3'). The

^{13}C -NMR (100MHz, CD_3OD): δ 93.41 (C-8), 98.58 (C-6), 104.46 (C-10), 114.90 (C-3'), 115.84 (C-5'), 121.78 (C-6'), 121.94 (C-1'), 132.10 (C-3), 144.73 (C-2), 148.73 (C-4'), 157.02 (C-9), 158.02 (C-2'), 161.80 (C-5), 164.71 (C-7), 177.96 (C-4). From these results, compound 2 was considered morin and its chemical structure is shown in Fig 6.

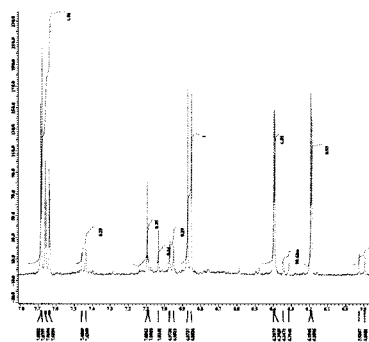


Fig. 4 ^1H NMR spectrum of compound 2

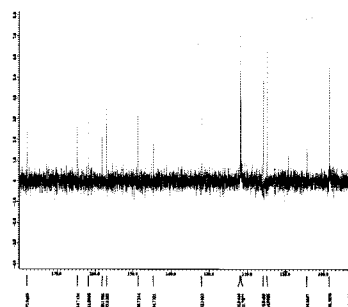


Fig. 5 ^{13}C NMR spectrum of compound 2

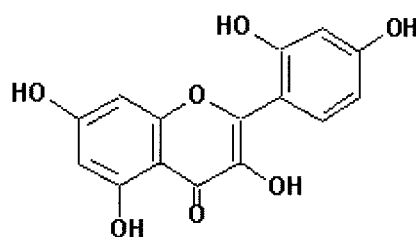


Fig. 6 Chemical structure of compound 2

Compound **3** was obtained as a yellow powder. It showed melting point at 220-225 °C and EI-MS m/z : 464 $[M]^+$. IR absorption bands at 3739.30, 1648.84, 1562.06, 1492.63, 1295.93, 1054.87, 622.89 were consistent with the presence of hydroxyl, carbonyl, aromatic ring and ether groups respectively. The proton and carbon NMR of this compound were shown in Fig 7 and 8, respectively. The ^1H -NMR (600MHz, CD_3OD): δ 3.42 (1H, t, 8.7, H-5''), 3.48 (1H, m, H-3''), 3.54 (1H, m, H-6a''), 3.55 (1H, m, H-2''), 3.64 (1H, d, H-6b''), 3.85 (1H, m, H-4''), 5.09 (1H, d, 7.70, H-1''), 6.13 (1H, d, 2.0, H-6), 6.30 (1H, d, 2.0, H-8), 6.86 (1H, d, 8.5, H-5'), 7.58 (1H, dd, 8.5, H-6'), 7.83 (1H, d, 2.2, H-2'). The ^{13}C -NMR (150MHz, CD_3OD): δ 60.59 (C-6''), 68.68 (C-4''), 73.85 (C-2''), 75.82 (C-3''), 77.02 (C-5''), 94.26 (C-8), 99.85 (C-6), 103.18 (C-1''), 104.36 (C-10), 114.78 (C-5'), 116.34 (C-2'), 121.53 (C-6'), 121.79 (C-1'), 134.40 (C-3), 144.52 (C-3'), 148.68 (C-4'), 156.44 (C-2), 157.40 (C-9), 161.44 (C-5), 165.50 (C-7), 177.70 (C-4). From these results, compound **3** was considered quercetin-3-O-glucopyranoside and its chemical structure is shown in Fig 9.

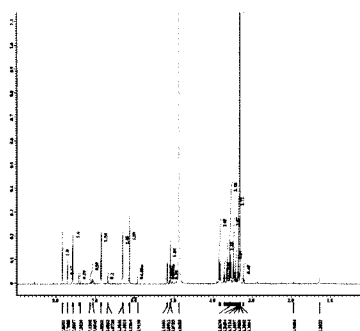


Fig. 7 ^1H NMR spectrum of compound **3**

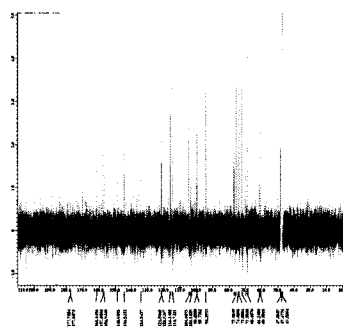


Fig. 8 ^{13}C NMR spectrum of compound **3**

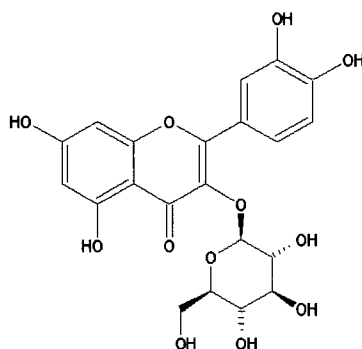


Fig. 9 Chemical structure of compound 3

Many attempts have been reported in the literature to delineate the structure-activity relationship underlying the natural antioxidant activity of certain phenolic compounds. This may involve the neutralization of free radicals initiating oxidation processes, or the termination of radical chain reactions, due to their hydrogen donating ability [16]. In this study, the comparative biological activity of three compounds isolated from guava leaves was evaluated as their antioxidant capacity to scavenge DPPH free radicals. It was found that all three isolated principles, quercetin, quercetin-3-O-glucopyranoside and morin had antioxidant activity but at different levels as shown in Fig 10 with the IC_{50} of 1.20 ± 0.02 , 3.58 ± 0.05 and 5.41 ± 0.20 $\mu\text{g/ml}$, respectively. It was clearly seen that quercetin is the most active principle in Thai guava leaves, followed by quercetin-3-O-glucopyranoside and morin, respectively. This result could be explained by the higher antioxidant activity being related to the greater number of hydroxyl groups on the flavonoid nucleus. The antioxidant activity of flavonoids was considered dependent on the presence of ortho

phenolic functions [17]. This finding is in accordance with the results reported by Bors et al., 1990 [18] and confirms that the *O*-dihydroxybenzene (catechol) structure is an important feature for enhanced radical-scavenging activity.

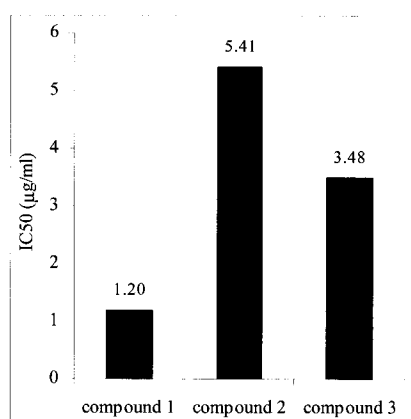


Fig. 10 The IC₅₀ value (µg/ml) for the isolated compounds

Conclusion

The methanolic extract of Thai guava leaves has high antioxidant activity. The active principles isolated from the methanolic extracts are three flavonoids with different levels of antioxidant power. The structure elucidation study reveals that the three active principles are quercetin, quercetin-3-*O*-glucopyranoside and morin

Acknowledgement

The authors are grateful for the financial support of the RGJ Grant and the DBR-MC Grant awarded by the Thailand Research Fund.

References

- [1] Halliwell B, Gutteridge JMC.
Free Radicals in Biology and Medicine.
Oxford University press, Oxford: UK, 2003.
- [2] Patel RP, Moellering D, Murphy-Ullrich J, Jo H, Beckman JS, Darley-Usmar VM.
Cell Signaling by Reactive Nitrogen and Oxygen Species in Atherosclerosis.
Free Radical Biology and Medicine 2000; 28 (12): 1780-1794.
- [3] Emerit I.
Reactive Oxygen Species, Chromosome Mutation, and Cancer: Possible Role of Clastogenic Factors in Carcinogenesis.
Free Radical & Medicine 1994; 16: 99-109.
- [4] Hipkiss AR.
Accumulation of Altered Proteins and Ageing: Cause and Effects.
Experimental Gerontology 2006; 41: 464-473.
- [5] Okonogi S, Duangrat C, Anuchpreeda S, Tachakittirungrod S, Chowwanapoonpohn S.
Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels.
Food Chemistry 2007; 103(3): 839-846.
- [6] Prakash P, Russel RM, Krinsky NI.
In Vitro Inhibition of Proliferation of Estrogen-Dependent and Estrogen-Independent Human Breast Cancer Cells Treated with Carotenoids or Retinoids.
Journal of Nutrition 2001; 131: 1574–1580.
- [7] Tachakittirungrod S, Okonogi S, Chowwanapoonpohn S.
Study on Antioxidant Activity of Certain Plants in Thailand: Mechanism of Antioxidant Action of Guava Leaf Extract.
Food Chemistry 2007; 103: 381-388.
- [8] Lutterodt G.D
Inhibition of Gastrointestinal Release of Acetylcholine by Quercetin as a Possible Mode of Action of *Psidium Guajava* Leaf Extracts in the Treatment of Acute Diarrhoeal Disease.
Journal of Ethnopharmacology 1989; 25: 235-247.

- [9] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C.
Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.
Food Science and Technology 1995; 28(1): 25-30.
- [10] Gamez EJC, Luyengi L, Lee SK, Zhu LF, Zhou BN, Fong HHS, Pezzuto JM, Kinghorn, A.D.
Antioxidant Flavonoid Glycosides from *Daphniphyllum Calycinum*.
Journal of Natural Products 1995; 61(5): 706-708.
- [11] Arima H, Danno G.
Isolation of Antimicrobial Compounds from Guava (*Psidium guajava* L.) and their Structural Elucidation.
Biosci. Biotechnol. Biochem 2002; 66 (8): 1727-1730.
- [12] Ternai B, Markham KR.
Carbon-13 NMR Studies of Flavonoids-I Flavones and Flavonols.
Tetrahedron 1976; 32: 565-569.
- [13] Markham KR, Ternai B, Stanley R, Geiger H, Mabry TJ.
Carbon-13 NMR studies of Flavonoids-III Naturally Occurring Flavonoid Glycosides and their Acylated Derivatives.
Tetrahedron 1978; 34: 1389-1397.
- [14] Slimestad R, Torskangerpoll K, Nateland HS, Johannessen T, Giske NH.
Flavonoids from Black Chokeberries., *Aronia Melanocarpa*.
Journal of Food Composition and Analysis 2005; 18: 61-68.
- [15] Baumann J, Wurn G, Bruchalausen FV.
Prostaglandin Synthetase Inhibiting O₂-Radical Scavenging Properties of Some Flavonoids and Related Phenolic Compounds.
Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 1979; 308: R27.
- [16] Cao G, Sofic E, Prior RL.
Antioxidant and Prooxidant Behaviour of Flavonoids: Structure-Activity Relationships.
Free Radical Biology and Medicine 1997; 22: 749-760.

- [17] Foti M, Piattelli M, Baratta MT, Ruberto G.
Flavonoids, Coumarins, and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure-Activity Relationship.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 1996; 44: 497-501.
- [18] Bors W, Heller W, Michel C, Saran M.
Flavonoids as Antioxidants: Determination of Radical-Scavenging Efficiencies.
In L. Packer (Ed.), Methods in Enzymology. Vol. 335.
San Diego, CA: Academic Press, 1990: 343-355.

Received September 15th, 2007
Accepted November 10th, 2007

ภาคผนวก - ข

Reprint

เรื่อง

Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand:

Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract



Volume 103, issue 3, 2007

ISSN: 0308-8146

FOOD CHEMISTRY

Managing Editor

G.G. Birch

Editors

P.M. Finglas

J.P. Roozen

F. Shahidi

Available online at

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

This article was originally published in a journal published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels

Siriporn Okonogi^{a,*}, Chadarat Duangrat^a, Songyot Anuchpreeda^b,
Suganya Tachakittirungrod^a, Sombat Chowwanapoonpohn^a

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^b Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Received 5 May 2006; received in revised form 3 July 2006; accepted 18 September 2006

Abstract

This work was undertaken to explore the potential of fruit waste materials as sources of powerful natural antioxidants. The peels of eight kinds of fruits commonly consumed and grown in Thailand were used. The ethanolic fruit peel extracts were subjected to the scavenging tests of DPPH and ABTS radicals. Results from both assays were in good agreement that the top three markedly high free radical-scavenging power was from the peel extracts of *Punica granatum* (pomegranate), *Nephelium lappaceum* (rambutan), and *Garcinia mangostana* (mangosteen). The IC₅₀ values to quench the DPPH free radicals of these three extracts were 0.003, 0.006, and 0.023 mg/ml and the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values from ABTS assay were 4.066, 3.074, and 3.001 mM/mg, respectively. The extract of mangosteen peel showed moderate toxicity to Caco-2 cells and high toxicity to peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with the IC₅₀ values of 32.0 and 4.9 µg/ml, respectively. Pomegranate peel extract stimulated Caco-2 cell and PBMC proliferation with the ED₅₀ of 4.7 and 44.4 µg/ml, respectively. Peel extract of rambutan exhibited extremely high value of IC₅₀ (>100 µg/ml) against both cell types indicating non-toxic activity to the cells. It was concluded that the peel of rambutan may be considered potentially useful as a source of natural antioxidants for food or drug product because of its high antioxidant activity and non-toxic property to normal cells.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Pomegranate; Rambutan; Mangosteen; Antioxidant; Cytotoxicity; ABTS; DPPH; Caco-2; PBMC

1. Introduction

In the past, many synthetic antioxidants have been popularly used in food and pharmaceutical formulations. Recently, the demand for natural antioxidants has increased, due to consumer concerns about the safety of synthetic antioxidants (Hudson, 1990; Shahidi, 1997). Among various plants, fruit is important as a natural antioxidant source. The antioxidant activity in fruits is notable since fruits are rich in compounds that have an important role in free radical-scavenging activity. Those compounds are polyphenols, such as flavonoids, tannins, and catechins

(Macheix, Fleuriet, & Billot, 1990). Moreover, fruits contain many vitamins, which express antioxidant activity, e.g. vitamin C, vitamin E, and β-carotene (Paul & Southgate, 1978; Hernandez, Lobo, & Gonzalez, 2006). The antioxidant activity in fruits varies among species and cultivars (Award, de Jager, van der Plas, & van der Krol, 2001; Kondo, Jitratham, Kittikorn, & Kanlayanarat, 2004). The diverse antioxidant compounds present in fruits are responsible for the high antioxidant capacity. Many experiments have reported the antioxidant activity of fruit juice and fruit pulp from edible fruits (Mokbel & Hashinaga, 2006; Valcheva-Kuzmanova, Borisova, Galunska, Krasnaliyev, & Belcheva, 2004; Bub et al., 2003). However, there is a little information on the antioxidant activity in fruit peels.

* Corresponding author. Tel.: +66 53 944 311; fax: +66 53 278 708.
E-mail address: sirioko@chiangmai.ac.th (S. Okonogi).

Peels are often the waste part of various fruits. These wastes have not generally received much attention with a view to being used or recycled rather than discharged. This might be due to their lack of commercial application (Soong & Barlow, 2004). Interestingly, the peel and seed fractions of some fruits have higher antioxidant activity than the pulp fractions (Jayaprakasha, Sigh, & Sakariah, 2001). For example, pomegranate peel has a higher antioxidant activity than its pulp (Li et al., 2006). Apple fruit peel was reported to be acclimatised to the prevailing light exposure within the tree canopy to meet the respective needs for dissipating excess absorbed photon flux density and detoxifying reactive oxygen free radical species (Ma & Cheng, 2003). Grape seed is higher than its pulp in antioxidant capacity and is a rich source of proanthocyanidin, which is very effective in scavenging various reactive oxygen free radical species (Guo et al., 2003).

Thailand has a diversity of edible fruits. However, only some of them are popularly consumed. Due to the high consumption of their edible parts, their peels (as waste products) have been discharged, causing a severe problem in the community as they gradually ferment and release off odours. As part of our ongoing research on antioxidants from natural resources, the peels of popular fruits, namely mangosteen, rambutan, banana, pomegranate, coconut, long-gong, passion fruit and dragon fruit, were selected for study. All are grown in Thailand. The edible parts of some of these fruits, e.g. pomegranate and mangosteen, have been reported to have high antioxidant activity (Gil, Tomas-Barberan, Hess-Pierce, Holcroft, & Kader, 2000; Schubert, Lansky, & Neeman, 1999; Williams, Ongsakul, Proudfoot, Croft, & Bellin, 1995). However, research on the antioxidant activity of the peels from such popular fruits has been scarce. Moreover, the cytotoxicity, particularly to normal cells of those peels, has not yet been reported. The aim of this study was to investigate and compare the antioxidant activity and cytotoxicity of fruit peels commonly consumed and grown in Thailand in order to search for a powerful non-toxic antioxidant source among them.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Fruits

Eight species of fruits most commonly consumed and grown in Thailand were purchased from a local grocery store. They were coconut (*Cocos nucifera*), mangosteen (*Garcinia mangostana*), dragon fruit (*Hylocereus undatus*), long-gong (*Lansium domesticum*), banana (*Musa sapientum*), rambutan (*Nephelium lappaceum*), passion fruit (*Passiflora foetida*) and pomegranate (*Punica granatum*).

2.1.2. Chemicals

Trolox, potassium persulfate, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic

acid) diammonium salt (ABTS), dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), non-essential amino acid (NEAA), and Histopaque®-1077 were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), RPMI 1640, trypsin–EDTA, and penicillin–streptomycin were from GIBCO™ Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Biochrom AG (Berlin, Germany) and ethanol from Fluka Chemicals (Buchs, Switzerland). All other chemicals were of the highest grade available.

2.2. Sample preparation

The dried fruit peels were ground into fine powder and extracted with 95% ethanol for three days, thrice, at room temperature. The filtrates were pooled and concentrated by rotary evaporator at 45 °C. The obtained semisolid extracts were kept in a desiccator at 4 °C until further used.

2.3. Antioxidant activity

2.3.1. DPPH method

The scavenging activity on DPPH radical of all fruit peel extracts was determined by modifying the methods of Gamez et al. (1998) and Brand-Williams et al. (1995). The extracts were mixed with ethanol to prepare an ethanolic test solution of different concentrations (0.1–1.0 mg/ml). DPPH was dissolved in ethanol and mixed with a certain amount of the ethanolic test solution. The solution was adjusted to a final DPPH concentration of 100 µM. The mixture was shaken vigorously and left to stand for 30 min in the dark at room temperature. The amount of DPPH remaining in each period of stand was determined spectrophotometrically at 540 nm using a microtitre plate reader. All measurement was performed in triplicate. The radical-scavenging activity was calculated as % inhibition from the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{OD}_{\text{blank}} - \text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{blank}}} \times 100$$

2.3.2. ABTS method

The pre-formed radical monocation of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) was generated according to the modified method of Re et al. (1999) by oxidation of ABTS solution (7 mM) with 2.45 mM potassium persulfate (K₂S₂O₈). The mixture was allowed to stand for 12 h in the dark at room temperature. The ABTS solution was diluted with ethanol to the absorbance of 0.7 ± 0.2 at 750 nm. Series of extract solutions were prepared by dissolving in ethanol to yield a concentration of 1 mg/ml. An aliquot of 20 µl of each ethanolic solution was added to 180 µl of ABTS^{•+} radical cation solution. The absorbance was monitored spectrophotometrically at 750 nm for 60 min by using a microtitre plate reader. All measurements were performed in triplicate. The antioxi-

dant activity of each sample was expressed as trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), which obtained by comparing the absorbance change at 750 nm in a reaction mixture containing a sample of plant extract with that containing trolox. This index is defined as the millimolar concentration of a trolox solution whose antioxidant capacity is equivalent to 1.0 mg of the extract (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald, & Robards, 2002).

2.4. Cytotoxicity

2.4.1. Caco-2 cell culture

The Caco-2 cells (ATCC, Manassas, VA) were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% non-essential amino acids, 100 U/ml of penicillin, and 0.1 mg/ml of streptomycin in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. The cells were used from passage 64–75. The culture medium was renewed on alternate days. When they had reached confluence, the cells were passaged at a split ratio of one to four by trypsinizing with 0.1% trypsin and 0.02% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS). The cytotoxicity study was performed when the cells grew up to 80–90% confluency and were seeded into the 96-well plates at a density of 8×10^3 cells/well.

2.4.2. Preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Blood samples from healthy volunteers were collected by venipuncture and transferred into 15 ml of heparin-coated test tubes. Blood was diluted at 1:1 ratio with PBS and layered onto Histopaque®-1077 at a volume ratio of 3:1 and centrifuged at 1000g for 30 min. During centrifugation, the PBMCs move from the plasma and are suspended in the density gradient isolating them from erythrocytes and granulocytes. The PBMC layer was removed and then washed twice with PBS. The supernatant was then removed and the cells were resuspended in RPMI1640 culture medium supplemented with 10% FBS, 100 U/ml of penicillin, 0.1 mg/ml of streptomycin and an appropriate amount of sodium bicarbonate. Cell viability was determined by using the trypan-blue dye exclusion method. The cell density of PBMC used in the cytotoxicity study was 1×10^5 cells/well of the 96-well tissue culture plate.

2.4.3. Measurement of cytotoxicity activity

A standard MTT assay (Alley, Scudiero, & Monks, 1988) was performed by plating Caco-2 cells or PBMCs in 96 well plates, in 100 µl of medium per well, and incubating before crude plant extract treatment at 37 °C for 48 h for Caco-2 and 24 h for PBMCs. After the incubation, various concentrations of crude plant extracts (5–100 µg/ml) in a medium (100 µl) were added to the cells and incubated for another 48 h. Each extracted concentration was added into three separated wells. The metabolic activity in each well was determined by the MTT assay and compared with untreated

cells. Briefly, after removal of 100 µl of medium, MTT stock dye solution (5 mg/ml MTT dye in PBS) was added (15 µl/100 µl medium) to each well, and the plate was incubated at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. After 4 h, supernatant was removed, followed by an addition of DMSO (200 µl) to each well and mixed thoroughly to dissolve the dye crystals. The absorbance was measured by using an ELISA plate reader at 570 nm with a reference wavelength of 630 nm. The experiment was done in triplicate. The cell viability was determined by the following formula:

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{Mean absorbance in test wells}}{\text{Mean absorbance in control wells}} \times 100$$

Dose–response curves between percentages of cell viability and concentrations of the extracts were constructed. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀), in the case of cell inhibition, or effective concentration (ED₅₀), in the case of cell stimulation, was determined from the plotted curve.

3. Results and discussion

3.1. The yield of extracts

Table 1 shows the percent yield of tested fruit peel extracts. The highest (10.68%) and lowest (1.40%) yields of extraction were obtained from the peels of rambutan and dragon fruit, respectively.

3.2. Radical-scavenging activity on DPPH

The radical-scavenging activity on DPPH was expressed as IC₅₀. This value was the concentration of the extract required to inhibit 50% of the initial DPPH free radical. The IC₅₀ of all peel extracts is shown in Table 2. Peel extracts of different kinds of fruits possessed obviously different antioxidant activities. The IC₅₀ values ranged from 0.003 to 1.291 mg/ml. The extract of pomegranate peel showed the highest antioxidant activity, with an IC₅₀ of 0.003 mg/ml, followed by the peel extracts of rambutan and mangosteen, with IC₅₀ values of 0.006 and 0.023 mg/ml, respectively. The weakest antioxidant activity was obtained from the extract of long-gong peel with an IC₅₀ of 1.29 mg/ml.

Table 1
Percent yield of extracts from different kinds of fruit peels

Plant name		% Yield
Common name	Scientific name	
Rambutan	<i>Nephelium lappaceum</i>	10.68
Banana	<i>Musa sapientum</i>	7.66
Mangosteen	<i>Garcinia mangostana</i>	7.21
Pomegranate	<i>Punica granatum</i>	6.21
Coconut	<i>Cocos nucifera</i>	5.80
Long-gong	<i>Lansium domesticum</i>	5.71
Passion fruit	<i>Passiflora foetida</i>	2.60
Dragon fruit	<i>Hylocereus undatus</i>	1.40

Table 2
IC₅₀ values of fruit peel extracts by DPPH radical method

Plant name		IC ₅₀ (mg/ml) ^a
Common name	Scientific name	
Pomegranate	<i>Punica granatum</i>	0.003 ± 0.002
Rambutan	<i>Nephelium lappaceum</i>	0.006 ± 0.003
Mangosteen	<i>Garcinia mangostana</i>	0.023 ± 0.007
Banana	<i>Musa sapientum</i>	0.031 ± 0.004
Coconut	<i>Cocos nucifera</i>	0.047 ± 0.005
Dragon fruit	<i>Hylocereus undatus</i>	0.084 ± 0.016
Passion fruit	<i>Passiflora foetida</i>	0.104 ± 0.014
Long-gong	<i>Lansium domesticum</i>	1.29 ± 0.001

^a Mean ± SD (n = 3).

3.3. Radical-scavenging activity on ABTS

The ABTS free radical assay can be used to measure the antioxidant activity of a broad diversity of substances, e.g., both aqueous phase radicals and lipid peroxy radicals (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996; Robert et al., 1999). In this experiment, the ABTS method was used to confirm the results from the DPPH test since it is based on a similar antioxidant mechanism and the extracts used in both tests were ethanol-soluble. The scavenging activity of the extracts on free radical ABTS, generated by potassium persulfate was compared with a standard amount of trolox. The result, calculated as trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), is shown in Table 3. All fruit peel extracts possessed the free radical-scavenging property but in different degrees. The TEAC values ranged widely from 0.207 to 4.07 mM/mg. The extract of pomegranate peel exhibited the highest TEAC value of 4.07 mM/mg, followed by that of rambutan and mangosteen with TEAC values of 3.07 and 3.00 mM/mg. The lowest TEAC value, which indicated the weakest antioxidant activity, was obtained from long-gong peel extract. This was in good agreement with that of the DPPH assay. The relationship between TEAC values and IC₅₀ of the samples was non-linear, as shown in Fig. 1. However, the plot of logarithmic values of IC₅₀ against TEAC gave good linearity with $R^2 = 0.9167$, as shown in Fig. 2, indicating similar trends in the free radical- and hydroxyl radical-scavenging activities.

Regarding these results, it could be considered that the peel extracts of pomegranate, mangosteen, and rambutan contained strong antioxidative agent(s), and pomegranate

Table 3
TEAC values of fruit peel extracts

Plant name		TEAC (mM/mg) ^a
Common name	Scientific name	
Pomegranate	<i>Punica granatum</i>	4.59 ± 0.009
Rambutan	<i>Nephelium lappaceum</i>	3.07 ± 0.003
Mangosteen	<i>Garcinia mangostana</i>	3.00 ± 0.016
Banana	<i>Musa sapientum</i>	1.80 ± 0.038
Coconut	<i>Cocos nucifera</i>	1.53 ± 0.044
Dragon fruit	<i>Hylocereus undatus</i>	0.685 ± 0.001
Passion fruit	<i>Passiflora foetida</i>	0.591 ± 0.008
Long-gong	<i>Lansium domesticum</i>	0.207 ± 0.002

^a Mean ± SD (n = 3).

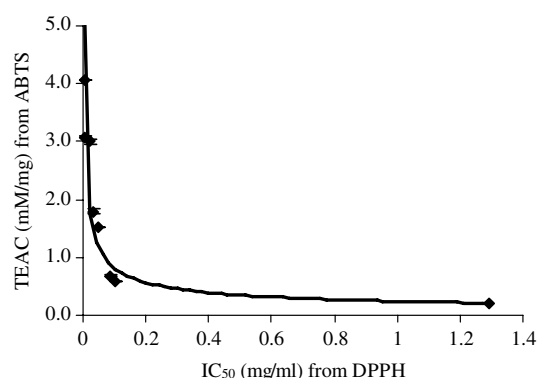


Fig. 1. Correlation of antioxidant activity of fruit peel extract from DPPH (IC₅₀) and ABTS (TEAC) assay.

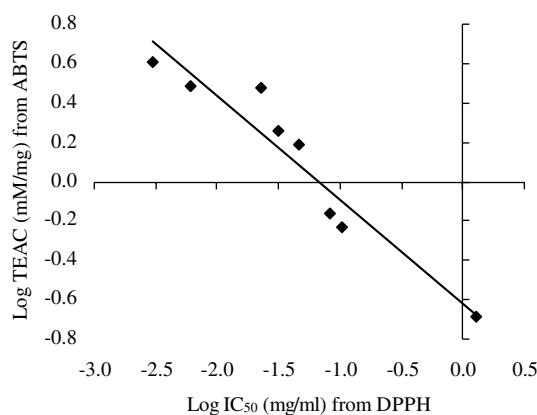


Fig. 2. The linear relationship of logarithmic values of IC₅₀ and TEAC.

had the highest potential. However, the utilization of these extracts as antioxidative resources should not be introduced unless their safety has been sufficiently proven. Pomegranate fruit was reported to have high antioxidant activity (Gil et al., 2000; Schubert et al., 1999). The peel of this fruit had recently been reported to have higher antioxidant activity than its pulp and seed (Li et al., 2006). However, Ferrara, Schettino, Forgione, Rullo, and Di Gennaro (1989) reported that some galenic preparations of pomegranate were toxic because of their alkaloid contents. There were some reports of immunological disturbance after consumption of pomegranate fruit (Igea et al., 1991; Gaig et al., 1992). Vidal et al. (2003) revealed possible toxic effects of *P. granatum* extracts in view of their anti-influenza activity. It was shown that toxic effects of *P. granatum* fruit extract occurred at higher doses than those effective in the models where its anti-viral activity had been studied. Therefore, study of cytotoxicity, particularly against normal cells, should be considered as a need before the active agent from these extracts can be generally utilized.

3.4. The cytotoxicity test

The Caco-2 cell line and PBMC were used for the cytotoxicity test in this study. The Caco-2 cell line is derived

from a human colon adenoma and has been used routinely in drug absorption screening, because the Caco-2 monolayer displays several features of the small intestinal epithelial barrier (Hillgren, Kato, & Borchardt, 1995). The cytotoxicity against the Caco-2 cell line could provide preliminary information for study of toxicity on the normal intestinal cell type and for the selection of appropriate concentrations required in a future permeability study of active components. The potential toxicity of the extract on normal cells was assessed by the cytotoxicity test against human PBMC. Many studies had utilized the PBMC to

assess the effects of chemicals or extracts on the proliferation of normal cells (Anazetti, Melo, Duran, & Haun, 2003; Liu et al., 2004). Figs. 3 and 4 demonstrate the dose–response curve of the fruit peel extracts against Caco-2 cell line and PBMC, respectively. From these curves, inhibition or stimulation of the cells could be observed. The IC_{50} was obtained when the activity was inhibition whereas the ED_{50} was obtained when the activity was stimulation. The cytotoxicity against Caco-2 cell line and human PBMC of all tested fruit peel extracts is summarized and shown in Table 4. The results show that most

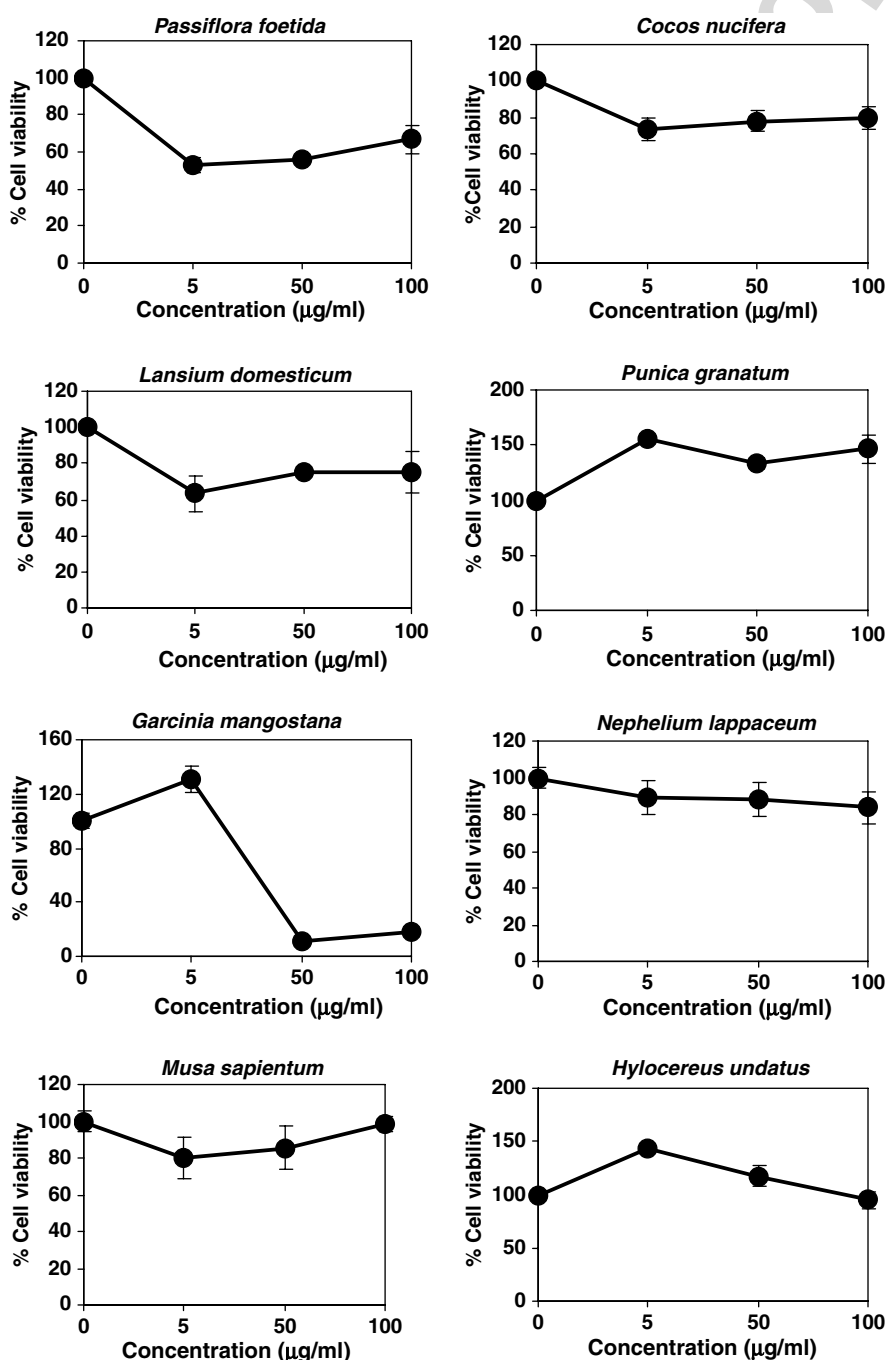


Fig. 3. Effect of the extracts on Caco-2 cells. Cells were grown in the presence of various concentrations of the plant extracts. The number of viable cells was determined by MTT assay in triplicate.

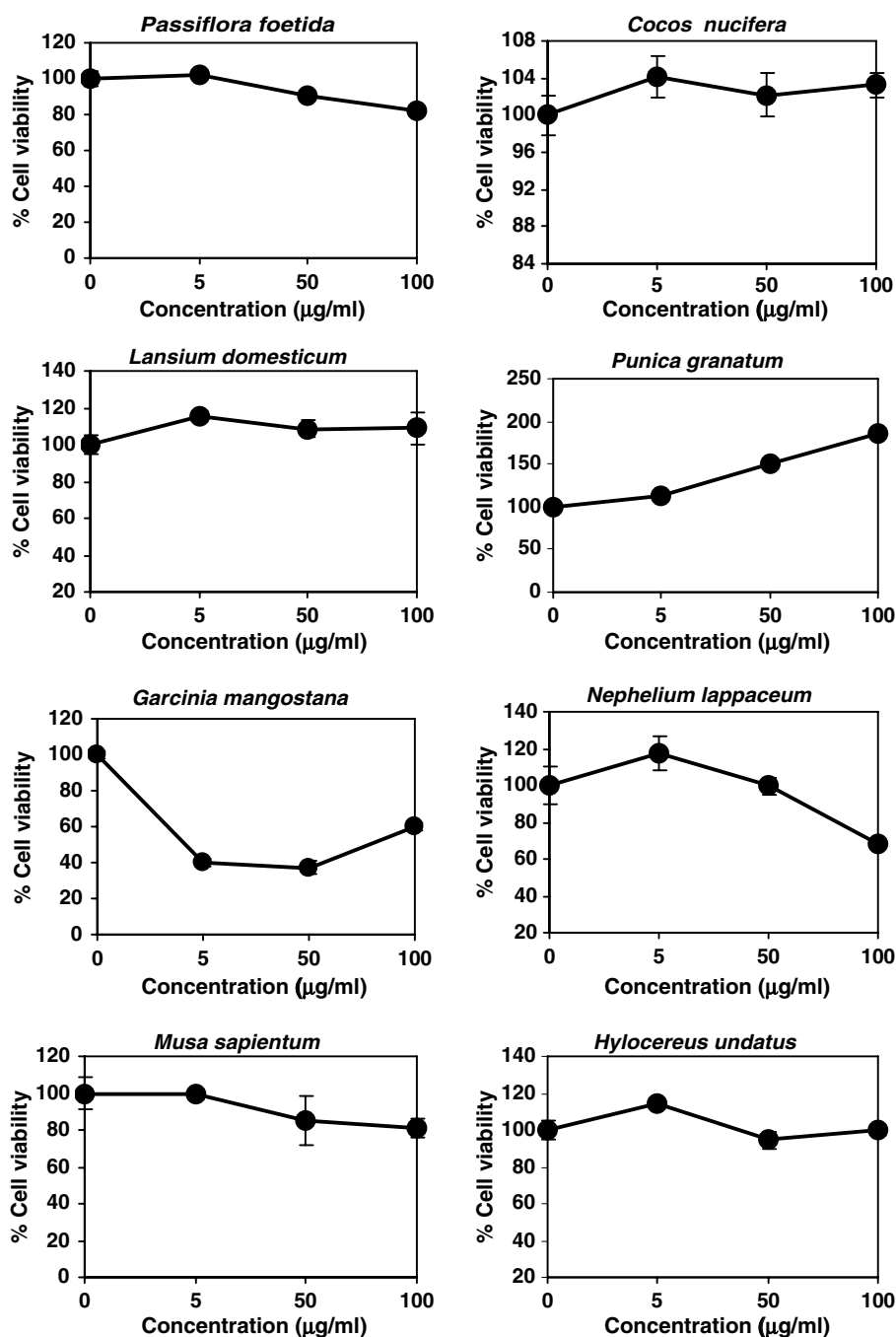


Fig. 4. Effect of the extracts on PBMC. Cells were grown in the presence of various concentrations of the plant extracts. The number of viable cells was determined by MTT assay in triplicate.

of the fruit peel extracts included in this study had no cytotoxic activity against either cell type, except those from mangosteen and pomegranate peels. This mangosteen peel extract exhibited potential toxicity against Caco-2 cells and PBMC with the IC_{50} values of 32.0 and 4.9 $\mu\text{g/ml}$, respectively. This indicated that the extract of mangosteen peel contained potential cytotoxic agent(s). Therefore, further purification to eliminate the toxic agent(s) might be beneficial for products containing the extract of the mangosteen peel. The extract of pomegranate peel showed stimulation

of cell proliferation in both Caco-2 cells and PBMC with the ED_{50} values of 4.7 and 44.4 $\mu\text{g/ml}$, respectively. This suggested that the application of this extract, as a natural antioxidant in a food or drug for humans, should be treated with caution. Among the three extracts which possessed high antioxidative activity, rambutan peel extract exhibited the highest value of IC_{50} (>100 $\mu\text{g/ml}$) against both cell types, indicating its mild activity to the cells. According to the standard National Cancer Institute criteria (Chen et al., 1988; Geran, Greenberg, Macdonald, Schumacher,

Table 4
Cytotoxic activities of the studied extracts against Caco-2 cell line and PBMC

Plant name	Cell Types	
	Caco-2	PBMC
<i>Punica granatum</i>	Stimulate ^a	Stimulate ^b
<i>Nephelium lappaceum</i>	Inactive	Inactive
<i>Garcinia mangostana</i>	Inhibit ^c	Inhibit ^d
<i>Musa sapientum</i>	Inactive	Inactive
<i>Cocos nucifera</i>	Inactive	Inactive
<i>Hylocereus undatus</i>	Inactive	Inactive
<i>Passiflora foetida</i>	Inactive	Inactive
<i>Lansium domesticum</i>	Inactive	Inactive

^a ED₅₀ = 4.7 µg/ml.

^b ED₅₀ = 44.4 µg/ml.

^c IC₅₀ = 32.0 µg/ml.

^d IC₅₀ = 4.9 µg/ml.

& Abbott, 1972), rambutan peel extract could be classified as non-toxic to normal human cells. It could be used as a natural source of antioxidant or even as a cancer-preventive agent since antioxidative agents are usually found to possess cancer-prevention activity. A good cancer-preventive agent should show inhibitory activity toward cancer cell growth, but not cause serious damage to human PBMC. Anazetti et al. (2003) studied dehydrochrotonin (DHC) which is a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara* (Sacaca) and dimethylamide-crotonin (DCR), a DHC derivative. DHC and DCR (up to 400 µM) inhibited HL60 cell growth, but did not cause serious damage to PBMC. In this study, we found that the ethanol extract from rambutan peel expressed high potential antioxidant activity with no toxicity to normal cells. The peel of this fruit will be a promising source of good antioxidative agents or cancer-preventive agents. However, investigation of the activity associated with further purification, the cultivated conditions and the active constituents of this plant may provide useful comparative information in the future.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support of the RGJ Grant and the DBR-MC Grant awarded by the Thailand Research Fund. We also thank Associate Professor N. Piapapolrungronj, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Prathom, Thailand, for kindly providing suggestions in the cell culture technique.

References

- Alley, M. C., Scudiero, D. A., & Monks, A. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, 48, 589–601.
- Anazetti, M. C., Melo, P. S., Duran, N., & Haun, M. (2003). Comparative cytotoxicity dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology*, 188, 261–274.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183–198.

- Award, M., de Jager, A., van der Plas, L. H. W., & van der Krol, A. R. (2001). Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of 'Elstar' and 'Jonagold' apples during development and ripening. *Scientia Horticulturae (Amsterdam, Netherlands)*, 90, 69–83.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- Bub, A., Watzl, B., Blockhaus, M., Briviba, K., Liegible, U., Muller, H., et al. (2003). Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status, and DNA damage. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 14, 90–98.
- Chen, C. F., Hwang, J. M., Lee, W., Chiang, H. C., Lin, J. C., & Chen, H. Y. (1988). Search for antitumor agent for Chinese herbs I. Antitumor screening method. *China Medical Journal (Taipei)*, 41, 177–184.
- Ferrara, L., Schettino, O., Forgione, P., Rullo, V., & Di Gennaro, S. (1989). Identification of the root *Punica granatum* in galenic preparations. *Italiana di Biologia. Sperimentale*, 65, 385–390.
- Gaig, P., Botey, J., Gutierrez, V., Pena, M., Esevenri, J. L., & Marin, A. (1992). Allergy to pomegranate (*Punica granatum*). *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 2, 216–218.
- Gamez, E. J. C., Luyengi, L., Lee, S. K., Zhu, L. F., Zhou, B. N., Fong, H. H. S., et al. (1998). Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum*. *Journal of Natural Products*, 61, 706–708.
- Geran, R. I., Greenberg, N. H., Macdonald, M. M., Schumacher, A. M., & Abbott, B. J. (1972). Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports Part 3*, 3(2), 103–105.
- Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4581–4589.
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., & Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23, 1719–1726.
- Hernandez, Y., Lobo, G. M., & Gonzalez, M. (2006). Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*, 96, 654–664.
- Hillgren, K. M., Kato, A., & Borchardt, R. T. (1995). In vitro systems for studying intestinal drug absorption. *Medicinal Research Reviews*, 15, 83–109.
- Hudson, B. J. F. (1990). *Food antioxidant*. London: Elsevier Applied Science.
- Igea, J. M., Cuesta, J., Cuevas, M., Elias, L. M., Marcos, C., Lazaro, M., et al. (1991). Adverse reaction to pomegranate ingestion. *Allergy*, 46, 472–474.
- Jayaprakasha, G. K., Sigh, R. P., & Sakariah, K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73, 285–290.
- Kondo, S., Jitratham, A., Kittikorn, M., & Kanlayanarat, S. (2004). Relationships between jasmonates and chilling injury in mangosteens, are effected by spermine. *HortScience*, 39, 1346–1348.
- Li, Y. F., Guo, C. J., Yang, J. J., Wei, J. Y., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96, 254–260.
- Liu, C. P., Tsai, W. J., Lin, Y. L., Liao, J. F., Chen, C. F., & Kuo, Y. C. (2004). The extracts from *Nelumbo nucifera* suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *Life Science*, 75, 699–716.
- Ma, F., & Cheng, L. (2003). The sun-exposed peel of apple fruit has higher xanthophyll cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate-glutathione pathway than the shaded peel. *Plant Science*, 165, 819–827.
- Macheix, J. J., Fleuriot, A., & Billot, J. (1990). *Fruits polyphenolics*. Florida: CRC Press.
- Mokbel, M. S., & Hashinaga, F. (2006). Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. *Food Chemistry*, 94, 529–534.

- Paul, A. A., & Southgate, D. A. T. (1978). *McCance and Widdowson's the Composition of Food*. London: Her Majesty's Stationery Office.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Rice-Evans, C., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure–antioxidant activity: activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933–956.
- Robert, R. E., Pellegrini, M., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Schubert, S. Y., Lansky, E. P., & Neeman, I. (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 11–17.
- Shahidi, F. (1997). *Natural antioxidants, chemistry, health effects and applications*. Champaign: AOCS Press.
- Soong, Y. Y., & Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88, 411–417.
- Valcheva-Kuzmanova, S., Borisova, P., Galunska, B., Krasnaliev, I., & Belcheva, A. (2004). Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from Aronia melanocarpa on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 56, 195–201.
- Vidal, A., Fallarero, A., Pena, B. R., Medina, M. E., Gra, B., Rivera, F., et al. (2003). Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 295–300.
- Williams, P., Ongsakul, M., Proudfoot, J., Croft, K., & Bellin, L. (1995). Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. *Free Radical Research*, 23, 175–184.