

การเปรียบเทียบพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยหลายวิธีการ

หนึ่งฤทัย สุพรม¹, ณัฐมน พรหมภักดี², ปราณิ นางงาม³ และ ชนนิษฐ์ ชูพยัคฆ์^{2,4,*}

¹ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

²ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

³ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

⁴สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

*อีเมลผู้ประพันธ์บรรณกิจ: cchoopayak@gmail.com; chonnanitc@nu.ac.th

บทคัดย่อ

พลูเป็นพืชไม้เลื้อย ใช้ส่วนใบรูปหัวใจ มีสรรพคุณทางการแพทย์และฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการ แต่ในปัจจุบันการใช้ประโยชน์พลูในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัดเมื่อเทียบกับคุณค่าที่มีมากมาย เพื่อส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากพลูไทย งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารเคมีระเหยง่ายในสารสกัด โดยได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัด 5 วิธี คือ การกลั่นใบพลูสดด้วยน้ำ และการหมักใบพลูในตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิดที่มีขั้วแตกต่างกัน คือ เอทานอล เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน และ เฮกเซน จากนั้นตรวจสอบสารสกัด หาปริมาณสารฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS และตรวจหาชนิดของสารเคมีระเหยง่ายในสารสกัดด้วยเทคนิค Gas chromatography - Mass Spectrometry ผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการสกัดพบว่า การสกัดด้วยเอทานอลได้ปริมาณสารสกัดสูง (10.78%) ได้สารฟีนอลิกรวมในปริมาณมาก สารสกัด 1 กรัมมีสารเทียบเท่า Gallic acid 99.09 ± 1.17 มก. ที่น่าสนใจคือ ได้ Eugenol acetate และ Allyl-pyrocatechol diacetate ในปริมาณสูง (49.89%, 30.59% ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง ด้วยความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ที่สารสกัด 100 มก. เทียบเท่า Gallic acid 12.5 ± 0.37 มก. และ Trolox 308.97 ± 15.30 μmol ตามลำดับ ในขณะที่การสกัดโดยการกลั่นด้วยน้ำ ได้จำนวนชนิดของสารออกฤทธิ์มากกว่า ที่น่าสนใจคือได้สาร Eugenol ในรูปอิสระ 23.46% Chavicol และ Chavicol acetate ในปริมาณสูง (14.51%) และ β -Caryophyllene (4.21%) ได้ปริมาณฟีนอลิกรวมค่อนข้างสูง น้ำมันพลู 1 กรัม มีสารเทียบเท่า Gallic acid 77.34 ± 4.5 มก. สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ที่สารสกัด 100 มก. เทียบเท่า Gallic acid 8.19 ± 0.14 มก. และ Trolox 187.13 ± 14.20 μmol ตามลำดับ แต่ข้อจำกัดของการกลั่นด้วยน้ำคือได้ปริมาณสารสกัดต่ำมาก (0.37%) ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการสกัดจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้ ซึ่งมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน

คำสำคัญ: พลู; องค์ประกอบทางเคมี; สารประกอบฟีนอลิก; ฟลาโวนอยด์; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; GC-MS

Comparison of Phytochemicals and Antioxidant Activities of *Piper betle* Extracts Derived from Various Extraction Methods

Nungruthai Suphrom¹, Nuttamon Prompakdee², Pranee Nangngam³ and Chonnanit Choopayak^{2,4,*}

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Mueang District, Phitsanulok 65000, Thailand

²Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Mueang District, Phitsanulok 65000, Thailand

³Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Mueang District, Phitsanulok 65000, Thailand

⁴Center of Excellence in Research for Agricultural Biotechnology, Naresuan University, Mueang District, Phitsanulok 65000, Thailand

*Corresponding author's e-mail: cchoopayak@gmail.com; chonnanitc@nu.ac.th

Abstract

Piper betle L. or Plu (in Thai) is a climbing perennial vine. The heart-shape leaf possesses several medicinal and biological properties. Despite its high value, the application still be limited in Thailand. Here, the relation between antioxidant activities and volatile constituents in betel extracts from five different extraction methods, comprising hydrodistillation of fresh leaves, ethanol-, ethyl acetate-, dichloromethane- and hexane maceration of dried leaves. The extracts then were measured for total phenolic content, total flavonoid content, DPPH, ABTS antioxidant activities assay as well as volatile constituent identification using Gas chromatography - Mass spectrometry. The results demonstrated that among five extraction methods, ethanolic extraction obtained high yield of 10.78% and high phenolic content (GAE of 99.09 ± 1.17 mg Gallic acid /g extract). Interestingly, the ethanolic extract contained substantial high amount of Eugenol acetate and Allyl-pyrocatechol 3,4 diacetate as 49.89% and 30.59%, respectively. In addition, the ethanolic extract contained high antioxidant activities of both DPPH (12.5 ± 0.37 mg Gallic acid/100 mg extract) and ABTS assay (308.97 ± 15.30 μ mol Trolox/100 mg extract). Whereas, hydrodistillation retrieved more types of compounds than other methods. Remarkably, free Eugenol (23.46%), Chavicol and Chavicol acetate (14.51%) especially β -Caryophyllene (4.21%) could be detected in betel oil. Moreover, total phenolic content was quite high (77.34 ± 4.5 mg Gallic acid /g extract) in the oil. DPPH and ABTS scavenging activity were 8.19 ± 0.14 mg Gallic acid and 187.13 ± 14.20 μ mol Trolox/100 mg extract, respectively. Unfortunately, the oil yield was dramatically drop to 0.37% from fresh leaves. Because of different characteristics of extraction, the suitable method should be considered prior to application.

Keywords: *Piper betle*; Chemical constituents; Phenolics; Flavonoids; Antioxidant activity; GC-MS

บทนำ

พลู (*Piper betle* L.) เป็นพืชไม้เลื้อย ใบสีเขียวรูปหัวใจ มีกลิ่นหอมฉุน และรสชาติเผ็ดร้อน มนุษย์ใช้ประโยชน์จากใบพลูในหลายด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอดีต พลูมีบทบาทในสังคมไทยเป็นอย่างมาก ทั้งด้านเศรษฐกิจ สังคม วัฒนธรรม สุขภาพและการแพทย์ ใบพลูเป็นส่วนประกอบในการเคี้ยวร่วมกับผลหมากแห้งและปูนแดง ช่วยกระตุ้นร่างกายให้สดชื่น มีแรงทำงาน และปกป้องทางเดินอาหารตั้งแต่ในช่องปากจนถึงระบบย่อยอาหาร จากบันทึกภูมิปัญญาด้านการแพทย์แผนไทย น้ำคั้นใบพลูมีสรรพคุณแก้ท้องอืดเฟ้อ นอกเหนือจากนั้นมีการใช้ทั้งเถาและใบพลูภายนอกร่างกาย แก้อาการฟกช้ำ แก้ผื่นลมพิษ แพ้แมลงสัตว์กัดต่อย รวมถึงสูดดมช่วยให้ทางเดินหายใจสะดวก แก้อหวนต์จมูก (ชนนิษฐา ชูพยัคฆ์, 2566) ในปัจจุบันมีการขึ้นทะเบียนพลูในบัญชียาหลักแห่งชาติ กล่าวถึงทั้งเถาและใบพลูสำหรับบรรเทาอาการผื่นแพ้ที่ผิวหนัง เป็นต้น พบว่าสารสกัดใบพลูมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการ (Biswas et al., 2022; Nayaka et al., 2021) โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Lubis et al., 2020; ปราณี นางงาม และคณะ, 2565) ต้านเชื้อรา และ ปรสิต (Kaypetch & Thaweboon, 2018; Leesombun et al., 2017; Leesombun et al., 2016) ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ และปกป้องระบบประสาท (Karak et al., 2018; Samar et al., 2018) เป็นต้น

สรรพคุณของใบพลู และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบพลู ได้มาจากสารเคมีองค์ประกอบ พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในใบพลู ส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ระเหยง่าย ทำให้ใบพลูมีกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ โดยสารอินทรีย์ระเหยง่ายที่พบเป็นปริมาณมากในใบพลูและสารสกัดพลู ประกอบด้วย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ ได้แก่ Eugenol, Allyl-pyrocatechol, Chavicol และอนุพันธ์ เป็นต้น สารอีกกลุ่ม คือ เซสควิเทอร์พีน ได้แก่ β -Caryophyllene และ Germacrene พบว่าพลูจากพื้นที่ต่างกัน สายพันธุ์ต่างกัน มีสัดส่วนของสารทั้งสองกลุ่มนี้แตกต่างกัน พบรายงานว่าพลูที่พบในประเทศไทย เป็นชนิดที่มีฟีนิลโพรพานอยด์สูง (Choopayak et al., 2022) โดยเฉพาะ Eugenol, Allyl-pyrocatechol และ อนุพันธ์ รวมกันแล้วประมาณ 80% ของสารระเหยง่ายทั้งหมดที่ตรวจพบ นอกจากนั้นสามารถพบเซสควิเทอร์พีนได้ประมาณ 15 - 20% ซึ่งส่วนใหญ่พบ β -Caryophyllene ได้ในปริมาณสูงที่สุดในกลุ่มนี้ (Karak et al., 2018) แสดงถึงความเสถียรของสาร ส่งผลดีต่อการนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป

สารที่พบในพลูและสารสกัดพลูมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการ ซึ่งสัมพันธ์กับสรรพคุณของพลู สารที่พบปริมาณมาก มีงานวิจัยเกี่ยวข้องจำนวนมาก และ มีการใช้อย่างแพร่หลายในหลายประเด็น คือ Eugenol กลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ โมเลกุลขนาดเล็ก $C_{10}H_{12}O_2$ มีขั้วเล็กน้อย ระเหยง่าย อยู่ในสถานะของเหลว น้ำมันที่อุณหภูมิห้อง มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Martínez-Herrera et al., 2016) ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Kim et al., 2016; Latifah-Munirah et al., 2015; Qian et al., 2020) ต้านมะเร็ง (Abdullah et al., 2018; Fangjun & Zhijia, 2018; Fathy et al., 2019; Zari et al., 2021) ป้องกันภาวะ NCD (Harb et al., 2019) และมีความปลอดภัย ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยา สหรัฐอเมริกาว่ามีความปลอดภัยสามารถใช้กับอาหาร (Hu et al., 2018) และการทันตกรรม (Martínez-Herrera et al., 2016) นอกเหนือจากนั้นสารในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ชนิดอื่น ได้แก่ Chavicol และอนุพันธ์ มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านมะเร็ง (Gundala et al., 2014; Singh et al., 2021) และ Allyl-pyrocatechol มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และ ต้านภาวะไทรอยด์เป็นพิษ (Panda et al., 2019; Phumat et al., 2020) สารอีกกลุ่มที่พบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง คือ β -Caryophyllene เป็นสารกลุ่มเซสควิเทอร์พีน สารกลุ่มนี้ระเหยง่าย เป็นน้ำมันที่อุณหภูมิห้อง กลไกการออกฤทธิ์โดยจับตัวกับ cannabinoid receptor2 (Jha et al., 2021) ทำให้มีผลต่อระบบประสาท สามารถบรรเทาอาการปวดในผู้ป่วยมะเร็งได้ (Viveros-Paredes et al., 2017) มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Arizuka et al., 2017; Hernandez-Leon et al., 2020) ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และ ปกป้องจากภาวะ NCD (Basha & Sankaranarayanan, 2016; Harb et al., 2018) เป็นต้น (Francomano et al., 2019)

จะเห็นได้สารเคมีองค์ประกอบในพลูหลายชนิด ที่มีการวิจัยรองรับว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปใช้ประโยชน์ได้สูง (Mak et al., 2019; S. Okonogi et al., 2021; Siriporn Okonogi et al., 2021) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ประโยชน์จากพลูในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด เพื่อส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากพลูและสารสกัดพลู งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการสกัดเพื่อให้ได้

สารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง อันจะเป็นพื้นฐานต่อการต่อยอดการใช้ประโยชน์จากพืชมามากขึ้น เพิ่มมูลค่าของพืชมูลค่าสูง ส่งผลให้เกิดความเชื่อมั่นในระดับสากลต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างใบพลูเพื่อการสกัด

ใบพลูที่ใช้ในการศึกษาเป็นพลูใบเหลือง ปลูกไว้กลางแจ้ง ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร 16.7479° N, 100.1919° E ได้รับการยืนยันชนิดพันธุ์และเก็บตัวอย่างแห้งเป็นหลักฐานไว้ในห้องเก็บตัวอย่างพรรณไม้แห้ง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร รหัส PNU6018 ในการสกัดสารได้ทำการเก็บตัวอย่างใบพลูอายุปานกลางไม่อ่อนไม่แก่ ใบสุภาพดี ไม่มีรอยโรคหรือแมลงกัดกิน เก็บใบในถุงสุญญากาศ ระหว่างเดือน พฤษภาคม – มิถุนายน

การกลั่นน้ำมันพลูด้วยเทคนิคการกลั่นด้วยน้ำ

นำใบพลูสดมาล้างด้วยน้ำประปา ซับพอหมาด ชั่งใบพลู 386.11 กรัม หั่นด้วยมีดให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก แล้วนำเข้าเครื่องกลั่น Clevenger apparatus ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บของเหลวที่ผ่านการควบแน่นประมาณ 100 มล. ทุกชั่วโมง จำนวน 7 ครั้ง นำเข้าตู้เย็น 4 °C ตั้งทิ้งไว้จนแยกเป็น 2 ชั้น ดูดส่วนน้ำมัน ซึ่งเห็นเป็นหยดน้ำมันอยู่ส่วนล่างของพลาสติกผสมกับเฮกเซน ลงใน funnel เขย่าแรง ๆ ให้ผสมกันดี ตั้งทิ้งไว้จนแยกเป็น 2 เฟส น้ำมันจะละลายอยู่ในชั้นของเฮกเซนด้านบน ปล่อยให้ชั้นน้ำด้านล่างออกจาก funnel ให้เกือบหมด ทำขั้นตอนการสกัดด้วยเฮกเซนซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วปล่อยให้ของเหลวชั้นล่างทิ้งให้หมด เทของเหลวที่เหลือลงในพลาสติกใหม่ ทำการดึงน้ำออกให้หมดโดยการเติมผง sodium sulfate anhydrous จากนั้นนำของเหลวที่ได้ประมาณ 100 มล. ไประเหยเฮกเซนออกภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Hei-vap value rotary evaporator, Heidolph, Germany) เก็บน้ำมันพลูที่ได้ลงในขวดแก้ว แล้วนำไปไล่เฮกเซนออกให้หมดด้วยแก๊สไนโตรเจน ซึ่งน้ำหนักน้ำมันที่สกัดได้ คำนวณหาร้อยละของสารที่สกัดได้ เทียบกับน้ำหนักใบพลูสดที่ใช้เริ่มต้น รายงานผลเป็น %yield (g/g FW) เก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ 4 °C

การหมักใบพลูแห้งในตัวทำละลายอินทรีย์

นำใบพลูสดมาล้างน้ำประปาให้สะอาด ซับพอหมาด อบในตู้อบลมร้อนที่ 50 °C จนแห้ง (3 วัน) จากนั้นนำใบพลูแห้ง 100 กรัม หมักในตัวทำละลายอินทรีย์ ปริมาตรรวม 500 มล. ในขวดแก้ว ปิดฝาให้สนิท วางในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 °C ทำการเขย่าผสมเป็นระยะ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำของเหลวมากรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำของเหลวที่ผ่านการกรองไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศ ด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Hei-vap value rotary evaporator, Heidolph, Germany) จนได้สารสกัดหยาบ ซึ่งน้ำหนักสารสกัด แล้วคำนวณหาร้อยละของสารที่สกัดได้เทียบกับน้ำหนักใบพลูแห้ง รายงานผลเป็น %yield (g/g DW) เก็บสารสกัดในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °C

การตรวจวัดชนิดของสารอินทรีย์ระเหยง่ายในสารสกัดพลูด้วยเทคนิค GC-MS

ละลายเจือจางสารสกัดในเฮกซานอล 1:100 จากนั้นนำไปกรองผ่านเยื่อขนาด 0.2 ไมครอน แล้วฉีดสารสกัด 1 µL ด้วยการฉีดน้ำมันพลูแบบทั้งหมัด (splitless) และฉีดสารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์แบบแบ่งส่วน (split 30:1) เข้าเครื่อง Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) (Perkin-Elmer, Sigma-115) โดยใช้เฟสอยู่กับที่เป็นคอลัมน์ HP-5MS ((5%-phenyl)-methylpolysiloxane) โมเดล Agilent 19091S-433 (30 m x 0.25 mm i.d.; film thickness 0.25 µm) และแก๊สฮีเลียมเป็นเฟสเคลื่อนที่ ด้วยอัตราการไหลแบบคงที่ 1 mL/min

สภาวะที่ใช้ในการแยกสาร ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิในตู้บรรจุคอลัมน์ (oven temperature) ซึ่งแบ่งเป็น 2 โปรแกรม คือ (1) น้ำมันพลู ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์รวม 19 นาที ประกอบด้วย อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 45 °C คงไว้ 0.2 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 10 °C ต่อนาที จนถึง 200 °C แล้วเพิ่มเป็น 30 °C ต่อนาที จนถึง 245 °C และคงไว้ 1.8 นาที (2) สารสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์รวม 52.2 นาที ประกอบด้วย อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 45 °C คงไว้ 0.2 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 10 °C ต่อนาที จนถึง 200 °C คงไว้ 20 นาที แล้วเพิ่มเป็น 30 °C ต่อนาที จนถึง 245 °C และคงไว้ 15 นาที ในการวิเคราะห์ได้ทำการตั้งค่าอุณหภูมิของการฉีดที่ 250 °C และ ตัวรับสัญญาณ MSD transfer line heater ที่ 280 °C การวิเคราะห์ชนิดของสารโดยการเปรียบเทียบสเปกตรัมของมวล ในช่วงมวล 50 - 300 amu ภายใต้โหมดอิเล็กตรอนไอออนในเซชันที่พลังงาน 70 eV เทียบกับฐานข้อมูล Wiley 7n.1 mass spectra library รวมถึงใช้เวลาที่พบพีคของสาร (retention time) ควบคู่กับการฉีดสารมาตรฐาน Eugenol และ β -Caryophyllene ภายใต้สภาวะเดียวกัน การวิเคราะห์ปริมาณของสาร คำนวณจากพื้นที่ใต้พีค และรายงานเป็นร้อยละของสารที่สนใจจากปริมาณสารที่พบทั้งหมด

การหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพลูด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay

การหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ใช้วิธีการดัดแปลงจาก (Sembiring et al., 2017) การวิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาใน 96-well microplate โดยปริมาตรรวม 200 μ L ประกอบด้วยสารสกัดพลูที่ละลายในเอทานอล 1 mg/mL หรือ Gallic acid ความเข้มข้น 6.25-200 μ g/mL ปริมาตร 20 μ L ผสมกับ 0.2N Folin-Ciocalteu phenol reagent 110 μ L และ 10% sodium carbonate 70 μ L หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 ด้วยเครื่อง microplate reader การคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยเทียบเท่ากับ Gallic acid (mg) ของสารสกัดพลู 1 g (Gallic acid Equivalent, GAE)

การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดพลูด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric assay

การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content) ใช้วิธีการดัดแปลงจาก (Sembiring et al., 2017) การวิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาใน 96-well microplate โดยปริมาตรรวม 220 μ L ประกอบด้วยสารสกัดพลูที่ละลายในเอทานอล 1 mg/mL หรือ Quercetin ความเข้มข้น 1.56 - 100 μ g/mL 50 μ L ผสมกับ 10% $AlCl_3$ 10 μ L เอทานอล 150 μ L และ 1M CH_3COONa 10 μ L หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 ด้วยเครื่อง microplate reader การคำนวณปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Quercetin และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยค่าเทียบเท่ากับ Quercetin (mg) ของสารสกัดพลู 1 g (Quercetin Equivalent, QE)

การตรวจวัดฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดพลูด้วยวิธี DPPH assay

การหาฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก (Govarthanan et al., 2015) ก่อนนำสารละลาย DPPH ไปใช้เจือจาง DPPH ในเมทานอลให้ได้ OD517 ประมาณ 0.8 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Optizen 3220 UV) การเตรียมสารมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 2 - 32 μ g/mL การเตรียมสารสกัดพลู โดยเจือจางสารสกัดพลูในเอทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 62.5 μ g/mL การวิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาใน 96-well microplate ปริมาตรรวม 200 μ L โดยเติมสารสกัดพลู หรือ Gallic acid 100 μ L ลงในสารละลาย 1mM DPPH 100 μ L และบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง OD517 ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่า OD ที่วัดได้มาคำนวณหาการกำจัดอนุมูลอิสระ (%scavenging = ((OD control - OD sample) / OD control) และ ค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยของค่าเทียบเท่า Gallic acid (mg) ของสารสกัดพลู 100 mg (Gallic acid Equivalent Antioxidant Capacity, GAE)

การตรวจวัดฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดพลูด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

การหาฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก (Rajurkar & Hande, 2011) เริ่มจากการเตรียมอนุมูลอิสระ ABTS โดยการผสม 7mM ABTS และ 2.45mM potassium persulfate (1:1) แล้วบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้เจือจาง ABTS ในน้ำกลั่นให้ได้ OD734 ประมาณ 0.8 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Optizen 3220 UV) การเตรียมสารมาตรฐาน Trolox โดยการเจือจาง 2 เท่าตามลำดับในเอทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 0.039 - 2.5 mM การเตรียมสารสกัดพลู โดยการเจือจางสารสกัดพลูในเอทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/mL

การวิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาใน 96-well microplate ปริมาตรรวม 200 μ L โดยเติมสารสกัดพลู หรือ Trolox 2 μ L ลงในสารละลาย ABTS 198 μ L และบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง OD734 ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่า OD ที่วัดได้มาคำนวณหาค่าร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ (%scavenging = ((OD control – OD sample) / OD control) และ ค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยของค่าเทียบเท่า Trolox (μ mole) ของสารสกัดพลู 100 mg (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์นัยสำคัญของความแตกต่างของข้อมูล โดยใช้โปรแกรม IBM[®] the Statistical Product and Service Solution software (SPSS, Chicago, IL, USA) version 23.0 ด้วยเครื่องมือ One-Way Analysis of Variance (ANOVA), Multiple Comparison, PostHoc test, Duncan and Turkey ที่ค่าความเชื่อมั่น $p < 0.05$ รายงานผลเป็นค่า mean $\pm$ standard deviation (SD) ของค่าที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ และระบุความเหมือน ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็ก

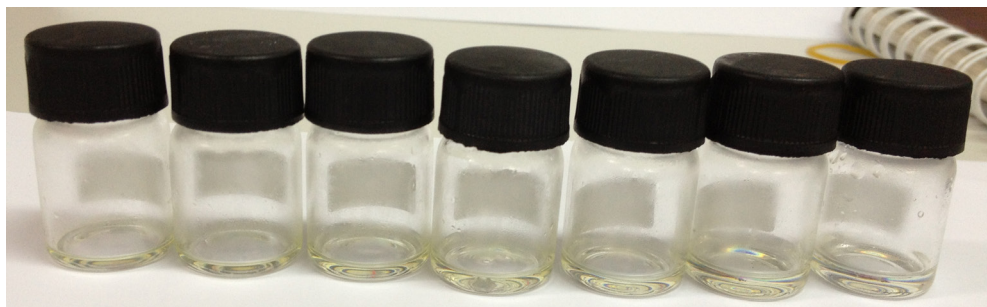
ผลและอภิปรายผล

ลักษณะของใบพลูที่ใช้ในการศึกษาและสารสกัดพลู

ใบพลูที่ใช้ในการศึกษาเป็นพลูใบเหลือง (ภาพที่ 1ก) ได้ทำการระบุชนิดพันธุ์และเก็บตัวอย่างแห้งเข้าห้องพรรณไม้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ รหัส PNU6018 น้ำมันพลูที่สกัดได้จากใบพลูสด มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อน สี กลิ่นฉุน (ภาพที่ 1ข) ได้ผลผลิตรวมกันจากการเก็บ 7 ส่วนเท่ากับร้อยละ 0.38 g/g FW ในขณะที่สารสกัดพลูจากตัวทำละลายอินทรีย์จากใบพลูแห้ง มีลักษณะเป็นของเหลวกึ่งแข็ง คล้ายคาราเมล สีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 1ค) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดที่ได้จากการหมักใบพลูแห้งในตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด เรียงจากต่ำไปสูง คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และ เอทานอล เท่ากับ 2.46, 8.43, 11.72, และ 10.79 g/g DW ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเฮกเซนสกัดสารออกมาได้น้อยมาก ในขณะที่ตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่า เช่น เอทานอลสามารถสกัดสารออกมาได้มากกว่า บ่งชี้ว่าสารระเหยง่ายที่อยู่ในใบพลูแห้งน่าจะเป็นสารที่มีขั้วปานกลาง ในกรณีนี้น่าจะเนื่องจากการอบใบพลูที่ 50 °C เป็นเวลา 2 วันในขั้นตอนการเตรียมใบก่อนสกัด ทำให้สารที่มีขั้วต่ำกว่า ระเหยได้ง่ายกว่า สูญเสียไประหว่างการอบมากกว่าสารที่มีขั้วสูง ซึ่งระเหยยากกว่า ทำให้สารที่เหลืออยู่ในใบพลูแห้ง มีความเข้มข้นมากขึ้น และถูกสกัดออกมาได้มากกว่าโดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว คือ เอทานอล และ เอทิลอะซิเตท



(ก)



(ข)

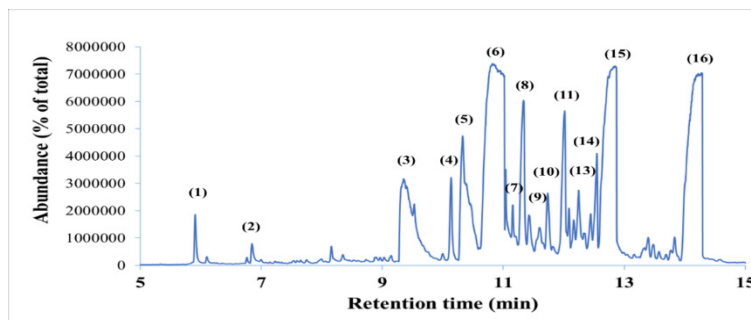


(ค)

ภาพที่ 1 ลักษณะของใบพลูและสารสกัดใบพลู (ก) ใบพลูที่ใช้ในการศึกษาเป็นพลูใบเหลือง (ข) ลักษณะของน้ำมันพลูที่สกัดได้ (ค) ลักษณะของสารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำละลายอินทรีย์

การตรวจวัดชนิดของสารอินทรีย์ระเหยง่ายในสารสกัดพลูด้วยเทคนิค GC-MS

ผลจากการวิเคราะห์ชนิดของสารเคมีระเหยง่ายในสารสกัดพลูด้วยเทคนิค GC-MS เมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำมันพลู สารสกัดเอทานอล สารสกัดเอทิลอะซิเตท สารสกัดไดคลอโรมีเทน และ สารสกัดเฮกเซน พบว่าการสกัดทุกวิธีได้ชนิดของสารคล้ายกัน ในปริมาณที่แตกต่างกัน ในภาพรวมสารระเหยง่ายที่พบในสารสกัดพลู ประกอบด้วยสารทุติยภูมิ 3 กลุ่ม ส่วนใหญ่อยู่ใน 1) กลุ่มฟีนอลิก กลุ่มย่อยฟีนิลโพรพานอยด์ 60% - 80% ได้แก่ Chavicol, Eugenol และ Allyl-pyrocatechol รองลงมา คือ 2) กลุ่มเทอร์ปีนอยด์ กลุ่มย่อยเซสควิเทอร์ปีน 5% - 15% ที่น่าสนใจคือ ถึงแม้ปริมาณสารที่ได้ไม่มาก แต่ฤทธิ์ทางชีวภาพสูง และ 3) กลุ่มเทอร์ปีนอยด์ กลุ่มย่อยโมโนเทอร์ปีน 2% - 3% ได้แก่ 1,8 Cineol, Linalool เป็นต้น ในน้ำมันพลูที่สกัดได้พบสารมากกว่า 16 ชนิด อยู่ในทั้ง 3 กลุ่ม โดยพบ Eugenol รุปอิสระมากที่สุดถึง 23.46% รองลงมาคือ Allyl-pyrocatechol 3,4-diacetate 17.27% ที่น่าสนใจคือ การกลั่นใบพลูสดสามารถสกัด Chavicol และ Chavicol acetate รวมกันได้ 14.51% และ β -Caryophyllene 4.2% (ภาพที่ 2)



(ก)

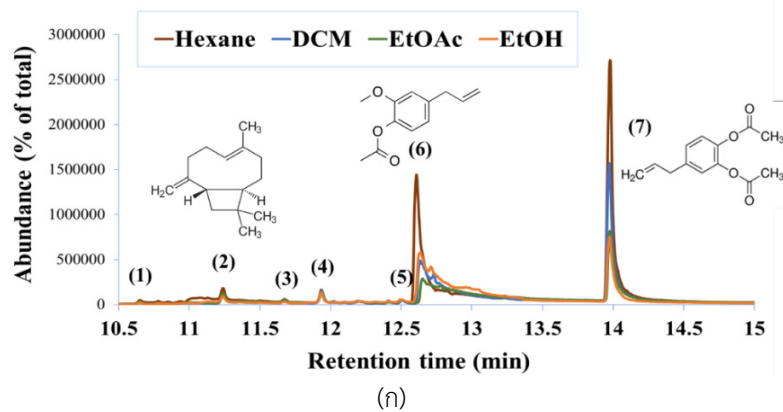
Peak	RT (min)	compounds	% of total	types	Peak	RT (min)	compounds	% of total	types
1	5.91	1,8-Cineole	0.67	MT	9	11.42	β -Gerjunene	1.22	ST
2	6.84	Linalool	0.36	MT	10	11.70	Aromadendrene	1.77	ST
3	9.40	Chavicol	7.61	PP	11	12.09	Germacrene D	0.66	ST
4	10.14	Camphene	1.39	MT	12	12.16	Zingiberene	0.80	ST
5	10.40	Chavicol acetate	6.9	PP	13	12.24	Ledene	1.68	ST
6	10.85	Isoeugenol/eugenol	23.46	PP	14	12.40	δ -Cadinene	2.50	ST
7	11.16	Methyleugenol	1.23	PP	15	12.85	Eugenol acetate	16.51	PP
8	11.33	β -Caryophyllene	4.21	ST	16	14.26	Allyl-pyrocatechol 3,4-diacetate	17.27	PP

(ข)

ภาพที่ 2 ชนิดและปริมาณของสารระเหยง่ายที่พบในน้ำมันพลู วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS (ก) แผนภาพ โครมาโทแกรม และ (ข) ข้อมูลในตาราง เป็นข้อมูลชุดเดียวกัน พบสาร 3 กลุ่ม คือ ฟีนิลโพรพานอยด์ (PP) โมโนเทอร์พีน (MT) และ เซสควิเทอร์พีน (ST) ค่าที่แสดงเป็นค่าตัวแทน 1 ชุดที่เลือกมาจากผลการวิเคราะห์มากกว่า 3 ครั้ง

องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบใบพลูแห้งหมักในตัวทำละลายอินทรีย์ พบสารอินทรีย์ระเหยง่าย 2 กลุ่ม คือ ฟีนิลโพรพานอยด์ และเซสควิเทอร์พีน โดยสารส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ พบมาก 2 ชนิด คือ Eugenol acetate และ Allyl-pyrocatechol 3,4-diacetate รวมกัน 50-90% ขึ้นอยู่กับวิธีสกัด นอกเหนือจากนั้นพบสารกลุ่มเซสควิเทอร์พีน มากกว่า 5 ชนิด รวมกัน 2-5% โดยส่วนใหญ่เซสควิเทอร์พีนที่พบ คือ β -Caryophyllene แต่ไม่พบสารกลุ่มโมโนเทอร์พีน การที่ตัวทำละลายอินทรีย์สามารถสกัด Eugenol acetate และ Allyl-pyrocatechol diacetate ออกมาได้มาก แต่ไม่พบ Eugenol รูปีอิสระ ไม่พบโมโนเทอร์พีน และ ปริมาณของเซสควิเทอร์พีน β -Caryophyllene ลดลงอย่างมาก สนับสนุนความคิดที่การอบใบพลูด้วยความร้อน 50°C เป็นเวลา 2 วัน ทำให้สารที่สลายตัวง่าย คือ Eugenol รูปีอิสระ โมโนเทอร์พีน และ เซสควิเทอร์พีน สลายตัวไป เหลือสารอนุพันธ์เกลืออะซีเตตที่คงสภาพมากกว่าอยู่เป็นปริมาณมากในสารสกัดจากใบพลูแห้ง

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวทำละลาย พบว่าเฮกเซนสามารถสกัด Allyl-pyrocatechol (ภาพที่ 3 พิกที่ 7) ได้มากที่สุด (51.96%) ในขณะที่เอทานอลสามารถสกัด Eugenol acetate (ภาพที่ 3 พิกที่ 6) ออกมาได้มากที่สุด (49.89%) และได้เกลืออะซีเตตของ Allyl-pyrocatechol ค่อนข้างสูง (30.59%) ในขณะที่เอทิลอะซีเตต สามารถสกัด β -Caryophyllene ออกมาได้มากที่สุด (3.27%) และ ไดคลอโรมีเทน สามารถสกัดทั้ง Allyl-pyrocatechol diacetate และ Eugenol acetate ออกมาได้สูงทั้งสองชนิด (48.79% และ 41.04% ตามลำดับ) (ภาพที่ 3)

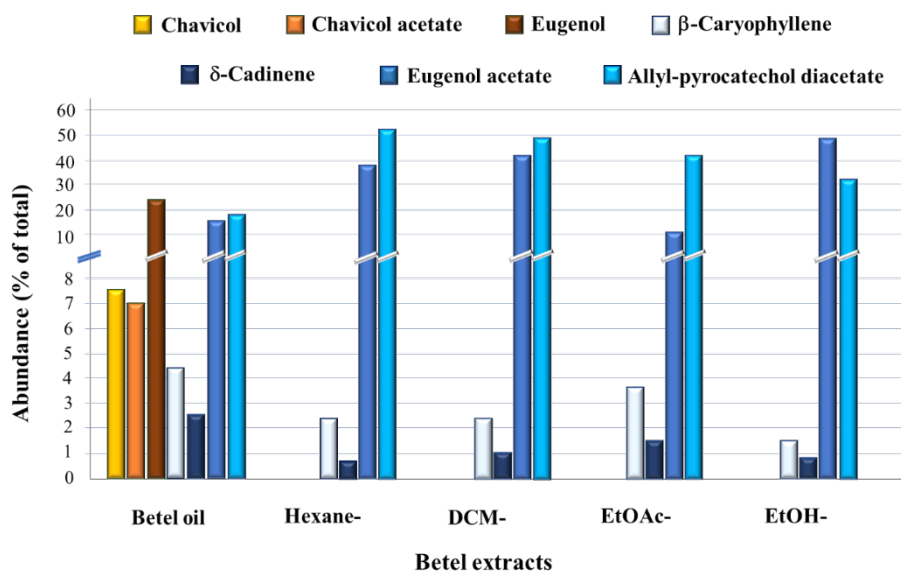


Peak	RT (min)	Compounds	Area of total (%)			
			Hexane extract	DCM extract	EtOAc extract	EtOH extract
1	10.65	α -Copaene	0.55	0.57	0.99	-
2	11.24	β -Caryophyllene	2.27	2.17	3.27	1.55
3	11.68	α -Humulene	-	0.56	0.74	-
4	11.94	α -Amorphene	1.83	-	-	-
5	12.50	δ -Cadinene	0.67	1.03	1.25	0.86
6	12.61	Eugenol acetate	38.53	41.04	10.48	49.89
7	13.98	Allyl-pyrocatechol 3,4-diacetate	51.96	48.79	40.28	30.59

(ข)

ภาพที่ 3 ชนิดและปริมาณของสารระเหยง่ายที่พบในสารสกัดพริกที่สกัดโดยการหมักใบพริกแห้งในตัวทำละลายอินทรีย์วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS (ก) แผนภาพโครมาโทแกรม และ (ข) ข้อมูลในตาราง เป็นข้อมูลชุดเดียวกัน ของสารสกัดพริก 4 ชนิด คือ Hexane, สารสกัดเฮกเซน; DCM, สารสกัดไดคลอโรมีเทน; EtOAc, สารสกัดเอทิลอะซิเตต และ EtOH, สารสกัดเอทานอล ค่าที่แสดงเป็นค่าตัวแทน 1 ชุดที่เลือกมาจากการวิเคราะห์มากกว่า 3 ครั้ง โดยแสดงโครงสร้างโมเลกุลเฉพาะที่พบมาก 3 ลำดับแรก คือ β -Caryophyllene (พีคที่ 2), Eugenol acetate (พีคที่ 6), และ Allyl-pyrocatechol diacetate (พีคที่ 7)

เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 5 วิธี พบว่าการสกัดน้ำมันพริกจากใบพริกสดถึงแม้จะได้ผลผลิตต่ำ ทำได้ยาก ต้องใช้เครื่องมือจำเพาะราคาแพง การสกัดซับซ้อน ยุ่งยาก และ ต้องใช้เวลามาก แต่ได้สารระเหยง่ายซึ่งมีปริมาณน้อย และ สารรูปอิสระ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่า ในขณะที่การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ต้องใช้วัตถุดิบเป็นใบพริกแห้ง ทำให้สารสำคัญหลายชนิดหายไป ได้แก่ Chavicol, Chavicol acetate และ Eugenol และ สาร β -Caryophyllene ลดลง (ภาพที่ 4) Chavicol เป็นสารระเหยง่ายกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ โมเลกุลขนาดเล็ก มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการ ถึงแม้จะมีปริมาณน้อยกว่า แต่ก็มีความน่าสนใจ เนื่องจากมีรายงานวิจัยถึงกลไกการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งผ่านการยับยั้งวัฏจักรเซลล์ และ ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์เยื่อ (EMT) และ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยมุ่งเป้าไปที่สารพันธุกรรมของเชื้อ ทำให้เชื้อตาย แสดงถึงศักยภาพจะพัฒนา Chavicol ไปเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียได้อย่างดี (Majumdar & Subramanian, 2019; Singh et al., 2018) มีรายงานวิจัยว่าสารไฮดรอกซีซาวิคอลมีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในชีววิถีการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่ทำให้ผิวคล้ำ สารนี้จึงมีศักยภาพที่จะประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางทำให้ผิวกระจ่าง ลดรอยหมองคล้ำของผิวหนังได้



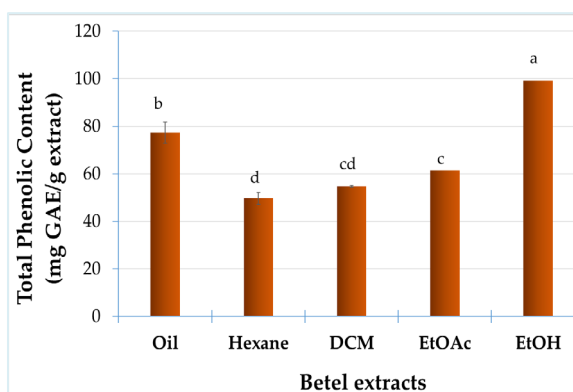
ภาพที่ 4 ชนิดและปริมาณสารเคมีระเหยง่ายที่พบมากในสารสกัดพลู 5 ชนิด วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS สารสกัดพลู 5 ชนิด คือ Betel oil, น้ำมันพลู; Hexane, สารสกัดเฮกเซน; DCM, สารสกัดไดคลอโรมีเทน; EtOAc, สารสกัดเอทิลอะซิเตต และ EtOH, สารสกัดเอทานอล ค่าที่แสดงเป็นค่าตัวแทนที่เลือกมาจากผลการวิเคราะห์มากกว่า 3 ครั้ง

สารที่พบมากในสารสกัดพลูทุกชนิดที่ทดสอบในงานนี้ คือ Eugenol และ Allyl-pyrocatechol สารสองชนิดนี้เป็นสารระเหยง่าย เป็นสารประกอบฟีนอลิก อยู่ในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง Eugenol พบได้ในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะในน้ำมันกานพลู (clove oil) มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการ ประกอบกับโมเลกุลมีขนาดเล็กสังเคราะห์ได้ง่าย ราคาในตลาดไม่สูงมากนัก ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา (FDA) ว่ามีความปลอดภัยสามารถใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ พบว่าสาร 2 ชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สูง (Jeyakumar & Lawrence, 2021; Kim et al., 2016; Latifah-Munirah et al., 2015) จึงน่าจะเป็นสารสำคัญหลักที่ทำให้ผู้ที่เคี้ยวหมากพลูมีสุขภาพช่องปากที่ดี ไม่มีปัญหาเหงือกพิน นอกเหนือจากความปลอดภัยแล้ว Eugenol มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและเป็นยาชาเฉพาะที่ จึงถูกใช้เป็นส่วนประกอบในสารอุดฟันในการทันตกรรม (Martínez-Herrera et al., 2016) มีรายงานวิจัยถึงกลไกการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของ Eugenol หลายงาน โดยส่งสัญญาณในเซลล์ผ่านวิถี NF-KB และ กระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งแบบ Apoptosis เป็นต้น (Islam et al., 2018) Allyl-pyrocatechol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และด้านการอักเสบโดยการส่งสัญญาณในเซลล์ผ่านวิถี MAPK และ Nrf2/HO-1 (De et al., 2017) งานวิจัยและการใช้ประโยชน์จาก Allyl-pyrocatechol ยังมีไม่มากนัก ถึงแม้จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย แต่ยังคงอยู่ในกระบวนการวิจัยและพัฒนา ดังนั้นการสกัดใบพลูแห้งด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่จะได้สารที่ประยุกต์ใช้ได้ต่อไปได้ ไม่ว่าจะเป็นการใช้ภายนอก ในเวชสำอาง เครื่องสำอาง หรือ เพื่อการพัฒนาต่อไปเป็นยา สาร β-Caryophyllene อยู่ในกลุ่มเซสควิเทอร์พีน เนื่องจากพบได้น้อยในธรรมชาติ ประกอบกับโครงสร้างโมเลกุลมีความซับซ้อนทำให้ยากต่อกระบวนการผลิตทางเคมี ทำให้ราคาของ β-Caryophyllene ทางการค้าสูง ส่งผลให้งานวิจัยเกี่ยวกับสารนี้ยังมีอยู่อย่างจำกัด แต่สารนี้มีความน่าสนใจที่พัฒนาไปเป็นยาได้ เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์ผ่านตัวรับแคนนาบินอยด์ ชนิดที่ 2 (CB2) ซึ่งเป็นตัวรับตัวเดียวกับแคนนาบินอยด์ (CBD) ในกัญชา ส่งผลให้มีความเกี่ยวข้องกับสารนี้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะงานวิจัยด้านการรักษาอาการปวดในผู้ป่วยมะเร็ง β-Caryophyllene มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ปกป้องระบบประสาท และป้องกันภาวะ NCD (Hwang et al., 2020; Irrera et al., 2020; Mannino et al., 2021; Picciolo et al., 2020; Scandiffio et al., 2020; Youssef et al., 2019)

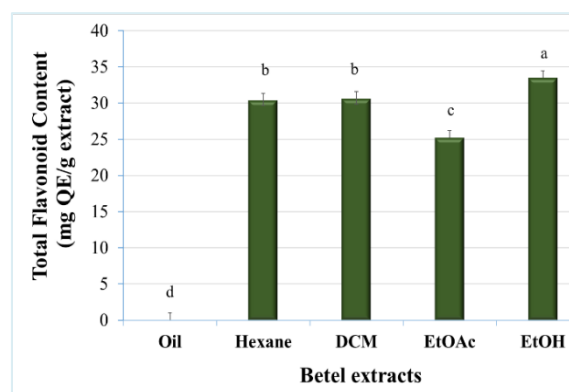
ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดพลู

วิธีการสกัดมีผลต่อปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดทั้ง 5 ชนิด แต่ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ไม่ค่อยแตกต่างกัน ยกเว้นน้ำมันพลูที่ไม่พบสารฟลาโวนอยด์ โดยปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในสารสกัดทั้ง 5 ชนิด เรียงตามค่าเทียบเท่า Gallic acid (GAE) จากมากไปน้อย (mg Gallic acid/สารสกัด 1 g) คือ สารสกัด ethanol (99.1 ± 1.17) > oil (77.3 ± 4.5) > ethyl acetate (61.4 ± 3.8), dichloromethane (54.7 ± 0.3) และ hexane (49.6 ± 2.5) ตามลำดับ (ภาพที่ 5ก) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดทั้ง 5 ชนิด เรียงตามค่าเทียบเท่า Quercetin (QE) จากมากไปน้อย (mg QE/สารสกัด 1 g) คือ สารสกัด ethanol (33.5 ± 1.5) > dichloromethane (30.6 ± 0.8), hexane (30.4 ± 0.7) > ethyl acetate (25.2 ± 1.4) และ oil (0 ± 0) ตามลำดับ (ภาพที่ 5ข)

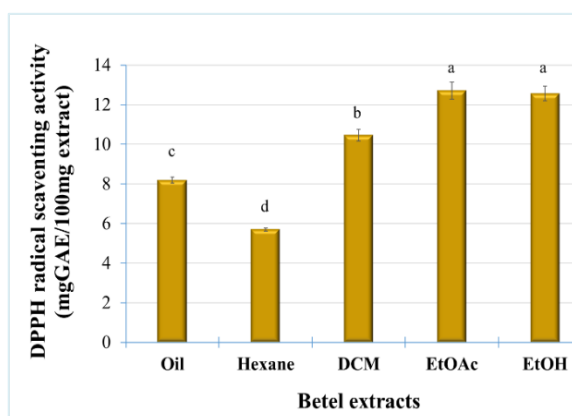
วิธีการสกัดมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นไปในทิศทางเดียวกับปริมาณของสารฟีนอลิกรวม แต่ไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม โดยความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดทั้ง 5 ชนิด เรียงตามค่าเทียบเท่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Gallic acid (GAEAC) จากมากไปน้อย (mg Gallic acid/สารสกัด 100 mg) คือ ethanol (12.56 ± 0.37), ethyl acetate (12.72 ± 0.4) > dichloromethane (10.46 ± 0.3) > oil (8.191 ± 0.14) > hexane (5.7 ± 0.08) ตามลำดับ (ภาพที่ 5ค) และ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดทั้ง 5 ชนิด เรียงตามค่าเทียบเท่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Trolox (TEAC) จากมากไปน้อย (umol Trolox/สารสกัด 100 mg) คือ สารสกัด ethanol (308.97 ± 15.3) > ethyl acetate (187.8 ± 4.2), oil (187.1 ± 14.2) > dichloromethane (123.8 ± 5.3) > hexane (86.2 ± 5.3) ตามลำดับ (ภาพที่ 5ง)



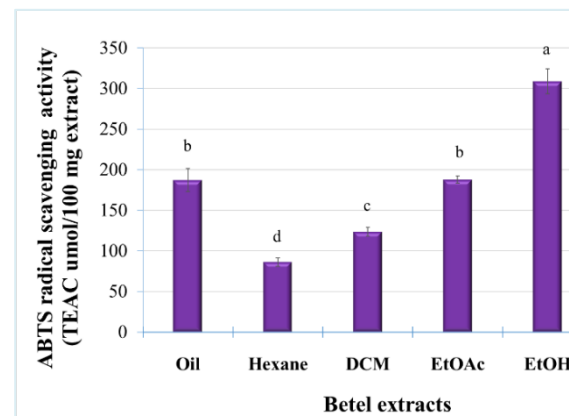
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 5 พิกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพลู 5 ชนิด (ก) ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (ข) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (ค) DPPH assay (ง) ABTS assay. สารสกัดพลู 5 ชนิด คือ Oil, น้ำมันพลู; Hexane, สารสกัดเฮกเซน; DCM, สารสกัดไดคลอโรมีเทน; EtOAc, สารสกัดเอทิลอะซิเตท และ EtOH, สารสกัดเอทานอล ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรเล็กบนแท่งแสดงนัยสำคัญของความแตกต่างของปริมาณสารหรือฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระระหว่างชนิดของสารสกัดพลู ที่ $p < 0.05$

เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารเคมีองค์ประกอบในสารสกัด ของวิธีการสกัดทั้ง 5 วิธี พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Gallic acid 12.56 ± 0.37 mg/สารสกัด 100 mg) และ ABTS (Trolox 308.97 ± 15.3 μ mol/สารสกัด 100 mg) สูงที่สุด สารสกัดมีสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (Gallic acid 99.1 ± 1.17 mg/สารสกัด 1 g) ซึ่งสอดคล้องกับผล GC-MS ที่พบสาร Eugenol acetate (49.89%) และ Allyl-pyrocatechol diacetate (30.59%) ปริมาณสูงในสารสกัดเอทานอล สำหรับน้ำมันพุ่มมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับปานกลาง โดยมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ในลำดับที่ 4 (Gallic acid 8.2 ± 0.14 mg/สารสกัด 100 mg) และ ABTS ในลำดับที่ 3 (Trolox 187.1 ± 14.2 μ mol/สารสกัด 100 mg) สารสกัดมีสารฟีนอลิกรวมสูงเป็นลำดับที่ 2 (Gallic acid 77.3 ± 4.5 mg/สารสกัด 1 g) แต่ไม่สามารถตรวจพบสารฟลาโวนอยด์รวมได้ ซึ่งสอดคล้องกับผล GC-MS ที่พบปริมาณสาร Eugenol acetate (16.51%) และ Allyl-pyrocatechol diacetate (17.29%) ในระดับปานกลาง แต่สาร Eugenol อิสระ (23.49%) และ Chavicol และ Chavicol acetate (14.51%) ซึ่งสูงกว่าวิธีอื่นๆ ในขณะที่สารสกัดด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด โดยมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Gallic acid 5.7 ± 0.08 mg/สารสกัด 100 mg) และ ABTS (Trolox 86.24 ± 5.32 μ mol/สารสกัด 100 mg) อยู่ในลำดับต่ำสุด สารสกัดมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมในระดับต่ำสุด (Gallic acid 49.6 ± 2.5 mg/สารสกัด 1 g) แต่ผล GC-MS พบปริมาณสาร Eugenol acetate (38.53%) และ Allyl-pyrocatechol diacetate (51.96%) ในระดับสูง จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดเฮกเซนอาจจะมีสารอื่นที่มีผลลดต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในสารสกัด ซึ่งอาจจะเป็นสารไม่มีขั้วที่ระเหยยากและรบกวนการกำจัดอนุมูลอิสระ นอกเหนือจากนั้นพบว่าสารสกัดพุ่มมีปริมาณฟลาโวนอยด์ค่อนข้างต่ำ ซึ่งจะไม่ค่อยมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพุ่มเมื่อเทียบกับปริมาณสารฟีนอลิก

สรุปผล

สารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลักในสารสกัดพุ่มน่าจะเป็นสารฟีนอลิก Eugenol และ Allyl-pyrocatechol เนื่องจากพบได้ในปริมาณสูง และสอดคล้องกับผลปริมาณสารฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้ โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการสกัดทั้ง 5 วิธี มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน การสกัดด้วยเอทานอลได้ผลผลิตสารสกัดหายาในปริมาณสูง (10.78%) ได้สารประกอบฟีนอลิกรวมในระดับสูง สาร Eugenol acetate และ Allyl-pyrocatechol diacetate มีปริมาณสูง ทำให้สารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการสกัดอีก 4 วิธี เมื่อเทียบกับการสกัดโดยวิธีอื่น ในขณะที่การกลั่นใบพุ่มสดด้วยน้ำ ได้น้ำมันพุ่มที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง คือ β -Caryophyllene, Chavicol และได้ Eugenol ในรูปอิสระสูงกว่าการสกัดโดยวิธีอื่น ได้สารประกอบฟีนอลิกรวมในระดับปานกลาง และให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระดับปานกลาง จึงเป็นวิธีการสกัดที่น่าสนใจ แต่ข้อจำกัดคือ ผลผลิตน้ำมันที่ได้ต่ำมาก เพียงแค่ 0.38%

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร สำหรับความอนุเคราะห์การระบุชนิดพันธุ์ การเก็บตัวอย่าง และการเตรียมตัวอย่างแห้ง และการเก็บเข้าคลังพืช

บรรณานุกรม

- ชนนิษฐ์ ชูพยัคฆ์. (2566). พลุ:องค์ความรู้จากงานวิจัยและการประยุกต์ใช้. บริษัท แดเน็กซ์ อินเทอร์เน็ตคอร์ปอเรชั่น จำกัด.
ปราณี นางงาม, ชยพล ศรีพนาม, & ชนนิษฐ์ ชูพยัคฆ์. (2565). ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนของสารสกัดหายาพืชน้ำที่รับประทานได้. *วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก*, 20(1), 118-130.

- Abdullah, M. L., Hafez, M. M., Al-Hoshani, A., & Al-Shabanah, O. (2018). Anti-metastatic and anti-proliferative activity of eugenol against triple negative and HER2 positive breast cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 321.
- Arizuka, N., Murakami, T., & Suzuki, K. (2017). The effect of β -caryophyllene on nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Toxicologic Pathology*, 30(4), 263-273.
- Basha, R. H., & Sankaranarayanan, C. (2016). β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene lactone attenuates hyperglycemia mediated oxidative and inflammatory stress in experimental diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 245, 50-58.
- Biswas, P., Anand, U., Saha, S. C., Kant, N., Mishra, T., Masih, H., Bar, A., Pandey, D. K., Jha, N. K., Majumder, M., Das, N., Gadekar, V. S., Shekhawat, M. S., Kumar, M., Radha, Proćków, J., Lastra, J. M. P., & Dey, A. (2022). Betelvine (*Piper betle* L.): A comprehensive insight into its ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological, biomedical and therapeutic attributes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(11), 3083-3119.
- Choopayak, C., Aranyakanon, K., Prompakdee, N., Nangngam, P., Kongbangkerd, A., & Ratanasut, K. (2022). Effects of *Piper betle* L. Extract and allelochemical eugenol on rice and associated weeds germination and seedling growth. *Plants*, 11(23), 3384.
- De, S., Manna, A., Kundu, S., De Sarkar, S., Chatterjee, U., Sen, T., Chattopadhyay, S., & Chatterjee, M. (2017). Allylpyrocatechol Attenuates collagen-induced arthritis via attenuation of oxidative stress secondary to modulation of the MAPK, JAK/STAT, and Nrf2/HO-1 pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 360(2), 249-259.
- Fangjun, L., & Zhijia, Y. (2018). Tumor suppressive roles of eugenol in human lung cancer cells. *Thoracic Cancer*, 9(1), 25-29.
- Fathy, M., Fawzy, M. A., Hintzsche, H., Nikaido, T., Dandekar, T., & Othman, E. M. (2019). Eugenol Exerts apoptotic effect and modulates the sensitivity of hela cells to cisplatin and radiation. *Molecules*, 24(21), 3979.
- Francomano, F., Caruso, A., Barbarossa, A., Fazio, A., La Torre, C., Ceramella, J., Mallamaci, R., Saturnino, C., Iacopetta, D., & Sinicropi, M. S. (2019). β -Caryophyllene: A sesquiterpene with countless biological properties. *Applied Sciences*, 9(24), 5420.
- Govarthanan, M., Rajinikanth, R., Kamala-Kannan, S., & Selvankumar, T. (2015). A comparative study on bioactive constituents between wild and in vitro propagated *Centella asiatica*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(1), 25-29.
- Gundala, S. R., Yang, C., Mukkavilli, R., Paranjpe, R., Brahmbhatt, M., Pannu, V., Cheng, A., Reid, M. D., & Aneja, R. (2014). Hydroxychavicol, a betel leaf component, inhibits prostate cancer through ROS-driven DNA damage and apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280(1), 86-96.
- Harb, A. A., Bustanji, Y. K., & Abdalla, S. S. (2018). Hypocholesterolemic effect of β -caryophyllene in rats fed cholesterol and fat enriched diet. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 62(3), 230-237.
- Harb, A. A., Bustanji, Y. K., Almasri, I. M., & Abdalla, S. S. (2019). Eugenol reduces LDL cholesterol and hepatic steatosis in hypercholesterolemic rats by modulating TRPV1 receptor. *Scientific Reports*, 9(1), 14003.

- Hernandez-Leon, A., González-Trujano, M. E., Narváez-González, F., Pérez-Ortega, G., Rivero-Cruz, F., & Aguilar, M. I. (2020). Role of β -caryophyllene in the antinociceptive and anti-inflammatory effects of tagetes lucida Cav. essential oil. *Molecules*, 25(3), 675.
- Hu, Q., Zhou, M., & Wei, S. (2018). Progress on the Antimicrobial Activity Research of Clove Oil and Eugenol in the Food Antisepsis Field. *Journal of Food Science*, 83(6), 1476-1483.
- Hwang, S.-M., Lee, K., Im, S.-T., Go, E. J., Kim, Y. H., & Park, C.-K. (2020). Co-application of Eugenol and QX-314 elicits the prolonged blockade of voltage-gated sodium channels in nociceptive trigeminal ganglion neurons. *Biomolecules*, 10(11), 1513.
- Irrera, N., D'Ascola, A., Pallio, G., Bitto, A., Mannino, F., Arcoraci, V., Rottura, M., Ieni, A., Minutoli, L., Metro, D., Vaccaro, M., Altavilla, D., & Squadrito, F. (2020). β -Caryophyllene inhibits cell proliferation through a direct modulation of CB2 receptors in glioblastoma cells. *Cancers*, 12(4), 1038.
- Islam, S. S., Al-Sharif, I., Sultan, A., Al-Mazrou, A., Remmal, A., & Aboussekhra, A. (2018). Eugenol potentiates cisplatin anti-cancer activity through inhibition of ALDH-positive breast cancer stem cells and the NF- κ B signaling pathway. *Molecular Carcinogenesis*, 57(3), 333-346.
- Jeyakumar, G. E., & Lawrence, R. (2021). Mechanisms of bactericidal action of Eugenol against Escherichia coli. *Journal of Herbal Medicine*, 26, 100406.
- Jha, N. K., Sharma, C., Hashiesh, H. M., Arunachalam, S., Meeran, M. N., Javed, H., Patil, C. R., Goyal, S. N., & Ojha, S. (2021). β -caryophyllene, a natural dietary CB2 Receptor selective cannabinoid can be a candidate to target the trinity of infection, immunity, and inflammation in COVID-19 [hypothesis and theory]. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.590201>
- Karak, S., Acharya, J., Begum, S., Mazumdar, I., Kundu, R., & De, B. (2018). Essential oil of Piper betle L. leaves: Chemical composition, anti-acetylcholinesterase, anti- β -glucuronidase and cytotoxic properties. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 10, 85-92.
- Kaypetch, R., & Thaweboon, S. (2018). Antifungal property of piper betle leaf oil against oral candida species. *MATEC Web of Conferences*, 242, 01021.
- Kim, Y. G., Lee, J. H., Gwon, G., Kim, S.-I., Park, J. G., & Lee, J. (2016). Essential Oils and eugenols inhibit biofilm formation and the virulence of Escherichia coli O157:H7. *Scientific Reports*, 6(1), 36377.
- Latifah-Munirah, B., Himratul-Aznita, W. H., & Mohd Zain, N. (2015). Eugenol, an essential oil of clove, causes disruption to the cell wall of *Candida albicans* (ATCC 14053). *Frontiers in Life Science*, 8(3), 231-240.
- Leesombun, A., Boonmasawai, S., & Nishikawa, Y. (2017). Effects of Thai piperaceae plant extracts on Neospora caninum infection. *Parasitology International*, 66(3), 219-226.
- Leesombun, A., Boonmasawai, S., Shimoda, N., & Nishikawa, Y. (2016). Effects of extracts from Thai piperaceae plants against infection with toxoplasma gondii. *PLoS One*, 11(5), e0156116.
- Lubis, R. R., Marlisa, & Wahyuni, D. D. (2020). Antibacterial activity of betle leaf (Piper betle L.) extract on inhibiting Staphylococcus aureus in conjunctivitis patient. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*, 9(1), 1-5.

- Majumdar, A. G., & Subramanian, M. (2019). Hydroxychavicol from Piper betle induces apoptosis, cell cycle arrest, and inhibits epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 166, 274-291.
- Mak, K. K., Kamal, M., Ayuba, S., Sakirolla, R., Kang, Y. B., Mohandas, K., Balijepalli, M., Ahmad, S., & Pichika, M. (2019). A comprehensive review on eugenol's antimicrobial properties and industry applications: A transformation from ethnomedicine to industry [Article]. *Pharmacognosy Reviews*, 13(25), 1-9.
- Mannino, F., Pallio, G., Corsaro, R., Minutoli, L., Altavilla, D., Vermiglio, G., Allegra, A., Eid, A. H., Bitto, A., Squadrito, F., & Irrera, N. (2021). Beta-Caryophyllene exhibits anti-proliferative effects through apoptosis induction and cell cycle modulation in multiple myeloma cells. *Cancers (Basel)*, 13(22), 5741.
- Martínez-Herrera, A., Pozos-Guillén, A., Ruiz-Rodríguez, S., Garrocho-Rangel, A., Vértiz-Hernández, A., & Escobar-García, D. M. (2016). Effect of 4-Allyl-1-hydroxy-2-methoxybenzene (Eugenol) on inflammatory and apoptosis processes in dental pulp fibroblasts. *Mediators of Inflammation*.
<https://doi.org/10.1155/2016/9371403>
- Nayaka, N. M. D. M. W., Sasadara, M. M. V., Sanjaya, D. A., Yuda, P. E. S. K., Dewi, N. L. K. A. A., Cahyaningsih, E., & Hartati, R. (2021). *Piper betle* (L): Recent Review of antibacterial and antifungal properties, safety profiles, and commercial applications. *Molecules*, 26(8), 2321.
- Okonogi, S., Phumat, P., Khongkhunthian, S., Chaijareenont, P., Rades, T., & Müllertz, A. (2021). Development of self-nanoemulsifying drug delivery systems containing 4-allylpyrocatechol for treatment of oral infections caused by *Candida albicans*. *Pharmaceutics*, 13(2), 167.
- Okonogi, S., Phumat, P., Khongkhunthian, S., Suttiat, K., & Chaijareenont, P. (2021). Denture-soaking solution containing *Piper betle* extract-loaded polymeric micelles; inhibition of *Candida albicans*, Clinical study, and effects on denture base resin. *Antibiotics*, 10(4), 440.
- Panda, S., Sikdar, M., Biswas, S., Sharma, R., & Kar, A. (2019). Allylpyrocatechol, isolated from betel leaf ameliorates thyrotoxicosis in rats by altering thyroid peroxidase and thyrotropin receptors. *Scientific Reports*, 9(1), 12276.
- Phumat, P., Khongkhunthian, S., Wanachantararak, P., & Okonogi, S. (2020). Comparative inhibitory effects of 4-allylpyrocatechol isolated from *Piper betle* on *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mutans*, and *Candida albicans*. *Archives of Oral Biology*, 113, 104690.
- Picciolo, G., Pallio, G., Altavilla, D., Vaccaro, M., Oteri, G., Irrera, N., & Squadrito, F. (2020). β -Caryophyllene Reduces the inflammatory phenotype of periodontal cells by targeting CB2 receptors. *Biomedicines*, 8(6), 164.
- Qian, W., Sun, Z., Wang, T., Yang, M., Liu, M., Zhang, J., & Li, Y. (2020). Antimicrobial activity of eugenol against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its effect on biofilms. *Microbial Pathogenesis*, 139, 103924.
- Rajurkar, N. S., & Hande, S. M. (2011). Estimation of phytochemical content and antioxidant activity of some selected traditional Indian medicinal plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(2), 146-151.

- Samar, C., Rasane, P., Kaur, S., Singh, J., Singh, J., Gat, Y., Gabra, U., Kaur, D., & Dhawan, K. (2018). Antioxidant and antimicrobial potential of selected varieties of *Piper betle* L. (Betel leaf). *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 90(4), 3871-3878.
- Scandiffio, R., Geddo, F., Cottone, E., Querio, G., Antoniotti, S., Gallo, M. P., Maffei, M. E., & Bovolin, P. (2020). Protective effects of (E)- β -caryophyllene (BCP) in Chronic Inflammation. *Nutrients*, 12(11), 3273.
- Sembiring, E., Elya, B., & Sauriasari, R. (2017). Phytochemical screening, total flavonoid and total phenolic content and antioxidant activity of different parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacognosy Journal*, 10, 123-127.
- Singh, D., Majumdar, A. G., Gamre, S., & Subramanian, M. (2021). Membrane damage precedes DNA damage in hydroxychavicol treated E. coli cells and facilitates cooperativity with hydrophobic antibiotics. *Biochimie*, 180, 158-168.
- Singh, D., Narayanamoorthy, S., Gamre, S., Majumdar, A. G., Goswami, M., Gami, U., Cherian, S., & Subramanian, M. (2018). Hydroxychavicol, a key ingredient of Piper betle induces bacterial cell death by DNA damage and inhibition of cell division. *Free Radical Biology and Medicine*, 120, 62-71.
- Viveros-Paredes, J. M., González-Castañeda, R. E., Gertsch, J., Chaparro-Huerta, V., López-Roa, R. I., Vázquez-Valls, E., Beas-Zarate, C., Camins-Espuny, A., & Flores-Soto, M. E. (2017). Neuroprotective Effects of β -caryophyllene against dopaminergic neuron injury in a murine model of parkinson's disease induced by MPTP. *Pharmaceuticals*, 10(3), 60.
- Youssef, D. A., El-Fayoumi, H. M., & Mahmoud, M. F. (2019). Beta-caryophyllene protects against diet-induced dyslipidemia and vascular inflammation in rats: Involvement of CB2 and PPAR- γ receptors. *Chemico-Biological Interactions*, 297, 16-24.
- Zari, A. T., Zari, T. A., & Hakeem, K. R. (2021). Anticancer Properties of Eugenol: A Review. *Molecules*, 26(23), 7407.