

ผลของอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับตัวทำละลายและระยะเวลาการสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชันต่อคุณภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบมะรุม

Effect of Solid-to-solvent Ratio and Maceration Time on Antioxidant Quality of *Moringa oleifera* Leaf Extract

เกตุการ ดาจันตา^{1*}, อุทัยวรรณ ฉัตรธง¹ และ หทัยทิพย์ ร้องคำ¹

Katekan Dajanta^{1*}, Utaiwan Chattong¹ and Hathaitip Rongkam¹

บทคัดย่อ: ใบมะรุมเป็นพืชอาหารที่อุดมด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย มีสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบหลักในการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับตัวทำละลาย (1:30, 1:40 และ 1:50, w/v) และระยะเวลาการสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชัน (3 และ 6 วัน) ต่อความสามารถในการสกัดสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์การรีดิวซ์เฟอริก (FRAP) ของสารสกัดใบมะรุม ผลการศึกษาพบว่าอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับตัวทำละลายที่ 1:30 (w/v) และระยะเวลาการสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชันนาน 3 วัน เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอล โดยมีค่า 21.18 mg GAE/g dry weight (DW.) และพบฤทธิ์การรีดิวซ์เฟอริกสูงที่สุดในสารสกัดที่อัตราส่วน 1:30 (w/v) โดยมีค่า 15.53 mg TE/g DW. ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าใบมะรุมมีศักยภาพในการเป็นแหล่งอาหารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ

คำสำคัญ: สารสกัดพืช, สารพฤกษเคมี, สารต้านอนุมูลอิสระ

ABSTRACT: *Moringa oleifera* L. leaves are an antioxidants rich edible plant that could be beneficial for human health. Phenolics and flavonoids are the major phytoconstituents assumed to be responsible for antioxidant activity. This study aimed to evaluate the effects of solid-to-solvent ratio (1:30, 1:40, and 1:50, w/v) and maceration time (3 and 6 days) on the extraction of phenolic compounds, total flavonoids, antioxidant capacities of DPPH radical scavenger and ferric reducing antioxidant power (FRAP) of *Moringa oleifera* L. leaf extract. The results found that solid-to-solvent ratio 1:30 (w/v) and 3 days of maceration time was the optimum condition for extraction of phenolic compounds with a value of 21.18 mg GAE/g dry weight (DW.). The highest antioxidant capacities of FRAP with a value of 15.53 mg TE/g DW. also found in the extract of solid-to-solvent ratio. These results clearly indicate that *Moringa* leaves are high potent natural antioxidant source.

Keywords: plant extract, phytonutrient, antioxidant

¹ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Division of Food Science and Technology, Faculty of Food and Agricultural Technology, Pibulsongkram Rajabhat University

* Corresponding author: katekan@psru.ac.th

บทนำ

มะรุม (*Moringa*; *Moringa oleifera* Lam.) จัดเป็นพืชสมุนไพรที่มีต้นกำเนิดอยู่ในแถบของประเทศอินเดีย ปากีสถาน บังกลาเทศและอัฟกานิสถาน ในปัจจุบันได้มีการกระจายพันธุ์ไปสู่ประเทศฟิลิปปินส์ กัมพูชา ทวีปอเมริกาหมู่เกาะแคริบเบียน และประเทศไทย (Mughul et al., 1999) ใบมะรุมเป็นแหล่งของวิตามินซี วิตามินเอ แคลเซียม โปแตสเซียม เหล็ก และโปรตีน (Rockwood et al., 2013; Gopalakrishnan et al., 2016) โดยใบมะรุมมีองค์ประกอบของแคลเซียมและโปรตีนสูงกว่านม 4 เท่า และ 2 เท่า ตามลำดับ มีวิตามินซีสูงกว่าส้ม 7 เท่า มีโปแตสเซียมสูงกว่ากล้วย และมีเหล็กสูงกว่าผักขม 3 เท่า และมีองค์ประกอบของวิตามินเอสูงกว่าแครอท 4 เท่า (Thurber and Fahey, 2009) นอกจากนี้ใบมะรุมยังเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอล (31.9 g/100g) และสารประกอบฟลาโวนอยด์ (40.8 g/100 g) (Pakade et al., 2013) ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่คือ isoquercetin, astragalin และ cryptochlorogenic acid (Vongsak et al., 2012) มีรายงานที่ระบุว่า isoquercetin มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีสรรพคุณในการรักษาอาการหืดหอบและลดความดันโลหิตสูง (Jung et al., 2010; Fernandez et al., 2005; Gasparotto et al., 2011) สารออกฤทธิ์ในใบมะรุมมีประโยชน์ทางการแพทย์ในการรักษาอาการอักเสบและติดเชื้อ โรคระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบทางเดินอาหาร และความผิดปกติของตับและไต (Singh et al., 1999; Hamza, 2010) มีส่วนช่วยป้องกันและรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหาร โรคผิวหนัง หลอดลมอักเสบ (Anwar et al., 2007) รวมถึงฤทธิ์ด้านการอักเสบ ยับยั้งการติดเชื้อไขมันในเลือด (Chumark et al., 2008; Verma et al., 2009) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Rahman et al., 2009; Vieira et al., 2010) และต้านมะเร็ง (Jung, 2014)

สารสกัดใบมะรุมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งในการทดสอบในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) และในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) และที่ผ่านมาได้มีการศึกษาวิธีการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากใบมะรุม โดย Vongsak et al. (2013) ได้เปรียบเทียบวิธีการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากใบมะรุมด้วยวิธีการต้มกับน้ำเดือด (decoction) การหมัก

การปล่อยให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงใบมะรุมอย่างช้าๆ (percolation) และการสกัดด้วยเครื่อง soxhlet ผลการศึกษาพบว่าวิธีการสกัดแบบมาเชอเรนซ์ในอัตราส่วนผงใบมะรุมแห้งต่อเอทานอลความเข้มข้น 70% ที่ 1:40 นาน 3 วัน ทำให้ได้สารสกัดที่มีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์มากที่สุด อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ผ่านมา ยังไม่มีรายงานผลของอัตราส่วนระหว่างผงใบมะรุมแห้งกับตัวทำละลายและระยะเวลาการสกัดด้วยวิธีมาเชอเรนซ์ต่อคุณภาพการต้านอนุมูลอิสระของใบมะรุม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างผงใบมะรุมแห้งกับตัวทำละลายเอทานอลและระยะเวลาการสกัดด้วยวิธีมาเชอเรนซ์ที่มีต่อคุณภาพการต้านอนุมูลอิสระของใบมะรุม ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลในการศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์จากมะรุมได้ต่อไป

วิธีการศึกษา

การเตรียมใบมะรุม

ใบมะรุมนำมาจากอำเภอบางระกำจังหวัดพิษณุโลก คัดเลือกเฉพาะใบที่ไม่แก่จัดที่มีสีเขียวอ่อนซึ่งเป็นส่วนที่บริโภคได้ล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา นำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 60°C นาน 90 นาที จะได้ใบมะรุมแห้งที่มีค่า a ต่ำกว่า 0.5 นำใบมะรุมที่อบแห้งแล้วมาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่นและร่อนผ่านตะแกรง ขนาด 40 เมช บรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยด์ ปิดให้สนิทและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการสกัดต่อไป

การสกัด

สกัดใบมะรุมด้วยวิธีมาเชอเรนซ์ (maceration method) โดยศึกษาอัตราส่วนระหว่างผงใบมะรุมต่อตัวทำละลายและระยะเวลาการแช่ผงใบมะรุมในตัวทำละลาย ตามแผนการทดลองแบบ 3x2 Factorial in Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยการผันแปรอัตราส่วนของผงใบมะรุมแห้งต่อตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 70% (w/v) (ปัจจัย A) 3 ระดับ คือ 1:30 1:40 และ 1:50 (w/v) ในฟลาสขนาด 125 มล. และผันแปรระยะเวลาการแช่ผงใบมะรุมในตัวทำละลาย (ปัจจัย B) 2 ระดับ คือ 3 และ 6 วัน โดยทำการเขย่าฟลาสในระหว่างการหมักทุก 24 ชั่วโมง กรองสารสกัด

ผ่านตะแกรงกรองเพื่อนำกากออกและนำสารสกัดไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman paper no.1 เก็บสารสกัดที่กรองได้ในที่มืดและเก็บรักษาสารสกัดที่ -20°C เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์คุณภาพการต้านอนุมูลอิสระต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compounds ของสารสกัดใบมะรุม

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ total phenolic compounds (TPC) ในสารสกัดใบมะรุมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method (Deladino et al., 2008) โดยผสมสารสกัด 0.40 มล. กับสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent (Merck, Germany) ปริมาตร 0.40 มล. เติมน้ำกลั่น Na_2CO_3 (Merck, Germany) ความเข้มข้น 2% (w/v) 4 มล. บ่มหลอดทดสอบที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที วัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Evolution 201, USA) ที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร คำนวณปริมาณ TPC ในหน่วย mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry weight (DW.) ($r^2 = 0.9992$)

การวิเคราะห์ปริมาณ total flavonoids ของสารสกัดใบมะรุม

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ total flavonoids (TFC) ในสารสกัดใบมะรุมด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric method (Yang et al., 2009) โดยผสมสารสกัด 1.50 มล. กับสารละลาย sodium nitrite (Ajax Finechem, New Zealand) ความเข้มข้น 5% จำนวน 0.075 มล. และบ่มในที่มืด 5 นาที เติมน้ำกลั่น aluminum chloride (Ajax Finechem, New Zealand) ความเข้มข้น 10% จำนวน 0.15 มล. และบ่มในที่มืด 6 นาที เติมน้ำกลั่น sodium hydroxide (Lab-Scan, Ireland) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 0.50 มล. เติมน้ำกลั่น 0.775 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร คำนวณปริมาณ total flavonoids ในหน่วย mg catechin equivalent (CE)/g DW. ($r^2 = 0.9961$)

การวิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity (DPPH)

ตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในสารสกัดใบมะรุมด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Nuengchamnong et al. (2009) โดยผสมสารสกัดใบมะรุม 1 มล. กับสารละลาย DPPH (Fluka Biochemica,

Switzerland) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 2 มล. บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในหน่วย mg butylated hydroxytoluene equivalent (BHT)/g DW. โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BHT (Sigma-Aldrich, Germany) ($r^2 = 0.9967$)

การวิเคราะห์ Ferric reducing-antioxidant power (FRAP)

ตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์การรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) ในสารสกัดใบมะรุมด้วยวิธีของ Maier et al. (2009) โดยผสมสารสกัดใบมะรุม 0.40 มล. กับสารละลาย FRAP 3 มล. บ่มหลอดทดสอบในอ่างน้ำอุ่น 37°C นาน 4 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร คำนวณค่า FRAP ในหน่วย mg trolox equivalent (TE)/g DW. ($r^2 = 0.9998$)

การออกแบบและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 3x2 Factorial in CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษาและวิจารณ์

งานวิจัยนี้ได้ทำแห้งใบมะรุมด้วยตู้อบแห้งแบบลมร้อนอุณหภูมิ 60°C ก่อนนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย ทั้งนี้เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลจากการทำลายของเอนไซม์ เช่น โพลีฟีนอลออกซิเดสซึ่งพบได้ในพืชทั่วไป อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการอบแห้งตัวอย่างพืชมีผลต่อการทำลายหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลและกระทบต่อชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลที่ตรวจวิเคราะห์ได้ โดยส่วนใหญ่การทำแห้งด้วยเทคนิคที่ใช้อุณหภูมิต่ำช่วยรักษาปริมาณสารประกอบฟีนอลและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าเทคนิคที่ใช้อุณหภูมิสูง (Yang et al., 2010) อย่างไรก็ตามรายงานของ Kim et al. (2006) ระบุว่า การใช้อุณหภูมิสูงในการอบแห้งช่วยทำลายพันธะของสารประกอบฟีนอลที่เชื่อมต่อกับโครงสร้างของพืช (bound form) ให้อยู่ในรูปของสารประกอบฟีนอลอิสระ (free form) และถูกสกัด

ออกมาด้วยตัวทำละลายได้มากกว่าการใช้ความร้อนต่ำหรือการไม่ใช้ความร้อนในการอบแห้ง และใช้วิธีการสกัดสารชีวภาพจากใบมะรุมด้วยวิธีมาเชอเรชั่น (maceration method) ซึ่งเป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีการหมักขึ้นพืชกับตัวทำละลายจนเนื้อเยื่อของพืชอ่อนนุ่มและเกิดการแทรกซึมของตัวทำละลายเข้าไปละลายสารชีวภาพในเนื้อเยื่อพืชออกมาอยู่ในส่วนของตัวทำละลาย เป็นวิธีการสกัดที่สารชีวภาพไม่ต้องสัมผัสกับความร้อนซึ่งอาจทำให้สารเสื่อมสภาพ สามารถทำได้ง่าย และต้นทุนต่ำ (Sithisarn et al., 2006)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์

อัตราส่วนของผงใบมะรุมต่อสารละลายเอทานอล ระยะเวลาการแช่ผงใบมะรุมในตัวทำละลาย และอิทธิพลร่วมของอัตราส่วนของผงใบมะรุมต่อสารละลายเอทานอลและระยะเวลาการแช่ผงใบมะรุมในตัวทำละลายมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (Table 1) โดยสารประกอบฟีนอลมีปริมาณลดลงเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของผงใบมะรุมต่อสารละลายเอทานอลจากอัตราส่วน 1:30 (w/v) (19.76 mg GAE/g DW.)

เป็น 1:50 (w/v) (12.11 mg GAE/g DW.) ทั้งนี้เนื่องจากการใช้อัตราส่วนระหว่างพืชตัวอย่างต่อตัวทำละลายที่ต่ำ (อัตรา 1:30, w/v) จะทำให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลสูงกว่าการสกัดที่ใช้อัตราส่วนระหว่างพืชตัวอย่างต่อตัวทำละลายที่สูงกว่า (อัตรา 1:40 และ 1:50, w/v) ขณะที่การใช้อัตราส่วนการสกัดที่สูงอาจส่งผลให้เกิดการเจือจางสารชีวภาพที่สกัดออกมาจากพืชได้ (Ho et al., 2008)

สารประกอบฟีนอลในสารสกัดมีปริมาณลดลงเมื่อเพิ่มเวลาการแช่ผงใบมะรุมในตัวทำละลายจาก 3 วัน (17.46 mg GAE/g DW.) เป็น 6 วัน (14.85 mg GAE/g DW.) การแช่พืชตัวอย่างในตัวทำละลายนานเกินไปอาจเกิดการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลที่ถูกสกัดออกมาอยู่ในตัวทำละลายเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้มีปริมาณลดลง (Sulaiman et al., 2017) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนของผงใบมะรุมต่อสารละลายเอทานอล ระยะเวลาการแช่ผงใบมะรุมในตัวทำละลาย และอิทธิพลร่วมของอัตราส่วนของผงใบมะรุมต่อสารละลายเอทานอลและระยะเวลาการแช่ผงใบมะรุมในตัวทำละลายไม่มีผลต่อปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยตรวจพบสารประกอบ

Table 1 Total phenolic compound and total flavonoid contents of *Moringa oleifera* leaf extracts

Factor	Total phenolic compounds (mg GAE/g DW.)	Total flavonoids (mg CE/g DW.)
solid-to-solvent ratio (A)	*	ns
1:30 (w/v)	19.76 ± 1.60 ^a	15.67 ± 1.11
1:40 (w/v)	16.59 ± 2.39 ^b	16.15 ± 0.72
1:50 (w/v)	12.11 ± 0.72 ^c	15.22 ± 0.55
Maceration time (B)	*	ns
3 day	17.46 ± 3.92	15.44 ± 1.02
6 day	14.85 ± 2.92	15.91 ± 0.67
A x B	*	ns
1:30 (w/v) x 3 day	21.18 ± 0.30 ^a	14.87 ± 1.01
1:30 (w/v) x 6 day	18.34 ± 0.56 ^b	16.47 ± 0.35
1:40 (w/v) x 3 day	18.72 ± 0.57 ^b	16.30 ± 0.95
1:40 (w/v) x 6 day	14.47 ± 0.63 ^c	16.00 ± 0.56
1:50 (w/v) x 3 day	12.48 ± 0.76 ^d	15.17 ± 0.71
1:50 (w/v) x 6 day	12.11 ± 0.72 ^d	15.27 ± 0.50

Values reported are the means ± standard deviations (n = 3). Different letters within the same columns indicate statistically significant differences ($P \leq 0.05$) by LSD. * = significant differences within the same columns ($P \leq 0.05$). ns = not significant differences within the same columns ($P > 0.05$). GAE = gallic acid equivalent, DW. = dry weight, CE = catechin equivalent

ฟลาโวนอยด์อยู่ระหว่าง 14.87 - 16.47 mg CE/g DW. เมื่อสกัดผงใบมะรุมด้วยตัวทำละลายเอทานอลในอัตรา 1:30 - 1:50 (w/v) นาน 3 - 6 วัน

สารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยอัตราส่วนของผงใบมะรุมกับสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% ที่ 1:30 1:40 และ 1:50 (w/v) หลังการหมักที่ 3 และ 6 วัน พบสารประกอบฟีนอลอยู่ในช่วง 12.11 - 21.18 mg GAE/g DW. และสารประกอบฟลาโวนอยด์อยู่ในช่วง 14.87 - 16.47 mg CE/g DW. (Table 1) ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำกว่างานวิจัยของ Vongsak et al. (2013) ซึ่งได้ระบุการตรวจพบสารประกอบฟีนอลในสารสกัดใบมะรุมที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 70% อัตรา 1:40 (w/v) ด้วยวิธีมาเซอเรชันนาน 3 วัน ในปริมาณ 53.5 mg chlorogenic acid equivalent/g dry powder และพบสารประกอบฟลาโวนอยด์ 25.1 mg isoquercetin equivalent/g dry powder ทั้งนี้เนื่องจากใช้วิธีการเตรียมสารสกัดแตกต่างกัน โดยงานวิจัยของ Vongsak et al. (2013) ได้ทำการสกัดกากที่เหลือของใบมะรุมซ้ำหลายครั้ง ขณะที่งานวิจัยนี้ทำการสกัดเพียงครั้งเดียว นอกจากนี้ยังคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์สมมูลกับสารมาตรฐานอ้างอิงแตกต่างกัน รายงานของ Vongsak et al. (2013) ยังได้ระบุว่าสารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่ในสารสกัดใบมะรุมคือ crypto-chlorogenic acid, isoquercetin และรายงานของ Verma et al. (2009) ระบุว่าสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบมะรุมส่วนใหญ่ คือ kaempferol, quercetin และ rutin นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบสารกลุ่ม phenolic acids คือ gallic acid, chlorogenic acid, ellagic acid และ ferulic acid ในสารสกัดใบมะรุมอีกด้วย (Bennett et al., 2003; Brahma et al., 2009)

การสกัดผงใบมะรุมด้วยตัวทำละลายในอัตราส่วนแตกต่างกันสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ได้แตกต่างกัน ทั้งนี้เป็นผลจากกลไกการเคลื่อนย้ายมวลสาร (mass transfer) ระหว่างองค์ประกอบที่อยู่ในชั้นของแข็งหรือตัวอย่างชิ้นพืชกับตัวทำละลายและอัตราการแพร่ (diffusion rate) ขององค์ประกอบในชั้นพืชให้ถูกสกัดออกมาอยู่ในส่วนของตัวทำละลาย (Tan et al., 2011; Wong et al., 2013) จนถึงจุดหนึ่งที่เกิดความสมดุล (equilibrium constant) ระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในชั้นพืชกับตัวทำละลายก็จะทำให้ความสามารถในการ

สกัดไม่เพิ่มขึ้นอีกต่อไป (Tan et al., 2011) ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนการสกัดระหว่างของแข็งกับตัวทำละลายและเวลาในการแช่ผงใบมะรุมกับตัวทำละลายมีผลต่อความสามารถในการสกัดสารประกอบฟีนอลจากใบมะรุม โดยการสกัดใบมะรุมด้วยอัตราส่วนของผงใบมะรุมกับสารละลายเอทานอลที่ 1:30 (w/v) นาน 3 วัน ทำให้ได้สารประกอบฟีนอลสูงที่สุด แสดงให้เห็นว่าที่สภาวะนี้เกิดการละลายของสารประกอบฟีนอลในชั้นพืชและแพร่ออกมาอยู่ในตัวทำละลายได้มากที่สุดหรือเกิดสภาวะสมดุลคงที่ ดังนั้นเมื่อเพิ่มอัตราส่วนการสกัดมากขึ้นหรือเพิ่มเวลาในการแช่ชิ้นพืชในตัวทำละลายจาก 3 วัน เป็น 6 วัน จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณการสกัดสารประกอบฟีนอลได้

ค่า DPPH radical-scavenging activity (DPPH) และ Ferric reducing-antioxidant power (FRAP)

Table 2 แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์การรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) ของสารสกัดใบมะรุม ผลการศึกษาพบว่า อัตราส่วนของผงใบมะรุมต่อสารละลายเอทานอล และอิทธิพลร่วมของอัตราส่วนของผงใบมะรุมต่อสารละลายเอทานอลและระยะเวลาการแช่ผงใบมะรุมในตัวทำละลายมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยการสกัดใบมะรุมที่อัตราส่วน 1:50 (w/v) นาน 3 และ 6 วัน ทำให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด (117.94 - 119.17 mg BHTe/g DW.) และพบว่าอัตราส่วนของผงใบมะรุมต่อสารละลายเอทานอลและระยะเวลาการแช่ผงใบมะรุมในตัวทำละลายมีผลต่อฤทธิ์การรีดิวซ์เฟอร์ริกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยการสกัดใบมะรุมที่อัตราส่วน 1:30 (w/v) และระยะเวลาการแช่ผงใบมะรุมในตัวทำละลายนาน 3 วัน ทำให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์การรีดิวซ์เฟอร์ริกสูงที่สุดคือ 15.53 mg TE/g DW. และ 15.33 mg TE/g DW. ตามลำดับ ขณะที่อิทธิพลร่วมของอัตราส่วนของผงใบมะรุมต่อสารละลายเอทานอลและระยะเวลาการแช่ผงใบมะรุมในตัวทำละลายไม่มีผลต่อฤทธิ์การรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารสกัดใบมะรุม

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบมะรุมไม่สอดคล้องกับฤทธิ์การรีดิวซ์เฟอร์ริกและปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบในสารสกัด (Table 1) ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของกลไกการ

ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และการรีดิวซ์เฟอริก โดยการตรวจวัดฤทธิ์การรีดิวซ์เฟอริกเป็นการวัดค่าความสามารถในการให้โปรตรอนกับอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกับวิธีการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และยังวัดความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นอีกกลไกหนึ่งที่ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระแบบลูกโซ่ได้ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ขึ้นอยู่กับชนิดและโครงสร้างของสาร โดยสารที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างมากจะแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้การจัดเรียงหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างและรูปร่างทางโครงสร้างของสาร (configuration) ยังส่งผลต่อความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลและฟลาโ

นอยด์ด้วยเช่นกัน (Banjarnahor and Artanti, 2014) และที่ผ่านมา มีรายงานของ Farhoosh et al. (2007) และ Vongsak et al. (2012) ได้แสดงผลการทดลองความไม่สอดคล้องของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ในลักษณะเดียวกันนี้ การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบมะรุมนอกจากการต้านออกซิเดชันแล้วยังมีรายงานที่บ่งชี้ว่าสารสกัดใบมะรุมมีฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือด ยับยั้งการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (Chumark et al., 2008) ป้องกันการเกิดความเสียหายของสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ ป้องกันภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) (Verma et al., 2009) และยับยั้งจุลินทรีย์ (Rahman et al., 2009; Vieira et al., 2010) ได้

Table 2 DPPH radical-scavenging activity (DPPH) and ferric reducing-antioxidant power (FRAP) of *Moringa oleifera* leaf extracts

Factor	DPPH (mg BHTe/g DW.)	FRAP (mg TE/g DW.)
solid-to-solvent ratio (A)	*	*
1:30 (w/v)	99.93 ± 3.14 ^c	15.53 ± 0.77 ^a
1:40 (w/v)	108.40 ± 3.01 ^b	14.74 ± 0.32 ^b
1:50 (w/v)	118.55 ± 1.55 ^a	14.26 ± 1.18 ^b
Maceration time (B)	ns	*
3 day	109.53 7.01	15.33 ± 0.88 ^a
6 day	108.39 9.69	14.36 ± 0.78 ^b
A x B	*	ns
1:30 (w/v) x 3 day	102.70 0.46 ^c	16.19 ± 0.16
1:30 (w/v) x 6 day	97.17 1.21 ^d	14.87 ± 0.40
1:40 (w/v) x 3 day	107.96 ± 3.81 ^b	14.75 ± 0.04
1:40 (w/v) x 6 day	108.84 ± 2.75 ^b	14.74 ± 0.50
1:50 (w/v) x 3 day	117.94 1.42 ^a	15.05 ± 1.17
1:50 (w/v) x 6 day	119.17 1.69 ^a	13.46 ± 0.44

Different letters within the same columns indicate statistically significant differences ($P \leq 0.05$) by LSD. * = significant differences within the same columns ($P \leq 0.05$). ns = not significant differences within the same columns ($P > 0.05$). BHTe = butylated hydroxytoluene equivalent; DW. = dry weight; TE = trolox equivalent

สรุป

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าใบมะรุมของไทยเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถสกัดออกมาได้ด้วยวิธีมาเซอเรชัน โดยสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือการใช้อัตราส่วนผงใบมะรุมต่อตัวทำ

ละลายเอทานอลความเข้มข้น 70% ที่ 1:30 นาน 3 วัน ทำให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุด ซึ่งสามารถนำสารสกัดใบมะรุมไปประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์อาหารหรือเครื่องสำอางได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Anwar, F., S. Latif, M. Ashraf, and A.H. Gilani. 2007. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother. Res.* 21:17–25.
- Banjarnahor, S.D.S., and N. Artanti. 2014. Antioxidant properties of flavonoids. *Med. J. Indones.* 23:239-244.
- Bennett, R.N., F.A. Mellon, N. Foidl, J.H. Pratt, M.S. Dupont, L. Perkins, and P.A. Kroon. 2003. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L. *J. Agric. Food Chem.* 51:3546-3553.
- Brahma, N.S., B.R. Singh, R.L. Singh, D. Prakash, R. Dhakarey, G. Upadhyay, and H.B. Singh. 2009. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food Chem. Toxicol.* 47:1109-1116.
- Chumark, P., P. Khunawat, Y. Sanvarinda, S. Phornchirasilp, N.P. Morales, L. Phivthong-ngam, P. Ratanachamnong, S. Srisawat, and K. Pongrapeeporn. 2008. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *J. Ethnopharmacol.* 116:439-446.
- Deladino, L., P.S. Anbinder, A.S. Navarro, and M.N. Martino. 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydr. Polym.* 71:126-134.
- Farhoosh, R., G.A. Golmohammadi, and M.H.H. Khodaparast. 2007. Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis* L.). *Food Chem.* 100:231–236.
- Fernandez, J., R. Reyes, H. Ponce, M. Oropeza, M.R. Vancalsteren, C. Jankowski, and M.G. Campos. 2005. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4- induced contraction in guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol.* 522:108–115.
- Gasparotto Jr.A., F.M. Gasparotto, E.L. Lourenço, S. Crestani, M.E. Stefanello, M.J. Salvador, J.E. da Silva-Santos, M.C. Marques, and C.A. Kassuya. 2011. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *J. Ethnopharmacol.* 134:363–372.
- Gopalakrishnan, L., K. Doriya, and D.S. Kumar. 2016. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness.* 5:49-56.
- Hamza, A. 2010. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats. *Food Chem. Toxicol.* 48:345-355.
- Ho, C.H.L., J.E. Cacace, and G. Mazza. 2008. Mass transfer during pressurized low polarity water extraction of lignans from flax seed meal. *J. Food Eng.* 89:64-71.
- Jung, I.L. 2014. Soluble extract from *Moringa oleifera* leaves with a new anticancer activity. *PLOS ONE.* 9:e95492-e95501.
- Jung, S.H., B.J. Kim, E.H. Lee, and N.N. Osborne. 2010. Isoquercitrin is the most effective antioxidant in the plant *Thuja orientalis* and able to counteract oxidative-induced damage to a transformed cell line (RGC-5 cells). *Neurochem. Int.* 57:713–721.
- Kim, S.Y., S.M. Jeong, W.P. Park, K.C. Nam, D.U. Ahn, and S.C. Lee. 2006. Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food Chem.* 97:472-479.
- Maier, T., A. Schieber, D.R. Kammerer, and R. Carle. 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem.* 112:551-559.
- Mughul, M.H., G. Ali, P.S. Srivastava, and M. Iqbal. 1999. Improvement of drumstick (*Moringa pteryosperma* Gaertn) a unique source of food and medicine through tissue culture. *Hamdard. Med.* 42: 37-42.

- Nuengchamnong, N., K. Kritasilp, and K. Ingkaninan. 2009. Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay. *Food Chem.* 117:750-756.
- Pakade, V., E. Cukrowska, and L. Chimuka. 2013. Comparison of antioxidant activity of *M. oleifera* and selected vegetables in South Africa. *S. Afr. J. Sci.* 109:1-5.
- Rahman, F., S. Chowdhury, M. Rahman, D. Ahmed, and A. Hossain. 2009. Antimicrobial resistance pattern of gram-negative bacterial causing tract infection. *Stamford J. Pharm. Sci.* 2:44-50.
- Rockwood, J.L., B.G. Anderson, D.A. Casamatta. 2013. Potential uses of *Moringa oleifera* and an examination of antibiotic efficacy conferred by *M. oleifera* seed and leaf extracts using crude extraction techniques available to under-served indigenous populations. *Int. J. Phytotherapy Res.* 3:61-71.
- Singh, K.K., and K. Kumar. 1999. Ethnotherapeutics of some medicinal plants used as antipyretic agent among the tribals on India. *J. Econ. Tax. Bot.* 23:135-141.
- Sithisarn, P., R. Supabphol, W. Gritsanapan. 2006. Comparison of free radical scavenging activity of Siamese neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss var. *siamensis* Valetton) leaf extracts prepared by different methods of extraction. *Med. Princ. Pract.* 15:219-222.
- Sulaiman, I.S.C., M. Basri, H.R.F. Masoumi, W.J. Chee, S.E. Ashari, and M. Ismail. 2017. Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chem. Cent. J.* 11:54-64.
- Tan, P.W., C.P. Tan, and C.W. Ho. 2011. Antioxidant properties: Effects of solid-to-solvent ration on antioxidant compounds and capacities of Pegaga (*Centella asiatica*). *International Food Research Journal.* 18: 557-562.
- Thurber, M.D. and J.W. Fahey. 2009. Adoption of *Moringa oleifera* to combat under-nutrition viewed through the lens of the "diffusion of innovations" theory. *Ecol. Food Nutr.* 48:212- 25.
- Verma, A.R., M. Vijayakumar, C.S. Mathela, and C.V. Rao. 2009. In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chem. Toxicol.* 47:2196-2201.
- Vieira, T.R.L., M.G. Cunha, D.S. Garrutti, T.F. Duarte, S.S.S. Félex, J.M. Pereira Filho, M.S. Madruga. 2010. Physical and sensorial properties of Santa Ines lamb meat terminated in diets with increasing levels of whole cotton seed (*Gossypium hirsutum*). *Cienc. Tecnol. Aliment.* 30:372-377.
- Vongsak, B., P. Sithisarn, S. Mangmool, S. Thongpraditchote, Y. Wongkrajang, and W. Gritsanapan. 2013. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Ind. Crops Prod.* 44:566-571.
- Vongsak, B., P. Sithisarn, W. Gritsanapan. 2012. HPLC quantitative analysis of three major antioxidant components of *Moringa oleifera* leaf extracts. *Planta Med.* 78:1252.
- Wong, B.Y., C.P. Tan, and C.W. Ho. 2013. Effect of solid-to-solvent ratio on phenolic content and antioxidant capacities of "Dukung Anak" (*Phyllanthus niruri*). *International Food Research Journal.* 20:325-330.
- Yang, J., J.F. Chen, Y.Y. Zhao, and L.C. Mao. 2010. Effects of drying processes on the antioxidant properties in sweet potato. *Agr. Sci. China.* 9(10):1522-1529.
- Yang, J., T.E. Martinson, and R.H. Liu. 2009. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chem.* 116:332-339.