

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของแคฝรั่ง

Chemical Constituents and Biological Activities of *Gliricidia sepium*

ตฤณกร เกตุกุลพันธ์¹ เยี่ยมศิริ มณีพิศมัย¹ ปราณี ปิ่นเงิน¹ อุษณีย์ ใบบัว¹
ประภาพร ภูริปัญญาคุณ¹ เพลินพิศ ยะสินธุ์¹ วีรนุช สระแก้ว¹ ชัยสิทธิ์ นิยะสม² และ รัตนา เฉลิมกลิ่น¹
Trinnakorn Katekunlaphan¹, Yiemsiri Maneepisamai¹, Pranee Pinngem¹, Utsanee Baibua¹
Prapapom Pooripunyakun¹, Plernpit Yasin¹, Veeranuch Srakaew¹, Chaiyasit Niyasom² and Ratana Chalermglin¹

บทคัดย่อ

จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจาก กิ่ง ลำต้น และใบ ของแคฝรั่ง เบื้องต้นพบว่ามีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ flavonols, flavones, flavanones และ xanthenes และยังพบสารในกลุ่ม แทนนิน และ ฟีนอลิก การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากส่วน กิ่ง ลำต้น และใบ ของแคฝรั่ง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้าน อัลไซเมอร์ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และวิธี ABTS พบว่าสารสกัด เมทานอลของแคฝรั่งทุกส่วนแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดเอทิลอะซีเตตและสารสกัด เฮกเซน โดยสารสกัดเมทานอลจากส่วนใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือมีค่า IC₅₀ โดยวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 0.0367 และ 0.2043 มก./มล. ตามลำดับ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรอกซ์ ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.0263 และ 0.0223 มก./มล. ตามลำดับ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้าน เชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดเอทิลอะซีเตตส่วนกิ่งและลำต้นแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ดีที่สุด แต่พบว่าสารสกัด ทุกส่วนของแคฝรั่งไม่สามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* ส่วนการทดสอบฤทธิ์ ต้านอัลไซเมอร์ สารสกัดทุกส่วนไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase

คำสำคัญ: แคฝรั่ง ฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอัลไซเมอร์

¹ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม

² สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

Abstract

Screening of chemical constituents stems, twigs and leaves of *Gliricidia sepium* showed the presence of flavonoids, mainly flavonols, flavones, flavanones, xanthones, together with tannins and phenolics. The extracts were evaluated for antioxidants, antibacterial and anti-alzheimer's activities. The antioxidant activity was determined using free radical scavenging of DPPH and ABTS methods. All crude methanol extracts showed higher antioxidant activity than ethyl acetate and hexane extracts. Moreover, the methanol extract of leaves showed the highest antioxidant activity in DPPH and ABTS assays with IC_{50} 0.0367 and 0.2043 mg/mL, respectively, when compared with known standard Trolox with IC_{50} 0.0263 and 0.0223 mg/mL, respectively. For antibacterial activity, the ethyl acetate extracts of twigs and stems exhibited highest activity against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, but all crude extracts were inactive against *Escherichia coli*. For anti-alzheimer activity, all extracts were inactive.

Keywords: *Gliricidia sepium* , Flavonoids , Antioxidant activity , Antibacterial activity , Anti-Alzheimer activity

บทนำ

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพ จึงมีพืชสมุนไพรนานาชนิด ในปัจจุบันความต้องการใช้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรเพื่อประโยชน์ในหลายๆ ด้าน เช่น ใช้รักษาโรค ใช้ทำเครื่องสำอางค์ เป็นต้น จึงได้มีการผลักดันให้สมุนไพรหรือพรรณไม้ไทย เป็นปัจจัยที่สำคัญส่วนหนึ่งในการแก้ไขปัญหาเศรษฐกิจ ยังผลให้วงการแพทย์ เภสัชกร และนักวิจัยจำนวนมากให้ความสนใจการทำวิจัยด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ดังนั้นการนำพืชสมุนไพรมาสกัดเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปใช้สำหรับเป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นยารักษาโรคหรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ จึงเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจ

แคฝรั่ง (*Gliricidia sepium*) จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae (Sotelo และคณะ, 1986) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางสูงประมาณ 3-15 เมตร เปลือกต้น

เป็นสีเทาเกือบขาว ผลัดใบช่วงฤดูหนาวเดือนตุลาคม-ธันวาคม ดอกบานสะพรั่งเต็มต้น (ภาพที่ 1) ราวเดือน ธันวาคม-พฤษภาคม (Elevitch และ Francis, 2006) แคฝรั่งพบได้บริเวณชายฝั่งตะวันออกถึงตะวันตกของเม็กซิโก อเมริกาใต้ อินเดีย และฟิลิปปินส์ มีการนำมาขยายพันธุ์ในประเทศไทยพบว่ามีเพียง 1 ชนิด ลักษณะเด่นของแคฝรั่ง คือ ดอกมีสีชมพูปนสีขาวสวยงาม สำหรับสรรพคุณทางยาและฤทธิ์ทางชีวภาพของแคฝรั่งในประเทศกัวเตมาลา คอสตาริกา และเวเนซุเอลา ใช้ส่วนเปลือกในการรักษาโรคติดต่อทางผิวหนังที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัว (Morton, 1981) ประเทศศรีลังกา จะปลูกแคฝรั่งไว้ใกล้ต้นชาเพื่อป้องกันแมลงที่จะมาทำลายต้นชา (Rastrelli และคณะ, 1999) สำหรับสารที่พบในแคฝรั่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Jurd, 1976) และไตรเทอร์ปีนอยด์ (Herath, 2000)



ภาพที่ 1 ดอกแคฝรั่งภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏ
จันทร์เกษม

ในการวิจัยครั้งนี้คณะวิจัยได้เก็บแคฝรั่งที่ปลูกภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏจันทร์เกษม โดยศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นและฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยังไม่มีผู้รายงาน คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอัลไซเมอร์ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นเผยแพร่ให้นักศึกษา บุคลากรของมหาวิทยาลัย และบุคคลทั่วไปได้ทราบถึงประโยชน์ของแคฝรั่งซึ่งเป็นต้นไม้ประจำมหาวิทยาลัยราชภัฏจันทร์เกษม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจาก กิ่ง ลำต้น และใบของแคฝรั่ง
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจาก กิ่ง ลำต้น และใบของแคฝรั่ง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอัลไซเมอร์

ขอบเขตของการวิจัย

1. ขอบเขตด้านเนื้อหา เป็นการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแคฝรั่ง
2. ประชากรที่ศึกษาเป็นการศึกษาส่วนต่างๆ ของแคฝรั่ง ได้แก่ กิ่ง ลำต้น และใบ

สมมติฐานของการวิจัย

แคฝรั่งที่ปลูกภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏจันทร์เกษม อาจจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจและกลุ่มสารที่แตกต่างจากที่มีผู้รายงานไว้

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัด เก็บตัวอย่างแคฝรั่งภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏจันทร์เกษม โดยตัดกิ่งแรกที่แยกออกจากลำต้นของแคฝรั่งซึ่งมีความยาวประมาณ 3 เมตร วัดจากปลายยอดถึงบริเวณที่ตัด โดยแยกส่วนของแคฝรั่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. กิ่งย่อยที่แยกออกมาจากกิ่งแรกของลำต้นทั้งหมดให้เป็นตัวแทนของส่วนกิ่ง
2. กิ่งแรกที่แยกออกจากลำต้น ให้เป็นตัวแทนของส่วนลำต้น
3. ใบ โดยเก็บใบทั้งหมดที่ได้จากกิ่งแรกของลำต้น นำส่วน กิ่ง ลำต้น และใบ ของแคฝรั่งมาล้างให้สะอาดและทำให้แห้งโดยผึ่งในที่ร่ม ประมาณ 1 สัปดาห์ จากนั้นบดให้ละเอียดแล้วทำการสกัดแคฝรั่งแต่ละส่วนโดยการแช่ในตัวทำละลายตามลำดับจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ คือ นอร์มัล-เฮกเซน (*n*-hexane) แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง คือ เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) และสุดท้ายเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง คือ เมทานอล (methanol) นำสารละลายที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ดูดตัวทำละลายที่ยังอาจหลงเหลืออยู่ด้วย high vacuum pump ได้สารสกัด (crude extract)

การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และฟีนอลิก ใช้วิธีตรวจสอบตาม อ้อมบุญ ล้วนรัตน์ (2536)

1. การตรวจสอบกลุ่มสารแอลคาลอยด์เตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยละลายในตัวทำละลายที่ใช้สกัด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต

และเมทานอล หยดสารละลายลงหลอดทดลอง
ประมาณ 2-3 หยด ในกรณีที่มีตะกอนมีสีขาว ขาวนวล
หรือเหลืองอ่อน ให้เติมกรดเจ็จจาก 1 หยด จากนั้น
หยดน้ำยาทดสอบ Dragendorff's, Marme's, Mayer's,
และ Wagner's reagents ลงไป 1-2 หยด สังเกตสี
และปริมาณของตะกอนที่เกิดขึ้น

2. การตรวจสอบกลุ่มสารฟลาโวนอยด์
เตรียมสารละลายของสารสกัดโดยละลายในตัวทำ
ละลายที่ใช้สกัดคือ ทำการทดสอบ 2 วิธี

2.1 วิธี Shinoda Test เติมสารละลาย
ของสารสกัด 1 มล. ลงในหลอดทดลองที่มีแมกนีเซียม
ยาวประมาณ 0.2 ซม. ทำการเติมกรดไฮโดรคลอริก
เข้มข้น (HCl) 10 หยด สังเกตสีส้มถึงสีแดงที่เกิดขึ้น
ทำให้หลอดเย็นโดยเจ็จจากด้วยน้ำปริมาตรเท่าตัว
จากนั้นเติม octyl alcohol 1 มล. เขย่าและตั้งทิ้งไว้
ให้แยกชั้นและสังเกตสีแต่ละชั้น

2.2 ปฏิกริยากับต่าง นำสารละลายของ
สารสกัดประมาณ 1 มล. เติมน้ำในหลอดทดลอง
แล้วหยด Ammonia TS (28% NH_4OH 35.7 มล.
ปรับปริมาตรเป็น 100 มล.) ที่ละหยด แล้วสังเกตสี
ที่เกิดขึ้น

3. การตรวจสอบกลุ่มสารแทนนินและฟีนอลิก
เติมสารละลายของสารสกัดทั้ง 9 ส่วน ใส่ลงใน
หลอดทดลองหลอดละ 2 มล. จำนวน 7 หลอด ดังนี้
หลอดที่ 1 ใช้เป็น control (sodium chloride solution)
หลอดที่ 2 เติม gelatin solution 2-3 หยด
หลอดที่ 3 เติม gelatin salt solution 2-3 หยด
หลอดที่ 4 เติม 1% ferric chloride 2-3 หยด
หลอดที่ 5 เติม bromine water 5-6 หยด
หลอดที่ 6 Vanillin-HCl test ถ่ายสารสกัดลงชาม
ระเหย แล้วอังด้วยไอน้ำจนแห้งเติม vanillin reagent
1 มล. และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 หยด
หลอดที่ 7 เติม Lime-Water 5 มล.

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี
DPPH (Yu และคณะ, 2002) เตรียมสารละลายของ

สารสกัด โดยชั่งสารสกัด 0.5 ก. ละลายใน
ตัวทำละลายที่ใช้สกัดแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล.
ส่วนสารละลายมาตรฐานโทรออกซ์ (6-Hydroxyl-
2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)
เตรียมโดยชั่งโทรออกซ์ 1 ก. ละลายใน 95 % เอทานอล
ให้ครบ 100 มล. นำสารละลายทั้ง 2 ชนิด มาปรับให้
มีความเข้มข้นที่ต่างๆ กัน 5 ความเข้มข้น ปิเปต
สารละลายของสารสกัดแต่ละความเข้มข้นใส่ใน
หลอดทดลองแต่ละหลอด หลอดละ 1 มล. จากนั้น
เติม 0.3 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
ลงไป 2 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วปิดให้สนิท ตั้งทิ้งไว้
ในที่มืด 30 นาที จึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว
คลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์
การต้านอนุมูลอิสระ (%inhibition)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี
ABTS (Re และคณะ, 1999) เป็นการใช้น้ำ potassium
persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) ความเข้มข้น 0.14 M ผสมกับ
ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline sulfonate)
เข้มข้น 7 mM ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง
จากนั้นนำมาเจ็จจากและวัดค่าดูดกลืนแสง
ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืน
แสงอยู่ระหว่าง 0.70 ± 0.02 ก่อนใช้งาน จากนั้น
นำสารสกัดและสารละลายมาตรฐานโทรออกซ์มา
เตรียมให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน 5 ความเข้มข้น
ปิเปตสารละลายสารสกัดแต่ละความเข้มข้นใส่ใน
หลอดทดลองแต่ละหลอด หลอดละ 1 มล. แล้วเติม
ABTS ลงไป 2 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด
6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น
734 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้าน
อนุมูลอิสระ

วิธีคำนวณ

คำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ดังนี้

$$\% \text{Inhibition} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่าการดูดกลืนที่วัดได้ของสารละลายของสารสกัดที่ผสมกับ DPPH

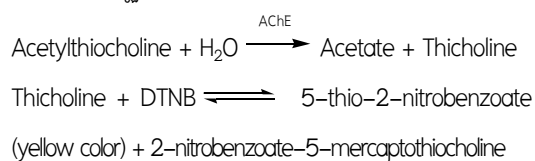
A_{control} = ค่าการดูดกลืนที่วัดได้ของ DPPH หรือ ABTS และตัวทำละลายที่ใช้

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดย Disc diffusion method โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauer และคณะ (1966) และวิธีของ Mahasneh และ El-Oqlah (1999) เพื่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ซึ่งได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นำโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบน Trypticase soy agar เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Trypticase soy broth บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland No. 0.5 เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ 10^7 – 10^8 เซลล์ต่อมล. จากนั้นจึงนำจุลินทรีย์ที่เตรียมได้ปริมาตร 0.1 มล. หยดลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hinton Agar โดยใช้แท่งแก้ววอลอดเชื้อเกลี่ยบนหน้าวุ้นให้ทั่วกัน ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจุลินทรีย์บนหน้าวุ้น นำแผ่นดิสต์ที่มีสารสกัดประมาณ 4 ไมโครกรัม/แผ่นดิสต์ มาวางบนวุ้นที่มีแบคทีเรีย บ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16–18 ชั่วโมง ทำการการอ่านผลเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเมื่อใช้สารที่มีความเข้มข้นเท่ากันโดยดูผลจากวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสต์ (รวมขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นดิสต์ ซึ่งในที่นี้ใช้แผ่นดิสต์ที่มี

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม.) โดยทำการแปลผลดังนี้ ถ้าพบ วงใสรอบแผ่นดิสต์ แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบ และถ้าไม่พบวงใสรอบแผ่นดิสต์แสดงว่า สารทดสอบไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอัลไซเมอร์ โดยศึกษา antiacetylcholinesterase activity ด้วยวิธี TLC combining bioassay ร่วมกับ Ellman's reagent (Rhee และคณะ, 2001) ซึ่งเป็นการทดสอบเบื้องต้นโดยใช้ตัวดูดซับที่เป็นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ชนิดบาง (TLC) ซึ่งตัดให้มีขนาดพอเหมาะกับสารที่จะทดสอบ นำสารละลายของสารสกัดที่ความเข้มข้น 25 มก./มล. ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น TLC โดยให้แถบมีความกว้างประมาณ 1 ซม. และมี galantamine hydrobromide เป็นสารมาตรฐาน นำไป develop ในระบบตัวทำละลาย 100% ไดคลอโรมีเทน ทำให้แห้งแล้วพ่นด้วย acetylthiocholine iodine (ATCI) จนทั่วแผ่น TLC ทิ้งไว้สักครู่ พ่น Ellman's reagent จนทั่วแผ่น TLC ซึ่งจะปรากฏเป็นพื้นสีเหลืองเกิดขึ้น พ่นเอนไซม์ จนทั่ว แผ่น TLC ปริ เว ณ สาร ที่ มี ฤ ท ธิ์ antiacetylcholinesterase (AChE) จะปรากฏเป็นจุดสีขาว

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังนี้



จากสมการ acetylthiocholine จะถูก AChE เปลี่ยนเป็น thicholine ซึ่งทำปฏิกิริยาต่อกับ 5,5'-dithiobis-[2-nitrobenzoic acid] (DTNB, Ellman's reagent) ให้สีเหลืองของ 5-thio-2-nitrobenzoate แต่ในกรณีที่สารสามารถไปยับยั้ง AChE ได้จะทำให้ acetylthiocholine ไม่ถูกเปลี่ยนเป็น thicholine และไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้

ผลการวิจัย

การสกัดสารจากแคฝรั่ง เมื่อนำส่วนต่างๆ ของแคฝรั่งมาทำการสกัดด้วยวิธีการแช่ ในตัวทำละลายโดยเรียงลำดับความเข้มข้นของสารจากน้อยไปมาก คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ ทำให้ได้สารสกัดทั้งหมด 9 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละสารสกัดที่ได้

แคฝรั่ง	สารสกัด	พืชแห้ง (กก.)	สารสกัด (ก.)	ร้อยละสารสกัด ที่ได้ (%yield)
กิ่ง	เฮกเซน		6.53	0.26
	เอทิลอะซิเตต	2.51	17.19	0.68
	เมทานอล		82.31	3.27
ลำต้น	เฮกเซน		12.61	0.11
	เอทิลอะซิเตต	11.8	58.76	0.49
	เมทานอล		113.84	0.96
ใบ	เฮกเซน		22.23	1.76
	เอทิลอะซิเตต	1.26	42.07	3.34
	เมทานอล		39.11	3.10

การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น

1. การตรวจสอบแอลคาลอยด์ พบว่า สารสกัดของแคฝรั่งทั้ง 9 สารสกัด ให้ผลลบกับ น้ำยาตกตะกอนแอลคาลอยด์ทั้ง 4 ชนิด (ตารางที่ 2) ผลการตรวจสอบสรุปได้ว่าในส่วนต่างๆ ของ แคฝรั่งไม่มีสารในกลุ่มแอลคาลอยด์

ตารางที่ 2 น้ำยาตรวจสอบสารแอลคาลอยด์ที่ใช้ และการแปลผล

น้ำยาทดสอบ	ผล (สีของตะกอน)
Dragendorff's reagent	ส้ม
Marme's reagent	ขาว
Mayer's reagent	ขาว
Wagner's reagent	น้ำตาลแดง

2. การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ พบว่า สารสกัดจากส่วนต่างๆ ของแคฝรั่งให้ผลการทดสอบกับ Shinoda's test และ Ammonia T.S. ที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3 และ 4) โดยสีที่เกิดขึ้น มีตั้งแต่สีเหลืองไปจนถึงสีส้มน้ำตาล สำหรับ สารสกัดของใบจะมีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ปนอยู่ด้วย ผลการตรวจสอบสรุปได้ว่าในทุกสารสกัดของ แคฝรั่งมีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบอยู่ โดยแต่ละสารสกัดมีองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ ที่เป็นไปได้แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ได้แก่ flavonols, flavones, flavanones และ xanthenes

ตารางที่ 3 การแปลผลการตรวจสอบสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์โดยวิธี Shinoda test

กลุ่มสาร	ผล
Flavonol	สีแดงถึงสีแดงเลือดนก
Flavone	สีส้มถึงสีแดง
Flavanone	สีแดงเลือดนกถึงสีม่วงชมพูอ่อน
Flavanonol	สีเข้ม แดงถึงม่วงแดง

ตารางที่ 4 การแปลผลการตรวจสอบสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์โดยวิธีปฏิกิริยากับต่าง

กลุ่มสาร	ผล
Flavone, Flavonol, Xanthone	สีเหลือง
Flavonone	สีส้มแดง
Chalcone, Aurone	สีม่วงทันที
Flavanonol	สีส้มน้ำตาล

3. การตรวจสอบแทนนินและฟีนอลิก การแปลผลการตรวจสอบแทนนินและฟีนอลิกมี ดังนี้
3.1 ให้ผลลบกับ gelatin และ gelatin salt reagent ไม่ให้สีกับ ferric chloride แสดงว่า ไม่พบแทนนิน หรือฟีนอลิก

3.2 ให้ผลบวกกับ gelatin และ gelatin salt reagent ให้สีเดียวกับ ferric chloride, bromine water และ vanillin-HCl test ให้ผลลบกับ lime-water แสดงว่ามีคอนเดนส์แทนนิน (condensed tannin)

3.3 ให้ผลบวกกับ gelatin และ gelatin salt reagent ให้สีออกน้ำเงิน น้ำเงินดำกับ ferric chloride และ lime-water ให้ผลลบกับ bromine water และ vanillin-HCl test แสดงว่ามีไฮโดรไลซ์แทนนิน (hydrolysed tannin)

3.4 ให้ผลบวกกับการตรวจสอบให้สีน้ำเงินอมเขียวกับ ferric chloride แสดงว่ามีแทนนิน 3.5 ให้ผลลบกับ gelatin และ gelatin salt reagent ให้สีน้ำเงิน หรือสีเขียว หรือสีผสมของทั้งสองสีกับ ferric chloride แสดงว่ามีฟิโนลิก

ผลการตรวจสอบสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของแคฝรั่ง สรุปได้ว่ามีแทนนินและฟิโนลิกเป็นองค์ประกอบ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS สารสกัดจากส่วนต่างๆ ของแคฝรั่ง เมื่อนำมาวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้อนุมูลอิสระ DPPH[•] และอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และใช้สารต้านอนุมูลอิสระ ไทรอกซ์ (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) เป็นสารเปรียบเทียบ โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของแคฝรั่งแสดงในรูปของค่า IC₅₀ (mg/ml.) (The half maximal inhibitory concentration) ซึ่งเป็นความเข้มข้นของ

สารสกัดที่สามารถยับยั้ง การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ 50% พบว่าสารสกัดส่วนใบในชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 5

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย นำสารสกัดทุกส่วนมาทำการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* พบสารสกัดเอทิลอะซีเตตส่วนกิ่งแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus* ได้สูงสุด ส่วนสารสกัดเอทิลอะซีเตตส่วนกิ่ง และต้น แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus aureus* ได้สูงสุด สารสกัดเอทิลอะซีเตตส่วนต้น แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* ได้สูงสุด และพบว่าทุกส่วนของแคฝรั่งไม่สามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* ดังแสดงในตารางที่ 6

การทดสอบฤทธิ์ต้านอัลไซเมอร์ เป็นการศึกษา antiacetylcholinesterase activity โดยวิธี TLC combining bioassay ร่วมกับ Ellman's reagent ซึ่งเป็นวิธีเบื้องต้นในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอัลไซเมอร์ พบว่าเมื่อทำการทดสอบ สารสกัดทุกส่วนไม่สามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง acetylcholinesterase ได้ คือ เมื่อพ่นเอนไซม์จนทั่วแผ่นซิลิกาเจล บริเวณสารไม่ปรากฏเป็นจุดสีขาวเกิดขึ้น เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน galantam

ตารางที่ 5ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่างๆ ของ แคลฝรั่งในรูปของค่า IC₅₀ โดยวิธี DPPH และ ABTS

แคลฝรั่ง		IC ₅₀ mg/ มล.	
		DPPH	ABTS
กิ่ง	เฮกเซน	1.5956	6.1556
	เอทิลอะซิเตต	0.1118	0.4355
	เมทานอล	0.0728	0.3342
ลำต้น	เฮกเซน	2.7935	10.3135
	เอทิลอะซิเตต	0.2091	0.4870
	เมทานอล	0.2004	0.5363
ใบ	เฮกเซน	0.7258	1.0640
	เอทิลอะซิเตต	0.4776	0.4416
	เมทานอล	0.0367	0.2043
Trolox		0.0263	0.0223

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

แคลฝรั่ง	ลำดับที่	สารสกัด	Clear zone* (diameter-mm)			
			<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
กิ่ง	1	เฮกเซน	8	Inactive	Inactive	Inactive
	2	เอทิลอะซิเตต	11.5	11	10	Inactive
	3	เมทานอล	8	Inactive	8	Inactive
ลำต้น	4	เฮกเซน	8	Inactive	Inactive	Inactive
	5	เอทิลอะซิเตต	11	11	11.5	Inactive
	6	เมทานอล	8	Inactive	Inactive	Inactive
ใบ	7	เฮกเซน	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
	8	เอทิลอะซิเตต	8	Inactive	9	Inactive
	9	เมทานอล	9	Inactive	11	Inactive
Control			Inactive	Inactive	Inactive	Inactive

Inactive = diameter 6 mm of disc, Control = DMSO (Dimethylsulfoxide) และ clear zone รายงานเป็นค่าเฉลี่ย

อภิปรายผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการนำแคลฝรั่งที่ปลูกไว้ภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏจันทร์เกษมมาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล นำสารสกัดที่ได้มาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้าน

อัลไซเมอร์จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจาก กิ่ง ลำต้น และใบ ของแคลฝรั่ง พบว่าสารสกัดทุกส่วนไม่มี แอลคาลอยด์ แต่มีสารในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ ได้แก่ flavonol , flavones , flavanone และ xanthone ประกอบอยู่ และยังพบว่ามีสารในกลุ่มของแทนนินและฟีนอลิก ด้วย ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และวิธี ABTS พบว่า

สารสกัดเมทานอลของแคฝรั่งทุกส่วน แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดเอทิลอะซีเตต และสารสกัดเฮกเซน โดยสารสกัดเมทานอลจากส่วนใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยค่า IC_{50} โดยวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 0.0367 และ 0.2043 มก./มล. ตามลำดับ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรอกซ์ ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0263 และ 0.0223 มก./มล. ตามลำดับ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดเอทิลอะซีเตตส่วนกิ่งและลำต้นในชั้นเอทิลอะซีเตต สามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ดีที่สุด แต่พบว่าสารสกัดทุกส่วนของแคฝรั่งไม่สามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia coli* ได้ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอัลไซเมอร์

สารสกัดทุกส่วนไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase แสดงว่าไม่มีกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอัลไซเมอร์

ข้อเสนอแนะการวิจัย

ในการตรวจสอบกลุ่มสารเบื้องต้นและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาเพื่อแยกสารให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่องมือขั้นสูงต่อไป ซึ่งอาจจะพบสารชนิดใหม่ และสารที่เคยมีผู้รายงานไว้แล้ว และควรทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ เพื่อเป็นแนวทางการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ชัยบุญญ์ ล้วนรัตน์. (2536). **การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ**. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ
- Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris and M. Turck. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493–496.
- Elevitch, C. R. and J. K. Francis. (2006). Species profiles for Pacific island agroforestry. *Gliricidia sepium* (gliricidia). www.traditionaltree.org.
- Herath, H. M. T. B., R. S. Dassanayake, A. M. A. Priyadarshani, S. Silva, G. P. Wannigama and J. Jamie. (1998). Isoflavonoids and a pterocarpan from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry* 47, 117–119.
- Herath, H. M. T. B. and S. Silva. (2000). New constituents from *Gliricidia sepium*. *Fitoterapia* 71, 722–724.
- Morton, J. F. (1981). In *Atlas of medicinal plants of middle America*. ed. Charles C. Thomas; Springfield, IL.
- Mahasneh, A. M. and A. A. El-Oqlah, (1999). Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. *J. Ethnopharmacol.* 64, 271–276.

- Rastrelli, L., I. Berger, W. Kubelka, A. Caceres, N. Tommast and F. Simone. (1999a). **New 12 α -hydroxyrotenoids from *Gliricidia sepium* bark.** *J. Nat. Prod.* 62, 188–190.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. (1999). **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Rhee, I. K., M. van der Meent, K. Ingkaninan and R. Verpoorte. (2001) **Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining.** *J. Chromatogr. A.* 915, 217–223.
- Yu, W., Y. Zhao, Z. Xue, H. Jin, D. Wang, X. Liang and T. Hu. (2002). **Antioxidant activity of natural vitamin E extracted from soybean sludge assessed by chemiluminescence.** *J. Sci. Food Agric.* 82, 230–233.