

บทความวิจัย (Research Article)

การเปรียบเทียบสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน สารสกัดเอทานอลจากยอดอ่อน ใบ ผล และเมล็ดของกระถินไทย

คณาทิพย์ สิงห์สาย^{1*}, อภิษฎา ศักดาวิโรจน์², กนกพิชญ์ เวชพานิชย์กิจกุล³ และ อสมามรณ์ หมุนสมัย⁴

The comparison of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activities of the ethanolic extracts of shoots, leaves, fruits and seeds of *Leucaena leucocephala*

Kanathip Singsai^{1*}, Apitsada Sakdavirote², Kanokpich Wechpanishkitkul³ and Asamaporn Moonsamai⁴

^{1*} School of Pharmaceutical Sciences, University of Phayao, Phayao Province, 56000

² Bungsamphan Hospital, Phetchabun Province, 67160

³ Somdej Phraphutthaloetla Hospital, Samut Songkhram Province, 75000

⁴ Sai ngam Hospital, Kamphaeng Phet Province, 62150

* Correspondence to: kanathip.si@up.ac.th

Naresuan Phayao J. 2020;13(3): 66-73.

Received; 17 September 2020; Revised: 28 October 2020; Accepted: 5 November 2020

บทคัดย่อ

กระถินเป็นพืชที่พบมากในประเทศไทย นิยมรับประทานร่วมกับอาหารพื้นบ้าน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระในแต่ละส่วนของสารสกัดจากกระถินไทย ได้แก่ ยอดอ่อน ใบ ผล และเมล็ด สกัดสารโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ด้วยวิธีการหมัก (maceration) และ rotary evaporation การวิจัยประกอบด้วย 3 การทดลอง คือ การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu การวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดจากยอดอ่อนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด คือ เท่ากับ $1,660.79 \pm 93.71$ มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมา คือ ใบ ผล และเมล็ด ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ พบว่าสารสกัดจากใบมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด เท่ากับ 518.83 ± 18.76 มิลลิกรัมสมมูลเคอซิทินต่อกรัมสารสกัด รองลงมา คือ ยอดอ่อน ผล และเมล็ด ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดจากใบมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระมากที่สุด ค่า 50% scavenging concentration (SC50) เท่ากับ 59.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ ยอดอ่อน ผล และเมล็ด ตามลำดับ จากการศึกษาสรุปได้ว่า สารสกัดจากใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากส่วนอื่น ๆ ของกระถินไทย ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่พบ

คำสำคัญ: กระถินไทย, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, สารประกอบฟีนอลิก, สารฟลาโวนอยด์

^{1*} คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

² โรงพยาบาลบึงสามพัน จังหวัดเพชรบูรณ์ 67160

³ โรงพยาบาลสมเด็จพระพุทธเลิศหล้า จังหวัดสมุทรสงคราม 75000

⁴ โรงพยาบาลไทรงาม จังหวัดกำแพงเพชร 62150

Abstract

Leucaena leucocephala is a very common plant in Thailand, which is herbal eaten together with traditional food. This study aimed to compare phenolic compounds, flavonoids, and antioxidant activities of the ethanolic extracts of shoots, leaves, fruits, and seeds of *Leucaena leucocephala*. Crude ethanolic extracts were prepared by maceration and rotary evaporation. There were 3 experiments including, phenolic compounds analysis by using Folin-Ciocalteu Colorimetric method, flavonoids analysis by aluminum chloride colorimetric method, and the antioxidant activity was using DPPH radical scavenging assay. In phenolic compounds analysis, the result showed that the ethanolic extract from shoots had the highest amount of phenolic compounds. There was $1,660.79 \pm 93.71$ mg gallic acid equivalent (GAE) per gram of extract, followed by leaves, fruits, and seeds, respectively. Flavonoids analysis, the result showed that the leaves extract had the highest amount of flavonoids, there was 518.83 ± 18.76 mg quercetin equivalent (QE) per gram of extract, followed by shoots, fruits, and seeds, respectively. DPPH radical scavenging assay, the result showed that the leaves extract had the highest antioxidant activity that 50% scavenging concentration (SC50) value 59.39 $\mu\text{g/mL}$, followed by shoots, fruits, and seeds, respectively. This study can conclude that the leaves extract had the highest antioxidant activity in comparison with other parts of *Leucaena leucocephala* that related to the amount of flavonoids.

Keywords: *Leucaena leucocephala*, antioxidant activities, phenolic compounds, flavonoids

บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radical) เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวหรืออิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ ซึ่งไม่เสถียร โดยอนุมูลอิสระมักจะหาทางจับคู่กับอะตอมหรือโมเลกุลใกล้เคียง เพื่อดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลเหล่านั้น ทำให้โมเลกุลเหล่านั้นสูญเสียอิเล็กตรอนของมันเป็นกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ เกิดปฏิกิริยาต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยปกติจะเกิดขึ้นภายในร่างกายระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) หรือกระบวนการเผาผลาญสารอาหาร แต่ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมก็มีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้ เช่น แสงอาทิตย์ สารปรุงแต่งอาหาร รวมถึงสารกัมมันตภาพรังสีในอากาศโดยเฉพาะควันจากท่อไอเสีย nitrous oxide และโรงงานอุตสาหกรรม ควันบุหรี่ แอลกอฮอล์ สารพิษจากยาฆ่าแมลง ความเครียด เป็นต้น

อนุมูลอิสระ ทำให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย เช่น การทำลายโครงสร้าง DNA การเปลี่ยนแปลงโปรตีน ตลอดจนไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือการสร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิด จนทำให้

การทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์นั้น ๆ ผิดปกติจากการศึกษาพบว่าภาวะที่ร่างกายมีอนุมูลอิสระมากเกินไป อาจก่อให้เกิดโรคและความผิดปกติต่าง ๆ ตามมามากมาย ได้แก่ โรคหัวใจ โรคแพ้ภูมิคุ้มกันตัวเอง โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ รวมถึงโรคชราก่อนวัย [1] นอกจากนี้ยังพบว่า อนุมูลอิสระยังมีผลต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน และโรคต่อกระเพาะอาหารอีกด้วย ซึ่งปกติภายในร่างกายจะมีระบบเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ ได้แก่ Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX), Glutathione reductase (GR), Glutathione S-transferase (GST) และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่จัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่ วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี และอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีซีลีเนียม (selenium) ซึ่งเป็นโลหะตัวหนึ่งในระบบเอนไซม์ที่สามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้ แต่หากสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ไม่สามารถทำหน้าที่ได้เพียงพอ หรืออาจมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมากเกินไป ก็จะทำให้เกิดสร้างความเสียหายขึ้นในร่างกาย ดังนั้นร่างกายจึงต้องการสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มจากภายนอก ซึ่งมีพืชหลายชนิดที่รายงานว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล

อิสระ ยกตัวอย่างเช่น มะขามป้อม มะเขือเทศ กระเทียม บล็อกโคลี่ เป็นต้น และหนึ่งในพืชที่มีฤทธิ์ คือ กระถินไทย [2]

กระถินไทยเป็นพืชพื้นบ้านที่สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae หรือ Leguminosae (ชื่อเดิม) กระถินไทยเป็นพืชที่มีสรรพคุณต่อสุขภาพมากมาย เช่น การรักษาโรคเบาหวาน รักษาโรคบิด รักษาอาการอักเสบของไต รักษาพยาธิ และ รักษาอาการนอนไม่หลับ เป็นต้น โดยในทางพืชบ้านมีการนำไปกระถินไทยมาใช้เพื่อบรรเทาอาการอักเสบหรือความเจ็บปวด บำรุงผิวพรรณให้ดูเปล่งปลั่ง มีสุขภาพดี เนื่องจากกระถินไทยมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าใบของกระถินไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการทดสอบหาสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งจัดเป็นหนึ่งในสารต้านอนุมูลอิสระ [3] และเมล็ดของกระถินไทยก็มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน [4] แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบการศึกษาที่เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกระถินไทยแต่ละส่วน ทางผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารดังกล่าว และเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในแต่ละส่วนของกระถินไทย ได้แก่ ยอดอ่อน ใบ ผล และเมล็ดของกระถินไทย

วัสดุและวิธีการ

การสกัดพืชตัวอย่าง [5]

เก็บยอดอ่อน ใบ ผล และเมล็ดของกระถินไทย จากสวนสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ล้างด้วยน้ำให้สะอาด ทำการผึ่งแดด และนำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วยตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) จากนั้นมาบดให้ละเอียดเพื่อให้มีขนาดเล็กลง ซึ่งน้ำหนักหลังการบด นำกระถินไทยแต่ละส่วนมาหมัก โดยใช้ตัวทำละลาย 90% เอทานอลที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำสารสกัดไป

กรองและระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง vacuum rotary evaporator ต่อด้วยการระเหย (evaporation) จนได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งนำหยาบสารสกัดหยาบที่ได้เพื่อคำนวณหาผลผลิตร้อยละ (%yield)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Total Phenolic Content) โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Veronica Dewanto et al. [6] เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิก (0 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเจือจางด้วย 80% เอทานอลให้ได้ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารสกัดโดยเจือจางด้วย 80% เอทานอลในอัตราส่วน 1:5 (w:v) ทำการทดลองโดยเริ่มจากการนำน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 10% Folin-Ciocalteu reagent (FCR) (w/v) 125 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ตามด้วยสารมาตรฐานหรือสารสกัด ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาทีที่อุณหภูมิห้องในที่มืด จากนั้นเติม 7% โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate; Na_2CO_3) (w/v) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 3 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 90 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ยี่ห้อ Jasco รุ่น V-630 โดยกำหนดให้ตัวควบคุมของสารมาตรฐาน คือ 10% Folin-Ciocalteu reagent ผสมกับน้ำกลั่น และ 7% โซเดียมคาร์บอเนต ตัวควบคุมของสารสกัด คือ สารสกัด ผสมกับน้ำกลั่น และ 7% โซเดียมคาร์บอเนต ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of gallic acid equivalent/g of extract)

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total Flavonoid Content) โดยวิธี aluminum chloride colorimetric method

วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์โดยวิธี aluminum chloride colorimetric method เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเคอซีทิน (Quercetin) ตัดแปลงวิธีการทดลองจาก Prommuak C et al. [7] เตรียมสารมาตรฐานเคอซีทินที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย 80% เอทานอล และสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองโดยนำ 95% เอทานอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร 10% อลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminum Chloride) (m/v) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร 1 โมลต่อลิตรโพแทสเซียมอะซิเตท (Potassium acetate) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ตามด้วยสารมาตรฐานหรือสารสกัด ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำมาวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ยี่ห้อ Jasco รุ่น V-630 ใช้ blank คือ 10% อลูมิเนียมคลอไรด์ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเคอซีทินในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อกรัมของสารสกัด (mg of quercetin equivalent/g of extract)

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging assay เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ตัดแปลงวิธีการทดลองจาก Singjai K et al., 2015 [8] โดยเตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ใน 80% เอทานอล เตรียมสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (0.01 – 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารสกัดมาละลายด้วย 80% เอทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 50, 100, 200, 400, 600 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสาร DPPH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well microplate ตามด้วยสารมาตรฐานหรือสารสกัด หรือ blank 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader ยี่ห้อ BioTek รุ่น Synergy H1 ทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยกำหนดให้ตัวควบคุม (control) ของสารมาตรฐานและสารสกัด คือ DPPH นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ free radical scavenging activity หรือ % scavenging activity โดยค่า % scavenging activity หมายถึง เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หรือค่าที่แสดงถึงการจับกันระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูลอิสระ โดยสูตรการคำนวณ คือ

$$\text{Scavenging activity (\%)} = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100$$

กำหนดให้

A₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control

A₁ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

จากนั้นคำนวณหาค่า 50% scavenging concentration (SC₅₀) ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

โดยมาจากการพล็อตกราฟระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์ของ scavenging activity และความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้งหมดทำการทดสอบซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง ($n=3$) แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) วิเคราะห์ post-hoc test โดย Tukey และคำนวณหาค่า SC_{50} ด้วยโปรแกรม Sigma plot version 12 ระดับ

นัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p\text{-value} < 0.05$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษา

การสกัดพืชตัวอย่าง

เมื่อสกัดสารจนได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) นำไปซึ่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ แล้วนำไปคำนวณหาผลผลิตร้อยละ (%yield) แสดงผลดังตาราง 1

ตาราง 1 ค่า % yield ของสารสกัดกระถินไทยแต่ละส่วน

สารสกัดกระถิน	Crude Extract (กรัม)	น้ำหนักพืชสดที่ใช้หมัก (กรัม)	% Yield
ยอดอ่อน	2.7	31.46	8.58
ใบ	11.88	229.31	5.18
ฝัก	24.41	525.49	4.66
เมล็ด	4.31	142.78	3.01

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Total Phenolic Content)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Total Phenolic Content) เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก โดยสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกและ

สารสกัดแต่ละส่วนของกระถิน ทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณกรดแกลลิก เมื่อเทียบสารสกัด 1 กรัม แสดงผลดังตาราง 2

ตาราง 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

สารสกัดกระถิน	มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
ยอดอ่อน	1,660.79 $\pm$ 93.71*
ใบ	642.94 $\pm$ 183.4†
ผล	277.74 $\pm$ 44.89
เมล็ด	86.10 $\pm$ 0.00

หมายเหตุ * หมายถึง $p\text{-value} < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับใบ หรือ ผล หรือ เมล็ด

† หมายถึง $p\text{-value} < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับผล หรือ เมล็ด

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total Flavonoid Content)

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total Flavonoid Content) เทียบกับสารมาตรฐานเคอซิทิน วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ โดยสารมาตรฐานเคอซิทิน และสารสกัดแต่ละส่วนของกระถินทำ

ปฏิกิริยากับอลูมิเนียมคลอไรด์ ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณเคอซิทิน เมื่อเทียบกับสารสกัด 1 กรัม แสดงผลดังตาราง 3

ตาราง 3 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

สารสกัดกระถิน	มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อกรัมของสารสกัด (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
ยอดอ่อน	438.72 $\pm$ 111.51*
ใบ	518.83 $\pm$ 18.76*
ผล	216.95 $\pm$ 4.45†
เมล็ด	34.27 $\pm$ 3.77

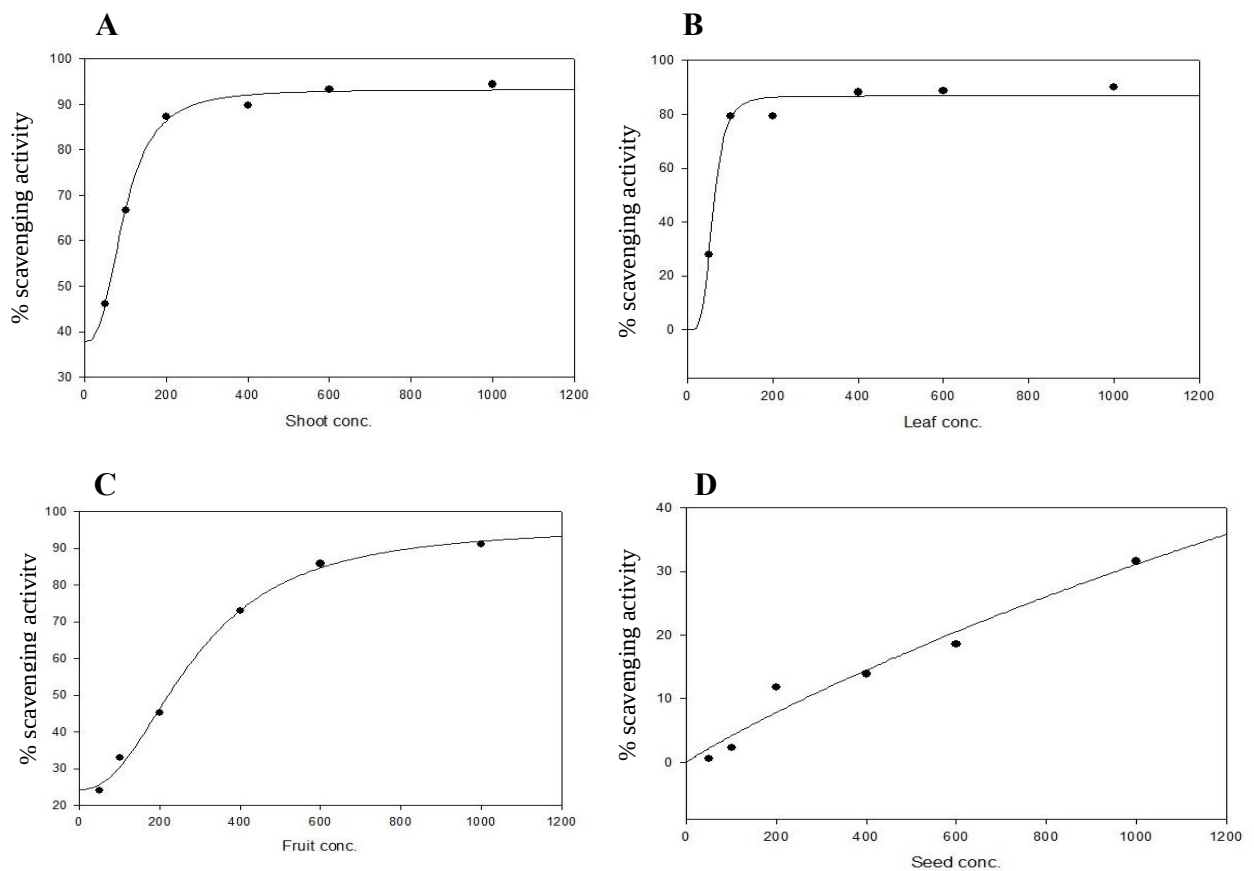
หมายเหตุ * หมายถึง p-value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับผล หรือ เมล็ด

† หมายถึง p-value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ด

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกและสาร

สกัดแต่ละส่วนของกระถิน โดยทำปฏิกิริยากับ DPPH วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหา % scavenging และนำค่าไปสร้างกราฟระหว่างค่า % scavenging และความเข้มข้น ดังรูป 1 (A)-(D)



รูป 1 กราฟระหว่างกับค่า % scavenging ความเข้มข้นของสารสกัดกระถินจากยอดอ่อน (A)

สารสกัดจากใบ (B) สารสกัดจากผล (C) และสารสกัดจากเมล็ด (D)

จากนั้นนำค่า % scavenging ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกและสารสกัดกระถินไทยแต่ละส่วนไปพล็อตกราฟ เพื่อหาค่า SC_{50} โดยโปรแกรม SigmaPlot version 10 โดยค่า SC_{50} ของกรดแอสคอร์บิก (สารมาตรฐาน) เท่ากับ 19.50 $\mu\text{g/ml}$ ค่า SC_{50} ของสารสกัดกระถินจากยอดอ่อน ใบ ผล และเมล็ด เท่ากับ 96.22, 59.39, 285.78 และ 5279.94 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

วิจารณ์

จากการศึกษาพบว่า พบสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากยอดอ่อนมากที่สุด ส่วนสารฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบในสารสกัดจากใบมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่นๆ ของกระถินไทย โดยสารฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารหนึ่งในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกที่พบได้มากในพืช โดยสารฟลาโวนอยด์สามารถจับกับโลหะหนัก เช่น $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ และ Cu^{2+} ที่มีผลเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ดังนั้น สารฟลาโวนอยด์สามารถชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกระถินไทยนั้น เป็นการศึกษาผ่านกลไก free radical scavenging คือ วัดความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ โดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้นเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีความรุนแรงน้อยกว่าอนุมูลอิสระเดิม

การศึกษารายงานว่า ใบของกระถินไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก คือ 2-(H)-benzofuranone-5, 6, 7, 7a-tetrahydro-4, 4, 7a-trimethyl สารประกอบฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์ ส่วนเมล็ดของกระถินไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารประกอบฟีนอลิก [3, 9] นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในใบ และเมล็ดของกระถินไทย พบว่าทั้งสองส่วนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยส่วนของใบมีค่า SC_{50} มากกว่าส่วนของเมล็ด [10] ซึ่ง

สอดคล้องกับผลการวิจัยนี้ มีการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดกระถินไทยที่มีและไม่มี การกำจัดคลอโรฟิลล์ ผลการศึกษาพบว่า เมล็ดที่ยังไม่มีการกำจัดสารคลอโรฟิลล์จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า แต่จะมีสารประกอบฟีนอลิกน้อยกว่า อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) [11] และมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระกับค่าดัชนีความเขียวในผลผลิตของผักเชียงดา ผลการศึกษาพบว่า ค่าดัชนีความเขียว มีความสัมพันธ์กับปริมาณคลอโรฟิลล์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ [12] การศึกษารายงานว่า ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันแปรผันตามปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่พบในพืช [13] ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ คือ สารสกัดจากใบมีค่า SC_{50} มากที่สุด นั่นคือบ่งบอกถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มากที่สุด สัมพันธ์กับสารฟลาโวนอยด์พบมากที่สุดเช่นกัน

จากการศึกษาสรุปได้ว่า สารสกัดจากใบกระถิน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากส่วนอื่นๆ ของกระถินไทย ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่พบมากในสารสกัดจากใบ แต่อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีวิเคราะห์ที่แตกต่างและหลากหลายในการศึกษาวิจัยในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. Int J Biomed Res. 2008; 4(2): 89-96.
2. Dzoyem JP, Eloff JN. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. J Ethnopharmacol. 2015; 160: 194-201.
3. Zayed MZ, Sallam SMA, Shetta ND. Review article on *leucaena leucocephala* as one of the miracle timber trees. Int J Pharm Pharm Sci. 2017; 10(1): 1-7.

4. Soottawat Benjakul, Phanat Kittiphattanabawon, Punnanee Sumpavapol, Sajid Maqsood. Antioxidant activities of lead (*Leucaena leucocephala*) seed as affected by extraction solvent, prior dechlorophyllisation and drying methods. J Food Sci Technol. 2014; 51(11): 3026-3037.
5. Ratikorn Chatchanayuenyong, Patcharawan Sujayanont, Auranut Vuttivirojana. Effects of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit Leaves Extracts in Culture of Human Umbilical Vein Cells. Pharmacogn J. 2018; 10(1): 148-153.
6. Dewanto V WX, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. J Agric Food Chem. 2002; 50(10): 3010-3014.
7. Prommuak C, De-Eknamkul W, Shotipruk A. Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. Sep Purif Technol. 2008; 62(2): 444-448.
8. Singsai K, Akaravichien T, Kukongviriyapan V, Sattayasai J. Protective Effects of *Streblus asper* Leaf Extract on H₂O₂-Induced ROS in SK-N-SH Cells and MPTP-Induced Parkinson's Disease-Like Symptoms in C57BL/6 Mouse. Evid Based Complement Alternat Med. 2015; 2015: 970354.
9. Adekunle OK, Akinlua A. Nematicidal effects of *Leucaena leucocephala* and *Giricidia sepium* extracts on meloidogyne incognita infecting okra. J Agric Sci. 2007; 52(1): 53-63.
10. Chowtivannakula P, Srichaikulb B, Talubmook C. Antidiabetic and antioxidant activities of seed extract from *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. Agric Nat Resour. 2016; 50(5): 357-361.
11. Benjakul S, Kittiphattanabawon P, Sumpavapol P, Maqsood S. Antioxidant activities of lead (*Leucaena leucocephala*) seed as affected by extraction solvent, prior dechlorophyllisation and drying methods. J Food Sci Technol. 2014; 51(11): 3026–3037.
12. Laotho S, Sritontip C, Sritontip P. Relationship between chlorophyll content, total phenolic, antioxidant activities and SPAD value of *Gymnema inodorum* Decne. under different nitrogen fertilizer. Khon Kaen Agr J. 2014; 42(3): 795-801.
13. Koodkaew I, Limpichotikul P. Study of Antioxidant Activity and Correlation of Antioxidant Compounds in Eight Species of Garden Herbs. SDU Res J. 2017; 10(1): 137-152.