

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดครามและการทำนายการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยการจำลองการจับกันระหว่างโมเลกุล

Antioxidant activities of the indigo extracts and prediction of tyrosinase inhibition by molecular docking

อริย์รัช ญาติจิมพลี, ภัทรพร คุ่มภัย และนิรมล ศากยวงศ์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

เฉลิมวรุฒ สมปาก

กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร

Aritouch Yartchimlee, Phataraporn Khumphai and Niramol Sakayawong*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University

Chalermwoot Sompark

²Postharvest and Processing Research and Development Division, Department of Agriculture

Received: December 20, 2021; Accepted: February 25, 2022

บทคัดย่อ

ต้นครามสายพันธุ์ *Indigofera tinctoria* L. และ *Indigofera suffruticosa* มีการปลูกอย่างแพร่หลายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ต้นครามสองสายพันธุ์นี้ให้สีโทนฟ้าเข้มจึงเป็นที่นิยมในการย้อมผ้าคราม นอกจากนี้ต้นครามยังเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอชที่ 50 เปอร์เซนต์ (IC₅₀) ค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP value) และการหาปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมด ที่ได้จากการสกัดใบ และเมล็ดต้นคราม ด้วยวิธีการสกัดแบบแช่หมักและแบบซอกซ์เลต เมื่อใช้เอทานอลความเข้มข้น 50, 70 และ 99.5 เปอร์เซนต์ เป็นตัวทำละลาย สารสกัดที่ได้นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีเพื่อนำมาทำนายการจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิง โดยใช้ชุดการคำนวณทั้งหมด 4 ชุด ได้แก่ ChemPLP, Goldscore, Chemscore และ ASP ผลจากการทดลองจากการหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์พบว่าปัจจัยของวิธีการสกัด และความเข้มข้นเอทานอล ไม่มีความสัมพันธ์กับค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอชที่ 50 เปอร์เซนต์ (IC₅₀) ค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP value) และการหาปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมด แต่ขึ้นส่วนในการสกัดถือเป็นปัจจัยสำคัญที่มีความสัมพันธ์ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารโพลีฟีนอล สารสกัดจากเมล็ดให้ค่า IC₅₀ ต่ำกว่าสารสกัดจากใบ ที่ผ่านการสกัดแบบแช่หมัก และแบบซอกซ์เลต โดยสารสกัดจากเมล็ดของสายพันธุ์ *I. tinctoria* L. มีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 0.18-0.36 และ 0.09-0.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากเมล็ดของสายพันธุ์ *I. suffruticosa*

มีค่า IC_{50} มีค่าอยู่ในช่วง 0.12-0.25 และ 0.05-0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนการวิเคราะห์ค่า FRAP value พบว่าสารสกัดจากใบของสายพันธุ์ *I. tinctoria* ที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีแช่หมัก และสารสกัดจากเมล็ดของสายพันธุ์ *I. suffruticosa* ที่สกัดด้วยวิธีซอล์กลิต มีค่า FRAP value สูง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 290.91-481.82 มิลลิกรัมโธรลิกต่อกรัมสารสกัด และ 338.49-565.46 มิลลิกรัมโธรลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์หาสารประกอบโพลีฟีนอล พบว่าสารสกัดจากใบให้ค่าสูงกว่าสารสกัดจากเมล็ด โดยพบว่าสารสกัดจากใบของสายพันธุ์ *I. tinctoria* ที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีแช่หมัก และสารสกัดจากใบของสายพันธุ์ *I. suffruticosa* ที่สกัดด้วยวิธีซอล์กลิต โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.83 ถึง 9.91 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง และ 7.17 ถึง 9.98 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดจากใบและเมล็ด ของ *I. tinctoria* L. ที่สกัดด้วยวิธีแช่หมัก ด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ โดยเทคนิคเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี พบสารสำคัญ 33 ชนิด ประกอบด้วย สารสำคัญกลุ่มกรดไขมันที่อิ่มตัว และไม่อิ่มตัว กลุ่มสารฟีนอลิก กลุ่มสารสเตียรอยด์ และสารให้สี และเมื่อนำมาทำนายการจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิง โดยใช้ชุดการคำนวณทั้งหมด 4 ชุด พบว่าสาร Phytol, Stearic Acid, Oleic Acid และ Vitamin E สามารถเข้าจับเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่ากรดโคจิก (สารมาตรฐาน) จากการคำนวณแบบ ChemPLP ของสารประกอบ Phytol และ Vitamin E จากส่วนของใบ มีค่าการเข้าจับ 83.78 และ 70.34 สารประกอบ Stearic Acid จากใบและเมล็ด มีค่าการเข้าจับ 78.34 และ สารประกอบ Oleic Acid จากเมล็ดมีค่าการเข้าจับ 75.13 ในขณะที่ค่าการจับกันระหว่างเอนไซม์ไทโรซิเนสกับสารมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic Acid) มีค่าเท่ากับ 55.23 ดังนั้นสารสกัดจากใบ และเมล็ดของพืชครามเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระสูง ผลการทดลองได้แสดงให้เห็นศักยภาพของการจับกันระหว่างสารประกอบต่าง ๆ ของสารสกัดครามและเอนไซม์ไทโรซิเนสในการยับยั้งขบวนการสร้างเม็ดสี ดังนั้นสารประกอบของสารสกัดจากครามจึงมีความน่าสนใจในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้ต่อไป

คำสำคัญ : คราม; ไทโรซิเนส; สารต้านอนุมูลอิสระ; เทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิง

Abstract

Indigofera tinctoria L. and *Indigofera suffruticosa* are also widely cultivated in the Northeast region of Thailand. Both indigo species provide give a dark blue tone that is appropriate for the indigo dyeing process. Moreover, indigo plants are the source of many bioactive compounds. This research aims to determine the antioxidant properties (IC_{50} values), ferric antioxidant power (FRAP) and total phenolic contents (TPC). The seeds and leaves were extracted by maceration and Soxhlet extraction with 50, 70, and 99.5 % ethanol. The indigo extracts were analysed data substances by gas chromatography mass spectroscopy (GC-MS). These compounds were used to predict the binding with tyrosinase enzyme by molecular docking technique. This technique was performed by four computation sets (e.g., ChemPLP, Goldscore, Chemscore, and ASP). The results from correlation coefficients analysis indicated that the extraction method and ethanol concentration had no relationship with IC_{50} , FRAP, and TPC values. However, the plant parts for extraction were considered an important

factor instead. Seed extracts had a lower IC_{50} value than leaf extracts in both maceration and Soxhlet extractions. The IC_{50} values from *I. tinctoria* L. seed extracts were in the range of 0.18 to 0.36 and 0.09 to 0.33 mg/mL, respectively. Meanwhile, IC_{50} values of *I. suffruticosa* were in the range of 0.12 to 0.25 and 0.05 to 0.19 mg/mL respectively. By FRAP assay, *I. tinctoria* leaf extracts from maceration technique and *I. suffruticosa* seed extracts from Soxhlet extraction have high reducing values. They were ranged from 290.91 to 481.82 and 338.49 to 565.46 mg Trolox equivalent/g extract, respectively. The analysis for TPC showed that the leaf extracts have a higher level than seed extracts. When *I. tinctoria* L. leaves were extracted by maceration technique, TPC values exhibited in the range of 5.83 to 9.91 mg gallic acid/gram dry sample. Whereas *I. suffruticosa* extracted by Soxhlet extraction, they were in the range of 7.17 to 9.98 mg gallic acid/gram dry sample. The indigo extracts from leaf and seed of *I. tinctoria* L. were extracted by the maceration technique with 99.5 % ethanol and analysed data substances by gas chromatography mass spectroscopy (GC-MS). The 33 compounds from data analysis appeared to be saturated and unsaturated fatty acids, phenolic substances, steroids, and color agents. These compounds were used to predict the binding with tyrosinase enzyme by molecular docking technique. The binding affinity values of the compounds of different parts of the indigo plants in four computation sets were higher than Kojic acid (standard substance). For the computation of the ChemPLP set, Phytol compound and vitamin E (from leaf parts) had binding values of 83.78 and 70.34. Stearic acid compounds (from leaf and seed parts) had a binding value of 78.34. and oleic acid compound (from the seed part) had the binding value of 75.13. Meanwhile, the binding affinity value between tyrosinase and kojic acid was 55.23. The results indicated that leaf and seed extracts from indigo plant were a high source of antioxidant substances. These results also demonstrated a remarkable potential of the binding affinities between various compounds (contained in the indigo extracts) and tyrosinase enzyme, which is related to inhibitory effects on melanogenesis. Therefore, indigo extract compounds are interesting for further developing cosmeceutical products.

Keywords: Indigo; Tyrosinase; Antioxidant; Molecular Docking

1. บทนำ

ต้นคราม (*Indigofera* Family) เป็นพืชพื้นเมืองในแถบทวีปเอเชียสามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย โดยต้นครามที่ได้รับความนิยมในการปลูกเพื่อนำไปใช้ในงานด้านอุตสาหกรรมย้อมผ้าครามคือครามบ้านหรือครามผักตง (*Indigofera tinctoria* Linn.) และครามเถื่อนหรือครามผักงอ (*Indigofera suffruticosa* Mill.) (Matpha และ Chantaranothai,

2015) เนื่องจากลักษณะของเจดสีของทั้งสองสายพันธุ์นั้นจะให้โทนสีน้ำเงินครามที่มีความเข้มของสีแตกต่างกันไปจากสายพันธุ์อื่น (Saithong และคณะ, 2011) นอกเหนือจากครามเป็นพืชที่ให้สีครามแล้วจากภูมิปัญญาท้องถิ่นภาคอีสาน เมื่อมีบาดแผลเลือดออกมักจะใช้น้ำครามมาทำแผลจะทำให้แผลหายเร็วและไม่เป็นหนอง เนื่องจากในน้ำครามมีสารแทนนิน (Tannin) ซึ่งมีฤทธิ์สมานแผลและ

สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Sharma และ Agarwal, 2015) จึงทำให้บาดแผลหายได้เร็วขึ้น ในพืชครามยังพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มของ สารประกอบโพลีฟีนอล ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และ แครทีนอยด์ (Sharma and Agarwal, 2015; Bakasso *et al.*, 2008) มีการนำสารสกัดครามไปใช้ทางการแพทย์ที่หลากหลาย เช่น การรักษาโรคมะเร็ง การฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Singh *et al.*, 2015; Srinivasan *et al.*, 2016) นอกจากนี้ครามยังถูกนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ทางเวชสำอางในการดูแลผิวพรรณ ซึ่งความหมายของเวชสำอาง (cosmeceuticals) คือผลิตภัณฑ์ดูแลผิวประเภทหนึ่ง ที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับเครื่องสำอางโดยรวมเอาสมบัติในการรักษาอาการผดผื่นของผิวหน้า เช่น สิว ริวรอย จุดด่างดำ และฝ้า-กระ เข้าไปด้วย การนำส่วนต่าง ๆ ของต้นครามมาศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งสมบัติฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่าครามมีศักยภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ (Bakasso *et al.*, 2008) ซึ่งสามารถยับยั้งเหตุของการเกิดความหยาบคล้อย ความไม่กระจ่างใส และความหมองคล้ำของผิวหน้าได้ (Chiang *et al.*, 2006) จึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาใช้เป็นเวชสำอาง ซึ่งการที่จะนำสารสำคัญของครามออกมาใช้ประโยชน์ได้จึงต้องผ่านกระบวนการสกัด ซึ่งวิธีแช่หมัก (Anusuya and Mamian, 2012; Heo *et al.*, 2014) และการสกัดแบบซอกซ์เลต (Sharma and Agarwal, 2015; Guruvaiah *et al.*, 2012) ซึ่งเป็นวิธีการสกัดสารจากพืชและสมุนไพรที่ได้รับความนิยมในการใช้อย่างแพร่หลาย โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดได้แก่ ตัวทำละลาย อุณหภูมิ ตัวอย่างพืช และสารที่ต้องการในสารสกัด เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในการเลือกใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้นั้นต้องผ่านการทดลองในห้องปฏิบัติการหลายขั้นตอน

เพราะในสารสกัดมักจะองค์ประกอบของสารจำนวนมาก การคัดค้นเทคโนโลยีสมัยใหม่เพื่อช่วยการทำนายการเข้าจับโดยจำลองการจับกันระหว่างโมเลกุล (Molecular docking) จึงเข้ามามีบทบาทในการวิเคราะห์และแสดงความเป็นไปได้ในการเกิดปฏิกิริยาภายในเซลล์ ซึ่งเป็นกระบวนการคัดกรองหาสารเคมีที่มีฤทธิ์ต่อโมเลกุลเป้าหมายได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถช่วยทำนายสมมติฐานหรือสร้างต้นแบบการทดลองใหม่ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (*in silico* modeling) (Chompunuch and Warawut, 2021)

จากการศึกษาก่อนหน้าของ Yartchimplee (2021) พบว่าเมื่อทำการสกัดใบจากคราม 15 ตัวอย่าง จาก 6 สายพันธุ์ ในพื้นที่เพาะปลูกทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยด้วยวิธีการแช่หมัก (maceration) ด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สายพันธุ์ *I. tinctoria* L. และ *I. suffruticosa* ให้ร้อยละของผลได้อยู่ในกลุ่มที่สูงรวมทั้งความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระค่าที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับสารควบคุมมาตรฐาน จึงมีความน่าสนใจที่จะนำสายพันธุ์ *I. tinctoria* L. และ *I. suffruticosa* ไปศึกษาต่อไป อีกทั้งเมล็ดของครามมีปริมาณฟลาโวนอยด์และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง (Heo *et al.*, 2014) จึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาใช้ในการศึกษาต่อเช่นกัน เพราะเป็นการเพิ่มมูลค่าเมล็ดของครามที่มีการนำไปใช้ในการเพาะปลูกแต่เพียงอย่างเดียว

ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นเพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและเมล็ดจากต้นครามสอง สายพันธุ์ ศึกษาอิทธิพลของตัวทำละลายกระบวนการสกัด และชิ้นส่วนตัวพืชคราม และนำสารสกัดที่ได้ไปศึกษาการจำแนกชนิดสารด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี และทำนายการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลานิน โดยสารประกอบที่ได้

จากการสกัดจากต้นครามถูกนำไปวิเคราะห์โดยการทำแบบจำลองโมเลกุลในการเข้าจับกับโปรตีนเป้าหมาย เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดจากครามไปใช้ในการผลิตเป็นเวชสำอางต่อไป

2. วิธีการ

2.1 วัตถุดิบในการสกัด

เมล็ดครามสายพันธุ์ *I. tinctoria* L. และ *I. suffruticosa* ได้รับความอนุเคราะห์มาจากแหล่งการเพาะปลูกฟาร์มครามณรงค์ จังหวัดสกลนคร และ อ้วนกลม แสบปีฟาร์ม ตำบลบ้านตาด อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี ประเทศไทย สายพันธุ์ครามได้รับการยืนยันสายพันธุ์จากงานวิจัยของ Thanananta *et al.* (2020a) Thanananta *et al.* (2020b) และ Buaban *et al.* (2020) โดยนำเมล็ดมาเพาะในถุงเพาะชำขนาด 6x12 นิ้ว ระยะเวลา 14 วัน จากนั้นย้ายต้นกล้าครามที่สมบูรณ์ปลูกในกระถางขนาด 10x7.5 นิ้ว ทำการทดลองบริเวณ ชั้น 4 อาคารบรรยายรวม 4 ศูนย์รังสิต อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี เมื่อครบระยะเวลา 180 วัน ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดลอง

2.2 เตรียมตัวอย่างคราม

นำเมล็ด และใบ ที่เก็บได้จากต้นคราม 2 สายพันธุ์ แยกเมล็ดที่ไม่สมบูรณ์ออก ส่วนใบจะเลือกใบที่มีเขียวสด ไม่มีรอยกัดของแมลงและเชื้อรา ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างไปอบด้วยตู้อบความร้อน (Hot air oven ยี่ห้อ Binder) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชั่วโมง (Heo *et al.*, 2014) พักให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง บั่นให้เป็นผงด้วยเครื่องบั่น (PHILIPS รุ่น HR2061) ความเร็วเบอร์ 3 เป็นเวลา 5 นาที คัดแยกขนาดด้วยตะแกรงร่อน เก็บตัวอย่างในถุงซิปล็อกในตู้ดูดความชื้น เพื่อป้องกันการสัมผัสอากาศและแสงแดด

2.3 การสกัด

ซึ่งตัวอย่างผงใบและเมล็ดของต้นคราม ทั้ง 2 สายพันธุ์ อย่างละ 5 กรัม ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิตร สำหรับการสกัดแบบแช่ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Singh *et al.* (2015) เติมตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 50, 70 และ 99.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 125 มิลลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม เขย่าที่เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Scilution รุ่น SI-s150) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 วัน ในส่วนการสกัดแบบ Soxhlet ดัดแปลงมาจากวิธีของ Asuntha *et al.* (2010) โดยเทผงตัวอย่างลงใน extraction thimble จากนั้นเติมตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 50, 70 และ 99.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 125 มิลลิตร ลงในขวดปริมาตรก้นกลมขนาด 250 มิลลิตร ใช้อุณหภูมิในการสกัดตั้งแต่ 100 ถึง 150 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการสกัด 6 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ทั้งสองแบบไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดหยาบไประเหยแห้งโดยด้วยเครื่องกลั่นระเหยภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator, V-800, BÜCHI) เก็บสารสกัดหยาบไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช วิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์ปริมาณสารโพลีฟีนอลด้วยวิธีโฟลีนซิโอแคลชู

2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.4.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH assay)

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช โดยดัดแปลงวิธีของ Anusuya and Mamain (2012) และ Singh *et al.* (2015) คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก มีหน่วยเป็นไมโครโมลาร์และเทียบกับค่าตัวควบคุม

ลบที่ใส่เอทานอลแทนการใส่สารละลายตัวอย่าง
คำนวณร้อยละของความสามารถในการยับยั้งการ
เกิดอนุมูลอิสระจาก FRSA (% free radical
scavenging activity) จากสมการที่ (2.1) และศึกษา
ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการยับยั้งอนุมูล
อิสระร้อยละ 50 (inhibitory concentration, IC₅₀)
โดยรายงานผลเป็น IC₅₀*DPPH (mg crude/ml
reaction) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น
515 นาโนเมตร

$$\text{FRSA (\%)} = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) \div A_{\text{blank}}] \times 100 \quad (2.1)$$

โดย A_{blank} แทนค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมที่
ทำปฏิกิริยากับดีพีพีเอช;

A_{sample} แทนค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร
ของตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับดีพีพีเอช

2.4.2 วิเคราะห์ความสามารถในการ รีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power; FRAP)

วิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก
ของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยดัดแปลงวิธีของ
Sharma and Agarwal (2015) และ Wong *et al.*
(2015) คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบกับ
กราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต เข้มข้น 1 มิลลิโม
ลาร์ โดยรายงานผลในหน่วย mg Trolox
equivalent/g extract

2.4.3 วิเคราะห์ปริมาณสารโพลีฟีนอล ด้วยวิธีโฟลลินซีโอแคลธู (Folin-Ciocalteu assay)

วิเคราะห์ปริมาณสารโพลีฟีนอลด้วยวิธีโฟลลินซี
โอแคลธู โดยดัดแปลงจากวิธีของ Guruvaiah *et al.*
(2012) คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอล
ทั้งหมด เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลล
ิคเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยรายงานผล

เป็นมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ
(mg GAE/g crude extract)

2.5 การจำแนกชนิดของสารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพของครามโดยเทคนิคแก๊สโครมา โทกราฟี (Gas chromatography- mass spectrometer: (GC-MS)

วิเคราะห์สารประกอบจากสารสกัดด้วยเทคนิค
Gas chromatography- mass spectrometer โดย
ดัดแปลงวิธีของ Rajan *et al.* (2015) นำสารสกัด
จากส่วนต่าง ๆ ของ *I. tinctoria* ได้แก่ ใบและเมล็ด
ที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีการแบบแช่หมัก ในตัวทำ
ละลายเอทานอลเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ ส่ง
ตัวอย่างวิเคราะห์ ที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ
(NanoTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ประเทศไทย

2.6 ผลการทำนายการเข้าจับของสารสกัด ครามกับไทโรซิเนสโดยเทคนิคการจำลอง โมเลกุล (Molecular docking)

เตรียมข้อมูลสารประกอบที่พบในคราม จากข้อ
2.5 จากฐานข้อมูล Pubchem หรือ Zinc database
(Irwin *et al.*, 2012) และใช้โมเลกุล Kojic acid เป็น
สารมาตรฐานในการทดสอบการเข้าจับกับเอนไซม์
เป้าหมายไทโรซิเนส (PDB id: 2Y9X.pdb) (Ismaya
et al., 2011) วิเคราะห์การเข้าจับของโมเลกุล
ภายในสารสกัดครามกับไทโรซิเนสโดยโปรแกรม
Gold 6.0 วิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นบริเวณ
โปรตีนเป้าหมายและลิแกนด์โดยใช้โปรแกรม Drug
discovery studio เพื่อแสดงปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น
ระหว่างกรด อะมิโนในบริเวณที่มีการจับของโปรตีน
เป้าหมายกับลิแกนด์

2.7 การทดสอบทางสถิติ

ค่าผลลัพธ์จะถูกนำเสนอด้วยค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วน
เบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวน
(analysis of variance: ANOVA) โดยทดสอบความ

แตกต่างกันระหว่างค่าเฉลี่ยแบบรายคู่ด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS รุ่นที่ 25.0

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 การทดสอบความสามารถการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคราม

การทดสอบความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดครามสายพันธุ์ *I. tinctorial* และ *I. suffruticosa* โดยแสดงค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลดีพีพีเอช ค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก และปริมาณสารโพลีฟีนอลของสารสกัดคราม 2 สายพันธุ์ พบว่าตัวอย่างที่มาจากเมล็ดให้ค่าปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ได้ดีกว่าตัวอย่างจากใบครามทั้งสองสายพันธุ์ โดยค่า IC_{50} ของการสกัดตัวอย่างเมล็ดด้วยวิธีการแช่หมัก สายพันธุ์ *I. tinctorial* มีค่าในช่วง 0.13-0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างใบ ให้ค่าในช่วง 0.28-0.47

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาวิธีการสกัดพบว่าการสกัดด้วยวิธีชอกห์เลต ให้ค่าในช่วง 0.10-0.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เมล็ด) และให้ค่าในช่วง 1.57-2.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ใบ) (Figure 1A) ส่วนค่า IC_{50} ของการสกัดตัวอย่างเมล็ดด้วยวิธีแช่หมักสายพันธุ์ *I. suffruticosa* ให้ค่าในช่วง 0.11-0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างใบ ให้ค่าในช่วง 1.25-3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาวิธีการสกัดพบว่าการสกัดด้วยวิธีชอกห์เลต ให้ค่าในช่วง 0.05-0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เมล็ด) และให้ค่าในช่วง 0.85-4.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ใบ) (Figure 1B) ส่วนการสกัดด้วยวิธีแช่หมักให้ผลที่ต่ำกว่า เนื่องจากกระบวนการสกัดด้วยวิธีชอกห์เลต มีการไหลเวียนของตัวทำละลายและมีการใช้ความร้อน ทำให้สารสำคัญที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชที่ไม่ทนความร้อนจะสลายไป นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่า IC_{50} ของการสกัดตัวอย่างเมล็ดครามทั้งสองสายพันธุ์ ด้วยตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 50, 70 และ 99.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ทั้งสองสายพันธุ์ ให้ค่า IC_{50} ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

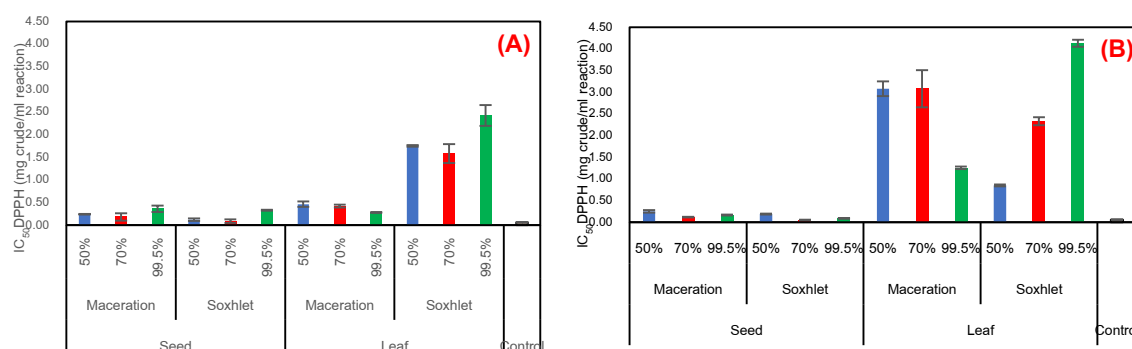


Figure 1 Effect of ethanol concentration (50, 70, and 99.5%), extraction methods (maceration and Soxhlet), and explants (leave and seed) on antioxidant activity by DPPH assay of the indigo plant (A: *I. tinctoria* L. and B: *I. suffruticosa*).

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assays) เพื่อประเมินความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยา redox-linked colorimetric method จากการทดลองพบว่าในตัวอย่างเมล็ด สายพันธุ์ *I. tinctoria* ให้ค่าในช่วง 214.55-420.00 มิลลิกรัมTrolox ต่อกรัมสารสกัด ส่วนตัวอย่างใบ ให้ค่าที่ต่ำกว่าในช่วง 107.88-481.82 มิลลิกรัมTrolox ต่อกรัมสารสกัด (Figure 2A) ส่วนในตัวอย่างเมล็ด สายพันธุ์ *I. suffruticosa* ให้ค่าในช่วง 209.09-565.46 มิลลิกรัมTrolox ต่อกรัมสารสกัด ส่วนตัวอย่างใบ ให้ค่าที่ต่ำกว่าในช่วง 145.46-349.39 มิลลิกรัมTrolox ต่อกรัมสารสกัด (Figure 2B) เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบวิธีการสกัด พบว่า การสกัดด้วยวิธีช็อกเก็ต ให้ค่าที่สูงกว่าวิธีแช่หมัก ในช่วง 358.18-565.46 มิลลิกรัมTrolox ต่อกรัมสารสกัด (เมล็ด) และ 107.87-276.36 มิลลิกรัมTrolox ต่อกรัมสารสกัด (ใบ) ส่วนการสกัดด้วยวิธีแช่หมัก ให้

ค่าในช่วง 209.09-332.82 มิลลิกรัมTrolox ต่อกรัมสารสกัด (เมล็ด) และ 290.91-481.82 มิลลิกรัมTrolox ต่อกรัมสารสกัด(ใบ) จากผลดังกล่าวพบว่าค่า FRAP ในตัวอย่างเมล็ดที่สกัดด้วยวิธีช็อกเก็ตให้ค่าที่สูงกว่าวิธีแช่หมัก แต่ในตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธีแช่หมักให้ค่าที่สูงกว่าวิธีช็อกเก็ต เมื่อพิจารณาถึงตัวทำลายเอทานอลเข้มข้น 50, 70 และ 99.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการรีดิวซ์ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ จากผลการทดลองการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ จะแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบของผล FRAP value ซึ่งหมายถึงหากสารสกัดมีค่า FRAP value ที่สูงก็จะมีสามารถในการรีดิวซ์ (สารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบ) ซึ่งทำให้ประจุของสารบ่งชี้ Fe^{3+} เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} ได้มากขึ้น เพราะโลหะไอออนเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ มากมาย

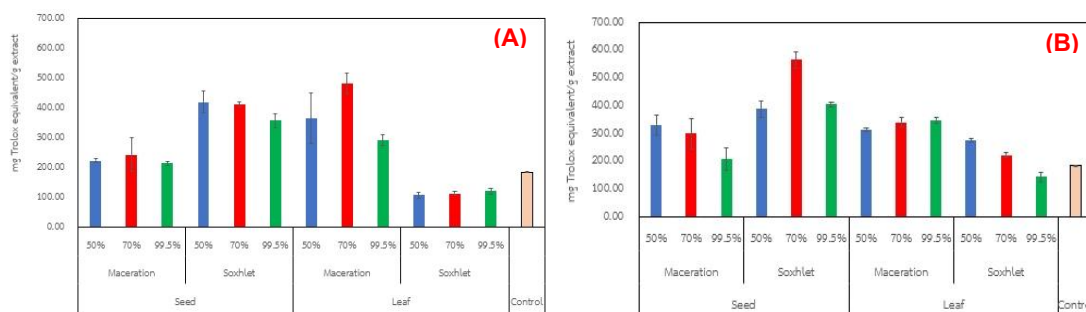


Figure 2 Effect of ethanol concentration (50, 70, and 99.5%), extraction methods (maceration and Soxhlet), and explants (leave and seed) on antioxidant activity by FRAP assay of the indigo plant (A: *I. tinctoria* L. and B: *I. suffruticosa*).

สำหรับปริมาณสารโพลีฟีนอลโดยวิธีโฟลีนชิโอ แคลนในสารสกัดครามทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดในทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในตัวอย่างเมล็ด สายพันธุ์ *I. tinctoria* ให้ค่าในช่วง 5.83-8.61 มิลลิกรัม

กรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ส่วนใบจะให้ค่าสูงกว่าในช่วง 5.83-9.91 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง (Figure 3A) ส่วนในตัวอย่างเมล็ด สายพันธุ์ *I. suffruticosa* ให้ค่าในช่วง 4.73-7.58 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ส่วนใบจะ

ให้ค่าสูงกว่าในช่วง 6.98-9.98 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง (Figure 3B) เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบวิธีการสกัด พบว่า การสกัดด้วยวิธีช็อกเก็ต ให้ค่า 4.72-7.96 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง (เมล็ด) และ 6.16-9.98 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง (ใบ) ส่วนการสกัดด้วยวิธีแช่หมักให้ผลที่สูงกว่า เนื่องจากการสกัดวิธีแช่หมัก เป็นกระบวนการสกัดที่ไม่ใช้ความร้อน สารประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อนจึงไม่เสียหายไป ให้ค่าในช่วง 5.60-8.61 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง (เมล็ด) และให้ค่าในช่วง 5.83-9.67 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง (ใบ) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาตัวทำลายเอทานอล ที่แตกต่างกัน 50, 70 และ 99.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดมีค่าไม่แตกต่างกัน

ทางสถิติ จากผลการหาปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมด พบว่าในชั้นส่วนที่สกัดจากใบครามนั้นมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดที่สูงกว่าในเมล็ด ในทั้งสองสายพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องจากในใบจะประกอบด้วยรงควัตถุของพืช (pigments) และสารสำคัญ (phytochemical) โดยสารเหล่านี้มีองค์ประกอบของสารโพลีฟีนอล ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Guruvaiiah และคณะ (2012) ที่ทำการวิเคราะห์ทางพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากใบคราม พบสารสำคัญอยู่ในกลุ่มของฟีนอล ฟลาโวนอยด์ สโปีนิน และไฟโตสเตียรอยด์ ในระดับที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบอื่น ๆ เช่น แอลคาลอยด์ แทนนิน ไตรเทอร์พีน เทอร์พีนอยด์ และคาร์โบไฮเดรตตามลำดับ

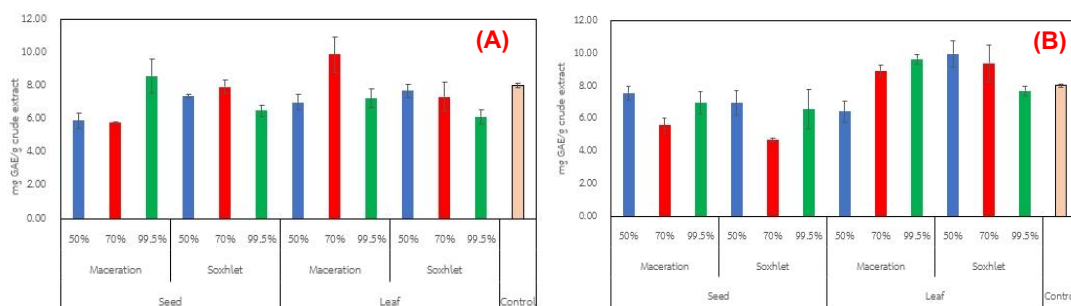


Figure 3 Effect of ethanol concentration (50, 70, and 99.5%), extraction methods (maceration and Soxhlet), and explants (leave and seed) on total phenolic content (TPC) of the indigo plant (A: *I. tinctoria* L. and B: *I. suffruticosa*).

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficients; r) เป็นค่าแสดงความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการสกัด ชั้นส่วนของต้นคราม ความเข้มข้นเอทานอล ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารโพลีฟีนอล ของสารสกัดครามสายพันธุ์ *I. tinctorial* และ *I. suffruticosa* (Table 1) พบว่าจากผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยการสกัดไม่มีความสัมพันธ์กับค่าการต้านอนุมูลอิสระ IC_{50} ของดีพีพีเอช ค่า

ความสามารถเป็นตัวรีดิวซ์เฟอร์ริก และการหาปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมด จากสายพันธุ์ *I. tinctorial* โดยพบว่าถือเป็นปัจจัยสำคัญที่มีความสัมพันธ์ต่อค่า TPC (Total phenolic contents) มีความสัมพันธ์เชิงบวก ($r \approx 0.3$, $p > 0.05$) ในขณะที่การวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับค่าการต้านอนุมูลอิสระ IC_{50} ของดีพีพีเอช มีความสัมพันธ์เชิงลบ ($r \approx -0.6$, $p > 0.01$) และค่าพลังงานความสามารถเป็นตัว

รติวธีเพอร์ริก มีความสัมพันธ์เชิงบวก ($r \approx 0.3$, $p > 0.05$) ขณะที่สายพันธุ์ *I. suffruticosa* ขึ้นส่วนในการสกัดมีความสัมพันธ์กับค่าการต้านอนุมูลอิสระ IC_{50} ของวิธีดีพีพีเอช ในเชิงบวก ($r \approx 0.6$, $p > 0.05$) และในขณะที่ค่าพลังงานความสามารถเป็นตัวรติวธีเพอร์ริก มีความสัมพันธ์เชิงลบ ($r \approx -0.5$, $p > 0.01$) รวมถึงค่าการต้านอนุมูลอิสระจากวิธีดีพีพีเอชและการวิเคราะห์ค่าพลังงานความสามารถเป็นตัวรติวธีเพอร์ริก ยังมีความสัมพันธ์เชิงลบต่อกัน ($r \approx -0.5$, $p > 0.01$ และ $r \approx -0.4$, $p > 0.01$) จากความสัมพันธ์ข้างต้นเป็นเหตุผลในการเลือก สายพันธุ์ *I. tinctoria* L. มาศึกษาการจำแนกสารประกอบที่อยู่ในสารสกัดจากชิ้นส่วนใบ และเมล็ด โดยการวิเคราะห์ด้วย

GC-MS เนื่องจากสายพันธุ์ดังกล่าวให้ค่าร้อยละของผลได้อยู่ในกลุ่มที่สูง และยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารโพลีฟีนอลที่สูง และทำการเลือกการสกัดสายพันธุ์นี้ด้วยวิธีแช่หมักเนื่องจากวิธีการนี้เป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์อย่างแพร่หลายเนื่องจากเป็นวิธีที่มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายในการสกัดถูกกว่าวิธีอื่น ๆ และมีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน เกิดการสูญเสียสารที่มีความไวต่อความร้อนต่ำ และผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยการสกัดเช่น ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลไม่มีความสัมพันธ์กับค่าการต้านอนุมูลอิสระ IC_{50} ของดีพีพีเอช ค่าความสามารถเป็นตัวรติวธีเพอร์ริก และการหาปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดด้วย

Table 1 Correlation coefficient (r) for correlation between extraction methods, fragments, ethanol concentration for antioxidant activity, and polyphenol content of *I. tinctoria* and *I. suffruticosa*

	Extraction	Explant	Ethanol	Dpph	Frap	TPC
<i>I. tinctoria</i>						
Extraction	1	.000	.000	.241	.092	-.039
Explant		1	.000	.283	.071	.356*
Ethanol			1	.013	.002	.133
Dpph				1	-.693**	-.092
Frap					1	.393*
TPC						1
<i>I. suffruticosa</i>						
Extraction	1	.000	.000	.089	-.053	-.024
Explant		1	.000	.611*	-.533**	.089
Ethanol			1	.010	-.001	.068
Dpph				1	-.550**	.306
Frap					1	-.459**
TPC						1

*Correlation is significant when $p < 0.05$ (2-tailed), **Correlation is significant when $p < 0.01$ (2-tailed).

Table 2 GC/MS spectral data of major compounds isolated from the indigo leaf extract and seed extract

Samples	Compound name	Molecular weight (g/mol)	m/z	Mass spectra
Leave extract	Linoleic acid	280.44	280	
	Palmitic acid	256.40	256	
	Indigo	262.27	262	
Seed extractm	Mome inositol	180.16	185	
	Oleic acid	282.47	282	
	Palmitic acid	256.40	256	

3.2 การจำแนกชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของครามโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography-mass spectrometer: (GC-MS)

นำตัวอย่างสารสกัดหยาบในชั้นส่วนของใบและเมล็ด ของสายพันธุ์ *I. tinctoria* L. ไปวิเคราะห์

ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) ที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักทางเคมีภายในสารสกัดหยาบจากใบคราม (Figure 4A และ Table 2) พบสารประกอบหลักคือ Linoleic acid, Palmitic acid และ Indigo ร้อยละ 21.57, 14.46 และ 9.37

Table 3 Tentative identification compounds of indigo leave and seed extract from GCMS analysis

No.	Plant parts	Retention Time	Tentative Identification compound	% of Total	No.	Plant parts	Retention Time	Tentative Identification compound	% of Total
1	L	4.05	1,3-Butanediol	0.231	18	L	18.1	Hexadecanamide	0.093
2	S	7.43	2-Pentylfuran	0.085	19	L S	19.57 19.6	Eicosanoic Acid	0.464 0.768
3	L S	9.18 9.48	Glycerin	3.744 0.443	20	S	20.82	Bis (2-Ethylhexyl Phthalate)	1.342
4	S	9.59	4H-Pyran-4-one,2,3-Dihydro-3,5-Dihydroxy-6-Methyl	0.852	21	S	21.21	Ethyl Docosanoate	4.495
5	L	10.49	4-(Methylamino) benzonitrile	0.862	22	L	21.18	Docasanoic acid, Methyl ester	0.228
6	L	11.15	Butanedioic Acid	0.814	23	L	21.49	Tryptanthrin	1.125
7	L	11.45	Ethyl Anthranilate	0.286	24	L S	24.78 24.78	Nonacosane	0.526 0.526
8	L	11.88	Anthranilate	0.789	25	L	27.66	Indigo	9.370
9	L S	14.39 14.38	Myristic Acid	0.673	26	L	30.06	Vitamin E	5.368
10	L	14.8	Neophytadiene	4.576	27	S	32.18	Campesterol	0.585
11	S	15.72	Mome inositol	27.733	28	L S	33.4 33.25	Stigmasterol	7.072 1.639
12	L S	16.31 16.25	Palmitic Acid	14.462 11.429	29	L	34.42	Epieudesmin	0.179
13	L	17.31	Phytol	3.476	30	L S	35.39	Beta-Sitosterol	2.679
14	S	17.72	Ethyl Oleate	1.944	31	S	37.93	Taraxasterol	0.321
15	S	17.87	Oleic Acid	21.579	32	S	38.31	Spinasterone	1.024
16	L	17.9	Linoleic Acid	21.579	33	S	41.05	Sitostenone	0.300
17	L S	18.00 17.99	Stearic Acid	2.043 3.229					

ตามลำดับ ส่วนในสารสกัดหยาบจากเมล็ดคราม (Figure 4B และ Table 2) พบสารหลักคือ Mome inositol, Oleic acid และ Palmitic acid ร้อยละ 27.73, 21.57 และ 11.42 ตามลำดับ สารประกอบภายในสารสกัดจากใบ และเมล็ดทั้งหมดที่ระบุชนิด

ได้ 33 ชนิด (Table 3) สารที่พบมากอยู่ในกลุ่มของกรดไขมันซึ่งพบทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวของพืช และกลุ่มสีธรรมชาติ Indigo โดยสารประกอบที่พบส่วนมากในสารสกัดจากใบครามและเมล็ดครามจะอยู่ในกลุ่มของกรดไขมันที่มีประโยชน์

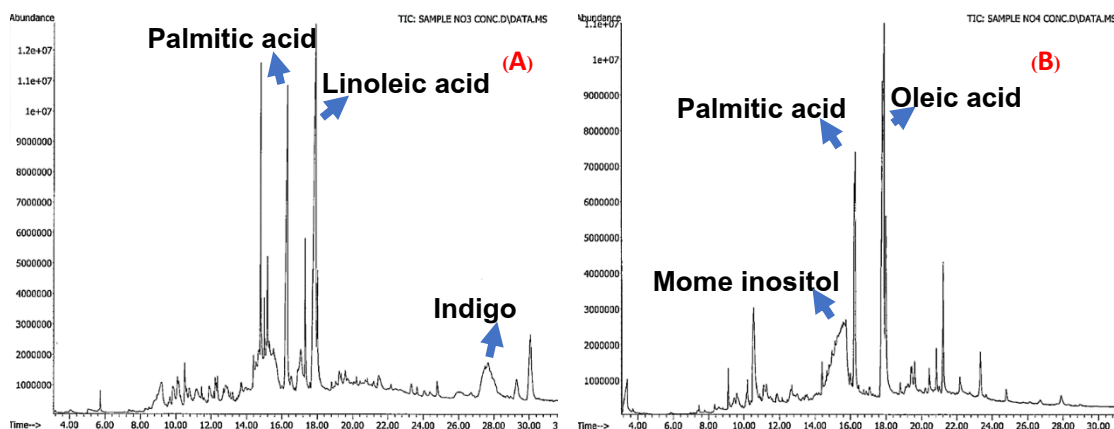


Figure 4 GC-MS chromatogram of indigo leave extract (A) and seed extract (B)

ได้แก่ กลุ่มกรดไขมัน ได้แก่ Linoleic acid, Palmitic acid, Stearic acid และ Glycerin กลุ่มสารสเตียรอยด์ ได้แก่ Stigmasterol สารประกอบฟีนอลิก วิตามินอี และ ไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ Phytol รวมไปถึงสารกลุ่มให้สีตระกูลสีฟ้าคราม ได้แก่ Indigo ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Srinivasan *et al.* (2016) และ Gerometta *et al.* (2020) ได้วิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดครามพบว่ามียาของสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ สโปีน และเทอร์ฟีนอยด์ เป็นต้น

3.3 การทำนายการเข้าจับของสารประกอบจากสารสกัดครามกับเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) โดยการจำลองการจับกันระหว่างโมเลกุลด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ดอกกิง (Molecular docking)

วิเคราะห์การเข้าจับกันของสารประกอบที่แยกได้ทั้ง 33 ชนิด กับเป้าหมายไทโรซิเนสรหัส PDB: 2Y9X โดยใช้ Gold 6.0 (Jones *et al.*, 1997) โดยใช้ฟังก์ชันการให้คะแนน Goldscore Chemscore ASP และ ChemPLP จากผลการทำนายพบว่าสารสกัดที่ได้จากใบ Phytol, Stearic Acid และ Vitamin E สารสกัดที่ได้จากเมล็ด Oleic Acid มีค่าพลังงานในการเข้าจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงเป็นไปตามแนวโน้มเดียวกันในทุกรูปแบบการคำนวณของโปรแกรม Gold โดยวิเคราะห์ค่าพลังงานเข้าจับเทียบกับสารมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid) พบว่ามีค่าพลังงานที่สูงกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก ทั้งนี้ค่าในแต่ละชุดการคำนวณแสดงถึงค่าพลังงานในการเข้าจับกับบริเวณที่สำคัญที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา (Active site) โดยเทียบเคียงลักษณะการเข้าจับกับโครงสร้างสารในเชิง 3 มิติ กับสารมาตรฐาน ซึ่งสามารถสังเกตได้ในการคำนวณทั้ง 4 รูปแบบ

Table 4 Molecular docking analysis of phytochemical isolates from indigo plant extracts with the tyrosinase enzyme

Ligand	Binding Energy (kcal/mol)			
	ChemPLP	Gold score	Chemscore	ASP
Standard Kojic acid	55.23	55.85	19.11	29.05
1. Phytol	83.78	71.86	36.77	38.08
2. Stearic Acid	78.34	61.01	58.22	34.22
3. Oleic Acid	75.13	61.45	33.63	34.13
4. Vitamin E	70.34	68.85	38.12	35.58

Table 5 The interaction between phytochemical isolates from indigo plant extracts and tyrosinase enzyme

Ligand	The type of interaction								
	$\pi - \pi$ stacked	π - Alkyl	π - Sigma	Covalent bond	C-H bond	Alkyl	Hydrophobic	Metal donor	Metal Acceptor
Standard Kojic acid	His1044	Ala1067	Val1064	-	His866 His1040 Phe1045 Met1061 Val1064	-	-	-	-
1. Phytol	-	Phe1045 Val1064	-	His842 His866	-	His1025 His1044 Ala1067	Val1064 His1025	-	-
2. Stearic Acid	-	-	-	His842	His866 His1040	-	His866	Cu2112	-
3. Oleic Acid	-	His1066	-	His866 His842	His842 Val1064	-	Val1064	-	-
4. Vitamin E	His1044	Phe871 His875 Val1028 His1040 Phe1045 Ala1067	-	His842	-	Val1029 Val1064	-	-	Cu2118

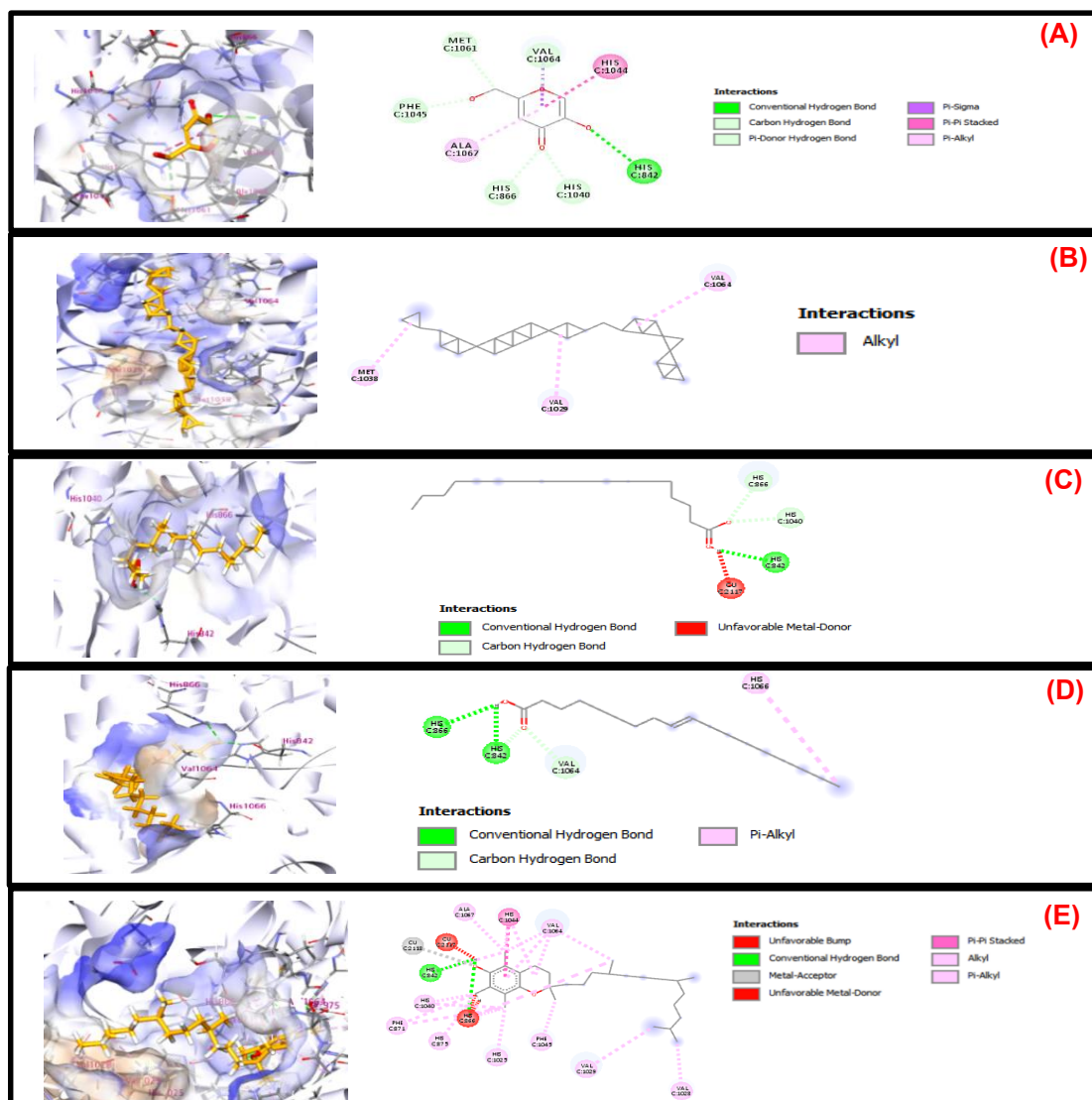


Figure 5 Three-dimensional (left) and two-dimensional (right) diagrams depicting the interaction of Kojic acid (A), Phytol (B), Stearic Acid (C), Oleic Acid (D), and Vitamin E (E) with the amino acid residues of the tyrosinase enzyme.

โดยสารตัวอย่างทั้งหมดให้ค่าสูงกว่าสารมาตรฐานในทั้ง 4 รูปแบบ (Table 4) เนื่องจากลักษณะการจับกันระหว่างลิแกนด์ของสารกับเอนไซม์ไทโรซิเนส มีการจับและเกิดปฏิกิริยสัมพันธ์ด้วยค่าพลังงานที่แตกต่างกัน แสดงใน Figure 5 และ Table 5

ผลการทำนายที่ได้นี้ให้ผลที่สอดคล้องกับการทดลองในห้องปฏิบัติการและการจำลองในคอมพิวเตอร์ของ Locatelli *et al.* (2018) พบว่าสารที่นำมาเป็นลิแกนด์มักเป็นสารกลุ่มกรดไขมัน สารโพลีฟีนอล และสารกลุ่มไฮโดรคาร์บอน ที่สกัดมาได้จากพืชนั้นมีแนวโน้มในการเข้าจับกับเอนไซม์ไทโร

ซินเนสได้ งานวิจัยนี้มีการนำสารสกัดที่ได้จากต้นจาคีออบ หรือ *Asphodeline liburnica* ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซินเนสได้เท่ากับ 29.78 ± 3.08 มิลลิกรัม Kojic acid ต่อกรัม และเมื่อทำนายการเข้าจับของสารลิแกนด์ Emodine ที่ได้จากการสกัดต้นจาคีออบด้วยโปรแกรม GOLD ซึ่งให้ค่าการเข้าจับ Goldscore เท่ากับ 57.5 และ Chemscore เท่ากับ 28.7 ซึ่งให้ค่าการเข้าจับที่สูงกว่าสารมาตรฐาน Kojic acid และยังสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซินเนสในห้องปฏิบัติการอีกด้วย และ Mahomoodally *et al.* (2019) ได้ทำการสกัดสารจากต้น *Hypericum lanuginosum* จากนั้นนำไปวิเคราะห์สารประกอบที่สกัดได้ด้วยเทคนิค LC-HRMS และได้คัดเลือกสารที่น่าสนใจ จำนวน 4 สาร ได้แก่ Chlorogenic acid, Quinic acid, Quercetin-3-O-rutinoside (rutin) และ Quercetin-3-O-galactoside (Hyperoside) ซึ่ง สาร สกัด Hyperoside มีค่าสมรรถภาพในการเชื่อมต่อกับโปรตีนเป้าหมายที่ระดับ (docking fitness value) 45.86 สูงที่สุดในทั้ง 4 สารประกอบ ซึ่งตัวโปรแกรม Gold นั้นรายงานถึงว่าหากมีค่า Docking fitness value สูง จะหมายถึงการมีค่า Binding affinity ที่ดีติดลบมาก ทำให้แสดงถึงลิแกนด์มีความสามารถเข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายได้ดี

4. สรุปผลการวิจัย

การศึกษาสารสกัดจากเมล็ด และใบของต้นคราม 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *I. tinctorial* และ *I. suffruticosa* ด้วยวิธีแช่หมัก และซอกห์เลต โดยตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 50, 70 และ 99.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารสกัดจากเมล็ดครามด้วยวิธีแช่หมักและซอกห์เลตให้ค่าปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชและความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (ค่า IC_{50}) ได้ดีกว่าตัวอย่างจากใบคราม สำหรับใน

ตัวอย่างใบจะให้ค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่สูงกว่าในตัวอย่างเมล็ด เห็นได้ว่าตัวอย่างเมล็ดของครามทั้งสองสายพันธุ์เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญจากสารสกัดใบและเมล็ดโดยเทคนิค Gas chromatography mass spectroscopy (GC-MS) พบสารสำคัญ 33 ชนิด และเมื่อนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้ในการเป็นสารลิแกนด์เพื่อเข้าจับกับไทโรซินเนสโดยการเข้าจับระหว่างโมเลกุลด้วยการจำลองการจับกันระหว่างโมเลกุล (Molecular docking) พบว่า Phytol, Oleic Acid, Stearic Acid และ Vitamin E ให้ค่าพลังงานการเข้าจับจากทุกชุดการคำนวณได้สูงกว่าสารมาตรฐาน Kojic Acid ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารดังกล่าวมีแนวโน้มในการเข้าจับกับไทโรซินเนสได้ดี นอกจากนี้ควรมีการนำไปศึกษาต่อในด้านคุณลักษณะทางเคมีของพืชเคมีเพิ่มเติมสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาใหม่หรือเวชสำอาง เพื่อเพิ่มมูลค่าของครามในปัจจุบัน นอกเหนือจากการใช้ในงานด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอ

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยแผนบูรณาการพัฒนาศักยภาพวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีวิจัยและนวัตกรรมประจำปี 2562 เลขที่ 8/2562 ทุนบัณฑิตเรียนดีเพื่อศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา ตามบันทึกข้อตกลงเลขที่ ทบ 15/2561 และได้รับความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างคราม จากอ้วนกลม แอปป์ฟาร์ม และณรงค์เดชฟาร์ม ในการวิจัยในครั้งนี้

6. References

Anusuya, N. and Manian, S., 2013, Antioxidant and free radical scavenging potential of different solvent extracts of *Indigofera*

- tinctoria* L. Leaves, Int. J. Pharm Sci., 5: 142-147.
- Asuntha, G., Prasannaraju, Y., and Prasad., K., 2010, Effect of ethanol extract of *Indigofera tinctoria* Linn (Fabaceae) on lithium/ pilocarpine- induced status epilepticus and oxidative stress in wistar rats, Trop. J. Pharm. Res., 9: 149-156.
- Bakasso, S., Lamien-Meda, A., Lamien. C., Kiendrebeogo, M., Millogo, J., Ouedraogo, A. and Nacoulma, O., 2008, Polyphenol contents and antioxidant activities of five *Indigofera* species (Fabaceae) from Burkina Faso Pak, J. Biol. Sci., 11: 1429-1435.
- Buaban. S., Thanananta, T., and Thanananta, N., 2020, Genetic relationship assessment of *Indigofera* using HAT-RAPD technique, TJST., 9: 378-387. (In Thai)
- Chiang, A., Wu, H., Yeh, H., Chu, C., Lin, H. and Lee, W., 2006, Antioxidant effects of black rice extract through the induction of superoxide dismutase and catalase activities, Lipids, 41: 797–803.
- Chompunuch, V. and Warawut, C., 2021, Bioinformatics Application in Biological Science Research, Burapha Sci. J., 15: 99-106. (In Thai)
- Gerometta, E., Grondin, I., Smadja, J., Frederich, M. and Gauvin- Bialecki, A., 2020, A review of traditional uses phytochemistry and pharmacology of the genus *Indigofera*, J. Ethnopharmacol., 253: 112608-112691.
- Guruvaiah, P., Arunachalam, A. and Velan, L., 2012, Evaluation of phytochemical constituents and antioxidant activities of successive solvent extracts of leaves of *Indigofera caerulea* Roxb using various *in vitro* antioxidant assay systems, Asian Pac. J. Trop. Dis., 2: 118-123.
- Heo, B., Park, Y., Bae, Y., Cho, J., Park K., Jastrzebski, Z. and Gorinstein, S., 2014, Anticancer and antioxidant effects of extracts from different parts of indigo plant, Ind. Crops Prod., 56, 9–16.
- Irwin, J., Sterling, T., Mysinger, M., Bolstad, E. and Coleman, R., 2012, ZINC a free tool to discover chemistry for biology, J. Chem. Inf. Model., 52: 1757-1768.
- Ismaya, W., Rozeboom, H., Weijn, A., Mes, J., Fusetti, F., Wichers, H. and Dijkstra, B., 2011, the Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone, Biochemistry, 50: 5477-5486.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R. and Taylor, R., 1997, Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking, J. Mol. Biol., 267: 727-748.
- Locatelli, M., Yerlikaya, S., Baloglu, M. C., Zengin, G., Altunoglu, Y. C., Cacciagrano, F., Campestre, C., Mahomoodally, M. F. and Mollica, A., 2018, Investigations into the therapeutic potential of *Asphodeline liturgical* roots *in vitro* and *silico* biochemical and toxicological perspectives, Food Chem. Toxicol., 120: 172-182.

- Mahomoodally, M. F. , Zengin G. , Zheleva-Dimitrova, D. , Mollica, A. , Stefanucci, A. , Sinan, K.I. and Aumeeruddy., M.Z., 2019, Metabolomics profiling, bio-pharmaceutical properties of *Hypericum lanuginosum* extracts by *in vitro* and *in silico* approaches, Ind. Crops Prod., 133, 379-382.
- Matpha, S. and Chantaranothai, P., 2015, The genus *Indigofera* L. in Thailand. Applied Taxonomic Research Center, Khonkaen: Khon Kaen University, 80 p. (In Thai)
- Rajan, R. , Srinivasan, S. , Wankhar, W. and Rathinasamy, S. , 2015, Research & reviews journal of pharmaceutical analysis, J. Pharm. Anal., 4: 72-83.
- Saithong, A. , Teanglum, A. and Lasopha, S. , 2011, Indigo and indigo products, Research Report, Sakonnakhon: Sakonnakhon rajabhat university, 70 p. (In Thai)
- Sharma, V. , and Agarwal, A. , 2015, Physicochemical and antioxidant assays of methanol and hydromethanol extract of ariel parts of *Indigofera tinctoria* Linn, Indian J. Pharm. Sci., 77: 729-734.
- Singh, R. , Sharma, S. , and Sharma, V. , 2015, Comparative and quantitative analysis of antioxidant and scavenging potential of *Indigofera tinctoria* Linn. extracts, J. Integr. Med., 13: 269-278.
- Srinivasan, S. , Wankhar, W. , Rathinasamy, S. and Rajan, R. , 2016, Free radical scavenging potential and HPTLC analysis of *Indigofera tinctoria* Linn. (Fabaceae), J. Pharm. Anal., 6: 125-131.
- Thanananta, N. , Buaban. S. and Thanananta, T., 2020a, Genetic relationship assessment of indigo plant (*Indigofera* Linn.) using SCoT technique, TJST., 9: 333-341. (In Thai)
- Thanananta, T. , Buaban. S. and Thanananta, N. , 2020b, Genetic relationship assessment of *Indigofera* Using ISSR technique, TJST., 9: 388-396. (In Thai)
- Wong, C., Cheung, W.S., Lau, Y., Bolanos de la Torre, A. and Owusu-Apenten, R., 2015, A frap assay at pH 7 unveils extra antioxidant activity from green, black, white and rooibos tea but not apple tea, F. Nutr. Report., 1: 16-23.
- Yartchimplee, A. , 2021, Antioxidant activities of the indigo extracts and prediction of tyrosinase inhibition by molecular docking, Master Thesis, Thammasat University, Pathum Thani, 168 p. (In Thai).