# พฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของชาเล็บรอก

# Phytochemicals and Biological Activities of *Toddalia asiatica* Tea

บุษราคัม สิงห์ชัย*, จันทร์จิรา ขอจุลซ้วน และปาริฉัตร ด้วงทอง

*สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี*

*ตำบลนาวุ้ง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี 76000*

Butsarakham Singchai*, Janjira Khojulchun and Parichat Duangthong

*Division of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Phetchaburi Rajabhat University,*

*Na Wung, Muang Phetchaburi 76000*

**บทคัดย่อ**

*Toddalia asiatica* (L.) Lam หรือเล็บรอก เป็นสมุนไพรในท้องถิ่นพบในประเทศไทยพบพืชนี้ที่ภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ รวมถึงในจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ แต่ยังไม่เป็นที่นิยมรับประทานมากเท่าในจังหวัดชุมพรและภาคใต้ของประเทศ เล็บรอกมีสรรพคุณช่วยลดไขมันในเส้นเลือด เพราะมีรสชาติที่เผ็ดร้อน และปัจจุบันเล็บรอกถูกนำมาวิจัยในหลายด้านเพื่อหาฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันส่วนต่าง ๆ ของเล็บรอก ด้วยวิธี DPPH และ nitric oxide ศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้นในส่วนที่ดีที่สุดในการต้านออกซิเดชัน และศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของชาเล็บรอก โดยมีวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน ด้วยวิธี DPPH และ nitric oxide วัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 515 และ 546 นาโนเมตร ตามลำดับ การวิจัยครั้งนี้เก็บเล็บรอกทุกส่วนที่จังหวัดชุมพร ในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2557 ในการเตรียมชาเล็บรอก นำผงกิ่งเล็บรอก 2.00 กรัมบรรจุในถุงชา แล้วชงที่อุณหภูมิ 60-100 °C ระยะเวลาชง 1-10 นาที สถิติที่ใช้ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ผลการวิจัยพบว่าส่วนของกิ่งแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นสูงสุดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 125 µg/ml มีร้อยละการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันเป็น 64.86 ส่วนใบและรากมีร้อยละการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันเป็น 29.72 และ 41.21 ตามลำดับ กิ่งแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยค่า $IC_{50}$±S.D. เท่ากับ 89.65±1.00 µg/ml โดยวิตามินซีมีค่า $IC_{50}$±S.D. เท่ากับ 59.38±0.00 µg/ml ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี nitric oxide สารสกัดทุกส่วนไม่แสดงฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน การศึกษาสารสำคัญเบื้องต้นในกิ่งเล็บรอก พบสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ แทนนิน คูมาริน และสเตอรอยด์ในพืชเป็นองค์ประกอบ การศึกษาการต้านออกซิเดชันเบื้องต้นชาเล็บรอกพบว่าที่ 70 °C เวลา 10 นาที ชาเล็บรอกสามารถต้านการออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ร้อยละ 27.04±2.88 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 % (v/v) ทั้งสารสกัดและชาจากกิ่งเล็บรอกไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิงที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 µg/ml และ 2.5 % (v/v) ตามลำดับ

**คำสำคัญ :** เล็บรอก; ฤทธิ์ทางชีวภาพ; พฤกษเคมี

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** sbung13@yahoo.com

## Abstract

*Toddalia asiatica* (L.) Lam. known as Lebrog in Thai was a local herbal plant found in Thailand, especially in the North-Eastern and Southern parts including Phetchaburi and Prachuap Khiri Khan Provinces. However, this herbal plant is consumed extensively by only people in Chumphon and other provinces in the Southern area. It has clolesterol-lowering property in blood vessels due to its hot and spicy taste. Currently, the herbal plant was has been tested for its biological activities. This research was conducted to: (1) examine the antioxidant activities of different parts of *T. asiatica* with DPPH and nitric oxide methods, (2) determine phytochemical constituents in the part of *T. asiatica* possessing the best antioxidant activities, and (3) examine its antioxidant properties in its tea form compared with vitamin C substance standard. By employing DPPH and nitric oxide methods, measure of ultra-violet absorbance was measured at 515 and 546 nm, respectively. All tested parts of *T. asiatica* were collected in Chumphon Province in August 2014. To prepare Lebrog in tea from, 2.0 g of its twig powder was packed in a tea bag and then brewed in warm to hot water in the temperature ranging from 60-100 °C for about 1-10 minutes. The data were analyzed for percentage, mean, and standard deviation. At the maximum concentration of 125 µg/ml, the results showed that the twig extract of the plant exerted strong DPPH scavenging activity of 64.86 % followed by its leaf and root extracts with 29.72 and 41.21 %, respectively. The twig extract and vitamin C had the $IC_{50}$ values of 89.65±1.00 µg/ml and 59.38±0.00 µg/ml, respectively. Studies on the antioxidant activity against nitric oxide showed that all the plant extracts did not have such activity. In addition, the study found that this herbal plant contained alkaloids, tannins, coumarin, and phytosterol as potential components. Also, the study found that the tea form of this plant when brew in hot water in 70 °C for 10 minutes with DPPH method, had DPPH scavenging activity of 27.04±2.88 % at the maximum concentration of 2.5 % (v/v). Both the extract and tea from its twig powder did not show cytotoxicity against Vero cells at the final concentrations of 10 µg/ml and 2.5 % (v/v), respectively.


**Keywords:** *Toddalia asiatica*; biological activity; phytochemical

## 1. บทนำ

เล็บรอกเป็นไม้เถาขนาดใหญ่ (รูปที่ 1) กิ่งก้านเล็กเรียว เถาแก่มีปุ่มของนมหนามติดอยู่ทั่วไป ผิวสีน้ำตาลมีกระสีขาวเนื้อสีเหลือง เถาอ่อนมีหนามแหลมงุ้ม ใบประกอบแบบนิ้วมือ 3 ใบ ใบย่อยรูปไข่ปลายสอบ มีจุดน้ำมันกระจายทั่วใบ ยาว 5-10 เซนติเมตร มีกลิ่นคล้ายการบูรและตะไคร้ ดอกสีเหลืองแกมเขียวเป็นช่อที่ปลายกิ่งและง่ามใบ ผลกลมฉ่ำน้ำ เมื่อสุกสีส้มมีกลิ่นคล้ายพริกไทย ใช้แต่งกลิ่นอาหาร เกิดตามป่าในเขตร้อนทั่วไป ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด [1-2] สรรพคุณทางสมุนไพรใช้ใบสดมีรสสุขุมหอม แก้ปวดท้อง ใช้เป็นอาหารยา ตำพอกหรือทาแก้โรคผิวหนัง เปลือกรากมี

รสสุขุมหอม ขับเหงื่อ บำรุงธาตุ แก้ไข้ แก้ท้องเสีย รักษามาลาเรียชนิดจับเว้นระยะ เถามีรสสุขุม ต้มดื่ม แก้ปวดเมื่อยเส้นเอ็น ขับปัสสาวะ แก้พิษโลหิต แก้พิษในข้อ ในกระดูก ในเส้นเอ็น แก้ไอ แก้พิษตานซาง ตานขโมย ขับพยาธิไส้เดือน แก้กามโรค แก้ปอดพิการ และรากมีรสสุขุมหอม ชงน้ำดื่มขับลม บำรุงกำลัง แก้เถาดานในท้อง แก้ปวดเสียดแทง แก้ริดสีดวงลำไส้ ตำพอกฝี [3] จากภูมิปัญญาชาวบ้าน ในจังหวัดชุมพรมีความเชื่อว่าเมื่อนำเล็บรอกต้มน้ำดื่มช่วยลดไขมันในเส้นเลือดได้เพราะรสชาติของเล็บรอกมีรสเผ็ดร้อน [4] เล็บรอกเป็นสมุนไพรที่มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆที่สนใจดังนี้ใบเล็บรอกมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลอง [5] มีองค์ประกอบสารกลุ่มคูมาริน [6] แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน [7] รากแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี nitric oxide ในสัตว์ทดลองที่ดีกว่าวิตามินซี [8] ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและพฤกษเคมีจากเล็บรอกด้วยวิธี DPPH และ nitric oxide รวมถึงศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากชาเล็บรอกที่ผลิตขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันส่วนต่าง ๆ ของเล็บรอก ด้วยวิธี DPPH และ nitric oxide เพื่อศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้นและความเป็นพิษต่อเซลล์ของส่วนที่ดีที่สุดของเล็บรอกในการต้านออกซิเดชัน และเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและความเป็นพิษต่อเซลล์ของชาเล็บรอก

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

การวิจัยครั้งนี้แบ่งเป็น 3 ตอน ดังนี้

**2.1 ตอนที่ 1 : สกัดสารและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด**

2.1.1 เก็บส่วนใบ กิ่ง และรากเล็บรอกที่ตำบลท่าแซะ อำเภอท่าแซะ จังหวัดชุมพร เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2557 และพิสูจน์เอกลักษณ์โดย นักพฤกษศาสตร์ อาจารย์ ดร.บุญสนอง ช่วยแก้ว สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

**รูปที่ 1** เล็บรอก [*Toddalia asiatica* (L.) Lam.]

2.1.2 อบพืชให้แห้งและบดเป็นชิ้นเล็กแล้วสกัดด้วยเอทานอล ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศออกจนได้สารสกัดพืชเก็บไว้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

2.1.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัดทุกส่วนด้วยวิธี DPPH [9] และ nitric oxide [10] เตรียมสารละลาย 0.02 mM 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazine (DPPH) 0.2 $cm^3$ และสารสกัดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5000 μg/ml ในเมทานอล 0.1 และ 3.7 $cm^3$ ลงในหลอดทดลอง (ทดลอง 3 ซ้ำ) บ่มในที่มืด 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

(วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน) คำนวณค่าร้อยละการต้านออกซิเดชันจากสูตร DPPH scavenging (%) = $[(A_0 - A_1) \div A_0] \times 100$ เมื่อเมื่อ $A_0$ = ค่าการดูดกลืนของสารควบคุม และ $A_1$ = ค่าการดูดกลืนของสารตัวอย่าง

หากสารสกัดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากกว่าร้อยละ 50 ทดสอบหาค่า $IC_{50}$ โดยการเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (125.00, 12.50, 1.25, 0.12, 0.01, 0.001 µg/ml) คำนวณค่า $IC_{50}$ จากการเทียบค่าในกราฟ ระหว่างความเข้มข้นและค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้สูตรเดียวกัน ทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) และนำมาผลที่ได้มาวิเคราะห์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (±S.D.)

2.1.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัดโดยการทดสอบด้วยไนตริกออกไซด์ (nitric oxide assay) มีขั้นตอนดังนี้ [10] เตรียมสารสกัดที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 µg/ml ในเอทานอล เติมสารละลาย sodium nitroprusside (5 mM) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7.4 ในหลอดทดลองที่มีสารสกัด 1.0 $cm^3$ บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที เติม Griess reagent 1.5 $cm^3$ (1 % sulphanilamide และ 0.1 % naphthylethylenediamine dichloride ใน 3 % กรดฟอสฟอริก ผสมในอัตราส่วน 1:1) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร (วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน) คำนวณค่าร้อยละการต้านออกซิเดชัน โดยใช้สูตรเดียวกับวิธี DPPH

2.1.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิง [cytotoxicity against primate cell line (Vero)] [11] เป็นวิธีทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ติดฉลากโปรตีนเรืองแสงสีเขียวชนิด pEGFP-N1 (Clonetech) โดยมีวิธีการสรุปดังนี้

(1) เตรียมสารสกัด ความเข้มข้น 50 µg/ml ปริมาตร 5 µl ลงในถาดหลุมชนิด 384 หลุม

(2) เติมสารละลายที่มีเซลล์ไตลิง จำนวน $3.3 \times 10^4$ cells/ml ปริมาตร 45 µl

(3) บ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะ 5 % $CO_2$

(4) วัดการเรืองแสงที่สภาวะกระตุ้นและการปล่อยพลังงานที่ความยาวคลื่น 485 และ 535 nm ตามลำดับ ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices, USA) โดยสารอีลิปติซีน (ellipticine) เป็นสารมาตรฐาน และ 5 % DMSO เป็นสารละลายควบคุม คำนวณหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยสูตร % Cytotoxicity = $[1 - (FU_T \div FU_C)] \times 100$ เมื่อ $FU_T$ = การเรืองแสงของเซลล์ที่มีสารสกัดหรือสารมาตรฐาน; $FU_C$ = การเรืองแสงของเซลล์ที่ไม่มีสารสกัดหรือสารมาตรฐาน

**2.2 ตอนที่ 2 : การทดสอบหาสารสำคัญเบื้องต้นในส่วนของพืชที่น่าสนใจ**

การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นรวมทั้งหมด 9 กลุ่มสาร [12,13] ดังนี้

2.2.1 การทดสอบแอลคาลอยด์ นำสารสกัดมาเล็กน้อย 2 M HCl 2 $cm^3$ ต้ม 2 นาที นำส่วนใส 1 $cm^3$ แล้วเติมรีเอเจนต์ Dragendorff's 2 หยด สังเกตสี

2.2.2 การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ นำสารสกัดมาเล็กน้อยเติม 10 % lead acetate ในน้ำ ต้มให้เดือดเบา ๆ 15 นาที ทำให้เย็น แล้วกรอง สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และนำสารละลายไปประเหยจนเกือบแห้งทำให้เย็น แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด เพื่อนำไปทดสอบหาองค์ประกอบของคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ดังนี้ ทดสอบส่วนที่เป็น steroid (Liebermann-Burchard reaction) นำสารละลายไดคลอโรมีเทนหลอดที่ 1 มาระเหยจนเกือบแห้ง หยด gracial acetic acid ลงไป 3 หยด เขย่าแล้วค่อย ๆ หยด conc.$H_2SO_4$

ลงไปตามข้าง ๆ หลอด 1 หยด สังเกตการณ์เปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง ทดสอบส่วนที่เป็น lactone butenolide (Kedde's reaction) ระเหยสารละลายไดครอโรมีเทนในหลอดที่ 2 หยด Kedde's reagent ลงไป 1 $cm^3$ และสารละลาย 1 M NaOH 2-3 หยด สังเกตสี ทดสอบส่วนที่เป็น deoxy sugar (Keller-Kiliane) เติม $FeCl_3$ reagent 3 $cm^3$ ลงในสารละลายคลอโรฟอร์มในหลอดที่ 3 เขย่าให้เข้ากัน เอียงหลอดทดลองแล้วค่อย ๆ ริน conc.$H_2SO_4$ 1 $cm^3$ ไปตามข้าง ๆ หลอดสังเกตสีระหว่างรอยต่อและสารละลายชั้นบน

2.2.3 การทดสอบฟลาโวนอยด์ นำสารสกัดมาเล็กน้อยสกัดไขมันออกด้วย hexane แล้วละลายใน 80 % เอทานอล 10 $cm^3$ แบ่งใส่หลอดทดลอง 2 หลอด ดังนี้ ทดสอบ Cyanidin นำสารละลายหลอดที่ 1 เติม conc.HCl 0.5 $cm^3$ และลวดแมกนีเซียม 1 แผ่น สังเกตการณ์เปลี่ยนสี ทดสอบ Leucoanthocyanin นำหลอดที่ 2 มาเติม conc.HCl 0.5 $cm^3$ อุ่นบน water bath 5 นาที สังเกตสี

2.2.4 การทดสอบซาโปนินเป็นการทดสอบฟอง นำสารสกัดเล็กน้อยใส่ในหลอดทดลองเติมน้ำกลั่น 5 $cm^3$ แล้วต้มบน water bath 5 นาที กรองขณะร้อน ปล่อยให้เย็น เขย่าสารละลายที่ใส่อย่างแรง 1 นาที สังเกตผลนาน 30 นาที เติม dil.$H_2SO_4$ 1 $cm^3$ ลงในสารละลาย ต้มนาน 5 นาที ปล่อยให้เย็น เขย่าแรง ๆ 1 นาที บันทึกผล

2.2.5 การทดสอบแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ นำสารสกัดมาเล็กน้อยใส่ในหลอดทดลอง เติม 10 % HCl 5 $cm^3$ แล้วต้ม นำสารละลายที่ได้สกัดด้วย $CH_2Cl_2$ นำชั้นน้ำที่ได้เติม 10 % $NH_3$ สังเกตสีที่เกิดขึ้น

2.2.6 การทดสอบแทนนิน เติมสารสกัดเล็กน้อยในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 5 $cm^3$แล้วต้มบน water bath 5 นาที กรองขณะร้อนนำสารละลายที่กรองได้ทำให้เจือจางโดยเติมน้ำกลั่นแล้วหยด $FeCl_3$ 3-4 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น

2.2.7 การทดสอบคูมาริน นำสารสกัดมาเล็กน้อยละลายในเอทานอลแล้วหยดลงบนกระดาษกรองที่ชื้นด้วยสารละลาย 1 M NaOH นำกระดาษให้ความร้อน แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอุตราไวโอเลต และสังเกตการณ์เรืองแสงที่เกิดขึ้นเมื่อฉายแสงอัตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 356 นาโนเมตร

2.2.8 ทดสอบสเตอรอยด์ในพืช (Liebermann-Burchard test) นำสารสกัดมาเล็กน้อยเติม dil.$H_2SO_4$ 10 $cm^3$เขย่าให้เข้ากัน ต้ม 15 นาที แล้วสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ระเหยไดคลอโรมีเทนออกเกือบแห้งหยด glacial acetic acid 3 หยด เขย่าให้เข้ากันดี แล้วค่อย ๆ หยด conc.$H_2SO_4$ 1-2 หยด ให้ไหลไปตามผนังชามกระเบื้องช้า ๆ สังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงไป

**2.3 ตอนที่ 3 : การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของชาเล็บรอก**

2.3.1 ชั่งผงกิ่งเล็บรอก 2.00 กรัม บรรจุในถุงชา ชงในน้ำร้อน ปริมาตร 250 $cm^3$ ที่อุณหภูมิ 60-100 °C และระยะเวลาการแช่ถุงชาในน้ำร้อน 1-10 นาที รอให้น้ำชาเย็นแล้วนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH เหมือนการทดสอบสารสกัดเปลี่ยนจากสารสกัดจากพืชเป็นน้ำชา ปริมาตร 0.1 $cm^3$ และคำนวณค่าร้อยละการต้านออกซิเดชันที่ความเข้มข้นน้ำชา 2.5 % (v/v) เปรียบเทียบความแตกต่างผลการทดสอบด้วยค่าที

2.3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิงทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบสารสกัดเปลี่ยนจากสารสกัดเป็นน้ำชาที่ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 % (v/v)

## 3. ผลการทดลองและวิจารณ์

เล็บรอกส่วนใบ กิ่ง และราก เมื่อนำมาสกัดด้วย

ตัวเอทานอล ได้สารสกัดพืชร้อยละ 5.10, 0.32 และ 3.32 ต่อน้ำหนักพืชแห้ง การทดสอบการต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ส่วน พบว่าที่ความเข้มข้น 125 μg/ml สารสกัดจากกิ่งมีร้อยละการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันสูงที่สุด รองลงมา คือ รากและใบด้วยค่าร้อยละ 64.86 41.21 และ 29.72 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และสารสกัดกิ่งมีค่า $IC_{50}$±S.D. เท่ากับ 89.65±1.00 μg/ml โดยวิตามินซีมีค่า $IC_{50}$± S.D. เท่ากับ 59.38±0.00 μg/ml และสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 125 μg/ml ไม่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี nitric oxide (ตารางที่ 1) ไม่สอดคล้องกับการวิจัยของ Madhavan และคณะ [8] ที่พบว่าสารสกัดชั้นแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีกว่าวิตามินซีประมาณ 3 เท่า ด้วยวิธี nitric oxide assay อาจเนื่องจากเล็บรอกที่คณะผู้วิจัยเก็บนั้นเป็นผักที่ปลูกเพื่อรับประทานมีการรดน้ำใส่ปุ๋ยเป็นเร่งการเกิดยอดอ่อนมากเกินไป อาจทำให้พืชผลิตสารเมทาโบไลท์ทุติยภูมิยังไม่สมบูรณ์ จึงแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยกว่าการเจริญเติบโตในธรรมชาติ และนอกจากนี้สารสกัดเอทานอลของกิ่งเล็บรอกไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิงที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 μg/ml (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 1** Antioxidant activity of *T. asiatica* extracts and vitamin C

| Part of plant | DPPH | | Nitric oxide | |
|---|---|---|---|---|
| | Inhibition* (%) | $IC_{50}$±S.D. (μg/ml) | Inhibition (%) | $IC_{50}$±S.D. (μg/ml) |
| Leaf | 29.72 | >125 | 0.00 | - |
| Branch | 64.86 | 89.65±1.00 | 0.00 | - |
| Root | 41.21 | >125 | 0.00 | - |
| Vitamin C | | 59.38±0.00 | | 142.85±8.02 |

* mean the obtained at a final concentration of 125 μg/ml; - mean was not test

**ตารางที่ 2** Cytotoxicity of *T. asiatica* branch extracts, *T. asiatica* tea, and ellipticine

| Sample | Cytotoxicity | |
|---|---|---|
| | Inhibition (%) | $IC_{50}$ (μg/ml) |
| Branch* | 0.00 | |
| Tea** | 0.00 | |
| Ellipticine | | 0.753 |

* and ** mean obtained at final concentrations of 50 μg/ml and 2.5 % (v/v), respectively.

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดกิ่งเล็บรอกพบว่ากลุ่มสาร 5 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ แทนนิน คูมาริน และสเตอรอยด์ (ตารางที่ 3) ส่วนการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของชากิ่งเล็บรอกด้วยวิธี DPPH ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 % (v/v) ของชาชง ณ อุณหภูมิ 60-100 °C ในช่วงระยะเวลา 1-10 นาที (ตารางที่ 4) พบว่าชาที่ชงที่อุณหภูมิ 70 °C เวลา 10 นาที มีร้อยละการยับยั้งออกซิเดชันดีที่สุด ร้อยละ 27.04±2.88 สอดคล้องกับเป็นการศึกษาชาต้านออกซิเดชันจากสมุนไพรหลายชนิดของ Chan และคณะ [14] อาจเนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในการชงชาไม่สูงที่จนทำลายสารออกฤทธิ์ที่ 60°C จึงแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดที่ระยะเวลา 1-4 นาที แต่เมื่อระยะเวลามากขึ้น 5 และ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 70 °C ชาที่ชงแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดเนื่องจากระยะเวลาสกัดเพิ่มขึ้นสามารถสกัดสารได้มากขึ้นที่อุณหภูมิสูงขึ้น

แต่ยังเหลือปริมาณสารออกฤทธิ์มากกว่าสารที่เสียสภาพไป ซึ่งแตกต่างจากชาที่ชงที่อุณหภูมิสูง 80-100 °C สารเมตาโบไลต์ชนิดทุติยภูมิถูกทำลายเมื่อระยะเวลาชง 1-5 นาทีแรก แต่เมื่อใช้เวลามากขึ้นเป็น 10 นาที สารออกฤทธิ์ถูกสกัดออกมากมากขึ้นอาจมากกว่าสารที่เสียสภาพไปที่ 100°C แสดงฤทธิ์ออกซิเดชันมากกว่าเนื่องจากใช้เวลาในการชงและระหว่างรอให้เย็นนานกว่าที่ 80-90 °C จึงแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีกว่านั่นเอง และชาเล็บรอกที่ชงที่อุณหภูมิ 70 °C ในระยะเวลา 10 นาที ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10 % (v/v) ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิง (ตารางที่ 2) จากผลการทดลองเป็นการยืนยันฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่ดีของเล็บรอกเนื่องจากชาเล็บรอกที่ผลิตขึ้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร ซึ่งมีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำมากแต่ยังสามารถแสดงฤทธิ์การต้านออกซิเดชันได้ การวิจัยนี้เป็นตัวอย่างการนำสมุนไพรในท้องถิ่นที่มีประโยชน์แต่หารับประทานยากมาประยุกต์ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถรับประทานได้สะดวกจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจต่อผู้บริโภคได้

**ตารางที่ 3** Phytochemical analysis of branch extract of *T. asiatica*

| Constituents | Methods | Results |
|---|---|---|
| Alkaloid | Mayer | - |
| | Wagner | - |
| | Dragendroff | + |
| Cardiac glycoside | Libermannburchard | + |
| | Kedde's reagent | - |
| | Keller-Killani test | - |
| Flavonoid | Cyaniding test | - |
| | Leucoanthocyanin test | - |
| Saponin | Foam test | - |
| Antraquinone glycoside | Borntraeger reaction | - |
| Tannins | Ferric chloride test | + |
| Coumarin | Alkaline test | + |
| Steroid | Libermannburchard | + |

+ mean positive result; - mean negative result

**ตารางที่ 4** Antioxidant activity of *T. asiatica* tea at a final concentration of 2.5 % (v/v)

| Time (minute) | Inhibition (%±S.D.) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 60 °C | 70 °C | 80 °C | 90 °C | 100 °C |
| 1 | 1.62(0.96) [a] | 0.00 [a] | 0.00 [a] | 0.00 [a] | 0.00 [a] |
| 2 | 3.14(0.62) [a] | 0.00 [a] | 0.00 [a] | 0.00 [a] | 0.00 [a] |
| 3 | 5.66(0.75) [b] | 2.51(1.66) [b] | 0.00 [a] | 0.00 [a] | 0.00 [a] |
| 4 | 8.17(1.01) [bc] | 5.66(1.30) [b] | 0.00 [a] | 0.00 [a] | 0.00 [a] |
| 5 | 9.43 (0.96) [c] | 13.20(1.31) [c] | 0.00 [a] | 0.00 [a] | 0.00 [a] |
| 10 | 18.23(1.18) [d] | 27.04(2.88) [d] | 5.66(2.97) [b] | .40(3.10) [b] | 10.06(0.63) [b] |

Differences between groups were tested using T-test. Values with different alphabets within each test were significantly different (P<0.05).

## 4. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตน์ราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี พ.ศ. 2558 ขอขอบคุณ หน่วยวิจัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ ที่เอื้อเฟื้อการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

## 5. รายการอ้างอิง

[1] สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช, 2556, พืชสมุนไพรในสวนพฤกษศาสตร์และสวนรุกขชาติในประเทศไทย, บริษัทเอสทีเพลทจำกัด, กรุงเทพฯ, 60 น.

[2] เต็ม สมิตินันทน์, 2557, ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย, ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม, โรงพิมพ์สำนักงานพุทธศาสนา, กรุงเทพฯ, 560 น.

[3] Kariuki, H.N., Kanui, T.I., Yenesew, A., Patel, N.B. and Mbugua, P.M., 2012, Antinociceptive activity of *Toddalia asiatica* (L) Lam. in models of central and peripheral pain, Phytopharmacology 3: 122-129.

[4] กนกวรรณ ขอุลซ้วน, การสัมภาษณ์, 15 ธันวาคม 2556.

[5] Irudayaraj, S.S., Sunil, C., Duraipandiyan, V. and Ignacimuthu, S., 2012, Antidiabetic and antioxidant activities of *Toddalia sciatica* (L.) Lam. leaves in streptozotocin induced diabetic rats, J. Ethnopharmacol. 143: 515-523.

[6] Raj, K.M., Balachandran, C., Duraipandiyan, V., Agastian, P. and Ignacimuthu, S., 2012, Antimicrobial activity of ulopterol isolated from *Toddalia ssiatica* ( L.) Lam.: A traditional medicinal plant, J. Ethnopharmacol. 140: 161-165.

[7] Sithisarn, P. and Jarikasem, S., 2010, Antioxidant activity and phenolic content of *Acanthopanax trifoliatus* and *Toddalia asiatica*, Kasetsart J. (Nat. Sci.) 44: 234-242.

[8] Madhavan, V., Shah, P., Murali, A. and Yoganarasimhan, S.N., 2010, *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity studies on the root of *Toddalia asiatica* (L) Lam. (Rutaceae), Asian J. Tradit. Med. 5: 188-198.

[9] Gaikwad, S.A., Kamble, G.S., Devare, S., Deshpande, N.R. and Salvekar, J.P., 2011, *In vitro* evaluation of free radical scavenging potential of *Cassia auriculata* L., J. Chem. Pharm. Res. 3: 766-772.

[10] Banerjee, S., Chanda, A., Ghoshal, A., Debnath, R., Chakraboty, S., Saha, R. and Das, A., 2011, Nitric oxide scavenging activity study of ethanolic extracts of *Ixora coccinea* from two different areas of Kolkata, Asian J. Exp. Biol. Sci. 2: 595-599.

[11] Hunt, L., Jordan, M., de Jesus, M. and Wurm, F.M., 1999, GFP-expressing mammalian cells for fast, sensitive, noninvasive cell growth assessment in a kinetic mode, Biotech. Bioeng. 65: 201-205.

[12] Nisar, M., Ali, S. and Qaisar, M., 2011, Preliminary phytochemical screening of flowers, leaves, bark stem and roots of *Rhododendron arboretum*, Middle East J.

Sci. Res.10: 472-476.

[13] Harborne, J.B., 1984, Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, 2nd Ed., Chapman and Hall, London.

[14] Chan, E.W.C., Eng, S.Y., Tan, Y.P., Wong, Z.C., Lye, P.Y. and Tan, L.N., 2012, Antioxidant and sensory properties of Thai herbal teas with emphasis on *Thunbergia laurifolia* Lindl, Chiang Mai J. Sci. 39: 599-609.