ว.วิทย. มข. 44(1) 142-152 (2559) KKU Sci. J. 44(1) 142-152 (2016)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากดอกถั่วแระและดอกส้มป่อย

Total phenolic and total flavonoid contents, free radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory potential from the methanolic extracts of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. and *Acacia concinna* (Willd.) DC. Flowers.

สุธิรา มณีฉาย[1*] และ ประสบอร รินทอง[2]

[1] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

[2] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

*Corresponding Author, E-mail: maneechaikik@gmail.com

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากดอกถั่วแระ (*Cajanus cajan*, Fabaceae) และดอกส้มป่อย (*Acacia concinna*, Fabaceae) สารสกัดหยาบที่ใช้ในการศึกษาเตรียมด้วยวิธีการสกัดแบบไหลย้อนกลับโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเมทานอลจากดอกถั่วแระและดอกส้มป่อยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 113.54 ± 2.75 และ 60.96 ± 3.64 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ ปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 0.22 ± 0.03 และ 0.98 ± 0.01 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งสองชนิดด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดดอกถั่วแระและดอกส้มป่อยที่ได้จากวิธีทดสอบ DPPH เท่ากับ 0.66 ± 0.03 และ 0.94 ± 0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนวิธีทดสอบ ABTS ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.60 ± 0.02 และ 0.84 ± 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกถั่วแระและดอกส้มป่อยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.21 ± 0.16 และ 1.91 ± 0.09 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ABSTRACT

The present research was aimed to determine total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant activity, tyrosinase inhibitory capacity of *Cajanus cajan* (Fabaceae) and *Acacia concinna* (Fabaceae) flowers. The methanolic crude extracts of *C. cajan* (CC) and *A. concinna* (AC) were prepared by reflux method. The results showed that total phenolic contents of CC and AC were 113.54±2.75 and 60.96±3.64 mg of gallic acid equivalent /g extract, respectively. The flavonoid contents were 0.22±0.03 and 0.98±0.01 mg of quercetin equivalent /g extract, respectively. Both extracts were also investigated their antioxidant activities using DPPH and ABTS assays. Based on DPPH method, IC_{50} of CC and AC were 0.66±0.03 and 0.94±0.02 mg/mL. For ABTS assay, IC_{50} of CC and AC were 0.60±0.02 and 0.84±0.01 mg/mL, respectively. The tyrosinase inhibitory activities of CC and AC were also determined. Their IC_{50} values were 2.21±0.16 and 1.91±0.09 mg/mL, respectively.

คำสำคัญ: ถั่วแระ ส้มป่อย ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Keywords: *Cajanus cajan*, *Acacia concinna*, Total flavonoid contents, Free radical scavenging activity, Tyrosinase inhibitory potential

บทนำ

ถั่วแระ (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) วงศ์ Fabaceae เป็นไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ช่อดอกออกที่ซอกใบ รูปดอกถั่ว กลีบดอกสีเหลืองมีขอบสีน้ำตาลแดง ตำรายาไทยใช้รากและเมล็ดสำหรับขับปัสสาวะ แก้ไข้ ถอนพิษ ต้นและใบขับลมลงเบื้องต่ำ รักษาโรคเส้นเอ็นพิการ การทดลองในสัตว์พบว่าสารสกัดจากเมล็ดถั่วแระมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด (วงศ์สถิตและคณะ, 2543)

ส้มป่อย (*Acacia concinna* (Willd.) DC.) วงศ์ Fabaceae เป็นไม้พุ่มรอเลื้อย เถามีเนื้อไม้ ช่อดอกแบบช่อกระจุกกลม กลีบเลี้ยงสีแดง กลีบดอกสีขาวนวล ส่วนใบใช้เป็นยาประคบเพื่อแก้ปวดเมื่อย รากใช้แก้ไข้ ฝัก ขับเสมหะ แก้ไข้จับสั่น ดอก แก้เส้นเอ็นที่พิการให้สมบูรณ์ (ก่องกานดาและลีนา, 2545)

ดอกของพืชในวงศ์ Fabaceae มีรายงานการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอาหาร สีย้อมและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Molares and Ladio, 2012; Suebkhampet and Sotthibandhu, 2012; Malinowska, 2013) ซึ่งสารสกัดจากดอกของพืชวงศ์ Fabaceae ยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วย (Mihaylova and Schaloe, 2013; Lai et al., 2014) และมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มดอกไม้ที่มีดอกสีแดงและดอกสีขาว พบว่าดอกสีแดงมีสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าดอกสีขาว (อรสุรินทร์และคณะ, 2553)

ถั่วแระและส้มป่อยมีสีกลีบดอกที่แตกต่างกัน โดยถั่วแระมีกลีบดอกสีเหลืองขอบน้ำตาลแดงส่วนส้มป่อยมีกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม กลีบดอกสีขาวนวล สีสัน

ต่างๆ ของกลีบดอกเกิดจากการสร้างสารแอนโทไซยานินที่มีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ สามารถพบได้ในแวคิวโอลและเซลล์เนื้อเยื่อชั้นนอกของดอก สารแอนโทไซยานินเป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) (กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553; Lee et al., 2005) มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้น หรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ (เจนจิราและประสงค์, 2554) ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุและทำให้เกิดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน และยังมีบทบาทสำคัญในการเกิดริ้วรอยก่อนวัยด้วย (Ames et al., 1993)

นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ด้วยเช่นกัน โดยไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ซึ่งพบในสิ่งมีชีวิตทั่วไป ทำงานเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของเห็ด ผัก ผลไม้ การลอกคราบในแมลง การเกิดสีผิว ผม ตาของสัตว์ เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน (Kim and Uyama, 2005) สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจะลดกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ช่วยป้องกันการสะสมของเมลานิน นำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางเพื่อทำให้ผิวขาว ปัจจุบันเครื่องสำอางที่มาจากสมุนไพรได้รับความนิยม จึงมีการศึกษาและคัดเลือกสมุนไพรที่มีความสามารถในการนำมาพัฒนาเป็นครีมบำรุงผิวขาวและมีสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันริ้วรอยก่อนวัยด้วย เช่นเจลล้างหน้าและแผ่นแปะจากสารสกัดมะขามป้อม (อุบลทิพย์, 2552)

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าสารสกัดสมุนไพรหลายชนิดมีสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วย เช่น สารสกัดเอทิลอะซีเตตจากผลมะขามป้อม (จันทิมา และคณะ, 2554) สารสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง (กล่าวขวัญ และคณะ, 2553) เป็นต้น

ปัจจุบันผู้คนให้ความสำคัญกับพืชสมุนไพรและพืชพื้นบ้านไทยมากขึ้น ถั่วแระและส้มป่อยเป็นอีกพืชพื้นเมืองที่มีรายงานการใช้ประโยชน์ทางยาและผลการวิจัยฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Todkar et al., 2010; Zu et al., 2010; Nahar et al., 2014, Rani et al., 2014) แต่ไม่พบรายงานการศึกษาส่วนดอกของพืชทั้งสองชนิด ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจสารสกัดจากดอกของพืชทั้งสองเพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อเป็นฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการเพิ่มคุณค่าของพืชพื้นบ้านไทยให้มีมูลค่ามากขึ้น สามารถนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี

ascorbic acid (Sigma-Aldrich), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) (Sigma-Aldrich), potassium acetate(Sigma-Aldrich), dipotassium peroxo-disulphate ($K_2S_2O_8$) (Sigma-Aldrich), Folin-Ciocalteu phenol reagent (Sigma-Aldrich), quercertin (Sigma-Aldrich), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich), glacial

acetic acid (Merck), sodium carbonate (Na_2CO_3) (Sigma-Aldrich), gallic acid (Sigma-Aldrich), kojic acid (Sigma-Aldrich), L-DOPA (Sigma-Aldrich), mushroom tyrosinase enzyme (Sigma-Aldrich), phosphate buffer, ethanol AR grade (Merck) และ methanol AR grade (Merck)

2. ตัวอย่างพืชและวิธีเตรียมสารสกัด

เก็บตัวอย่างดอกถั่วแระและดอกส้มป่อยจากเขตพื้นที่ตำบลศิลา อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ตรวจเอกลักษณ์ด้วยรูปวิธานระดับสกุลและชนิดพร้อมทั้งเปรียบเทียบตัวอย่างพรรณไม้จากพิพิธภัณฑ์พืช กรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร (Bangkok Herbarium: BK) และเก็บตัวอย่างพรรณไม้แห้งไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนตัวอย่างพืชแห้งสนิท บดเป็นผงละเอียด ชั่งผงตัวอย่าง 10 กรัม เติมเมทานอล 99.8% ปริมาตร 300 มิลลิลิตร และเตรียมสารสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบไหลย้อนกลับ (reflux) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำของเหลวที่ได้ไประเหยแห้งด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ freeze dryer จนได้สารสกัดหยาบเก็บรักษาสารสกัดในภาชนะปิดทึบแสงที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric (ดัดแปลงวิธีจาก Amin et al., 2006) ใช้กรดแกลลิคเป็นสารมาตรฐาน (ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 12.5-100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ละลายสารสกัดด้วยเมทานอล นำสารสกัดแต่ละชนิดมา 0.5 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของสารสกัด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกในสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิคในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด (mg of gallic acid equivalent / g extract)

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์โดยวิธี aluminum chloride colorimetry (ดัดแปลงวิธีจาก Prommuak et al., 2008) โดยใช้เคอร์ซิตินเป็นสารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 12.5-100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ละลายสารสกัดด้วยเมทานอล นำสารสกัดแต่ละชนิดมา 0.5 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของสารสกัด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วเติมเอทานอล 95 % ลงไป 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 10 % aluminium chloride 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปเติม 1 M potassium acetate 0.1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5มิลลิลิตรตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด (mg of quercetin equivalent / g extract)

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ดัดแปลงวิธีจาก Likhitwitayawuid et al., 2006) ซึ่งมีวิธีการทดสอบดังนี้เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบโดยนำสารสกัดดอกถั่วแระและสารสกัดดอกส้มป่อยมาเตรียมให้อยู่ในรูปสารละลายโดยใช้เม

ทานอลเป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH 100 μM ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ใส่ลงไมโครเพลท บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader (SPECTRO star Nano, BMG LabTech) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ได้ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง (As) และใช้เมทานอลเป็น blank (Ac) และมีวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน คำนวณหาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจากสูตร

$$\% \text{ radical scavenging} = [(Ac - As)/Ac] \times 100$$

สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับ % radical scavenging แล้วหาค่า IC_{50}

5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (ดัดแปลงวิธีจาก Payet et al., 2005) ซึ่งมีวิธีการทดสอบดังนี้ เตรียมสารละลาย ABTS โดยนำสารละลาย 7 mM ABTS ผสมกับสารละลาย 2.45 mM $K_2S_2O_8$ ให้เข้ากันโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย นาน 12-16 ชั่วโมง เจือจางสารละลาย ABTS ด้วยเอทานอล และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7±0.02 นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบละลายด้วยเมทานอล ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร และสารละลาย ABTS ปริมาตร 280 ไมโครลิตร ใส่ลงไมโครเพลท ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader (SPECTRO star Nano, BMG LabTech) ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ได้ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง (As) และใช้เอทานอลเป็น blank (Ac) และมีวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน คำนวณหาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [(Ac - As)/Ac] \times 100$$

6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโร-ซิเนสจากเห็ด (ดัดแปลงวิธีจาก Alam et al., 2011) ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบละลายด้วย 50% DMSO ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 6.8) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และเอนไซม์ ไทโรซิเนส 31 Units/มิลลิลิตรที่ละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเพลท ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย 2.5 mM L-DOPA ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วย microplate reader (SPECTRO star Nano, BMG LabTech) ที่ช่วงความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร สารมาตรฐาน คือ กรดโคจิค คำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

$$\% \text{ Inhibition} = 100\ [(A-B)-(C-D)] / (A-B)$$

โดย A คือค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ที่ไม่มีสารสกัด, B คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม, C คือค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่มีเอนไซม์, D คือค่าการดูดกลืนแสงเฉพาะสารสกัดไม่มีเอนไซม์

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโว-นอยด์ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้งหมดทำการทดสอบซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ยและหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ผลการวิจัย

สารสกัดดอกถั่วแระมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองแกมน้ำตาล สารสกัดดอกส้มป่อยมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีแดงแกมน้ำตาลเข้ม

น้ำหนักสารสกัดเท่ากับ 1.051 และ 2.733 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

1. การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกคำนวนได้จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค (y=1.5605x+0.0139, R^2=0.9984) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากดอกถั่วแระและดอกส้มป่อยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 113.54±2.75 และ 60.96±3.64 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ สำหรับปริมาณสารฟลาโวนอยด์ คำนวนได้จากกราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน (y=3.1832x+0.5477, R^2=0.9971) พบว่าสารสกัดจากดอกถั่วแระและดอกส้มป่อยมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 0.22±0.03 และ 0.98±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดจากดอกถั่วแระและดอกส้มป่อยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.66±0.03, 0.94±0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยที่สารมาตรฐานวิตามินซีมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.07±0.003 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับวิธีทดสอบ ABTS พบว่าสารสกัดจากดอกถั่วแระและดอกส้มป่อยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.60±0.02, 0.84±0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารมาตรฐานวิตามินซีมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.04±0.019 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2

3. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด โดยรายงานเป็นค่า IC_{50} พบว่าสารสกัดดอกถั่วแระและดอกส้มป่อยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.21±0.16, 1.91±0.09 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารมาตรฐานกรดโคจิคมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.20±0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 น้ำหนักและร้อยละน้ำหนักสุทธิ (percentage of yield) ของสารสกัด

ชนิดสารสกัด	น้ำหนักสารสกัด(กรัม)	ร้อยละของน้ำหนักสุทธิ
สารสกัดดอกถั่วแระ	1.051	10.5
สารสกัดดอกส้มป่อย	2.733	27.3

ตารางที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

	สารสกัดดอกถั่วแระ	**สารสกัดดอกส้มป่อย**	**สารมาตรฐาน**
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด)	113.54 ± 2.75	60.96 ± 3.64	กรดแกลลิค
ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด)	0.22 ± 0.03	0.98 ± 0.01	เคอร์ซิติน
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	0.66 ± 0.03	0.94 ± 0.02	วิตามินซี 0.07 ± 0.003
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	0.60 ± 0.02	0.84 ± 0.01	วิตามินซี 0.04 ± 0.019
ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	2.21 ± 0.16	1.91 ± 0.09	กรดโคจิค 0.20 ± 0.002

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเมทานอลของดอกถั่วแระมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดเมทานอลจากดอกส้มป่อยประมาณ 2 เท่า ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดดอกถั่วแระมีฤทธิ์ที่ดีกว่าสารสกัดดอกส้มป่อยโดยพิจารณาจากค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่า

เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือวิตามินซี พบว่าสารสกัดจากดอกของพืชทั้งสองชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าวิตามินซีทั้งวิธีทดสอบ DPPH และ ABTS ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีในสารสกัดทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS

โดยพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ (ศรินรัตน์และคณะ, 2556) ได้ทำการทดสอบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม และจากรายงานการศึกษาสารสำคัญที่พบจากส่วนดอกของพืชสกุล *Acacia* sp. (Wu et al., 2008) ได้รายงานสารสำคัญที่พบในดอก *A. confusa* พบสาร europetin 3-rhamnoside, gallic acid และmyricetin 3-rhamnoside เป็นต้น ซึ่งได้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า myricetin 3-rhamnoside และ europetin 3-rhamnoside มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.0 และ 3.2 μM ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่า quercetin (ค่า IC_{50} เท่ากับ 4.5 μM) ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้ สารสกัดดอกส้มป่อยที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายอาจมีสารประกอบฟีนอลิกเช่น gallic acid หรือ myricetin 3-rhamnoside ที่พบในดอกของพืชสกุลส้มป่อยด้วยเช่นกัน ซึ่งมีผลทำให้สารสกัดจากดอกส้มป่อยมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีเช่นกัน

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่าสารสกัดจากดอกถั่วแระมีความสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวได้ใกล้เคียงกับสารสกัดจากดอกส้มป่อย เมื่อเปรียบเทียบกับกรดโคจิคแล้วพบว่ากรดโคจิคมีฤทธิ์ยับยั้งดีกว่าสารสกัด

เมทานอลของดอกถั่วแระและดอกส้มป่อย ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกและสาร ฟลาโวนอยด์ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดทั้งสองชนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของจันทิมาและคณะ (2554) ที่ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทิลอะซีเตตจากผลมะขามป้อม พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับสารต้านอนุมูลอิสระแต่ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากรายงานการศึกษาของ (El-toumy et al., 2011) ทำการศึกษาสารสำคัญของดอก *A. nilotica* พบสาร quercetin 3-O-β-gluco-pyranoside, naringenin, quercetin เป็นต้น พบว่าสอดคล้องกับรายงานการศึกษาสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดได้จากดอกของ *Heterotheca inuloides* โดยพบสารสำคัญกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น quercetin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.07 mM, luteolin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.19 mM, kaempferol มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.23 mM มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดโคจิค (IC_{50} เท่ากับ 0.014 mM) luteolin และ kaempferol ซึ่งคณะผู้วิจัยได้รายงานว่าสารฟลาโวนอยด์ที่มีกลุ่ม 3-OH และ 4-carbonyl (3-hydroxy-4-keto moiety) เช่นที่พบในโครงสร้างของเคอร์ซิติน มีโครงสร้างคล้ายกับสารมาตรฐานกรดโคจิค ทำให้มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี (Kubo et al., 2000)

จากผลการวิจัยพบว่าสารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารที่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อพิจารณาจากเคมีอนุกรมวิธานของพืชทั้งสองชนิดที่อยู่ในวงศ์ Fabaceae พบว่ามีสารสำคัญใกล้เคียงกันในกลุ่มฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ เช่นสาร gallic acid, quecertin, catechin and cyanidin (Wing, 2013) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาสารสำคัญของพืชทั้งสองชนิดนี้ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าสารสกัดดอกถั่วแระและดอกส้มป่อยที่มีสีกลีบดอกที่แตกต่างกัน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์แตกต่างกัน ทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกันด้วย งานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกของสารสกัดดอกของพืชทั้งสอง ควรจะมีการศึกษาฤทธิ์ชีวภาพอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลชีพ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีประโยชน์ต่อสุขภาพ สามารถป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะ

โรคหัวใจขาดเลือด และโรคมะเร็ง (Newmark, 1996) ซึ่งอาจสามารถนำไปใช้เป็นทางเลือกในบริโภคผักพื้นบ้านเพื่อการส่งเสริมสุขภาพและการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงบประมาณเงินแผ่นดินประจำปี 2556 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินงานวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2553). แอนโทไซยานิน. สำนักหอสมุด และศูนย์สารสนเทศ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาวรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข และเอกรัฐ ศรีสุข. (2553). ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 2 (ฉบับพิเศษ): 143-150.

ก่องกานดา ชยามฤต และลีนา ผู้พัฒนพงศ์. (2545). สมุนไพรไทย ตอนที่ 7. ประชาชาชนจำกัด: กรุงเทพมหานคร.

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์ (1): 59-70.

จันทิมา หอมกลบ, สุพนิดา วินิจฉัย, หทัยรัตน์ ริมคีรี, นครเหลืองประเสริฐ และวิชัย หฤทัยธนาสันติ์. (2554). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทิลอะซีเตดจากผลมะขามป้อมจากแหล่งในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48, 3-5 กุมภาพันธ์ 2554, กรุงเทพมหานคร.

วงศ์สถิต ฉั่วสกุล, พร้อมจิต ศรลัมพ์ และสมภพ ประธานธุรารักษ์. (2543). สยามไภษัชยพฤกษ์ สารานุกรมสมุนไพร เล่ม 2. ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพมหานคร.

ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์, วรางคณา สบายใจ และสิริมาส นิยมไทย. (2556). การทดสอบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 43(3): 723-730.

อรสุรินทร์ ฮวบบางยาง, มัณฑนา บัวหนอง, เฉลิมชัย วงษ์อารี, ชัยรัตน์ เตชวุฒิพร และวาริช ศรีละออง. (2553). การศึกษาคุณค่าทางอาหารและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในดอกไม้ที่รับประทานได้. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 41 ฉบับที่ 3/1 (พิเศษ): 381-384.

อุบลทิพย์ นิมมานนิตย์. (2552). การพัฒนาสารสกัดมะขามป้อมเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหาร และเครื่องสำอาง. การเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพรสู่ระดับอุตสาหกรรม ครั้งที่ 2, 19-20 มีนาคม 2552. สำนักงานคณะ กรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.). กรุงเทพฯ: 79-91.

Alam, N., Yoon, K.N. and Lee, T.S. (2011). Evaluation of the antioxidant and antityrosinase activities of three extracts from *Pleurotus nebrodensis* fruiting bodies. African Journal of Biotechnology 10(11): 2978-2986.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90(17): 7915-7922.

Amin, I., Norazaidah, Y. and Hainida, K. I. E. (2006). Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. Food Chemistry 94: 47-52.

El-toumy, S.A., Mohamed, S.M., Hassan, E.M. and Mossa, A.-T.H. (2011). Phenolic metabolites from *Acacia nilotica* flowers and evaluation of its free radical scavenging activity. Journal of American Science 7(3): 287-295.

Kubo, I., Kinst-Hori, I., Chaudhuri, S.K., Kubo, Y., SaÂnchezb, Y. and Ogurab, T. (2000). Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. Bioorganic & Medicinal Chemistry 8: 1749-1755.

Kim, Y.J. and Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. Cellular and Molecular Life Sciences 62: 1707–1723.

Lai, J-S., Lin, C-C. and Chiang, T-M. (2014). Tyrosinase inhibitory activity and thermostability of the flavonoid complex from *Sophora japonica* L (Fabaceae). Tropical Journal of Pharmaceutical Research 13(2): 243-247

Lee, J., Durst, R.W. and Wrolstad, R.E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. Journal of AOAC International 88: 1269-1278.

Likhitwitayawuid, K., Sornsute, A., Sritularak, B. and Ploypradith, P. (2006). Chemical transformations of oxyresveratrol (trans-2,4,3,5-tetrahydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and a strong cytotoxic agent. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 16: 5650-5653.

Malinowska, P. (2013). Effect of flavonoids content on antioxidant activity of commercial cosmetic plant extracts. Herbapolonica 59(3): 63-75.

Mihaylova, D. and SchalowII, S. (2013). Antioxidant and stabilization activity of a quercetin containing flavonoid extract obtained from Bulgarian *Sophora japonica* L. Brazilian Archives of Biology and Technology 56(3): 431-438.

Molares, S. and Ladio, A. (2012). The usefulness of edible and medicinal Fabaceae in Argentine and Chilean Patagonia: environmental availability and other sources of supply. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012: 1-12.

Nahar, L., Nasrin, F., Zahan,R., Haque, A., Haque, E. and Mosaddik, A. (2014). Comparative study of antidiabetic activity of *Cajanus cajan* and *Tamarindus indica* in alloxan-induced diabetic mice with a reference to *in vitro* antioxidant activity. Pharmacognosy Research 6: 180-187.

Newmark, H. L. (1996). Plant phenolics as potential cancer prevention agents dietary phytochemicals in cancer prevention and treatment. Advances in Experimental Medicine and Biology 401: 25-34.

Payet, B., Sing, A.S.C. and Smadja, J. (2005). Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 10074-10079.

Prommuak, C., D-Eknamkul, W. and Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extract. Separation and Purification Technology 62: 444-448.

Rani, S., Poswal, G., Yadav, R. and Deen, M.K. (2014). Screening of Pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) seeds for study of their flavonoids, total phenolic content and antioxidant properties. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 28(2): 90-94.

Suebkhampet, A and Sotthibandhu, P. (2012). Effect of using aqueous crude extract from butterfly pea flowers as a dye. Suranaree Journal of Science and Technology 19(1): 15-19.

Todkar, S.S., Chavan, V.V. and Kulkarni, A.S. (2010). Screening of secondary metabolites and antibacterial activity of *Acacia concinna*. Research Journal of Microbiology 5: 974-979.

Wink, M. (2013). Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). South African Journal of Botany 89: 164–175.

Wu, J-H., Huang, C-Y., Tung, Y-T., and Chang, S-T. (2008). Online RP-HPLC-DPPH screening method for detection of radical-scavenging phytochemicals from flowers of *Acacia*

confusa. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 328–332.

Zu, Y. G., Liu, X.L., Fu, Y.J., and Wink, M. (2010). Chemical composition of the SFE-CO_2 extracts from *Cajanus cajan* (L.) Huth and their antimicrobial activity *in vitro* and *in vivo*. Phytomedicine 17: 1095-1001.

❑❑❑❑❑