ว.วิทย. มข. 48(2) 200-207 (2563) KKU Sci. J. 48(2) 200-207 (2020)

การตรวจสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเพกา

Determination of antioxidant activity of *Oroxylum indicum* leaves extracts

สุจิตรา ยาหอม[1*] จิตรสุดา กุลวัฒน์[1] และ เบญจพร บุราณรัตน์[1]

[1]คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

Sujitra Yahom[1*] Jitsuda Kullawat[1] and Benjaphorn Buranrat[1]

Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Maha Sarakham, 44150 Thailand

[*]Corresponding Author, E-mail: sujitra.yahom@gmail.com

Received: 24 January 2019 | Revised: 20 December 2019 | Accepted: 26 December 2019

บทคัดย่อ

เพกา (*Oroxylum indicum*) เป็นพืชสมุนไพรที่รู้จักกันเป็นอย่างดีที่พบว่ามีสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ อัลคาลอยด์ แทนนินและเทอร์พีนอยด์ เป็นต้น การวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบเพกา โดยสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอลและเมทานอล นำสารสกัดทั้งหมดมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP ตรวจสอบหาปริมาณฟีนอลิกปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และ Aluminum chloride colorimetric ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบเพกามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดทั้งการทดสอบด้วยวิธี DPPH (IC_{50} 0.92±0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ FRAP (111.91±3.02 มิลลิกรัม Fe^{2+} ต่อกรัมของสารสกัด) และมีปริมาณฟีนอลิกรวม (121.90±1.70 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมของสารสกัด) และฟลาโวนอยด์รวม (298.73±14.46 มิลลิกรัม RE ต่อกรัมของสารสกัด) สูงสุดเช่นกัน จากผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารได้ดีที่สุด และสารสกัดเอทานอลออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดในทุกวิธีการทดสอบ ซึ่งสารสกัดเอทานอลจากใบเพกามีสารประกอบทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี จึงควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมยาต่อไป

ABSTRACT

Oroxylum indicum (L.) Kurz is popularly known to have various bioactive compounds such as flavonoids, glycosides, alkaloids, tannins and terpenoids etc. In this study, we investigated the antioxidant activity of 4 crude extracts of *O. indicum* leaves, obtained using the solvents hexane, ethyl acetate, ethanol and methanol. Antioxidant activities of the extracts were investigated by DPPH and FRAP assays. Total phenolic and flavonoid content were determined by Folin - Ciocalteu and Aluminum chloride colorimetric assays, respectively. The results indicated that the ethanolic extract of *O. indicum* leaves had the highest antioxidant activities in both DPPH (IC_{50} 0.92±0.2 mg/ml) and FRAP assays (111.91±3.02 Fe^{2+} mg/g extract), and had the highest total phenolic (121.90±1.70 GAE mg/g extract) and flavonoid content (298.73±14.46 RE mg/g extract). In conclusion, ethanol extract was found to be a good solvent for extraction and having good antioxidant activity in all assays.

O. indicum leaves ethanolic extract contains bioactive compounds and have good antioxidant activities that could be studied in other biological activities and may be useful for pharmaceutical products.

คำสำคัญ: เพกา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ สารสกัดหยาบ

Keywords: *Oroxylum indicum*, Antioxidant activity, Phenolic, Flavonoid, Crude extract

บทนำ

ปัจจุบันนี้โลกมีความก้าวหน้าทางด้านอุตสาหกรรมและเทคโนโลยีมากขึ้น ส่งผลให้เรามีพฤติกรรมการใช้ชีวิตที่เปลี่ยนไป ต้องเจอกับสภาวะแวดล้อมที่เป็นมลพิษ อาทิเช่น มลพิษจากโรงงานอุตสาหกรรม มลพิษจากการจราจร รวมถึงสภาวะโลกร้อนที่เพิ่มขึ้นในทุก ๆ ปี ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (Free radical) โดยอนุมูลอิสระนี้จะถูกสร้างขึ้นในร่างกายโดยธรรมชาติและยังมีหน้าที่สำคัญในหลาย ๆ กระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยอนุมูลอิสระในร่างกายอาจเกิดขึ้นจากกระบวนการต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น การเผาผลาญน้ำตาลเพื่อใช้เป็นพลังงาน การปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยอาหาร หรือการออกกำลังกาย เป็นต้น นอกจากนี้ ปัจจัยจากภายนอกก็เป็นอีกสาเหตุ ร่างกายอาจได้รับสารที่ประกอบด้วยอนุมูลอิสระจำนวนมากหรือสารดังกล่าวอาจไปกระตุ้นให้เซลล์ของร่างกายผลิตอนุมูลอิสระมากขึ้นก็ได้ เช่น การเผชิญรังสีต่าง ๆ เช่น รังสียูวี รังสีเอกซเรย์ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าพลังงานสูง การสูดดมควันบุหรี่ มลพิษจากสิ่งแวดล้อม เช่น โลหะหนัก การรับประทานอาหารที่ปิ้งหรือย่างจนไหม้เกรียม สารเคมีจากอุตสาหกรรม ก๊าซโอโซนที่ถูกนำมาใช้ทางอุตสาหกรรมและเครื่องใช้ในบ้าน ยารักษาโรคบางชนิด และ ยาฆ่าแมลง เป็นต้น (อนงนาฎ, 2560) โดยหากสารอนุมูลอิสระนี้มีความเข้มข้นสูงขึ้นก็อาจเป็นอันตรายต่อร่างกายและสร้างความเสียหายต่อส่วนประกอบของเซลล์ ดีเอ็นเอ โปรตีน รวมถึงเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาจพัฒนาให้เกิดโรคต่าง ๆ ตามมา เช่น มะเร็ง อัลไซเมอร์ พาร์กินสัน เบาหวาน ต้อกระจก จอประสาทตาเสื่อม และโรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น (เจนจิราและประสงค์, 2554) ดังนั้นจึงมีการรณรงค์ให้ประชาชนให้ความสนใจเกี่ยวกับการดูแลสุขภาพมากขึ้น โดยการหันมาบริโภคอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) เช่น ผักและผลไม้บางชนิด รวมถึงไปถึงการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบทั้งในรูปอาหารเสริมเครื่องดื่มและเครื่องสำอาง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่มาจากสมุนไพรนั้นนับเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ผู้คนให้ความสนใจกันเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เพราะมีความเชื่อว่าอาหารและผลิตภัณฑ์ที่มีจากจากธรรมชาติมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งหาได้ง่ายและราคาถูก

พืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระนั้นมีมากมายหลายชนิด โดยพืชเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพในการดักจับกับอนุมูลอิสระ (Scavenging effect) ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ (Reducing power) และการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอนเอ (DNA protection) เป็นต้น ซึ่งพืชที่ผู้วิจัยสนใจเพื่อใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในครั้งนี้ คือ เพกา (*Oroxylum indicum*) ซึ่งเป็นพืชอาหารในตำราแผนโบราณจีน โดยเพกามีสรรพคุณในการรักษาโรคได้หลายอย่าง เช่น ผล(ฝัก) ของเพกา เป็น antiflammatory (Lalrinzuali et al., 2015) สารสกัดจากเปลือกมีฤทธิ์ antioxidant และ antimicrobial (Moirangthem et al., 2012) และฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Roy et al., 2007) ด้วยเพกาเป็นพืชพื้นบ้านที่สามารถนำมารับประทานในชีวิตประจำวันและใช้ประโยชน์ได้ โดยทุกส่วนของเพกามีสรรพคุณในการใช้รักษาและป้องกันการเกิดโรคได้ เช่น เปลือกช่วยสมานแผล ช่วยทำให้น้ำเหลืองปกติ บำรุงโลหิต ฝักแก้ร้อนในกระหายน้ำ ช่วยขับลม เมล็ดช่วยระบายท้อง รากช่วยบำรุงธาตุ แก้ท้องร่วง ฝนกับน้ำปูนใสทาแก้บวมอักเสบ ด้วยสรรพคุณที่หลากหลายด้านยาของเพกา ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบเพกา โดยใช้วิธีการแช่ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเมทานอล (Suchada et al., 2015) และศึกษาการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบเพกา เพื่อเป็นข้อมูลที่สนับสนุนการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดใบเพกา

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ใบเพกา โดยเก็บและรวบรวมตัวอย่างใบพืช คัดเลือกเฉพาะใบแก่ที่มีลักษณะใบสมบูรณ์ นำมาล้างทำความสะอาด แล้วนำไปอบจนแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดและชั่ง

น้ำหนัก จากนั้นนำผงใบเพกาที่บดละเอียดแล้ว 250 กรัม มาหมักแช่ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเมทานอล โดยใช้ตัวทำละลาย ชนิดละ 500 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน แล้วรินส่วนที่เป็นสารละลายออกโดยใช้ผ้าขาวแล้วกรองซ้ำด้วยกระดาษกรอง นำกากตัวอย่างเดิมมาสกัดซ้ำอีก 2 รอบ นำส่วนที่เป็นสารละลายทั้งสามครั้งมารวมกันแล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ชั่งหาน้ำหนักของส่วนสกัดหยาบ เก็บสารสกัดไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป (Nanasombat and Teckchuen, 2009)

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1 การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH scavenging activity)

การทดสอบดัดแปลงจากวิธีที่รายงานโดย สุวรรณาและคณะ (2560) และ Chan et al. (2007) มีวิธีทำโดยสรุปดังนี้ ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในไมโครเพลทนาน 1 นาที จากนั้น ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH จากปฏิกิริยาควบคุมที่ไม่ได้ใส่ส่วนสกัดและคำนวณหาค่า IC_{50} จากผลการทดลอง โดยคำนวณหา % radical scavenging

2.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

การทดสอบดัดแปลงจากวิธีที่รายงานโดย Kumar et al. (2011) และ Suchada et al. (2015) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง ตรวจวัดได้โดยการใช้อนุมูลอิสระเสถียร 2,4,6-tri (2-pyridyl)-tri-azine (TPTZ) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระของตัวอย่างด้วยสาร Ferric reducing antioxidant power (FRAP) เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูล-อิสระมาตรฐาน คือ $FeSO_4.7H_2O$ โดยเตรียมสารอนุมูลอิสระเสถียร FRAP ให้มีความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย นำมาผสมกับตัวอย่างในปริมาตร 30 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมไมโครเพลทแล้วเติมสารละลาย FRAP 270 ไมโครลิตร แต่ blank ให้เติม Acetate buffer ลงไปแทนสารละลาย FRAP ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ วิธีการคำนวณทำเช่นเดียวกันกับการหาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด แล้วรายงานค่าที่ได้ในรูปมิลลิกรัมสมมูลของ $FeSO_4$ (มิลลิกรัม Fe (II) ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)

3. การวิเคราะห์ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด (Total phenolics content)

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด ตรวจวัดโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteau ดัดแปลงจาก Dewanto et al. (2002) โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐานปริมาณฟีโนลิกทั้งหมดจึงแสดงในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัม น้ำหนักตัวอย่างแห้ง สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ความแตกต่างความเข้มข้นของกรดแกลลิกเตรียมใน 80% เมทานอล ที่ความเข้มข้น 0.02 0.04 0.08 0.16 0.32 และ 0.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมดของตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ตัวอย่าง 12.5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร และสารละลาย Folin-Ciocalteu (ที่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร หลังจากนั้น 6 นาที เติม 7% sodium carbonate (Na_2CO_3) ปริมาตร 125 ไมโครลิตรและเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader spectrophotometers (Synergy HT, BiotTek instruments, USA) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สารมาตรฐานที่ใช้ทำกราฟมาตรฐานคือกรดแกลลิกเตรียมที่ความเข้มข้น 0.02 0.04 0.08 0.16 0.32 และ 0.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงผลปริมาณฟีโนลิกทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัม GAE ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

4. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content)

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในตัวอย่างตามวิธี $AlCl_3$ colorimetric ที่ดัดแปลงมาจาก Miliauskas et al. (2004) เทียบกับสารมาตรฐานคือ Rutin นำตัวอย่างมา 25 ไมโครลิตร มาเติมสารละลาย 7% $NaNO_2$ ปริมาณ 7.5

ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น ปริมาณ 12.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืด 5 นาที นำมาเติม 10% $AlCl_3$ (ปริมาณ 15 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บในที่มืด 5 นาที เติมสารละลาย 1 M NaOH ปริมาณ 50 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 27.5 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บในที่มืด 5 นาที จากนั้น นำไปตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็น blank ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดคำนวณ โดยใช้กราฟมาตรฐาน Rutin เตรียมที่ความเข้มข้น 0–400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำเสนอค่าเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของ Rutin ในสารสกัด 1 กรัม (มิลลิลิตร RE ต่อกรัมของสารสกัด)

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one – way analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ตามวิธีของ Duncan's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

โดยโครงการวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับสถาบันจากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เลขที่การรับรอง: IBC 5003/2562

ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลด้วยวิธี DPPH

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเพกาที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอลและเมทานอล และนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการทดสอบด้วยวิธี DPPH มีผลการทดสอบดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเพกาจากการทดสอบด้วยวิธี DPPH

สารสกัดในตัวทำละลาย	DPPH IC_{50} (mg/ml), (Mean±S.D., n=3)
เฮกเซน	$17.04±0.08^{c}$
เอทิลอะซิเตท	$1.91±0.04^{ab}$
เอทานอล	$0.92±0.21^{a}$
เมทานอล	$2.94±1.9^{b}$

a, b, c ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

จากตารางที่ 1 พบว่า สารสกัดเอทานอลจากใบเพกามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 0.92±0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัดเอทิลอะซิเตทและเมทานอลจากใบเพกา โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 1.91±0.04 และ 2.94±1.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเฮกเซนจากใบเพกามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 17.04±0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

ผลการทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี FRAP พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบเพกามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 111.91±3.02 มิลลิกรัม Fe^{2+} ต่อกรัมของสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดเอทิลอะซิเตทและเมทานอล โดยมีค่าอยู่ที่ 78.00±3.55 และ 68.29±4.12 มิลลิกรัม Fe^{2+} ต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเฮกเซนจากใบเพกามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด โดยมีค่าอยู่ที่ 26.74±9.80 มิลลิกรัม Fe^{2+} ต่อกรัมของสารสกัด ดังตารางที่ 2

3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม ผลการทดสอบพบว่าสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดเอทานอลจากใบเพกามีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด โดยมีค่าอยู่ที่ 121.91±7.70 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมของสารสกัด รองลงมาคือสารสกัดเอทิลอะซิเตทและเมทานอล มีปริมาณฟีนอลิกรวม 66.82±1.99 และ 58.22±3.80 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมของสารสกัด ส่วนสารสกัดเฮกเซนมีปริมาณฟีนอลิกรวมต่ำที่สุดคือ 17.17±1.32 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมของสารสกัด ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเพกาจากการทดสอบด้วยวิธี FRAP

สารสกัดในตัวทำละลาย	FRAP (Fe^{2+} mg/g extract) (Mean±S.D., n=3)
เฮกเซน	26.74±9.80[c]
เอทิลอะซิเตท	78.00±3.55[b]
เอทานอล	111.91±3.02[a]
เมทานอล	68.29±4.12[b]

a, b, c ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางที่ 3 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบเพกา

สารสกัดในตัวทำละลาย	ปริมาณฟีนิลิกทั้งหมด (GAE mg/g extract) (Mean±S.D., n=3)
เฮกเซน	17.17 ± 1.32[d]
เอทิลอะซิเตท	66.82 ± 1.99[b]
เอทานอล	121.91± 7.70[a]
เมทานอล	58.22 ± 3.80[c]

a, b, c, d ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดใบเพกา ผลการทดสอบพบว่ามีปริมาณที่แตกต่างกันออกไป โดยพบว่าสารสกัดเอทานอลมีปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์สูงที่สุดคือ 298.73±14.46 มิลลิกรัม RE ต่อกรัมของสารสกัด รองลงมาคือสารสกัดเอทิลอะซิเตทและเมทานอล มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม 227.06±4.72 และ 141.40±13.11มิลลิกรัม RE ต่อกรัมของสารสกัด ส่วนสารสกัดเฮกเซนมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมต่ำที่สุดคือ 12.40±7.80 มิลลิกรัม RE ต่อกรัมของสารสกัด ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดใบเพกา

สารสกัดในตัวทำละลาย	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (RE mg/g extract), (Mean ± S.D., n=3)
เฮกเซน	12.40 ± 7.80[d]
เอทิลอะซิเตท	227.06 ± 4.72[b]
เอทานอล	298.73± 14.46[a]
เมทานอล	141.40 ± 13.11[c]

a, b, c, d ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลด้วยวิธี DPPH

จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่าชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารมีผลต่อค่า IC_{50} ของสารสกัดที่ได้จากตัวอย่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยสารสกัดที่สกัดเอทานอล จะมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด ซึ่งจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ในขณะที่สารสกัดเฮกเซน จะมีค่า IC_{50} ที่สูงมาก ซึ่งแทบจะไม่มีมีฤทธิ์ในการจับอนุมูลอิสระเลย จึงทำให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำมาก โดยจากผลการทดสอบในครั้งนี้พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบเพกา มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด รองลงมาคือ เอทิลอะซิเตท เมทานอล ส่วนเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Harminder et al. (2011) ที่รายงานเกี่ยวกับลักษณะสัณฐานวิทยา พฤกษศาสตร์พื้นฐาน พฤกษเคมีและเภสัชวิทยาของใบเพกาว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากใบเพกาสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 129.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Tenpe et al. (2009) ที่ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการป้องกันโรคตับเบื้องต้นของสารสกัดจากใบเพกา โดยการสกัดในตัวทำละลายต่างชนิดกันคือ ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทานอล คลอโรฟอร์มและน้ำ และทดสอบ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบเพกา มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด คือ 16.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม แสดงว่ามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุดและยังสอดคล้องกับการรายงานของ Vanitha et al. (2018) ที่รายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเพกา โดยทดสอบ 2 วิธีคือ DPPH และ Nitric oxide radical scavenging พบว่า จากการทดสอบทั้ง 2 วิธี สารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลสิระสูงที่สุด

2. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

จากการทดสอบหาความเป็น reducing power ของสารสกัดโดยใช้วิธี FRAP พบว่าชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารออกมาจากตัวอย่างใบเพกามีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยสารสกัดเอทานอลมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์สูงที่สุด (111.91±3.02 มิลลิกรัม Fe^{2+} ต่อกรัมของสารสกัด) รองลงมารองลงมาคือ เอทิลอะซิเตท เมทานอล ส่วนเฮกเซนมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ต่ำมาก (26.74±9.80 มิลลิกรัม Fe^{2+} ต่อกรัมของสารสกัด) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Priyanka et al. (2017) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเพกา โดยการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์ทั้งหมด วิเคราะห์โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu, Aluminium chloride-coloride assay และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ผลการทดสอบพบว่าพบสารฟีนอล ฟลาโวนอยด์และอัลคาลอยด์สูงที่สุดในสารสกัดเอทานอลจากเปลือกเพกา และผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดจากสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี FRAP

จากผลการทดสอบการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี DPPH และ FRAP พบว่าสารสกัดเอทานอลมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดและสารสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดซึ่งให้ผลสอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี แสดงว่าสารต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างใบเพกาได้มากเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว ซึ่งมีรายงานที่แสดงให้เห็นว่า ความมีขั้วของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดอาจมีผลต่อการละลายของสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ที่มีฤทธิ์เป็นสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้มากยิ่งขึ้น (Mohsen and Ammar, 2009) และจะเห็นได้ว่าในกรณีนี้สารสกัดใบเพกาที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วคือเฮกเซนนั้นแทบจะไม่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเลย

3. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin – Ciocalteu assay พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบเพกาให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (121.90±1.70 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมของสารสกัด) รองลงมาคือ เอทิลอะซิเตทและเมทานอล (66.82±1.99 และ 58.22±3.80 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมของสารสกัด) ส่วนสารสกัดเฮกเซนให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมต่ำที่สุด (17.17±1.32 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมของสารสกัด) เมื่อพิจารณาพบว่าสารสกัดเอทานอล จะมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกรวมมากที่สุดและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mishra et al. (2010) ที่เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของเพกา โดยจากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบเพกา มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด (124.7±4.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม pyrocatechol equivalents) ตามด้วยส่วนสารสกัดจากรากและเปลือกและรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกจะมีความสัมพันธ์กันกับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยหากพบปริมาณฟีนอลิกรวมในปริมาณสูงที่สุดจะมีประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระ (scavenging effect) และการเป็นตัวรีดิวซ์ (reducing power) สูงที่สุดด้วยเช่นกัน

4. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยใช้วิธี $AlCl_3$ colorimetric assay พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบเพกาให้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด (298.73±14.46 มิลลิกรัม RE ต่อกรัมของสารสกัด) รองลงมาคือเอทิลอะซิเตทและเมทานอล (227.06±4.72 และ 141.40±13.11 มิลลิกรัม RE ต่อกรัมของสารสกัด) ส่วนสารสกัดเฮกเซนให้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมต่ำที่สุด (12.40±7.80 มิลลิกรัม RE ต่อกรัมของสารสกัด) เมื่อพิจารณาพบว่าสารสกัดเอทานอลจะมีปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sithisarn et al. (2016) ที่วิเคราะห์พฤกษเคมีของสารสกัดจากเมล็ดเพกาที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน พบว่าสารสกัดเอทานอลจากเมล็ด

เพกามีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงสุด (10.66 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมของสารสกัดและ 7.16 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ) แต่แตกต่างจากรายงานของ Samatha et al. (2012) และ Moirangthem et al. (2013) ที่รายงานไว้ว่าสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของเพกาที่สกัดด้วยเมทานอลจะให้ปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงที่สุด (320.7 และ 346.6 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ) จากผลการรายงานแตกต่างกันอาจเป็นผลเนื่องจากกรรมวิธีที่ใช้ในการสกัดสารจากตัวอย่างพืชโดยการสกัดในแต่ละกรรมวิธีอาจจะมีผลต่อปริมาณของสารเหล่านี้ เช่น การเตรียมสกัดสารจากพืช โดยการหมักด้วยเอทานอลจะให้ปริมาณกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากกว่าการสกัดด้วยการต้ม เป็นต้น Sithisarn et al. (2006)

จากผลการทดสอบ เมื่อพิจารณาทั้งปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีแนวโน้มสอดคล้องกันคือ ถ้าสารสกัดจากใบเพกามีปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูง สารสกัดจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นด้วยเช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ถือว่าเป็นสารในกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระหรือยับยั้งการเกิดออกซิเดชันนั่นเอง (ลือชัย, 2555)

สรุปผลผลการวิจัย

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบเพกาในครั้งนี้ พบว่าสารสกัดจากใบเพกามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งในการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP แต่ในการทดสอบยังต้องใช้สารสกัดปริมาณที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในส่วนอื่น ๆ ของเพกาด้วย อาทิเช่น ฝัก เปลือก หรือดอก เป็นต้น รวมถึงการศึกษาสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบของเพกา ซึ่งเพกานับเป็นพืชทางเลือกหนึ่งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี สามารถใช้ข้อมูลเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางในลำดับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่สนับสนุนงบประมาณทุนส่งเสริมและพัฒนาการวิจัยสำหรับบุคลากร ปีงบประมาณ 2562 และอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณคณะสาธารณสุขศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการปฏิบัติงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

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

ลือชัย บุตคุป. (2555). สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสาคาม 31: 443-455.

สุวรรณา วรรัตน์, วันชัย อินทรพิทักษ์ และ วธู พรหมพิทยารัตน์. (2560). การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิคเชิงภาพกับวิธีไมโครเพลสดีพีพีเอช. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 19(3): 147-153.

อนงนาฏ ไพนุพงศ์. (2560). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระกับสุขภาพ. วารสารวิทยาสาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต 1(2): 20-27.

Chan, E. W. C., Lim, Y. Y. and Omar, M. (2007). Antioxidant and antibacterial activity of leaves of *Etlingera* species (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia. Food Chemistry 104: 1586-1593.

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., and Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 3010–3014.

Harminder, S. V. and Chaudhary, A. K. (2011). A review on the taxonomy, ethanobotany, chemistry and pharmacology of *Oroxylum indicum* vent. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 73(5): 483-490.

Kumar, V., Chaurasia, A. K., Naglot, A., Gopalakrishnan, R., Gogoi, B. J., Singh, L., Srivastava, R. B. and Deka, D. C. (2011). Antioxidant ant antimicrobial activities of stem bark extracts of *Oroxylum indicum* Vent. (Bignoniaceae)- a medicinal plant of northeastern India. South Asian Journal of Experimental Biology 1(3): 152-157.

Lalrinzuali, K., Vaberiryureilai, M. and Jagetia, G. C. (2015). Investigation of the anti-inflammatory and analgesic activities of ethanol extract of stem bark of Sonapatha *Oroxylum indicum* in vivo. International Journal of Inflamatiom 2016:1-8.

Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. and Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry 85: 231–237.

Mishra, S. L., Sinhamahapatra, P. K., Nayak, A., Das, R. and Sannigrahi, S. (2010). *In Vitro* antioxidant potential of different parts of *Oroxylum indicum*: a comparative study. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 72(2): 297-269.

Mohsen, S. M. and Ammar, A. S. M. (2009). Total phenolic content and antioxidant activity of corn tassel extract. Food chemistry 112: 595-598.

Moirangthem, D. S., Talukdar, N. C., Bora, U., Kasoju, N. and Das, R. K. (2013). Differential effects of *Oroxylum indicum* bark extracts: antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and apoptotic study. Cytotechnology 65: 83-95.

Nanasombat, S. and Teckchuen, N. (2009). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of thai local vegetables. Journal of Medicinal Plants Research 3(5): 443-449.

Priyanka, H., Prakash, R. C., Subrata, D., Anupam, D. T. and Manabendra, D. C. (2017). In vitro antioxidant activity of bark extracts of *Oroxylum indicum* (L) vent. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 10(8): 263-266.

Roy, M. K., Nakahara, K., Trakoontivakorn, V. N., Takennaka, G., Takenaka, M., Isobe, S. and Tsushida, T. (2007). Baicalein, a flavonoid extracted from a methanolic extract of *Oroxylum indicum* inhibits proliferation of a cancer cell line in vitro via induction of apoptosis. An International Journal of Pharmaceutical Sciences 62(2): 149-153.

Samatha, T., Shyamsundrachary, R., Srinivas, P. and Swamy, N. R. (2012). Quantification of total phenolic and total flavonoid contents in extracts of *Oroxylum indicum* L. Kurz. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 5(4): 177-179.

Sithisarn, P., Supabphol, R. and Gritsanapan, W. (2006). Comparison of free radical scavenging activity of Siamese neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss var. *siamensis* Valeton) leaf extracts prepared by different methods of extraction. Medical Principles and Practice 15: 219–222.

Sithisarn, P., Nantateerapong, P., Rojsanga, P. and Sithisarn, P. (2016). Screening for antibacterial and antioxidant activities and phytochemical analysis of *Oroxylum indicum* fruit extracts. Molecules 21(4): 1-8.

Suchada, M. and Paveena, L. (2015). Investigating antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP assay and total phenolic compounds of herbal extracts in YA-HOM Thepphachit. Advanced Science 15: (1): 106-117.

Tenpe, C. R., Upaganlawar, A., Burle, S. and Yeole, P. G. (2009). *In Vitro* antioxidant and preliminary hepatoprotective activity of *Oroxylum indicum* vent leaf extracts. Pharmacologyonline 1: 35-43.

Vanitha, B. J., Jyotish, B., Jayalakshmi, M., Pushpabharathi, N. and Kalpana, C. S. (2018). Phytocompounds and its therapeutic properties of *Oroxylum indicum*: a review. International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences 9(3): 971-979.

❑❑❑❑❑