

พฤกษเคมีเบื้องต้นและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปลือกสะตอ

Phytochemical Compounds and Antioxidant Activities of *Parkia speciosa* Hassk.

นิสาพร มุหะมัด^{1*}, ปิยศิริ สุนทรนนท์ สินไชย², อุบล ต้นสม³, วรรณกษมา ฮารอน¹,
ลิขิต ลาเต๊ะ¹, ลดาวัลย์ คงศรีจันทร์¹ และ ฮาบิลลาห์ จะปะกียา⁴
Nisaporn Muhamad^{1*}, Piyasiri Soontornnon Sinchai²,
Ubol Tansom³, Wankassama Haron¹, Likit Lateh¹, Ladawan Kongsrichan¹
and Habilla Chapakiya⁴

Received: 13 February 2023

Revised: 18 June 2023

Accepted: 9 November 2023

บทคัดย่อ

การศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากเปลือกสะตอ (*Parkia speciosa* Hassk.) ที่สกัดด้วยวิธีการหมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล ผลการศึกษาพบว่ามีสารประกอบพฤกษเคมีที่สำคัญ 9 ชนิด ได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของเปลือกสะตอที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่ามากที่สุด รองลงมาคือไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตตและเฮกเซน โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้เท่ากับ 646.83 ± 27.72 , 137.82 ± 5.84 , 7.15 ± 0.26 และ 4.14 ± 0.09 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัดตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่าสารสกัดจากเปลือกสะตอที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุดกำจัดอนุมูลได้สูงสุด (50.6 ± 1.51 – 63.38 ± 0.71) รองลงมาคือสารสกัดจากเปลือกสะตอที่สกัดด้วย ไดคลอโรมีเทน

¹หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง สุขภาพและการชะลอวัย คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ยะลา ประเทศไทย 95000

²Cosmetic Science, Health and Anti-Aging Program, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University, Yala, Thailand 95000

³หลักสูตรวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ยะลา ประเทศไทย 95000

⁴General Science Program, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University, Yala, Thailand 95000

⁵หลักสูตรเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ยะลา ประเทศไทย 95000

⁶Applied Chemistry Program, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University, Yala, Thailand, 95000

⁷ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (สำนักงานปัตตานี) ปัตตานี ประเทศไทย 94000

⁸The Halal Science Center, Chulalongkorn University (Pattani Office), Pattani, Thailand, 94000

ผู้นิพนธ์ประสานงาน(Corresponding author) e-mail: nisaporn.m@yru.ac.th

เอทิลอะซิเตตและเฮกเซน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเปลือกสะตอที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระมากกว่าเปลือกสะตอที่สกัดด้วยตัวทำละลายอีกสามชนิด โดยมีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ 50% (IC₅₀) เท่ากับ 0.66 ± 0.05 , 0.14 ± 0.002 , 0.033 ± 0.001 , 0.023 ± 0.002 และ 0.019 ± 0.001 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมที่เวลา 5, 20, 30, 40 และ 60 นาทีตามลำดับ สอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกโดยรวมที่มีมากที่สุดในเปลือกสะตอที่สกัดด้วยเอทานอล แสดงให้เห็นว่าเปลือกสะตอเป็นพืชที่มีศักยภาพที่สามารถนำไปศึกษาและพัฒนาต่อยอดเพื่อทำเป็นส่วนประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์เวชสำอางที่ดีต่อผิวพรรณได้

คำสำคัญ: สารพฤกษเคมี, ฤทธิ์ทางชีวภาพ, สารต้านอนุมูลอิสระ, เปลือกสะตอ

Abstract

The preliminary phytochemical research of biological activities and antioxidants in stink bean (*Parkia speciosa* Hassk.) peel extracted by maceration extraction with four organic solvents, hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and ethanol. The extracts of stink bean peels were found to include nine classes of significant phytochemical compounds which were alkaloids, phenolics, flavonoid, coumarin, saponins, tannins, terpenoid, steroid, and cardiac glycosides. The total phenolic content of stink bean peel extracted with ethanol was recorded to be the greatest, followed by ethyl acetate dichloromethane and hexane with equilibrium values of 646.83 ± 27.72 , 137.82 ± 5.84 , 7.15 ± 0.26 and 4.14 ± 0.09 mg GAE/g FW respectively. The antioxidant activity using the DPPH radical scavenging method showed the highest percentage of radical scavenging record in the stink bean peel extracted with ethanol (50.6 ± 1.51 – 63.38 ± 0.71) followed by the stink bean peel extracted with dichloromethane, ethyl acetate and hexane respectively. In addition, ethanol-extracted stink bean peel was exhibited highest antioxidant activity by showing the lowest IC₅₀ value of 0.66 ± 0.05 , 0.14 ± 0.002 , 0.033 ± 0.001 , 0.023 ± 0.002 and 0.019 ± 0.001 µg/ml at 5, 20, 30, 40 and 60 min respectively. This corresponds to the greatest total phenolic content in stink bean peel extracted using ethanol. It demonstrates that the stink bean peel is a promising plant that can be further researched and developed to be a key ingredient in skin-beneficial cosmetic products.

Keywords: Phytochemical compounds, Bioactive compounds, Antioxidant, Stink bean peel

บทนำ

สะตอ (*Parkia speciosa* Hassk.) คือพืชผักยืนต้นที่มีฝักแบนยาว เมล็ดกลม สีเขียว กลิ่นฉุน มีถิ่นกำเนิดทางภาคใต้ของไทย จัดเป็นผักเศรษฐกิจที่มีคนนิยมบริโภคมากชนิดหนึ่ง ฝักมีความยาวโดยเฉลี่ยประมาณ 25-45 เซนติเมตร เปลือกฝักมีสีเขียวตรงกลาง ฝักเป็นตุ่มนูน โดยด้านในเป็นที่อยู่ของเมล็ดที่เรียงซ้อนกันประมาณ 10-20 เมล็ดต่อฝัก เมล็ดมีลักษณะคล้ายหัวแม่มือ หรือรูปรีค่อนข้างกลม ขนาดเมล็ดทั่วไปกว้างประมาณ 2.2-2.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร เมล็ดอ่อนมีสีเขียวให้รสหวานมันและมีกลิ่นฉุน เมื่อแก่จะเริ่มเหลืองและเมื่อสะตอสุกฝักจะเปลี่ยนเป็นสีดำ [1] สารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบเฉพาะในพืช สารกลุ่มนี้อาจเป็นสารที่ทำให้พืชผักชนิดนั้นๆ มีสี กลิ่นหรือรสชาติที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว การศึกษาเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีชนิดต่างๆที่พบในพืชคือ การศึกษาเกี่ยวกับการสกัดสารสำคัญจากพืช การแยกสารให้บริสุทธิ์ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สกัดได้จากพืช การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในพืชตลอดจนกระบวนการทางชีวเคมี เป็นต้น [2] มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีในเมล็ดสะตอพบว่าประกอบไปด้วยสารสำคัญได้แก่ สารประกอบฟลาโวนอยด์, สารประกอบฟีนอลิก, เทอร์พีนอยด์, เบต้า-ซิโตสเตอรอล, สเตกมาสเตอรอล, ฟีทอล, แคมเพสเตอรอลและสควอเลน, เลคติน, ไกลซินและกรดแอสปาทิก เป็นต้น [3, 4] ทั้งนี้พบว่าฟีทอลมีคุณสมบัติต้านสารก่อมะเร็ง [5, 6], มีฤทธิ์ยับยั้งปวดและต้านการอักเสบ [5], ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย [5], ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ [6 - 8] นอกจากนี้มีการศึกษาสารสำคัญและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากฝักสะตอ 2 ชนิด ได้แก่ สะตอขาว และสะตอดาน พบว่าสะตอดานจะมีปริมาณของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงกว่าสะตอขาว โดยสารสกัด 50% เอทานอลจากฝักสะตอทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดสอบด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging

activity, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical cation-based assays และศึกษาฤทธิ์คีเลชันของโลหะ (Metal ion chelating assay) โดยสารสกัดจากสะตอขาวจะมีฤทธิ์ที่ต่ำกว่า [9] สอดคล้องกับรายงานการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นในผักสะตอจำพวกชาโปนินฟลาโวนอยด์ แทนนินและสเตียรอยด์จากการสกัดด้วย n-hexane และพบพฤกษเคมีจำพวกชาโปนิน ฟลาโวนอยด์ แทนนินและไตรเทอร์พีนเมื่อสกัดด้วย ethyl acetate and ethanol ผลทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* พบว่าสามารถมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญ [10]

จากคุณสมบัติและคุณประโยชน์ทางโภชนาการที่มากมายของสะตอส่งผลให้มีการนำสะตอมาแปรรูปเพื่อถนอมอาหารให้สามารถมีรับประทานได้ตลอดทั้งปีและได้มีการแปรรูปสะตอมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป เพื่อเป็นแนวทางเพิ่มมูลค่าวัตถุดิบให้สามารถผลิตในระดับครัวเรือนและอุตสาหกรรมขนาดย่อมได้ จากความต้องการของตลาดในการบริโภคที่เพิ่มขึ้นจึงได้ส่งผลให้มีการเลือกสะตอเหลือใช้ที่เป็นปัญหาต่อสภาพแวดล้อมเป็นจำนวนมาก และเพื่อเป็นการจัดการปัญหาขยะรวมถึงส่งเสริมและเพิ่มมูลค่าให้กับเปลือกสะตอ คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดที่ได้จากเปลือกสะตอเพื่อนำสารสกัดสำคัญที่ได้นั้นไปเป็นสารตั้งต้นในการนำไปเป็นส่วนประกอบของการผลิตผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยผู้วิจัยมีความคาดหวังว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในเปลือกสะตอจะสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางที่เป็นประโยชน์ต่อผิวพรรณรวมถึงการนำความรู้ที่ได้ถ่ายทอดสู่ชุมชนต้นแบบต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

นำตัวอย่างเปลือกสะตอสดล้างให้สะอาดและนำมาอบที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 –5 วัน บดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น นำส่วนที่บดละเอียดมา 500 กรัม นำตัวอย่างมาสกัดด้วยวิธีแช่หมัก (maceration) ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล ปริมาตร 5000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันในที่มืด เมื่อครบเวลาจึงนำสารละลายของแต่ละตัวอย่างมารองด้วยกรวยแก้วและกระดาษกรอง Whatmanเบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จนแห้ง เก็บสารสกัดหยาบที่ได้เพื่อทำการทดสอบในขั้นต่อไป [11]

1. การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น [11]

นำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากเปลือกสะตอโดยแบ่งการทดสอบสารพฤกษเคมีออกเป็น 10 กลุ่ม ได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ชาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน [11] ทำการทดสอบ 3 ซ้ำซ้ำละ 3 ตัวอย่าง

1.1 การตรวจสอบสารอัลคาลอยด์ (Alkaloids)

เตรียมสารละลายแวกเนอร์ (Wagner's reagent) โดยการละลายไอโอดีน 2 กรัม และโพแทสเซียมไอโอไดด์ 6 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำ 1.5% v/v HCl ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ จากนั้นนำไปอุ่นบนเครื่องอ่างน้ำ (Water bath) นาน 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ Whatman เบอร์ 1 แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปหยดสารละลายแวกเนอร์ (Wagner's reagent) จำนวน 5 หยด เขย่าเบาๆ ถ้าปรากฏตะกอนสีเหลืองแสดงว่ามีสารอัลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ

1.2 การตรวจสอบสารฟีนอลิก (Phenolic)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอ่างน้ำ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส กรองส่วนที่ไม่ละลายออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมน้ำ 1.0% FeCl₃ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่ามีสารในกลุ่มฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ

1.3 การตรวจสอบสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่ากรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ใส่หลอดแมกนีเซียมชิ้นเล็กๆ ลงไป 1 ชิ้น และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc. HCl) จำนวน 5 หยด เขย่าและไปอุ่นบนเครื่องอ่างน้ำ 5 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่ามีสารฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ

1.4 การตรวจสอบสารแอนทราควิโนน (Anthraquinones)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่านำไปอุ่นบนเครื่องอ่างน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่ อุณหภูมิห้องนำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปเติมน้ำละลายแอมโมเนีย (10% NH_3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าปรากฏสารเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่ามีสารแอนทราควิโนนเป็นองค์ประกอบ

1.5 การตรวจสอบคูมาริน (Coumarins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำละลาย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่ากรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรองเติมน้ำละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (6 M NaOH) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าสารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่ามีสารคูมารินเป็นองค์ประกอบ

1.6 การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

ใช้การทดสอบแบบการเกิดฟอง โดยการชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอ่างน้ำ 5 นาที เขย่าแรงๆเพื่อให้เกิดฟอง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่ามีซาโปนินเป็นองค์ประกอบ

1.7 การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอ่างน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมน้ำละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวหรือน้ำเงินดำแสดงว่ามีสารแทนนินเป็นองค์ประกอบ

1.8 การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายสารด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ค่อยๆ เติมน้ำกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงไป หากปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก แสดงว่ามีสารเทอร์พีนอยด์เป็นองค์ประกอบ

1.9 การตรวจสอบสเตอรอยด์ (Steroids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายสารด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ค่อยๆ เติมน้ำกรดกลีเซอแลอิก (Glacial acetic acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเติมน้ำกรดซัลฟิวริกเข้มข้น จำนวน 3 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียว แสดงว่ามีสารสเตอรอยด์เป็นองค์ประกอบ

1.10 การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมน้ำละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่าจากนั้นเติมน้ำกรดกลีเซอแลอิก (Glacial acetic acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงไป เขย่าและค่อยๆ เติมน้ำกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่ามีสารคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ในองค์ประกอบ

2. การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ [12]

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมตามวิธีของ Folin-Ciocalteu method [12] โดยการนำสารตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ 1N Folin – Ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-5 นาที จากนั้นเติม 20% w/v Na_2CO_3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 nm โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid (0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งรายงานเป็นหน่วยมิลลิกรัมของแกลลิก/กรัม ต่อสารสกัด)

2.2 การทดสอบสมบัติต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging activity

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging activity [13] โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน DPPH 2 มิลลิโมลาร์ในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้พอดีด้วยเมทานอลจะได้ Metabolic DPPH จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรที่เวลา 5, 20, 30, 40 และ 60 นาที โดยใช้เมทานอลเป็น blank คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (% Radical Scavenging) ดังสมการ (1)

$$\% \text{ Radical Scavenging} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (1)$$

เมื่อ A_{control} คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุมที่เติมสารละลาย DPPH กับเมทานอลเท่านั้น

A_{sample} คือการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆผสมกับสารละลาย DPPH

รายงานผลในรูป IC_{50} ที่คำนวณได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง % Radical scavenging ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดที่ทำให้ค่า % Radical Scavenging ลดลงร้อยละ 50

ผลการวิจัย

1.การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

ผลการทดสอบจำแนกตามชนิดของตัวทำละลายดังนี้ เมื่อทำการสกัดเปลือกสะตอโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายนั้นตรวจพบสารประกอบกลุ่ม คูมาริน, เทอร์พีนอยด์, สเตอรอยด์และคาดีแอลกอฮอล์ และเมื่อทำการสกัดเปลือกสะตอโดยใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายพบสารประกอบกลุ่ม ฟลาโวนอยด์, เทอร์พีนอยด์, สเตอรอยด์และคาดีแอลกอฮอล์ และเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตพบสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์, คูมาริน, ซาโปนิน, สเตอรอยด์และคาดีแอลกอฮอล์ สำหรับการสกัดเปลือกสะตอโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายนั้นพบสารประกอบเกือบทุกกลุ่มยกเว้น แอนทราควิโนน, เทอร์พีนอยด์และสเตอรอยด์ เป็นที่น่าสนใจว่าไม่พบสารประกอบกลุ่มแอนทราควิโนนเลยไม่ว่าจะใช้ตัวทำละลายชนิดใดดังแสดงในตารางที่ 1

Table 1 Phytochemical Compounds in stink bean peel extracted using four organic solvents, hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and ethanol.

Phytochemical	Hexane	Dichloromethane	Ethyl acetate	Ethanol
Alkaloids	-	-	-	+
Phenolics	-	-	-	+
Flavonoid	-	+	+	+
Anthraquinone	-	-	-	-
Coumarin	+	-	+	+
Saponins	-	-	+	+
Tannins	-	-	-	+
Terpenoid	+	+	-	-
Steroid	+	+	+	-
Cardiac Glycosides	+	+	+	+

Note (-) Not Detected, (+) Detected

2.การศึกษาการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบเห็นได้ชัดว่า เปลือกสะตอที่สกัดด้วยเอทานอลของจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายอื่นโดยมีค่าเท่ากับ 646.83 ± 27.72 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัด รองลงมาคือเปลือกสะตอที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเท่ากับ 137.82 ± 5.84 และการสกัดเปลือกสะตอด้วยไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนทำให้ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม 7.15 ± 0.26 และ 4.14 ± 0.09 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัดตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 1

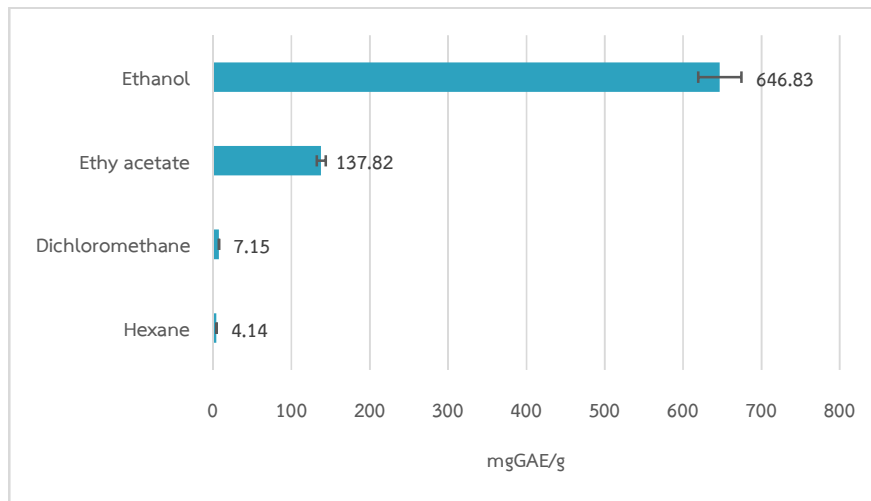


Figure 1 Total phenolic content in stink bean peel extracted using four organic solvents, hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and ethanol

3.การทดสอบสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging activity

ตารางที่ 2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH ของเปลือกสะตอที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่าสูงสุดในทุกช่วงเวลา คือ $50.6 \pm 1.51 - 63.38 \pm 0.71\%$ และมากกว่าตัวทำละลายที่ใช้สกัดชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาคือเปลือกสะตอที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน คือ $30.96 \pm 1.94 - 38.15 \pm 0.99\%$ และเปลือกสะตอที่สกัดด้วยเฮกเซนมีค่าการยับยั้งน้อยที่สุด คือ $19.46 \pm 1.30 - 24.59 \pm 1.82\%$

Table 1 The antioxidant activity using the DPPH radical scavenging in stink bean peel extracted using four organic solvents at several time

Solvents	%DPPH inhibition				
	5 Min	20 Min	30 Min	40 Min	60 Min
Hexane	19.46 ± 1.30	19.88 ± 0.91	21.18 ± 0.96	22.16 ± 1.42	24.59 ± 1.82
Dichloromethane	30.96 ± 1.94	32.92 ± 2.72	33.76 ± 2.79	35.40 ± 2.72	38.15 ± 0.99
Ethyl acetate	24.31 ± 0.73	28.23 ± 1.24	29.61 ± 1.59	30.72 ± 2.16	32.17 ± 2.10
Ethanol	50.6 ± 1.51	55.48 ± 2.01	60.09 ± 0.97	62.83 ± 1.01	63.38 ± 0.71

นอกจากนี้ยังพบว่าเปลือกสะตอที่สกัดด้วยเอทานอลมีสมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระดีกว่าเปลือกสะตอที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ ในทุกช่วงเวลาทดสอบ โดยมีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) อยู่ที่ 0.66 ± 0.05 , 0.14 ± 0.002 , 0.033 ± 0.001 , 0.023 ± 0.002 และ 0.019 ± 0.001 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2

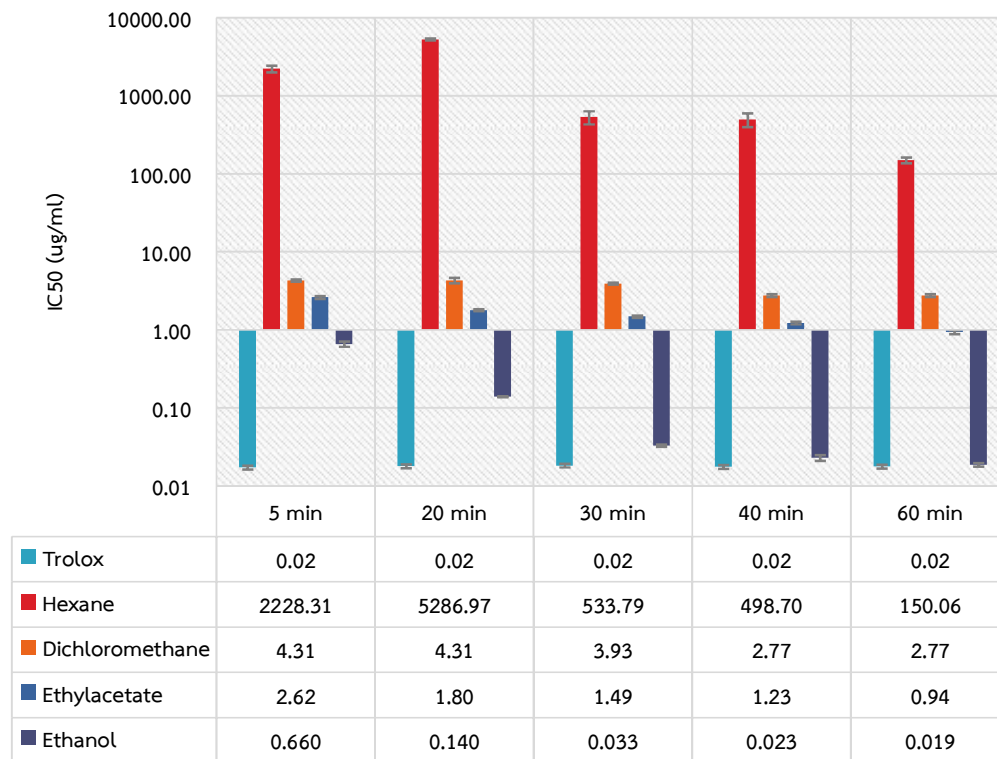


Figure 2 IC50 value of antioxidant activity in stink bean peel extracted using four organic solvents at 2 µg/ml

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น 10 กลุ่ม ได้แก่ อัลคาลอยด์, ฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์, แอนทราควิโนน, คูมาริน, ซาโปนิน, แทนนิน, เทอร์ปีนอยด์, สเตอรอยด์และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยใช้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีและการตกตะกอนที่เกิดขึ้นกับตัวทำละลายทั้งสี่ชนิดที่เลือกมาทดสอบ ผลที่ได้พบว่าสามารถตรวจพบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นทั้ง 9 กลุ่มในตัวทำละลายต่างชนิดกัน และสำหรับการสกัดเปลือกสะตอโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายนั้นพบสารประกอบเกือบทุกกลุ่มยกเว้น แอนทราควิโนน, เทอร์ปีนอยด์และสเตอรอยด์ นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจว่าการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นไม่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายชนิดใดจาก 4 ชนิดที่เลือกมาทำการทดสอบ กลับไม่พบสารประกอบกลุ่มแอนทราควิโนนเลย สอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบของสลัดน้ำ (*Nosturtium officinal*) ทั้งแบบสดและแบบแห้งด้วยเอทานอลว่าพบสารพฤกษเคมีเป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นแอนทราควิโนน, เทอร์ปีนอยด์, สเตอรอยด์และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ [14] จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของเปลือกสะตอพบว่าเปลือกสะตอที่สกัดด้วยเอทานอลของจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายอื่น รองลงมาคือเปลือกสะตอที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน อธิบายได้จากสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบมากในพืชโดยตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ ได้แก่กรดแกลลิก, คาเทชิน,ควอซิทิน,ฟลาโวนอยด์, เบต้าแคโรทีนและวิตามินซีซึ่งโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) แทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่ส่วนมากเป็นสารที่มีขั้วจึงมีคุณสมบัติละลายในตัวทำละลายจำพวกแอลกอฮอล์ได้ดีสามารถอธิบายได้จากกลไกของสารจำพวกฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระว่าเมื่อมีอนุมูลอิสระมาติดอิเล็กตรอนไปแต่ในโครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่นจึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้างทำให้โครงสร้างเสถียรและไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป [14] การวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในเปลือกสะตอพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH ของเปลือกสะตอที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่าสูงสุดในทุกช่วงเวลา รองลงมาคือเปลือกสะตอที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ส่วนเปลือกสะตอที่สกัดด้วยเฮกเซนมีค่าการยับยั้งน้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีการสกัดที่นิยมใช้ในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากพืช ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของตัวทำละลาย เนื่องจากองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระและความเป็นขั้วของสารประกอบที่แตกต่างกัน [15] จึงทำให้ความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้สกัดมีผลต่อความสามารถต้านอนุมูลอิสระ

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเปลือกสะตอนั้นพบว่าเปลือกสะตอที่สกัดด้วยเอทานอลมีสมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระดีกว่าเปลือกสะตอที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ ในทุกช่วงเวลาทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้หลายรายงานที่อธิบายว่าพืชที่มีสารประกอบฟีนอลิกจะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูง [16] ยิ่งไปกว่านั้นผลที่ได้จากการทดสอบในครั้งนี้ก็เป็นไปในทิศทางเดียวกับรายงานวิจัยอีกหลายฉบับที่ทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสะตอเมื่อทดสอบในสัตว์ทดลองประเภทหนูจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH และ FRAP ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากสะตอเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตับตลอดจนแก้ไขความผิดปกติของตับในหนูได้ [17] และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ superoxide dismutase (SOD) รวมถึงลดระดับของ malondialdehyde (MDA) ในเลือดของหนูทดลองที่ได้รับน้ำมันปาล์มอย่างมีนัยสำคัญ [18]

เปลือกสะตอมีการตรวจพบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ได้แก่อัลคาลอยด์, ฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์, คูมาริน, ซาโปนิน, แทนนิน, เทอร์พีนอยด์, สเตอรอยด์และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบและยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ โดยตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดได้แก่เอทานอล ผลการทดสอบแม้จะไม่พบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นกลุ่มแอนทราควิโนน แต่ไม่มีผลต่อความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปลือกสะตอ อย่างไรก็ตามควรจะมีการวิจัยเพิ่มเติมโดยเฉพาะการตรวจสอบหาสารปนเปื้อนและทดสอบอาการแพ้เพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้นำไปเป็นส่วนผสมที่สำคัญในการผลิตเครื่องสำอางที่เป็นประโยชน์ต่อผิวพรรณได้ รวมถึงการนำความรู้ที่ได้ถ่ายทอดสู่ชุมชนต้นแบบต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลาที่สนับสนุนทุนวิจัยงบบำรุงการศึกษา ปี 2564 ในงานวิจัยนี้และขอขอบคุณศูนย์การเรียนรู้แม่ลาน มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ที่อนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัย

References

- [1] Helen, C. F. H. (1986). *Parkia (Leguminosae: Mimosoideae). Flora Neotropica*, 43, 1-123.
- [2] Noppamas, S. (2001). *Pharmacognosy "Medicine and Natural Products"*. 3rd ed. Bangkok: Saengteinkarnphimph. (in Thai)
- [3] Ghasemzadeh, A., et al. (2018). Assessment and Comparison of Phytochemical Constituents and Biological Activities of Bitter Bean (*Parkia speciosa* Hassk.) Collected from Different Locations in Malaysia. *Chemistry Central journal*, 12(1), 12.
- [4] Azemi, A. K., et al. (2022). Phytochemical Contents and Pharmacological Potential of *Parkia speciosa* Hassk. for Diabetic Vasculopathy: A Review. *Antioxidants*, 11(2), 431.
- [5] Chhikara, N, et al. (2018). Bioactive Compounds, Food Applications and Health Benefits of *Parkia speciosa* (Stinky Beans): A Review. *Agriculture & Food Security*, 7, 46(2018).
- [6] Adilla Zaini, N., & Mustafa, F. (2017). Review: *Parkia speciosa* as Valuable, Miracle of Nature. *Asian Journal of Medicine and Health*, 2(3), 1–9.
- [7] Kwanjai, S. (2009). *Antioxidant Properties of Stink Bean as Affected by Various Processing*, (Master thesis, Prince of Songkla University). (in Thai)
- [8] Ahmad, N. I., et al. (2019). A Review on the Phytochemicals of *Parkia Speciosa*, Stinky Beans as Potential Phytomedicine. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, 2(3), 151-173.
- [9] Wonghirundecha, S., et al. (2014). Total Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Stink Bean (*Parkia speciosa* Hassk.) Pod Extracts. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 36(3), 301-308.
- [10] Hasim, H., et al. (2015). Antibacterial Activity of *Parkia speciosa* Hassk. Peel to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Bacteria. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(4), 239-243.
- [11] Ayoola, G.A., et al. (2008). Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal

- Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 1019-1024.
- [12] Andrew, M. T., et al. (1987). Total Phenolics and High-Performance Liquid Chromatography of Phenolic Acids of Avocado. *Journal of Agricultural. Food Chemistry*, 35(6), 921-925.
- [13] Prommuak, C., et al. (2008). Extraction of Flavonoids and Carotenoids from Thai Silk Waste and Antioxidant Activity of Extracts. *Separation and Purification Technology*, 62, 444-448.
- [14] Napattaorn, B, (2019). Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Fresh and Dried *Nosturtium officinal* Plants. *EAU Heritage Journal Science and Technology*, 14(1), 144-154. (in Thai)
- [15] Sultana, B., et al. (2009). Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*, 14(6), 2167–2180.
- [16] Djeridane, A., et al. (2006). Antioxidant Activity of some Algerian Medicinal Plants Extracts Containing Phenolic Compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654–660.
- [17] Gao, L., et al. (2023). Stink Bean (*Parkia speciosa*) Empty Pod: A Potent Natural Antidiabetic Agent for the Prevention Of Pancreatic and Hepatorenal Dysfunction in High Fat Diet/Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats. *Archives of physiology and biochemistry*, 129(1), 261–267.
- [18] Nurdyansyah, F., et al. (2023). The Effect of Stinky Bean (*Parkia speciosa*) Peel Ethanolic Extract to Enhance Superoxide Dismutase (SOD) and Reduce Malondialdehyde (MDA) Level of “jelantah” Exposed Rats. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1200, 012049.