

## ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบหูกวางต่างสี

Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of *Terminalia catappa* L. leaf extracts

สุมิตราภรณ์ พิศชวนชม

อีเมล: sumitraporn.phicuanchom@gmail.com

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร. ปัญญวัฒน์ ปินตาทอง

อีเมล: punyawatt.pin@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของใบหูกวาง 3 สี โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ อะซิโตน เอทานอล เมทานอล และน้ำ ตลอดจนการตรวจสอบเอกลักษณ์สารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดใบหูกวาง จากการศึกษาพบว่าเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุด ที่ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดสูงสุด โดยใบหูกวางสีเขียวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดเท่ากับ  $660 \pm 78$  มิลลิกรัม GAE/กรัมสารสกัด  $446.0 \pm 4.41$  มิลลิกรัม TEAC/กรัมสารสกัด และ  $277.80 \pm 2.01$  มิลลิกรัม KAE/กรัมสารสกัด ตามลำดับ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ( $r = 0.653, 0.845$  ตามลำดับ) เมื่อตรวจสอบเอกลักษณ์สารประกอบฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบ โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าปริมาณกรดแทนนิกที่เป็นองค์ประกอบสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดโดยมีปริมาณร้อยละ 4.46 และ 3.42 โดยน้ำหนักในใบหูกวางสีเขียวและสีแดง ตามลำดับ

**คำสำคัญ:** ใบหูกวาง, สารประกอบฟีนอลิก,ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

### Abstract

The objective of this study was to evaluate total phenolic content (TPC), antioxidant and tyrosinase inhibitory activities from three different color leaves of *Terminalia catappa* L. which were extracted by different polarity of 4 solvents namely, acetone ethanol methanol and water. The result revealed that methanol was considered as the best solvent for extraction as compared with the other solvent. The green *Terminalia catappa* L. leaf significantly showed the highest TPC, antioxidant and tyrosinase inhibitory activities at  $660 \pm 78$  mg GAE/g extract,  $446.0 \pm 4.41$  mg TEAC/g extract and  $277.80 \pm 2.01$  mg KAE/g extract, respectively ( $p < 0.05$ ). Pearson correlation method was used to determine relationship among responses tested and found that relation between TPC and antioxidant activity, TPC and tyrosinase inhibitory activity was considered as medium ( $r = 0.653$ ) and high ( $r = 0.845$ ) level, respectively. Moreover, high-performance liquid chromatography (HPLC) was used to identify the main phenolic component represented in the leaves of *Terminalia catappa* L. and the result revealed that amount of tannic acid was in responsible with the phenolic content and bioactivities represented in the *Terminalia Catappa* L. leaves. The 4.46 and 3.42 w/w of tannic acid was present in green and red leaf extract, respectively.

**Keywords:** *Terminalia catappa* L., Phenolic, Antioxidant, Inhibitory tyrosinase activities

### บทนำ/หลักการและเหตุผล

ต้นหูกวาง (*Terminalia catappa* L.) เป็นพืชไม้ขนาดใหญ่ จัดเป็น ไม้ยืนต้นและผลัดใบ พบได้ในประเทศไทยตามสวนสาธารณะ บ้านเรือน ใบของต้นหูกวางจะมีระยะก่อนการผลัดใบอยู่ 3 ระยะ ซึ่งในการเปลี่ยนแปลงระยะต่างๆจะทำให้สีของใบเปลี่ยนแปลง โดยระยะเริ่มต้นหรือระยะแตกใบใบหูกวางจะมีสีเขียว เมื่อเข้าสู่ระยะก่อนผลัดใบใบหูกวางจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือสีส้ม และเมื่อเข้าสู่ระยะผลัดใบใบหูกวางจะเปลี่ยนเป็นสีแดง มีการศึกษาองค์ประกอบในใบหูกวางพบว่าใบหูกวางมีสารออกฤทธิ์ในกลุ่มอัลคาลอยด์, กรดฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์, แทนนิน (อรัญญา พลพรพิสิฐ และคณะ, 2549) โดยสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของใบหูกวางมีคุณสมบัติเป็นสารอนุมูลอิสระที่ดี นอกจากนั้นสารแทนนินยังมีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียได้ จึงมีการใช้ประโยชน์จากใบหูก

กว้างในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (วัชรวิภา ภูริวิโรจน์กุล และนนทวิทย์ อารีรัตน์, 2549) ในงานวิจัยของสรณัฐจิตร อินอ่อน (2560) มีการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดใบหูกวางต่างสี พบว่าในใบหูกวางสีเขียวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าใบหูกวางสีเหลืองและสีแดง แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานวิจัยการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในใบหูกวาง ซึ่งจากรายงานการวิจัยของพรสุข จิตรเวช (2548) พบว่าสารประกอบฟีนอลิกสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ เกิดจากสารประกอบของฟีนอลิก ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจน กับบริเวณ active site ของเอนไซม์ ส่งผลทำให้เกิด steric hindrance ของโครงสร้าง ทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาเกี่ยวกับ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของใบหูกวางในระยะต่างๆ ตลอดจนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส รวมถึงการตรวจสอบเอกลักษณ์เพื่อหาสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในใบหูกวางแต่ละสี เพื่อเป็นข้อมูลด้านงานวิจัยพื้นฐานและสามารถพัฒนาสารสกัดเพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอางต่อไป

#### วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดใบหูกวางระยะต่างๆ ที่มีสีแตกต่างกัน
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิก, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดจากใบหูกวาง
3. วิเคราะห์สารองค์ประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบหูกวาง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารสำคัญ การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

#### ขอบเขตการศึกษา

1. เตรียมตัวอย่างใบหูกวาง 3 ระยะที่มีสีแตกต่างกันคือสีเขียว, สีเหลือง และสีแดง จากบริเวณสวนอุตสาหกรรมศรีสทพัฒน์ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี
2. เตรียมสารสกัดหยาบจากใบหูกวางทั้ง 3 ระยะ โดยการสกัดด้วยวิธีเขย่าเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ อะซิโตน เมทานอล เอทานอลและน้ำ

3. หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบใบหูกวาง

4. วิเคราะห์สารฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบที่ในสารสกัดหยาบใบหูกวาง โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

### บททวนวรรณกรรม

#### 1. ใบหูกวาง

ใบของต้นหูกวางเป็นใบเดี่ยวมีระยะเวลาการผลัดใบอยู่ 3 ช่วง คือเดือนพฤษภาคม – กันยายน ซึ่งเป็นฤดูฝนต้นหูกวางจะแตกใบอ่อนมีสีเขียว และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือส้มในช่วงเดือนตุลาคม – มกราคมซึ่งเป็นระยะก่อนการผลัดใบ แล้วจะเข้าสู่ระยะการผลัดใบใบหูกวางจะเปลี่ยนสีแดงในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ - เมษายน โดยลักษณะของใบหูกวางที่มีการเปลี่ยนแปลงสีในระยะการเจริญเติบโตแสดงดังภาพที่ 1.1



ที่มา สราญจิตร อินอ่อน (2560)

ภาพที่ 1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของใบหูกวางสด และการเปลี่ยนแปลงสีในระยะต่างๆ

#### 2. สารองค์ประกอบและฤทธิ์ทางชีวภาพของใบหูกวาง

ใบหูกวางประกอบด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ เถ้า, เซลลูโลส, ลิกนิน, แทนนิน, เพนโทแซน, อัลคาลอยด์, กรดฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์ และสารอื่นๆ แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณสารองค์ประกอบทางเคมีของใบหูกวาง

ชนิดองค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณ (ร้อยละ)
เซลลูโลส	41.93
ถั่ว (สารประกอบอินทรีย์ประเภทซัลโฟ)	25.76
ลิกนิน	7.21
แทนนิน	12.67
แอลคาลอยด์	3.95
เพนโทแซน	3.79
สเตอรอย	1.54
ซาโปนิน	1.38
ฟลาโวนอยด์	0.76
ไตรเทอร์พีนอยด์	0.23

ที่มา สมจินตนา พุทธมาตย์ และวรวัฒน์ สุวรรณสาร (2550)

นอกจากนี้ในใบหูกวางยังพบชนิดสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ 5 ชนิดได้แก่ กรดแทนนิก, รูติน, ไอโซเคอซิทิน, ทองแดง และสังกะสี โดยมีปริมาณกรดแทนนิกสูงที่สุดคือร้อยละ  $14.5 \pm 3.2$  ส่วนปริมาณของ รูติน, ไอโซเคอซิทิน, ทองแดง และสังกะสีมีเพียงร้อยละ  $0.2 \pm 1.6$ ,  $0.12 \pm 1.6$ ,  $0.004 \pm 0.12$  และ  $0.026 \pm 0.71$  ตามลำดับ (อรัญญา พลพรพิสิฐ และคณะ, 2549)

ฤทธิ์ทางชีวภาพของใบหูกวางพบว่า ใบหูกวางมีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียได้ดีเนื่องจากอุดมไปด้วยสารแทนนินอยู่มาก จึงมีการใช้ประโยชน์จากใบหูกวางในด้านยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (วัชรวิภา ภูริวิโรจน์กุล และนนทวิทย์ อารีย์ชน, 2549) นอกจากนี้งานวิจัยของสรราชจิตร อินอ่อน (2560) ได้ศึกษาปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบหูกวาง พบว่า ใบหูกวางสีเขียวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลมากกว่าใบหูกวางสีเหลืองและสีแดงคือ  $280.26 \pm 4.59$  มิลลิกรัม GAE/กรัมตัวอย่าง และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดโดยการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $337.87 \pm 3.85$  และ  $347.47 \pm 1.47$  มิลลิกรัม TEAC/กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ

## ระเบียบวิธีวิจัย

### 1. การเตรียมตัวอย่างใบหูกวาง

เตรียมตัวอย่างใบหูกวาง 3 ระยะคือใบหูกวางสีเขียว, ใบหูกวางสีเหลือง และใบหูกวางสีแดง จากบริเวณสวนอุตสาหกรรมศรีสุพรรณ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี ในช่วงระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2562 - เดือนมีนาคม พ.ศ. 2563 นำไปล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ แล้วผึ่งให้แห้งในที่ร่ม แล้วนำไปอบในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักที่อบแห้งคงที่ แล้วนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (Blender)

### 2. การสกัดสารจากใบหูกวาง

การสกัดสารตามวิธีของ สราญจิตร อินอ่อน (2560) โดยนำผงแห้งของใบหูกวางที่บดละเอียดมาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ อะซิโตน เอทานอล เมทานอลและน้ำ ในอัตราส่วน 1 : 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) นำไปสกัดด้วยวิธีการเขย่า โดยใช้เครื่องเขย่าแบบหมุนรอบด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดมากรองด้วยกระดาษกรองหมายเลข 1 เก็บสารละลายไว้ แล้วนำไปประเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดตัวอย่าง จะได้สารสกัดหยาบ (crude) บันทึกร้อยละของสารสกัดที่ได้และลักษณะทางกายภาพที่ได้

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบหูกวาง

1) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin – Ciocalteu ตามวิธีของ Annegowda *et al.* (2010) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน รายงานผลในรูปแบบของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (Gallic acid equivalents, mg GAE/g Extract)

2) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบหูกวางด้วยวิธี DPPH (DPPH radical scavenging activity assay) ตามวิธีของ สริตา สังข์ทอง และคณะ (2556) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน รายงานผลในรูปแบบของมิลลิกรัมสมมูลของ Trolox ต่อกรัมของสารสกัด (Trolox equivalents, mg TEAC /g Extract)

3) การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method คัดแปลงจากวิธีของ ทัดพิชา กายเย็น (2560) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยใช้

กรดโคจิกเป็นสารมาตรฐาน รายงานผลในรูปแบบของมิลลิกรัมสมมูลของกรดโคจิกต่อกรัมของสารสกัด (Kojic acid, mg KAE/g Extract)

4) การตรวจเอกลักษณ์ของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบหูกวาง คัดแปลงจากวิธีของ ทัดพิชา กายเย็น (2560) การวิเคราะห์ใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงยี่ห้อ Shimadzu (Shimadzu Cooperation Analytical&Measuring Instruments Division Kyoto, Japan) ตัวตรวจวัดรุ่น SPD-M20A Diode array detector และใช้คอลัมน์ C-18 (4.6 x 10 cm., ขนาดรู 5  $\mu$ m)) สารมาตรฐานที่ใช้คือ Tannic acid, Rutin และ Quercetin

5) การหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation coefficient,  $r$ ) ในการแปลผลระดับความสัมพันธ์อ้างอิงจากงานวิจัยของ Mukaka (2012)

## ผลวิจัย

### 1. การเตรียมสารสกัดจากใบหูกวาง

สารสกัดใบหูกวางที่สกัดด้วย อะซิโตน เอทานอล เมทานอลและน้ำ โดยสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดใบหูกวางสีเขียวและสีแดงจะมีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล ส่วนใบหูกวางสีเหลืองจะมีลักษณะเป็นผงสีเหลือง การสกัดใบหูกวางสีเขียวและสีแดงด้วยตัวทำละลายเมทานอลจะให้ปริมาณร้อยละผลผลิตมากที่สุดคือ  $17.47 \pm 1.1$  และ  $15.78 \pm 0.4$  ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าปริมาณร้อยละผลผลิตที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆอย่างมีนัยยะสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ส่วนใบหูกวางสีเหลืองที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ให้ปริมาณร้อยละผลผลิตที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ ( $p > 0.05$ ) ดังตารางที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณร้อยละผลผลิตที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกันในใบหูกวางต่างสี พบว่าการใช้เมทานอลในการสกัดใบหูกวางสีเขียวและสีแดงมีให้ปริมาณร้อยละผลผลิตมากที่สุด เมื่อเทียบกับสารที่สกัดด้วยใบสีเหลืองอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ดังตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าชนิดของใบหูกวางและตัวทำละลายมีผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบ

ตารางที่ 2 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดใบหูกวาง

ชนิดของใบหูกวาง	ร้อยละของสารสกัดที่ได้			
	อะซิโตน	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ
ใบหูกวางสีเขียว	3.83±0.57 <sup>dB</sup>	9.64±0.09 <sup>cB</sup>	17.47±1.08 <sup>aA</sup>	15.62±0.96 <sup>bA</sup>
ใบหูกวางสีเหลือง	9.73±2.60 <sup>aA</sup>	5.68 ±1.15 <sup>bC</sup>	9.02 ±3.27 <sup>aC</sup>	9.39±1.95 <sup>aB</sup>
ใบหูกวางสีแดง	3.21±0.93 <sup>cB</sup>	11.52±1.27 <sup>bA</sup>	15.78±0.41 <sup>aB</sup>	12.10±2.13 <sup>bB</sup>

หมายเหตุ 1. ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรพิมพ์เล็กแตกต่างกันในแถวเดียวกันในแต่ละตัวทำละลาย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p<0.05$ )

2. ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรพิมพ์ใหญ่แตกต่างกันในแนวสดมภ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p<0.05$ )

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบหูกวาง

1) การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบหูกวาง

สารสกัดใบหูกวางสีเขียว สีเหลือง และสีแดงที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด มากกว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) เท่ากับ  $660.79\pm5.35$   $618.91\pm10.33$  และ  $185.68\pm4.37$  มิลลิกรัม GAE/กรัมตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบหูกวาง ที่ใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกัน พบว่าสารสกัดใบหูกวางสีเขียวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด และใบหูกวางสีแดงจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกต่ำที่สุด ดังตารางที่ 3



ตารางที่ 3 ปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดใบหูกวาง

ชนิดของใบหูกวาง	ปริมาณสารฟีนอลิก (มิลลิกรัม GAE/กรัมตัวอย่าง)			
	อะซิโตน	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ
ใบหูกวางสีเขียว	515.42±17.73 <sup>bA</sup>	664.92±11.19 <sup>aA</sup>	660.79±5.35 <sup>aA</sup>	531.05±9.34 <sup>bA</sup>
ใบหูกวางสีเหลือง	461.47±17.71 <sup>cB</sup>	515.05±10.64 <sup>bB</sup>	618.91±10.33 <sup>aB</sup>	471.48±10.00 <sup>cB</sup>
ใบหูกวางสีแดง	89.32±1.82 <sup>dC</sup>	166.97±7.30 <sup>bC</sup>	185.68±4.37 <sup>aC</sup>	101.9±4.51 <sup>cC</sup>

หมายเหตุ 1. ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรพิมพ์เล็กแตกต่างกันในแถวเดียวกันในแต่ละตัวทำละลาย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p<0.05$ )

2. ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรพิมพ์ใหญ่แตกต่างกันในแนวสดมภ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p<0.05$ )

2) การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบหูกวางโดยวิธีกวาดจับอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity)

สารสกัดใบหูกวางสีเขียวและใบสีเหลืองที่สกัดด้วยตัวทำละลายคือเมทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) เท่ากับ 446.79±4.41 และ 285.14±8.03 มิลลิกรัม TEAC/กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ สารสกัดใบหูกวางสีแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) เท่ากับ 207.19±4.89 และ 217.76±3.80 มิลลิกรัม TEAC/กรัมตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกัน พบว่าใบหูกวางสีเขียวจะให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในใบหูกวาง

ชนิดของใบหูกวาง	ปริมาณสารฟีนอลิก (มิลลิกรัม GAE/กรัมตัวอย่าง)			
	อะซิโตน	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ
ใบหูกวางสีเขียว	242.90±6.89 <sup>cA</sup>	350.70±13.47 <sup>bA</sup>	446.79±4.41 <sup>aA</sup>	193.78±0.83 <sup>dA</sup>
ใบหูกวางสีเหลือง	193.96±5.17 <sup>cB</sup>	246.89±3.40 <sup>bB</sup>	285.14±8.03 <sup>aB</sup>	183.50±8.72 <sup>cB</sup>
ใบหูกวางสีแดง	198.97±10.29 <sup>bB</sup>	207.19±4.89 <sup>bC</sup>	217.76±3.80 <sup>aC</sup>	166.41±4.36 <sup>cC</sup>

**หมายเหตุ** 1. ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรพิมพ์เล็กแตกต่างกันในแถวเดียวกันในแต่ละตัวทำละลาย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ )

2. ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรพิมพ์ใหญ่แตกต่างกันในแนวสดมภ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ )

3) การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบหูกวาง

สารสกัดใบหูกวางสีเขียวสกัดด้วยตัวทำละลายคือเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เท่ากับ 277.80±2.01 มิลลิกรัม KAE/กรัมตัวอย่าง สำหรับสารสกัดใบหูกวางสีเหลืองที่สกัดด้วยตัวทำละลายคืออะซิโตนจะมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เท่ากับ 216.88±7.76 มิลลิกรัม KAE/กรัม สารสกัดใบหูกวางแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายคืออะซิโตน และเมทานอลจะให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เท่ากับ 62.42±6.59 มิลลิกรัม KAE/กรัมตัวอย่าง ดังตารางที่ 4 ดังนั้นสารสกัดของใบหูกวางที่สกัดด้วยตัวทำละลายคืออะซิโตน และเมทานอลจะมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าตัวทำละลายอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของใบหูกวางทั้ง 3 สี พบว่า ใบหูกวางสีเขียวจะให้ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสารสกัดใบหูกวางสีเหลืองและใบหูกวางสีแดง โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 277.81±2.01 มิลลิกรัม KAE/กรัมตัวอย่าง ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ชนิดของใบหูกวาง	ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (มิลลิกรัม KAE/กรัมตัวอย่าง)			
	อะซีโตน	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ
ใบหูกวางสีเขียว	221.27±1.22 <sup>bA</sup>	184.73±0.40 <sup>cA</sup>	277.81±2.01 <sup>aA</sup>	140.62±5.43 <sup>dA</sup>
ใบหูกวางสีเหลือง	216.88±7.76 <sup>aA</sup>	178.83±8.99 <sup>bA</sup>	161.46±6.24 <sup>bB</sup>	95.84±4.32 <sup>bB</sup>
ใบหูกวางสีแดง	62.42±6.59 <sup>ab</sup>	34.77±6.05 <sup>bb</sup>	70.4±1.56 <sup>aC</sup>	42.12±4.29 <sup>bC</sup>

**หมายเหตุ** 1. ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรพิมพ์เล็กแตกต่างกันในแถวเดียวกันในแต่ละตัวทำละลาย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ )

2. ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรพิมพ์ใหญ่แตกต่างกันในแนวสดมภ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ )

3. การหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยมีค่า  $r$  เท่ากับ 0.653 มีความสัมพันธ์กันเชิงบวกในระดับปานกลาง

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิก กับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยมีค่า  $r$  เท่ากับ 0.845 มีความสัมพันธ์กันเชิงบวกในระดับสูง

ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่าฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยมีค่า  $r$  เท่ากับ 0.691 มีความสัมพันธ์กันเชิงบวกในระดับปานกลาง

#### 4. การวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของสารสำคัญในตัวอย่างสารสกัดใบหูกวาง

การวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบหูกวางพบว่า สารสกัดใบหูกวางสีเขียวที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าใบหูกวางสีเหลืองและใบหูกวางสีแดงจึงได้นำสารสกัดใบหูกวางสีเขียวและสีแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแทนนิก (Tannic acid) รูติน (Rutin) และเคอร์เซติน (Quercetin) พบว่าใบหูกวางสีเขียวและสีแดงมีปริมาณกรดแทนนิกเท่ากับ 4.46% และ 3.42% w/w รูติน (Rutin) เท่ากับ 0.13% และ 0.67% w/w ตามลำดับ ส่วนปริมาณเคอร์เซติน (Quercetin) ในตัวอย่างใบหูกวางทั้ง 2 สีมีปริมาณน้อยมากไม่ปรากฏฟิสิกัลโครมาโตแกรม จึงไม่สามารถคำนวณปริมาณได้

#### อภิปรายผล

จากการศึกษาสารสกัดใบหูกวางที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน และใบหูกวางต่างสีพบว่าตัวทำละลายและสีของใบหูกวางส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายคือเมทานอลจะมีร้อยละผลผลิตมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Charng-Cherng Chyaua, Shu-Yao Tsaib, Pei-Tzu Kob and Jeng-Leun Maub (2002) ที่พบว่า methanol เป็นตัวทำละลายชนิดกึ่งมีขั้ว (semi-polar solvents) จะให้ปริมาณร้อยละผลผลิตที่มากที่สุด เนื่องจากสารองค์ประกอบภายในของใบหูกวางพบว่าในใบหูกวางจะมีสารกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และซาโปนินอยู่มาก ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่มีโครงสร้างละลายน้ำได้ ดังนั้นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ใช้สกัดต้องเป็นตัวละลายชนิดกึ่งมีขั้ว (semi-polar solvents) หรือมีขั้ว (polar solvents) จะให้ปริมาณร้อยละผลผลิตที่มากที่สุด

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบหูกวางจะพบว่า ใบหูกวางสีเขียวที่สกัดด้วยตัวทำละลายคือเมทานอลจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของสุกัญญา บุญถล่ม (2540) ที่พบว่าในใบหูกวางสีเขียวมียะปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลคือคอนเดนเซดแทนนินมากกว่าใบหูกวางสีเหลืองและสีแดง ซึ่งคอนเดนเซดแทนนิน เป็นสารในกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระ จึงทำให้ใบหูกวางสีเขียวมีฤทธิ์ต้าน

อนุมูลอิสระที่สูงกว่าใบหูกวางสีเหลืองและใบหูกวางสีแดง และงานวิจัยของ Bae-Harboe and Park (2012) พบว่าสารกลุ่มฟีนอลิกมีความสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ โดยสารกลุ่มฟีนอลิกสามารถแย่งจับธาตุโลหะทองแดงได้ดีกว่า L-DOPA ซึ่งเป็น Substrate ของเอนไซม์ไทโรซิเนสให้ธาตุโลหะทองแดงของเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่สามารถเข้าจับกับ L-DOPA ได้ กระบวนการสังเคราะห์เมลานินจึงไม่เกิด ดังนั้นใบหูกวางสีเขียวที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูง จึงแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่ามีความสัมพันธ์กันเชิงบวกในระดับปานกลาง ( $r=0.653$ ) แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบหูกวางไม่ได้เป็นผลมาจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบหูกวางเพียงอย่างเดียว อาจจะมีสารชนิดอื่น ๆ ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีความสัมพันธ์กันเชิงบวกในระดับสูง ( $r=0.845$ ) แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ และความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส มีความสัมพันธ์กันเชิงบวกในระดับปานกลาง ( $r=0.691$ )

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ 3 ชนิดคือ กรดแทนนิก (Tannic acid) รุทีน (Rutin) และ เควอร์เซติน (Quercetin) พบว่า ใบหูกวางสีเขียวและใบหูกวางสีแดงมีปริมาณกรดแทนนิกที่แตกต่างกัน ส่วนปริมาณของรุทีนไม่แตกต่างกัน โดยใบหูกวางสีเขียวจะมีปริมาณกรดแทนนิกเท่ากับร้อยละ 4.46 ของสารในตัวอย่าง (%w/w) แสดงให้เห็นว่าสารที่ส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมาจากปริมาณของกรดแทนนิกในใบหูกวาง

#### ข้อเสนอแนะ

1. ใบของต้นหูกวางอุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังนั้นควรมีการนำสารสกัดจากใบหูกวางมาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เพื่อพัฒนาตำรับครีมจากสารสกัดธรรมชาติ
2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงสารกลุ่มฟีนอลิกที่สำคัญ 6 ชนิดคือ ellagic acid, gallic acid, epicatechin, quercitrin, rutin และ tannic acid ในใบหูกวาง เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญกับฤทธิ์ทางชีวภาพ

### รายการอ้างอิง

- ทัตพิชา กายเย็น. (2560). *ผลของระยะเวลาการสุกต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของมะม่วงหาวมะนาวโห่*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.
- พรสุข จิตรเวช. (2548). *ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น ฤทธิ์ต้านคอลลาจีเนส และฤทธิ์ต้านไทโรซิเนสของสารสกัดมะขามป้อมที่ปลูกในประเทศไทย สำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง*. วิทยานิพนธ์ปริญญาเกศศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีเกศฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- วัชรวิภา ภูริวิโรจน์กุล และนนทวิทย์ อารีรัตน์. (2549). *ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากัดและความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางต่อปลากัด*. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาประมง ครั้งที่ 44. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สมจินตนา พุทธมาตย์ และวรวัฒน์ สุวรรณสาร. (2550). *การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบหูกวางและผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำและการยับยั้งแบคทีเรียในน้ำกรุงเทพฯ*. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช วันที่ 30 ม.ค.-2 ก.พ. 2550. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สรานัญจิตร อินอ่อน. (2560). *ความสัมพันธ์ของสีใบหูกวางกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ*. การค้นคว้าอิสระวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง, เชียงราย.
- สรिता สังข์ทอง, ปัญญวัฒน์ ปินดาทอง และภานุพงษ์ ใจวุฒิ. (2556). *การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเมล็ดหมาก (*Areca catechu* L.) ด้วยวิธีการสกัดของแข็งด้วยของเหลว โดยไมโครเวฟ*. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 18(2), 195-202
- อรัญญา พลพรพิสิฐ, นันทริกา ชันชื้อ, วิณา เคยพุดชา, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, เอน โคะมากาโตะ. (2549). *รายงานผลการวิจัย การใช้ใบหูกวาง (*Terminalia catappa* L.) เพื่อรักษาโรคในปลากัด (*Betta splendens*) และปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*)*. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- Annegowda, H. V., Ween, N. C., Mordi, M. N., Ramanathan, S., & Mansor, S. M. (2010). Evaluation of phenolic content and antioxidant property of hydrolysed extract of *Terminalia catappa* L. leaf. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9(8), 479-485.

Bae-Harboe, Y. S. C., & Park, H. Y. (2012). Tyrosinase: A central regulatory protein for cutaneous pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(12), 2678-2680.

Chyauu, C. C., Tsai, S. Y., Ko, P. T., & Mau, J. L. (2002). Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminallia catappa* leaves. *Food Chemistry*, 78(4), 483-488.

doi: 10.1016/s0308-8146(02)00162-0

Mukaka, M., (2012). Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*, 24(3), 67-71

