

นิพนธ์ต้นฉบับ

**การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบมะขาม
ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำและเอทานอล**

**ธันธิชา ชะโลธาร^{1*} สรรใจ แสงวิเชียร¹ ศุภะลักษณ์ พักคำ¹ กริยาภา หลายรุ่งเรือง²
ปิยะนุช ทิมคร² และเจมส์ พิงผล³**

¹การแพทย์แผนไทยประยุกต์ บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

²วิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี คณะสาธารณสุขศาสตร์และสหเวชศาสตร์

สถาบันพระบรมราชชนก กระทรวงสาธารณสุข

³วิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุข กาญจนาภิเษก (นนทบุรี)

*ผู้นิพนธ์ที่ให้การติดต่อ E-mail: tchalotan@gmail.com

Received date: February 14, 2023; Revised date: July 3, 2023; Accepted date: July 3, 2023

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบมะขามด้วยการสกัดด้วยน้ำ การสกัดด้วยเอทานอล 70% และเอทานอล 95% เป็นการศึกษาเพื่อนำข้อมูลมาพัฒนาตำรับน้ำมันมะขามของวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี ซึ่งมีส่วนประกอบของใบมะขามเป็นยาหลักมีสรรพคุณในการช่วยบรรเทาอาการปวดตามกล้ามเนื้อ จึงนำใบมะขามสดมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน นำสารสกัดทั้งหมดมาศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP รวมถึงหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu การศึกษาพบว่า การสกัดใบมะขามด้วยน้ำให้สารสกัดมากที่สุด (ร้อยละ 5.857) สารสกัดของใบมะขามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดด้วยวิธี DPPH คือ สารสกัดเอทานอล 70%ของใบมะขาม ($EC_{50} \pm SEM = 13.42 \pm 0.54 \mu g/ml$) ซึ่งพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารมาตรฐาน สารสกัดของใบมะขามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดด้วยวิธี FRAP คือ สารสกัดเอทานอล 95% (FRAP value = $203.42 \pm 0.64 mgFe^{2+}/gextract$ และ TEAC value = $95.78 \pm 0.28 mgTrolox/gextract$) และสารสกัดเอทานอล 70% ของใบมะขามมีปริมาณของสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุด ($136.64 \pm 3.55 mg GAE/gextract$) จากการศึกษาพบว่าการสกัดใบมะขามด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณฟีนอลิกรวม อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาฤทธิ์อื่น ๆ เพิ่มเติมรวมถึงการศึกษาทางคลินิกต่อไป

คำสำคัญ: สารสกัดใบมะขามสด ต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

Study of Antioxidant activity of *Tamarindus indica* L. leaves water and ethanolic extracts

Tanticha Chalotan^{1*} Sanjai Sangvichien¹ Supalak Fakkham¹ Kriyapa Lairungruang²
Phiyannuch Thimkorn² Jame Phungphol³

¹Applied Thai Traditional Medicine, Graduate School, SuanSunandha Rajabhat University

²Abhaibhubejhr College of Thai Traditional Medicine Prachinburi, Faculty of Public Health and
Allied Health Sciences, Praboromarajchanok Institute, Ministry of Public Health

³Kanchanabhishek Institute of Medical and Public Health Technology, Praboromarajchanok
Institute

*Corresponding Author E-mail: tchalotan@gmail.com

Abstract

A study of the antioxidant activity of *Tamarindus indica* L. (Tamarind) leaves with distilled water, 70% ethanol and 95% Ethanol extract were a study to control and develop a tamarind oil formula of Abhaibhubejhr College of Traditional Medicine Prachinburi which contains tamarind leaves as the main drug to muscle pain relief. The results revealed distilled water extract to have the highest extraction yield of extract (w/w) (5.857). The 70% Ethanol extract from Tamarind fresh leaves extraction determined the antioxidant activity by DPPH radical scavenging activity method had higher antioxidant activity than other extraction methods ($EC_{50} = 13.42 \pm 0.54 \mu\text{g/ml}$). The Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of tamarind fresh leaves extract with 95% ethanol has higher antioxidant activity than other extraction methods (FRAP value = $203.42 \pm 0.64 \text{ mgFe}^{2+}/\text{g extract}$ and TEAC value = $95.78 \pm 0.28 \text{ mgTrolox/g extract}$). And total phenolic contents, it was found that the extract with 70% ethanol had the highest total polyphenolic contents ($136.64 \pm 3.55 \text{ mg GAE/g extract}$). The follow-up study, nevertheless, should be emphasized other effects including further clinical studies.

Keywords: *Tamarindus indica* L. leaves extract, Antioxidant, Antioxidant assays

บทนำ

วิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี เป็นอีกหนึ่งหน่วยงานที่ได้มีการนำเอาความรู้ทางด้านการแพทย์แผนไทยประยุกต์มาใช้ในการจัดการเรียนการสอนมาอย่างยาวนานมากกว่าสิบปี รวมถึงมีการให้บริการผู้ป่วยทางการแพทย์แผนไทย โดยผู้ป่วยที่มาเข้ารับการรักษาส่วนใหญ่เป็นกลุ่มโรคทางกล้ามเนื้อ จะได้รับการบำบัดและรักษาด้วยหัตถการและยาสมุนไพรต่าง ๆ ตามอาการของผู้ป่วยแต่ละรายหนึ่งในหัตถการที่ค่อนข้างเป็นที่นิยมอย่างการนวดน้ำมันนั้น ทางวิทยาลัยฯ ได้มีการคิดค้นสูตรตำรับน้ำมันสำหรับการบรรเทาอาการต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับผู้ป่วยขึ้นมาโดยเฉพาะ อาทิ น้ำมันกระดุกไก่อดำ น้ำมันหญ้าขี้ฉอดมอน เป็นต้น ซึ่งแต่ละตำรับก็จะมีสรรพคุณเด่นแตกต่างกันไปตำรับน้ำมันมะขาม เป็นหนึ่งในตำรับยาน้ำมันที่มีการใช้ในการบำบัดและรักษาผู้ป่วยที่มาใช้บริการ มาอย่างยาวนานเป็นตำรับยาน้ำมันที่ผสมผสานศาสตร์จากอายุรเวทอินเดียกับศาสตร์การแพทย์แผนไทย ซึ่งมีสรรพคุณเด่นในการคลายกล้ามเนื้อและบรรเทาอาการปวดตึงกล้ามเนื้อจากการใช้งานหรืออาการที่เป็นอยู่ โดยมีส่วนผสมหลักคือ ใบมะขามสด ร่วมกับตัวยาอื่น ๆ ในตำรับอีกหลากหลาย จากการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับใบมะขาม พบว่าใบมะขามมีสารสำคัญกลุ่ม essential oils, fatty acids, polyphenols, flavonoids และแร่ธาตุต่าง ๆ⁽¹⁾ มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย⁽²⁾ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ⁽³⁾ และฤทธิ์ในการปกป้องตับ⁽⁴⁾ โดยได้มีการศึกษาจากสารสกัดจากใบมะขามแห้งด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ รวมถึงการทดลองในหนู โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบและให้สารสกัดโดยการรับประทานสารสกัดขนาดต่าง ๆ⁽⁵⁾ แต่ยังไม่พบข้อมูลการเปรียบเทียบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของใบมะขามสดเมื่อสกัดใบมะขามสดด้วยน้ำ เอทานอล 70% และเอทานอล 95%

ผู้วิจัยจึงมีความต้องการในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบมะขามด้วยน้ำการสกัดด้วยเอทานอล 70% และ เอทานอล 95% โดยสารสกัดน้ำจะได้จากการคั้นสด เพื่อเลียนแบบกระบวนการทำน้ำมันมะขามให้มากที่สุด และใช้วิธีการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH, วิธี FRAP และการหาปริมาณของสารฟีนอลรวม (total phenolic contents) เพื่อนำผลที่ได้จากการศึกษามาพัฒนาคุณภาพตำรับยาน้ำมันมะขามของวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในใบมะขามสด และเปรียบเทียบการต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากจากสารสกัดใบมะขามสดด้วยน้ำ เอทานอล 70% และ เอทานอล 95% โดยใช้การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และการหาปริมาณ total phenolic contents

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัตถุดิบ

ใบมะขามใบย่อยรูปขอบขนานขนาดเล็ก สีเขียวแก่ จากต้นมะขามที่มีการตรวจสอบข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tamarindus indica* L. เก็บจากต้นมะขามบริเวณหน้าโรงงานยา วิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี โดยการตัดกิ่ง แล้วนำมารูดใบย่อยไปทำความสะอาด จากนั้นนำใบมะขามสดมาสกัดด้วยน้ำ เอทานอล 70% และ เอทานอล 95%

2. การสกัดใบมะขามสดด้วยน้ำ

นำตัวอย่างใบมะขามสด 150 กรัมมาปั่นกับน้ำในอัตราส่วน 1:3 (ตัวทำละลาย 450 ml) แล้วนำไปกรองด้วยกรวยกรองแก้ว (funnel glass) ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 1 คืนด้วยเครื่อง Freeze Dryer (Martin Christ, Germany) ซึ่งเก็บสารสกัดที่ได้ เพื่อนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไปคำนวณหาปริมาณของสารสกัด (%yield)

3. การเตรียมสารสกัดตัวอย่างใบมะขามสดโดยวิธี Maceration

นำตัวอย่างใบมะขาม 150 g ใส่ในขวดลูกขมพู่ ขนาด 1,000 ml แล้วเติมตัวทำละลายเอทานอล 70% ในอัตราส่วน 1 : 3 (ตัวทำละลาย 450 ml) แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน นำสารสกัดที่ได้ไปกรองด้วยกรวยกรองแก้ว (funnel glass) ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำไประเหยแห้ง โดยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator; Senco, India) ที่อุณหภูมิ 45°C นำสารสกัดที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 45°C จนน้ำหนักคงที่ ซึ่งเก็บสารสกัดที่ได้ เพื่อนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไปทำซ้ำอีก 2 ครั้งและคำนวณหาปริมาณสารสกัด (%yield) จากสูตรเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -20°C ทำวิธีเดียวกันนี้โดยเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นเอทานอล 95%

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เตรียมสารละลาย DPPH ชั่ง DPPH ใส่ Weighing boat 1.2 mg ใช้ Dropper หยด Absolute ethanol แล้วค่อย ๆ ชะ DPPH จาก Weighing boat ลงใน Volumetric flask ปรับปริมาตรด้วย ให้ได้ปริมาตร 50 ml แล้วห่อด้วย Foil นำไปแช่ตู้เย็นที่ 4°C ชั่ง BHT (Positive control) 10 mg ใส่ใน Centrifuge tube ขนาด 15 ml ละลายด้วย Absolute ethanol (เตรียมที่ความเข้มข้น 1 mg/ml) เตรียมสารสกัด 10 mg ที่ความเข้มข้น 100, 50, 10 และ 1 µg/ml นำสารสกัดที่เตรียมไว้มาใส่ตัวทำละลาย และเติมสารละลาย DPPH ใน 96-well plate flat, bottom (Costar Corning, USA) แล้วห่อกระดาษฟอยล์แล้วตั้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง Microplate Reader (Thermo Scientific, Finland) ที่ความยาวคลื่น 517 nm ทำการทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนตัวทำละลายคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามสมการ

$$\%inhibition = \frac{OD_{control} - OD_{sample}}{OD_{control}} \times 100$$

เมื่อ $OD_{control}$ คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารควบคุม - Blank_{control}

OD_{sample} คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง - Blank_{sample}

จากนั้นนำค่า %inhibition มาคำนวณค่า EC_{50} โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 9.3.1 ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM (N=3)

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

เตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสมสารละลาย 300mM acetate buffer pH 3.6 (A) เตรียมสารละลาย 20mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (B) เตรียมสารละลาย 10mM TPTZ ใน 40mM HCl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและหลีกเลี่ยงการสัมผัสแสง (C) เตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยการผสม A B และ C อัตราส่วน 10 : 1 : 1 ตามลำดับ โดยเตรียมแล้วใช้ทันที เตรียมสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml ในตัวทำละลายต่างๆ สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน โดยละลาย Trolox ด้วย Absolute Ethanol และเจือจางให้ได้เป็น 6 ความเข้มข้น คือ 5, 25, 50, 100, 200 และ 300 µg/ml ตามลำดับใช้ $Fe(II)$ sulfate heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) เป็นสารมาตรฐานโดยละลาย $Fe(II)$ sulfate heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ด้วยน้ำกลั่นและเจือจางให้ได้เป็น 6 ความเข้มข้น คือ 5, 25, 50, 100, 200 และ 300 µg/ml ตามลำดับ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของ $FeSO_4$ และ Trolox หาค่าที่ต้องการจะทดสอบลงใน 96-well plate flat, bottom (Costar Corning, USA) เตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยการนำ A B และ C มาผสมกันในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 นาที แล้วนำไปเติมลงใน 96-well plate flat, bottom (Costar Corning, USA) ที่มีสารที่ต้องการทดสอบอยู่ ตั้งทิ้งไว้ 8 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593nm (n=3) โดยเครื่อง Microplate Reader (Thermo Scientific, Finland) คำนวณค่าการดูดกลืนแสงจากสมการ

$$\text{Absorbance} = A - B - C$$

เมื่อ A = Sample B = Blank C = Control

นำไปคำนวณค่าความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (FRAP Value) โดยเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ (FeSO₄·7H₂O) และค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่วิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox (Trolox equivalent capacity) (TEAC) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (N=3)

6. การหาปริมาณของสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic contents)

เตรียมสารละลาย Folin – Ciocalteu’s reagent ใช้ Autopipette(FOUR E’S Scientific, China) 100-1,000 μ l ตูดสารละลาย Folin – Ciocalteu’s reagent มา 5 ml ใส่ใน Volume flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 ml แล้วนำไปทอพออยล์เก็บในตู้เย็นซึ่ง Na₂CO₃ 3.75 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 ml สร้างกราฟมาตรฐาน Gallic acidเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid โดยละลายกับ Absolute Ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml นำไปเจือจางให้ได้เป็น 7 ความเข้มข้น คือ 5, 10, 25, 50, 100, 250 และ 500 μ g/ml สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานหาค่าการดูดกลืนแสงที่ต้องการจะทดสอบลงใน 96-well plate flat, bottom(Costar Corning, USA) 20 μ L หยตสารละลาย Folin – Ciocalteu’s reagent 100 μ L หยตสารละลาย Na₂CO₃ 80 μ L หยตนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765nm (n=3) โดยเครื่อง Microplate Reader(Thermo Scientific, Finland) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณรวมของสารฟีนอลิกโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (mg GAE/g crude extract) (Gallic acid)⁽⁶⁾ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (N=3)

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่วิเคราะห์ได้จากวิธีการต่าง ๆ โดยแสดงออกมาในรูปแบบ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 9.3.1

ผลการศึกษา

1. ปริมาณสารสกัด

ปริมาณสารสกัดที่ได้จากการคำนวณ (%Yield) พบว่า สกัดใบมะขามสดด้วยน้ำมีปริมาณของสารสกัดมากที่สุด (ร้อยละ 5.857) รองลงมาคือเอทานอล 95%(ร้อยละ 3.794)และเอทานอล 70%(ร้อยละ 3.651) ตามลำดับดังตารางที่ 1

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPHพบว่าสารสกัดของใบมะขามสดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดด้วยวิธี DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 nm คือ สารสกัดด้วยเอทานอล 70%ของใบมะขาม (EC₅₀ $\pm$ SEM = 13.42 $\pm$ 0.54 μ g/ml) ตามมาด้วย สารสกัดด้วยเอทานอล 95% (EC₅₀ $\pm$ SEM = 25.77 $\pm$ 0.42 μ g/ml) สารสกัดด้วยน้ำ (EC₅₀ $\pm$ SEM = 28.56 $\pm$ 2.29 μ g/ml) และสารมาตรฐาน BHT (EC₅₀ เท่ากับ 18.13 $\pm$ 0.54 μ g/ml) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสกัดด้วยเอทานอล 70%ดังผลการศึกษาในตารางที่ 2

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีFRAP

ผลการศึกษาในตารางที่ 2 แสดงค่าการคำนวณค่าความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (FRAP Value) ได้จากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Ferrous sulfate (FeSO₄) สมการ $y = 0.0041x + 0.0696$, R² = 0.9996 ดังรูปที่ 1 จากการศึกษาพบว่าสารสกัดด้วย 95% Ethanol มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่า FRAP value เท่ากับ 203.42 $\pm$ 0.64mgFe²⁺/g extract รองลงมาคือ สารสกัดเอทานอล70% และสารสกัดด้วยน้ำ มีค่า FRAP เท่ากับ 183.06 $\pm$ 2.77 และ 134.06 $\pm$ 2.58mgFe²⁺/g extract ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ค่า TEACคำนวณ

ค่าจากกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ในสมการ $y = 0.0093x + 0.0129$, $R^2 = 0.9997$ ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 2 พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอล 95% มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่า TEAC เท่ากับ $95.78 \pm 0.28 \text{ mgTrolox/gextract}$ รองลงมาคือ สารสกัดเอทานอล 70% และสารสกัดด้วยน้ำ มีค่า TEAC เท่ากับ 86.80 ± 1.22 และ $65.20 \pm 1.14 \text{ mgFe}^{2+}/\text{g extract}$ ตามลำดับสารมาตรฐาน BHT มีค่า FRAP เท่ากับ $390.51 \pm 5.80 \text{ mgFe}^{2+}/\text{g extract}$ และ TEAC เท่ากับ $178.26 \pm 2.56 \text{ mgTrolox/gextract}$ ซึ่งมากกว่าสารสกัดจากใบมะขามสด

4. การหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิก (Total phenolic contents)

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin – Ciocalteu ในตารางที่ 2 และภาพที่ 3 จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0045x + 0.0466$, $R^2 = 0.9997$ ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid พบว่า สารสกัดเอทานอล 70% ของใบมะขามมีปริมาณของสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดเอทานอล 95% และสารสกัดด้วยน้ำ โดยมีปริมาณของสารฟีนอลิก 136.64 ± 3.5 , 136.64 ± 3.55 และ $65.40 \pm 1.05 \text{ mg GAE/gextract}$ ตามลำดับ

อภิปรายผล

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin – Ciocalteu พบว่า สารสกัดของใบมะขามสดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดและมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุดคือ สารสกัดด้วยเอทานอล 70% รองลงมาคือ สารสกัดด้วยเอทานอล 70% และสารสกัดด้วยน้ำ การวิเคราะห์หาค่า FRAP พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอล 95% รองลงมาคือ สารสกัดด้วยเอทานอล 95% และสารสกัดด้วยน้ำ จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ สอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในใบมะขามแห้งและเมล็ดด้วยวิธี DPPH โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลพบว่า มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดน้ำ IC_{50} values of 301.83 and 346.63 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และมีค่า FRAP เท่ากับ 0.76 ± 0.08 และ $0.33 \pm 0.03 \text{ mgFe}^{2+}/\text{g}$ โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ตามลำดับ⁽⁷⁾ ซึ่งอาจเกิดจากสารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดมีสารกลุ่มอื่นนอกจากกลุ่มฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้เช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาพิษเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระของใบมะขามโดยการนำ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลายในการสกัดใบมะขามแห้ง พบว่า ในใบมะขามมีสารกลุ่ม Saponins, Steroids และ Flavonoids⁽⁸⁾ ซึ่งเป็นสารกลุ่ม alkaloids มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ที่มักถูกนำมาใช้เป็นยาหลายประเภท และเป็นสารที่พบมากในพืชสมุนไพร เช่น ยาในกลุ่มระงับอาการปวด/ชาเฉพาะที่ เป็นต้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกตัวทำละลายเป็นน้ำและเอทานอล เนื่องจากในกระบวนการผลิตน้ำมันมะขามใช้การคั้นใบมะขามสดกับน้ำเปล่า และกรองเอาสารสกัดที่ได้ไปผสมกับตัวยานอื่น ๆ ก่อนจะเคี่ยวจนได้ตัวยามา นอกจากนี้ตัวทำละลายเอทานอลและน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกัน และสารสำคัญในใบมะขามมีกลุ่ม phenolic และสารอื่นๆที่ละลายได้ดีในเอทานอล เอทานอล เอธิลอะซิเตต และตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ เช่น เฮกเซน อะซิโตน คลอโรฟอร์ม ปีโตรเลียม อีเทอร์ หรือคาร์บอนเตตระคลอไรด์⁽⁹⁾ โดยเอทานอลเป็นตัวทำละลายกึ่งมีขั้วจึงสกัดสารได้หลากหลายชนิด และน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วจะสกัดได้สารที่มีขั้วออกมา จึงอาจส่งผลให้สกัดสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระออกมา ทำให้การสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าน้ำ และเลือกใช้สารละลายมาตรฐาน BHT เป็นตัวเปรียบเทียบเนื่องจากเป็นสารประกอบฟีนอล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และมีความเสถียรค่อนข้างมาก

ในทดสอบฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ อาศัย 3 กลไก⁽¹⁰⁾ คือ 1) การกำจัดอนุมูลอิสระโดยตรง (free radical scavenger) 2) การกำจัดออกซิเจน (oxygen scavenger) เป็นกลไกที่จะยับยั้งอนุมูลอิสระโดยทำปฏิกิริยากับซิงเกิลทออกซิเจน (singlet oxygen; $^1\text{O}_2$) ในสารละลาย 3) สารคีเลต (chelating agents) เป็นกลไกที่จะยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการกำจัดไอออนโลหะที่เป็นปัจจัยให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน พบว่า Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นโลหะ จึงได้เลือกใช้วิธีการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH, ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระ

ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และการหาปริมาณของสารฟีนอลรวม(total phenolic contents) ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH นั้น เป็นวิธีเบื้องต้นที่นิยมใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งทำปฏิกิริยาในตัวกลางสารอินทรีย์ เนื่องจาก DPPH เป็นอนุมูลอิสระไนโตรเจนอะตอมที่มีสีม่วงค่อนข้างมีความเสถียร และอยู่ในรูปของอนุมูลแล้ว ทำให้ไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลอิสระ⁽¹¹⁾ การทดสอบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+} -TPTZ (Ferric tripyridyltriazine) $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ เป็น Fe^{2+} -TPTZ (Ferrous tripyridyltriazine) $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ จากการทดลองทั้ง 2 วิธีพบว่าสารสกัดที่ให้ไฮโดรเจนอะตอมในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี คือ สารสกัดด้วยเอทานอล 70% ซึ่งเมื่อเทียบกับการทดสอบด้วย FRAP assay นั้นสารที่สกัดด้วยเอทานอล 70% มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระไม่ดีเท่าเอทานอล 95% แต่ยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่น และการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดด้วยเอทานอล 70% มีค่ามากที่สุด ซึ่งคาดว่าจะสอดคล้องกับพิษทางเคมีของใบมะขามซึ่งมีสารประกอบฟีนอลิกในโครงสร้างซึ่งละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วจำพวกแอลกอฮอล์ได้ดี ทำให้เมื่อมีกลไกของสารอนุมูลอิสระมาดิ่งอิเล็กตรอนไปแต่ในโครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่น จึงเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (Delocalization) ทำให้โครงสร้างเสถียร สามารถแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้⁽¹²⁾

นอกจากนี้จากการทดลองทำให้ทราบว่าสารที่เตรียมมาสกัดใบมะขามสดด้วยวิธีการสกัดน้ำ สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระออกมาได้ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานที่ตั้งไว้ เพียงแต่มีปริมาณที่น้อยกว่า สารสกัดด้วยเอทานอล 70% และเอทานอล 95% แต่การสกัดด้วยน้ำให้ปริมาณสารออกมามากที่สุด ซึ่งคาดว่าสาร flavonoid C-glycosides น่าจะเป็นสารที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ⁽¹³⁾

ข้อสรุป

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากจากสารสกัดใบมะขามสดด้วยการสกัดด้วยเอทานอล 70% เอทานอล 95% และน้ำ ผ่านการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH, FRAP และการหาปริมาณ total phenolic contents นั้น ทำให้ทราบว่าสารสกัดใบมะขามสดด้วยน้ำให้สารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระปริมาณมากแต่การสกัดด้วยเอทานอลให้สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าการสกัดด้วยน้ำ ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในกระบวนการเตรียมน้ำมันสามารถใช้ในการสกัดทั้ง 2 วิธีได้ ในการเลือกใช้อาจจะคำนึงถึงต้นทุนในการผลิตด้วย และควรนำไปศึกษาต่อ โดยการศึกษาสมุนไพรอื่น ๆ ในตำรับและตำรับน้ำมันมะขามร่วมด้วย รวมถึงการศึกษาฤทธิ์อื่น ๆ เช่น ฤทธิ์การต้านการอักเสบ และการศึกษาทางคลินิก เพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการพัฒนายา หรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ จากใบมะขามสดต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้อย่างสมบูรณ์ ต้องขอขอบคุณทางห้องปฏิบัติการวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยุเบศร จังหวัดปราจีนบุรี และห้องปฏิบัติการวิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุข กาญจนภิเษก (นนทบุรี) ที่ให้ความช่วยเหลือและเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทดลอง

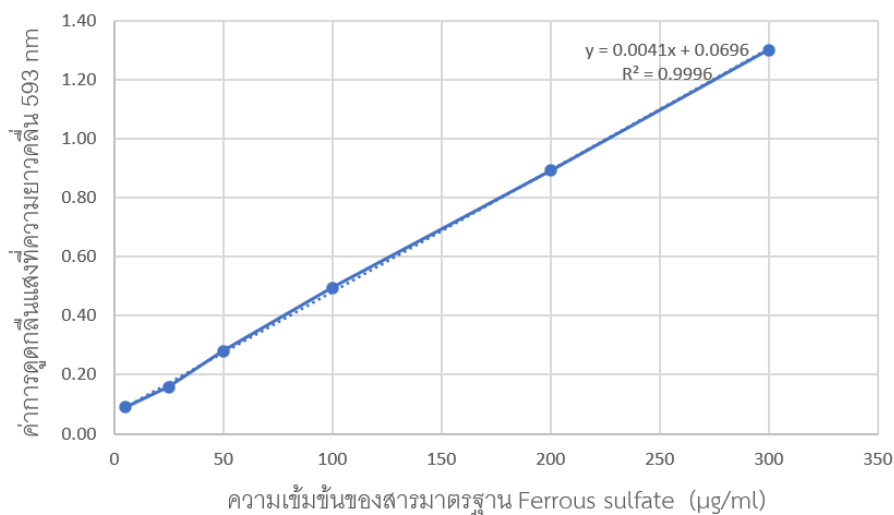
ตาราง ภาพ และแผนภาพ

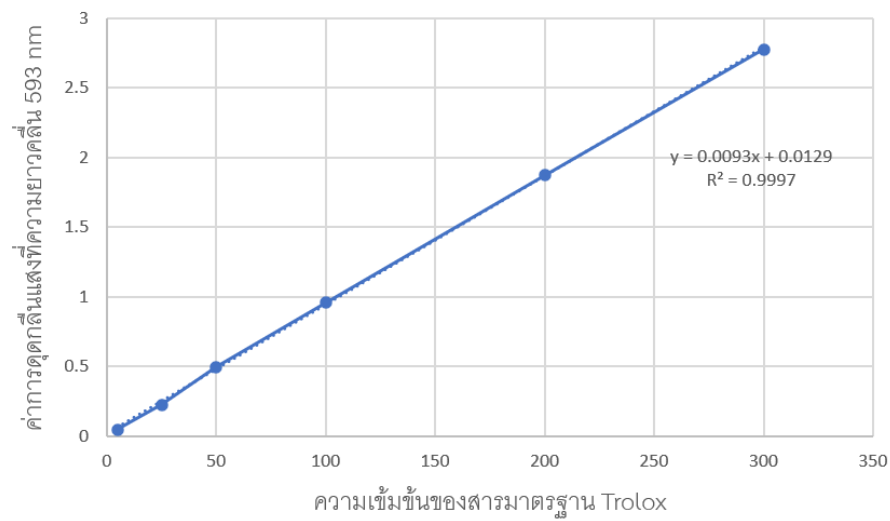
ตารางที่ 1 ร้อยละของสารสกัดใบมะขาม (%yield) ของสารสกัดใบมะขามด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ตัวทำละลาย	น้ำหนักของ ใบมะขาม (กรัม)	น้ำหนักของ สารสกัดหยาบ (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (%yield (w/w))
เอทานอล 95%	150	5.6910	3.794
เอทานอล 70%	150	5.4766	3.651
Distilled water	150	8.7862	5.857

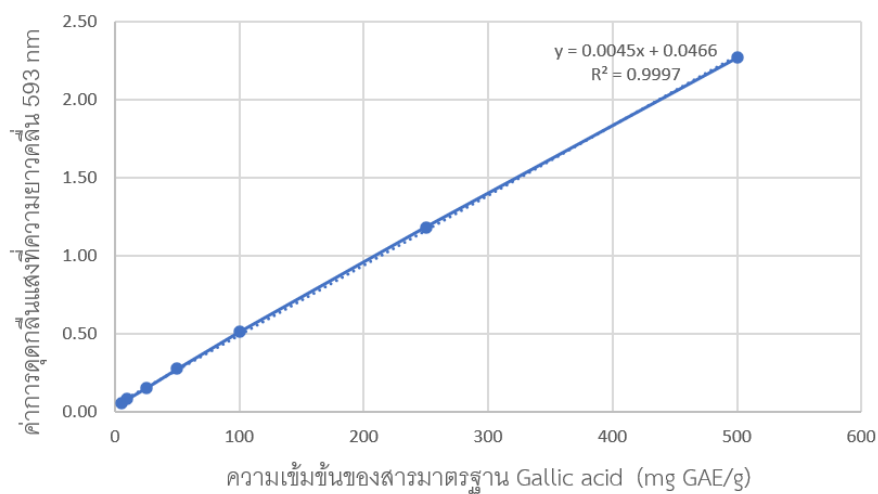
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีต่างๆ และปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวม ของสารสกัดใบมะขามด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ

Extract	ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธีต่างๆ			ปริมาณของ สารประกอบ ฟีนอลิกรวม ±SEM (mg GAE/g)
	EC ₅₀ of DPPH±SEM (µg/ml)	TEAC value of FRAP±SEM(mgTrolox/g)	FRAP value±SEM (mgFe ²⁺ /g)	
เอทานอล 95%	25.77±0.42	95.78±0.28	203.42±0.64	112.50±3.36
เอทานอล 70%	13.42±0.54	86.80±1.22	183.06±2.77	136.64±3.55
Distilled water	28.56±2.29	65.20±1.14	134.06±2.58	65.40±1.05
BHT	18.13±0.54	178.26±2.56	390.51±5.80	315.61±3.51

ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Ferrous sulfate (FeSO₄) (µg Fe²⁺ equivalent/g sample extract) ที่ความยาวคลื่น 593 nm



ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Trolox ที่ความยาวคลื่น 593 nm (µg/ml)



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความยาวคลื่น 765nm (µg/ml)

เอกสารอ้างอิง

1. Escalona-Arranz JC, et al. (2010). Antimicrobial activity of extracts from *Tamarindus indica* L. leaves. **Pharmacogn Magazine**. 6(23), 242-7.
2. Salihu Abdallah M. (2018). Antibacterial activity of leaves and fruits extract of *Tamarindus indica* against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Shigella* at potiskum yobe state, Nigeria. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care (AJPRHC)**, 7(5), 606-609.
3. RazaliN, et al. (2012). Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics from the leaves, seeds, veins and skins of *Tamarindus indica* L. **Food Chemistry**, 131(2), 441-448.
4. SinhaBP, et al. (2019). Efficacy evaluation of ethanolic extract of *Tamarindus indica* L. leaves as possible alternate therapy in septic arthritis model of rabbit. **BMC Complementary Alternative Medicine**. 19(1). 261.
5. Rodriguez AmadoJR, et al. (2016). Antioxidant and Hepatoprotective Activity of a New Tablets Formulation from *Tamarindus indica* L. **Evidence - Based Complementary Alternative Medicine**. 3918219.
6. Habila JD, et al. (2009). Total phenolics and antioxidant activity of *Tridax procumbens* Linn. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 4.
7. MeherB and Dash D. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of *Tamarindus indica* L. **International Journal of Phytomedicine**. 5, 322-329.
8. Dahiru M, et al.(2023). Phytochemical Analysis and Antioxidant Potential of Ethylacetate extract of *Tamarindus indica* (Tamarind) Leaves by Frap Assay. **Fundamental and Applied Pharmaceutical Science**. 3(2), 45-53.
9. RamamoorthyP and Bono A. (2007). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. **Journal of Engineering Science and Technology**. 2.
10. Embuscado ME. (2015). Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**. 18, 811-819.
11. บุหรีน พันธุ์สุวรรณ. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. 21(3), 275-286.
12. Pietta PG. (2000). Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. 63(7), 1035-1042.
13. Bhatia VK, et al. (1966). C-glycosides of tamarind leaves. **Phytochemistry**. 5(1), 177-181.