สารพฤกษเคมี สารอาหาร และฤทธิ์ทางชีวภาพของผลหูกวาง

Phytochemicals, Nutrients and Biological Activities of *Terminalia catappa* Linn. Fruits

บุษราคัม สิงห์ชัย[1*] ชนิกา ประเสริฐกุล[1] พนิดา กิ่งน้ำฉ่า[1] สุภาพร สมร[1]และ ชนิดา ศรีสาคร[2]

Butsarakham Singchai[1*], Chanika Prasertkul[1], Panida Kingnamcha[1], Supaporn Smorn[1] and Chanida Srisakorn[2]

[1]สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ต. นาวุ้ง อ.เมือง จ.เพชรบุรี 76000

[2]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ต. นาวุ้ง อ.เมือง จ.เพชรบุรี 76000

[1] Division of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Phetchaburi Rajabhat University, Nawung Subdistrict, Mueang District, Phetchaburi Province, 76000

[2] Faculty of Science and Technology, Phetchaburi Rajabhat University, Nawung Subdistrict, Mueang District, Phetchaburi Province, 76000

*Corresponding author; E-mail: sbung13@yahoo.com

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้น สารอาหารและฤทธิ์ทางชีวภาพของผลหูกวาง ได้แก่ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยเก็บผลหูกวางจากตำบลนาวุ้ง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี ในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2559 เมล็ดของผลหูกวาง และเนื้อผลหูกวางตากแห้งแล้วบดละเอียดสกัดด้วยเมทานอล นำไปศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นดังนี้ แอลคาลอยด์ทดสอบด้วยรีเอเจนต์ดราเจนดรอร์ฟ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ทดสอบด้วย รีเอเจนต์ลิเบอร์มานน์-เบอร์ชาร์ด เคดเด และเคลเลอร์-คิเลียน์ ส่วนฟลาโวนอยด์ทดสอบด้วยวิธีไซยานิน และ ลิวโคแอนโทไซยานิน ซาโปนินทดสอบการเกิดโฟม แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ ทดสอบด้วยปฏิกิริยาบอร์นแทรกเกอร์ สำหรับแทนนิน คูมาริน น้ำตาลรีดิวส์ และโปรตีนทดสอบด้วยรีเอเจนต์เฟอร์ริกคลอไรด์ แอลคาไลน์ เบเนดิกส์ และนินไฮดริน ตามลำดับ การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัด ทดสอบด้วยวิธี DPPH โดยมีวิตามินซีเป็นสารควบคุมเชิงบวก และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (vero cell) ของสารสกัดด้วยวิธี Green Fluorescent Protein (GFP) โดยมี อิลิปติซีนเป็นสารควบคุมเชิงบวก ส่วนการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของพืชสด ได้แก่ความชื้น ไขมัน โปรตีน เส้นใย เถ้า ด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC, 1990 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลได้แก่ค่าเฉลี่ย ร้อยละ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และการวิเคราะห์ One-way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ผลการทดลองพบว่าสารสกัดเมล็ดและเนื้อผลประกอบด้วยสารกลุ่มแทนนิน น้ำตาลรีดิวส์และโปรตีน เป็นองค์ประกอบ เมล็ดของผลหูกวางประกอบด้วยโปรตีนปริมาณมากที่สุดร้อยละ 25.03 ± 0.60 รองลงมาได้แก่คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ความชื้น และเส้นใย 23.42 ± 0.28 20.94 ± 0.08 13.57 ± 0.01 และ13.21 ± 0.68 ตามลำดับ ส่วนปริมาณเถ้าน้อยที่สุด

ร้อยละ 3.83 ± 0.01 ส่วนเนื้อผลมีปริมาณความชื้นมากที่สุดร้อยละ 36.77 ± 0.01 รองลงมาได้แก่คาร์โบไฮเดรต โปรตีน เส้นใย และไขมันร้อยละ 18.54 ± 0.08 18.13 ± 0.32 14.66 ± 0.42 และ 6.10 ± 0.09 ตามลำดับ ส่วนปริมาณเถ้าน้อยที่สุดร้อยละ 5.80 สารสกัดเมล็ดและเนื้อผลแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 4.17 ± 0.10 และ 8.00 ± 0.67 µg/ml ตามลำดับ สารสกัดทั้งสองชนิดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml

คำสำคัญ: หูกวาง สารพฤกษเคมี สารอาหาร

Abstract

The purposes of this research were to study preliminary phytochemicals, nutrients and biological activities of *Terminalia catappa* L. fruits including their antioxidation and cytotoxicity. The fruits were harvested from, Nawung Sub-district, Mueang District, Phetchaburi Province in June 2016. Dried and ground samples were successively extracted with methanol. The phytochemicals of methanolic crude extracts were studied as follows: alkaloids tested by Dragendorff method. Cardioglycosides were tested by three methods which consisted of Liebermann-Burchard, Kedde's reagent and Keller-Kiliane tests. Flavonoids were tested by Cyanidin and Leucoanthocyanin standard tests. Foam test and Borntrager reaction were used for testing saponin and anthraquinone glycosides, respectively. Tannins, coumarins, reducing sugar and proteins were tested by ferric chloride, alkaline, Benedict's reagent and Ninhydrin tests, respectively. The DPPH method was used for antioxidant study by using vitamin C as a positive control and detected at 515 nm. The cytotoxicity test (Vero cell) was determined by Green Fluorescent Protein (GFP) technique, which ellipticine was used as positive control. The evaluations of the nutrition of fresh samples, including analyses of moisture, fat, protein, fiber, and ash were studied by using standard methods, AOAC, 1990. The data were analyzed to evaluate mean, percentage, standard deviation and One-way ANOVA with Duncan test at 0.05 significant. The results were as follows seed and flesh of the fruit consisted of tannin, reduced sugar and protein. The protein percentage of seed part showed the highest amount 25.03 ± 0.60 and percentages of carbohydrates, fat, moisture and fiber were determined as 23.42 ± 0.28, 20.94 ± 0.08, 13.57 ± 0.01 and 13.21 ± 0.68, respectively. The lowest percentage of nutrient in the seed was ash of 3.83 ± 0.01. The highest amount nutrient composition of flesh was showed the moisture percentage as 36.77 ± 0.09; following percentages of carbohydrates, protein, fiber and fat were 18.54 ± 0.08, 18.13 ±

0.32, 14.66 ± 0.42 and 6.10 ± 0.09, respectively. Ash percentage was determined in minimal portion, 5.80 ± 0.28. Methanolic extracts showed antioxidant activities with IC_{50} 4.17 ± 0.10 and 8.00 ± 0.67 µg/ml in seed and flesh parts, respectively. Both extracts have no cytotoxic property against Vero cell at 50 µg/ml.

Keywords: *Terminalia catappa*, phytochemicals, nutrients

บทนำ

หูกวาง (Figure 1.) เป็นไม้ยืนต้นสูงและขนาดใหญ่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย มีชื่อสามัญว่า Indian almond ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Terminalia catappa* Linn. อยู่ในวงศ์ Combretaceae มีชื่อท้องถิ่นที่เรียกแตกต่างกันไป เช่น ตาปัง (พิษณุโลก สตูล) โคน (นราธิวาส) หลุมปัง (สุราษฎร์ธานี) คัดมือ ตัดมือ (ตรัง) ตาแปห์ (มลายู-นราธิวาส) [1] ลักษณะใบเป็นแบบใบเดี่ยวรูปไข่กลับ ขนาดใหญ่ สีเขียว ออกเรียงเวียนสลับกันเป็นกระจุกหนาแน่นบริเวณปลายกิ่ง ปลายใบแหลมเป็นติ่งสั้นๆ เนื้อใบหนา ใบอ่อนเป็นสีเขียวอ่อน เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นเขียวเข้ม แล้วจะเปลี่ยนเป็นสีส้มแดงเมื่อใกล้ร่วงหรือผลัดใบ ผลัดใบในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน เปลือกและผลมีรสฝาดมาก ใช้แก้ท้องเสีย ย้อมหนังสัตว์ ผลเป็นผลเดี่ยวในแต่ละผลมีเมล็ด 1 เมล็ด ลักษณะของผลเป็นรูปทรงรีค่อนข้างแบนเล็กน้อย ผลแข็ง เมล็ด ลักษณะของเมล็ดเป็นรูปไข่หรือรูปรี แบนป้อมเล็กน้อยคล้ายกับผล เมื่อเมล็ดแห้งจะเป็นสีน้ำตาล แข็ง ภายในมีเนื้อมาก สรรพคุณทางยาลำต้นใช้เป็นยาแก้ไข้ แก้ท้องร่วง ยาระบาย ยาสมาน โรคคุดทะราดขับน้ำนมของสตรี ใบเป็นยาขับเหงื่อ แก้ต่อมทอนซิลอักเสบ ยาถ่ายพยาธิ รักษาโรคทางเดินอาหารและตับ รักษาโรคไขข้ออักเสบ ผลใช้เป็นยาถ่าย เมล็ดเป็นยาแก้ขัดเบา แก้นิ่ว และรักษาโรคเรื้อน [1] รวมไปถึงมีรายงานทางด้านคุณค่าอาหารซึ่งพบว่าเมล็ดของผลหูกวางมีคุณค่าทางอาหารสูง [2]

หูกวางได้ถูกนำมาวิจัยในหลายด้าน เช่น การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบหูกวาง [3] และผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำและการยับยั้งแบคทีเรียในน้ำ [3] ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากัดและความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางต่อปลากัด [4] การลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดใบหูกวาง [5] ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบหูกวางในการยับยั้งโรคแคงเกอร์มะนาว [6] การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันในเมล็ด หูกวาง [7] สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้สนใจศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้น คุณค่าทางโภชนาการ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและความเป็นพิษต่อเซลล์ ของผลหูกวางซึ่งได้แยกศึกษาเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วน เนื้อผล (Mesocarp) และเมล็ด (seed)

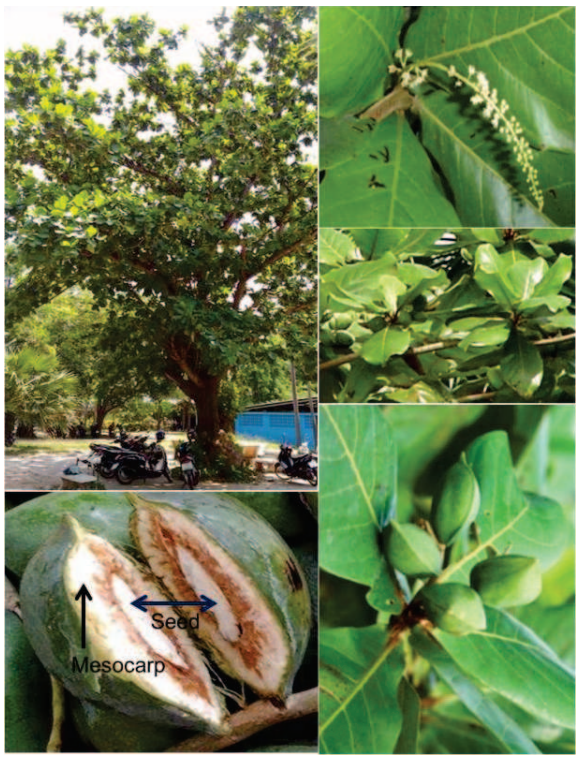

Figure 1. *Terminalia catappa* Linn., red and blue arrows indicate mesocarp and seed ,respectively.

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างพืช ตัวอย่างผลหูกวางสดโตเต็มที่ สีเขียว บนต้น ถูกเก็บในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ตำบลนาวุ้ง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี ในเดือนมิถุนายน 2559 พิสูจน์เอกลักษณ์พืชโดยนักพฤกษศาสตร์ (ดร.บุญสนอง ช่วยแก้ว) เก็บตัวอย่างพืชไว้ที่หน่วยวิจัยเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ผลหูกวางถูกแยก 2 เป็นส่วน (ส่วนเมล็ดและเนื้อผล) ส่วนเมล็ดนำไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการทันที ทั้งสองส่วนถูกนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพและทดสอบหาสารพฤกษเคมี โดยเริ่มต้นจากนำไปตากแห้งแล้วบดละเอียดหรือบดละเอียดแล้ว นำไปอบแห้งแล้วสกัดด้วยเมทานอล 3 วัน 3 ครั้ง หลังจากนั้นระเหยตัวทำละลายออก

2. การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นรวมทั้งหมด 9 กลุ่มสารอ้างอิงวิธีตามของ Nisar และคณะ [8] และ Harborne [9] ดังนี้

2.1 การทดสอบแอลคาลอยด์ นำสารสกัดมาเล็กน้อย 2 M กรดไฮโดรคลอริก (HCl) จำนวน 2 ml ต้มนาน 2 นาที จากนั้นนำส่วนใส 1 ml เติมรีเอเจนต์ดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff) 2 หยดสังเกตสี

2.2 การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ นำสารสกัดมาเล็กน้อยมาเติมด้วย 10 % lead (II) acetate ($Pb(OAc_2$ (aq)) ในน้ำ ต้มให้เดือดเบา ๆ 15 นาที ทำให้เย็น สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และนำสารละลายไดคลอโรมีเทนไประเหยจนเกือบแห้งทำให้เย็น แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด เพื่อทดสอบหาองค์ประกอบของคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ดังนี้ ทดสอบส่วนที่เป็นสเตียรอยด์ (steroid) ด้วยรีเอเจนต์ลิเบอร์มานน์-เบอร์ชาร์ด (Liebermann-Burchard reagent) นำสารละลายไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) หลอดที่ 1 มาระเหยจนเกือบแห้ง หยดด้วยสาร glacial acetic acid (CH_3COOH) ลงไปจำนวน 3 หยด เขย่าแล้วค่อย ๆ หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc.H_2SO_4) ลงไปตามข้าง ๆ หลอด 1 หยด สังเกตการณ์เปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง ทดสอบส่วนที่เป็นบิวทาโนไลด์แลคโทน (lactone butenolide) ทดสอบด้วยรีเอเจนต์เคดเด (Kedde's reagent) ระเหยสารละลายไดคลอโรมีเทน ในหลอดที่ 2 หยดรีเอเจนต์เคดเดลงไป 1 ml และสารละลาย 1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2-3 หยด สังเกตสี ทดสอบส่วนที่เป็นน้ำตาลดีออกซี (deoxy sugar) ทดสอบด้วยรีเอ

เจนต์เคลเลอร์-คิเลียน์ (Keller-Kiliane's reagent) เติมเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) 3 ml ลงในสารละลายไดคลอโรมีเทนในหลอดที่ 3 เขย่าให้เข้ากัน เอียงหลอดทดลองแล้วค่อย ๆ ริน กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 ml ไปตามข้าง ๆ หลอดสังเกตสีระหว่างรอยต่อและสารละลายชั้นบน

2.3 การทดสอบฟลาโวนอยด์ นำสารสกัดมาเล็กน้อยสกัดไขมันออกด้วยเฮกเซน 10 ml ดูดสารละลายเฮกเซนทิ้งไป นำสารละลายที่เหลือละลายด้วย 80 % เอทานอล 10 ml แบ่งใส่หลอดทดลอง 2 หลอด ดังนี้ 1) ทดสอบไซยานิน (Cyanidin test) นำสาร ละลายหลอดที่ 1 เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc.HCl) 0.5 ml และลวดแมกนีเซียม 1 แผ่น สังเกตการณ์เปลี่ยนสี และ 2) ทดสอบลิวโคแอนโท-ไซยานิน (Leucoanthocyanin test) นำหลอดที่ 2 มาเติม กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 ml อุ่นบนอ่างน้ำร้อน (Water bath) 5 นาที สังเกตสี

2.4 การทดสอบซาโปนินด้วยการทดสอบโฟม นำสารสกัดเล็กน้อยใส่ในหลอดทดลองเติมน้ำกลั่น 5 ml แล้วต้ม 5 นาที กรองขณะร้อนปล่อยให้เย็น เขย่าสารละลายที่ใส่อย่างแรง 1 นาที สังเกตผลนาน 30 นาที เติมกรดซัลฟิวริกเจือจาง (dil.H_2SO_4) 1 ml ลงในสารละลาย ต้มนาน 5 นาที ปล่อยให้เย็น เขย่าแรง ๆ 1 นาที บันทึกผล

2.5 การทดสอบแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ โดยนำสารสกัดมาเล็กน้อยใส่ในหลอดทดลอง เติม 10 % กรดไฮโดรคลอริก 5 ml แล้วต้ม 3 นาที นำไปสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน นำชั้นน้ำที่ได้เติม 10 % แอมโมเนีย (NH_3) สังเกตสีที่เกิดขึ้น

2.6 การทดสอบแทนนิน เติมสารสกัดเล็กน้อยในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 5 ml แล้วต้มบนอ่างน้ำร้อน 5 นาที กรองขณะร้อนนำสารละลายที่ได้ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วหยดเฟอร์ริกคลอไรด์ 3-4 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น

2.7 การทดสอบคูมาริน นำสารสกัดมาเล็กน้อยละลายในเอทานอลแล้วหยดลงบนกระดาษกรองที่ชื้นด้วยสารละลาย 1 M NaOH นำกระดาษให้ความร้อนโดยเป่าด้วยไดเป่าผมเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอุตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร และสังเกตการณ์เรืองแสงที่เกิดขึ้น

2.8 ทดสอบสเตียรอยด์ในพืชด้วยรีเอเจนต์ ลิเบอร์มานน์-เบอร์ชาร์ด (Liebermann-Burchard reagent) นำสารสกัดมาเล็กน้อยเติมกรดซัลฟิวริกเจือจาง 10 ml เขย่าให้เข้ากัน ต้ม 15 นาที สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ระเหยไดคลอโรมีเทนเกือบแห้งหยด glacial acetic acid 3 หยด เขย่าให้เข้ากันดี แล้วค่อย ๆ หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1-2 หยด ให้ไหลไปตามผนังชามกระเบื้องช้า ๆ สังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงไป

3. การวิเคราะห์สารอาหารจากผลหูกวางศึกษาที่ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ด้วยวิธีมาตรฐานของ The Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990) ที่อ้างถึงใน Mbah และคณะ [10] ได้แก่ การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใยและเถ้า สำหรับปริมาณคาร์โบไฮเดรต [8] คิดจากผลต่างของ 100 กับผลรวมร้อยละของโปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า ดังสูตรร้อยละคาร์โบไฮเดรตคิดจาก 100 – (ร้อยละความชื้น + ร้อยละโปรตีน + ร้อยละไขมัน + ร้อยละเส้นใย + ร้อยละเถ้า)

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัดด้วยวิธี DPPH ตามการศึกษาของบุษราคัม และคณะ [11] โดยการเติมสารละลาย 0.02 mM 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine (DPPH) 0.2 ml และสารสกัดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1250.000 µg/ml ในเมทานอล 0.1 ml และเมทานอล 3.7 ml ลงในหลอดทดลอง (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) บ่มในที่มืด 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (วิตามินซีเป็นสารมาตรฐานเชิงบวก) คำนวณค่าร้อยละการต้านออกซิเดชันจากสูตร

$$\text{DPPH scavenging (\%)} = ((A_0 - A_1)/ A_0) \times 100$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนของสารควบคุม

A_1 = ค่าการดูดกลืนของสารตัวอย่าง

หากสารสกัดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากกว่าร้อยละ 50 ทดสอบหาค่า IC_{50} โดยการเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ (125.000, 12.500, 1.250, 0.125, 0.012 และ0.001 µg/ml) คำนวณค่า IC_{50} จากการเทียบค่าในกราฟ ระหว่างความเข้มข้นและค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้สูตรเดียวกัน ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) และนำมาผลที่ได้มาวิเคราะห์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (±S.D.)

5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Vero cell) [12] วิธีทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนินการโดยติดฉลากโปรตีนเรืองแสงสีเขียวชนิด pEGFP-N1 (Clonetech) เริ่มต้นจากเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ปริมาตร 5 µl ลงในถาดหลุมชนิด 384 หลุม เติมสารละลายที่มีเซลล์ Vero จำนวน $3.3x10^4$ cells/ml ปริมาตร 45 µl บ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะ 5% CO_2 วัดการเรืองแสงที่สภาวะกระตุ้นและการปล่อยพลังงานที่ความยาวคลื่น 485 และ 535 นาโนเมตร ตามลำดับ ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices, USA) ทั้งนี้สารอิลิปติซีน (Ellipticine) ถูกใช้เป็นสารมาตรฐานเชิงบวกและ 5%DMSO เป็นสารละลายควบคุมเชิงลบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ การคำนวณหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยสูตร

% Cytotoxicity = $[1-(FU_T/FU_C)]X100$ เมื่อ FU_T = การเรืองแสงของเซลล์ที่มีสารสกัด FU_C = การเรืองแสงของเซลล์ที่ไม่มีสารสกัด

6. สถิติที่ใช้ในการวิจัย ร้อยละ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation: SD) และการวิเคราะห์ One-way ANOVA ด้วยการทดสอบ Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ผลการศึกษา

จากการสกัดเมล็ดและเนื้อผลของหูกวางด้วยเมทานอล พบว่าสารสกัดเมทานอลส่วนเมล็ดมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล ร้อยละโดยน้ำหนักของสารสกัดต่อน้ำหนักพืชสดคือ 4.19 ส่วนสารสกัดเมทานอลของเนื้อผล มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม ร้อยละโดยน้ำหนักของสารสกัดต่อน้ำหนักพืชสด 14.16 จากการศึกษาพฤกษเคมีของสารสกัดของเมล็ดและเนื้อผลหูกวาง ด้วยวิธีต่างๆพบว่า ทั้ง 2 สารสกัดมีองค์ประกอบเป็นสารกลุ่มแทนนิน น้ำตาลรีดิวส์ และโปรตีน ดัง Table 1 ในส่วนเนื้อและเมล็ดมีสารเมทาโบไลต์ชนิดทุติยภูมิชนิดเดียวกัน

Table 1. Phytochemicals of *T. catappa* L. fruits extracts

Phytochemicals	Methanolic extracts	
	Seed	Flesh
alkaloids	-	-
cardioglycosides	-	-
flavonoids	-	-
saponin	-	-
anthraquinone glycosides	-	-
tannins	+	+
coumarins	-	-
reducing sugar proteins	+	+
proteins	+	+

Remark: + = Found, - = Not found

สำหรับการศึกษาปริมาณคุณค่าสารอาหารจากส่วนเมล็ด และเนื้อผล พบว่ามีปริมาณสารอาหารที่แตกต่างกันดัง Table 2.

Table 2. Nutrients of *T. catappa* fruits

Types	% Nutrients*	
	Seed	Flesh
moisture	13.57±0.01[a]	36.77±0.09[b]
lipid	20.94±0.08[a]	6.10±0.09[b]
protein	25.03±0.60[a]	18.13±0.32[b]
ash	3.83±0.01[a]	5.80±0.28[b]
fiber	13. 21±0.68[a]	14.66±0.42[a]
carbohydrates	23.42±0.28[a]	18.54±0.08[b]

* Values are means ± SD of three experiments performed in triplicate. Different superscript letters within the same row indicate significant differences ($p < 0.05$).

เมล็ดของผลหูกวางประกอบด้วยโปรตีนปริมาณมากที่สุดร้อยละ 25.03 ± 0.60 รองลงมาได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ความชื้นและเส้นใย ในปริมาณ 23.4±0.28 20.94±0.08 13.57±0.01 และ 13.21±0.68 ตามลำดับ ส่วนปริมาณเถ้าน้อยที่สุดร้อยละ 3.83 ± 0.01

ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดเมล็ดและเนื้อผลของ หูกวาง (Table 3) พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.17± 0.10 และ 8.00±0.67 µg/ml ตามลำดับ ส่วนสารมาตรฐานวิตามินซี แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 0.06±0.00 µg/ml

Table 3. Antioxidant activity of the methanolic extracts

Sample tests	IC_{50}±SD (µg/ml)
seed extract	4.17±0.10
flesh extract	8.00±0.67
Vitamin C	0.06±0.00

Table 4. Cytotoxicity test of the *T. catappa* Linn. extracts

Sample tests	IC_{50} (µg/ml)
seed extract	>50
flesh extract	>50
ellipticine	1.58

สำหรับการศึกษาด้านการเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Green Fluorescent Protein พบว่าสารสกัดทั้ง 2 ส่วน ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 50 µg/ml (Table 4) ส่วนสารมาตรฐานเชิงบวกอีลิปติซีน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.58 µg/ml

อภิปรายผล

การศึกษากลุ่มสารพฤกษเคมีของผลหูกวางครั้งนี้เป็นการรายงานครั้งแรก โดยก่อนหน้านี้มีรายงานการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของผลหูกวางที่หล่นจากต้นในประเทศอินเดีย [13] แล้วสกัดด้วยแอซีโตน พบสารกลุ่มแอลคาลอยด์ ซาโปนินแทนนิน คูมาริน สเตียรอยด์ น้ำมันและไขมันแต่ไม่พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ทั้งนี้กลุ่มสารที่พบแตกต่างกันนี้อาจเนื่องจากการสกัดสารทั้งหมดของผลไม่มีการแยกเมล็ด เนื้อผลแห้งและเปลือกออกจากกัน จึงมีโอกาสพบสารหลากหลายกลุ่มมากกว่าส่วนเนื้อ หรือเมล็ดที่ได้รายงานไว้ในครั้งนี้

เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารอาหารที่เคยศึกษามาก่อนในเมล็ดแห้งหล่นจากต้น เก็บจากบริเวณในมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย [7] พบว่า เมล็ดหูกวางที่เก็บจากต่างพื้นที่แต่ในประเทศไทยเหมือนกันมีปริมาณร้อยละโปรตีน เถ้าและเส้นใยใกล้เคียงกัน ส่วนเมล็ดจากผลสดจะมีปริมาณความชื้นและคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าเมล็ดจากผลแห้งประมาณ 3 เท่าและ 2 เท่าตามลำดับ ร้อยละโปรตีนของเมล็ดจากผลแห้งมีปริมาณสูงกว่าเมล็ดจากผลสดประมาณ 3 เท่า เนื่องมาจากลักษณะภูมิประเทศของสองจังหวัดแตกต่างกันมากจึงทำให้ปริมาณเมทาโบไลต์ชนิดทุติยภูมิในพืชแตกต่างกัน ส่วนเนื้อผลมีปริมาณความชื้นมากที่สุดร้อยละ 36.77±0.09 รองลงมาได้แก่คาร์โบไฮเดรต โปรตีน เส้นใย และไขมันร้อยละ 18.54±0.08 18.13±0.32 14.66±0.42 และ 6.10 ± 0.09 ตามลำดับ ส่วนปริมาณเถ้าน้อยที่สุดร้อยละ 5.80±0.28 โดยการศึกษาส่วนนี้เป็นการรายงานครั้งแรกและมีปริมาณสารอาหารที่แตกต่างจากการวิเคราะห์ทั้งเนื้อผลสดและเปลือกจากประเทศบราซิล [14] โดยตัวอย่างพืชของไทยมีปริมาณความชื้น และโปรตีนมากกว่า 2 เท่าและ 9 เท่าตามลำดับ ส่วนปริมาณไขมันและเส้นใยนั้นตัวอย่างพืชที่เก็บจากบราซิลมีมากกว่าประมาณ 2 เท่า อาจเนื่องมาจากภูมิประเทศที่แตกต่างกันส่งผลให้ปริมาณสารอาหารของพืชแตกต่างกัน หรืออาจเป็นสารอาหารที่มีปริมาณแตกต่างในส่วนเปลือกผล ในการวิจัยครั้งนี้พบว่าปริมาณสารอาหารทุกชนิดของการวิเคราะห์ยกเว้นเส้นใย เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดสดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ทั้งนี้การศึกษานี้อาจเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาคุณค่าสารอาหารจากพืชในท้องถิ่นที่เหลือใช้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านอาหารสัตว์ต่อไป

สรุป

สารสกัดเมล็ดและเนื้อผลประกอบด้วยสารกลุ่มเดียวกันได้แก่แทนนิน น้ำตาลรีดิวส์และโปรตีน สำหรับเมล็ดของผลหูกวางประกอบด้วยโปรตีนปริมาณมากที่สุดร้อยละ 25.03±0.60 รองลงมาได้แก่คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ความชื้น และเส้นใย ตามลำดับ ส่วนปริมาณเถ้าน้อยที่สุดร้อยละ 3.83±0.01 ในส่วนของเนื้อผลมีปริมาณความชื้นมากที่สุดร้อยละ 36.77± 0.09 รองลงมาได้แก่คาร์โบไฮเดรต โปรตีน เส้นใย และไขมันตามลำดับ ส่วนปริมาณเถ้าน้อยที่สุดร้อยละ 5.80±0.28 สารสกัดเมล็ดและเนื้อผลแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH โดยแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 4.17±0.10 และ 8.00±0.67 µg/ml ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าค่า IC_{50} ที่ได้ยังคงมีค่าสูงกว่าวิตามินซีที่ใช้เป็นสารมาตรฐานเชิงบวก สารสกัดทั้ง

สองส่วนไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml เมื่อเปรียบเทียบกับอิลิปติซีน ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.58 µg/ml

อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเป็นครั้งแรกในการรายงานการศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้น สารอาหาร ตลอดจนฤทธิ์ทางชีวภาพทางด้านการเป็นสารต้านการออกซิเดชันและความเป็นพิษต่อเซลล์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. บุญสนอง ช่วยแก้ว สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ที่ช่วยพิสูจน์เอกลักษณ์พืช และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยี ชีวภาพ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่เอื้อเฟื้อการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

เอกสารอ้างอิง

1. นิจศิริ เรืองรังสี และธวัชชัย มังคละคุปต์. 2549. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์. [online]: เข้าถึงได้จาก http://www.angelfire.com/ri2/rangsan/important.html. 25 มีนาคม 2560
2. คณิตา เลขะกุล. 2539. พฤกษศาสตร์. แผนกวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
3. สมจินตนา พุทธมาตย์ และวรวัฒ สุวรรณสาร. 2550. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบหูกวาง และผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำและการยับยั้งแบคทีเรียในน้ำ. *รายงานการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 45* กรุงเทพมหานคร. 579-585.
4. นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2549. ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากัดและความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางต่อปลากัด. *รายงานการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 44*. กรุงเทพมหานคร.
5. Ahmed, S.M., Swamy, V.B.M., Dhanapal, P.G.R. and Chandrashekara V.M. 2005. Anti-diabetic activity of *Terminalia catappa* Linn. leaf extracts in alloxan-induced diabetic rats. *IJPT.* 4(1): 36-39.
6. ยิ่งลักษณ์ ทองอินทร์ ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และสุรัตน์วดี จิวะจินดา. 2556. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบหูกวางในการยับยั้งโรคแคงเกอร์มะนาว. *รายงานการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 51* กรุงเทพมหานคร.
7. Weerawatanakorn, M., Janporn, S., Ho, C. and Chavasit, V. 2015. *Terminalia catappa* Linn seeds as a new food source. Songklanakarin *J. Sci. Technol*. 37(5): 507-514.
8. Nisar, M., Ali, S. and Qaisar, M., 2011. Preliminary phytochemical screening of flowers, leaves, bark stem and roots of *Rhododendron arboretum*. *Middle East J. Sci. Res.* 10: 472-476.
9. Harborne, J.B., 1984. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, 2nd Ed., Chapman and Hall, London.

10. Mbah, B. O., Eme, P. E. and Eze, C. N. 2013. Nutrient potential of Almond seed (*Terminalia catappa*) sourced from three states of Eastern Nigeria. *Afr. J. Agric. Res.* 8(7): 629-633

11. บุษราคัม สิงห์ชัย นิศา ตระกูลภักดี และ สาวิตรี ทองลิ้ม. 2560. น้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวหลวงราชินี. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 25(1): 27-34.

12. Hunt, L., Jordan, M., Jesus, M. De and Wurm. F.M., 1999. GFP-expressing mammalian cells for fast, sensitive, noninvasive cell growth assessment in a kinetic mode, *Biotechnol Bioeng.* 65: 201-205.

13. Godghate, A.G., Sawant, R.S. and Jadhav, S.D. 2013. Comparative screening of acetonic extract of fruits of *Terminalia catappa* Linn. And Anacardium occidentale Linn. *Asian J Plant Sci Res*. 3(2): 150-153.

14. Santos, O.V. dos, Lorenzo, N.D. and Lannes, S.C. da S. 2016. Chemical, morphological, and thermogravimetric of *Terminalia catappa* Linn. *Food Sci Technol*. 36(1): 151-158.