

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระในใบหม่อน 2 สายพันธุ์

Determination of phenolic compound and antioxidant activity in leaves of 2 mulberry (*Morus alba* L.) cultivar

วิจิตรา แสงโคตร¹, อรุณญา พรหมกุล¹, วรณทิตา เสวตบวร² และ เกียรติกร พัทธการ^{1*}

Wichittra Sawaengkhrot¹, Arunya Prommakool¹, Wanticha Savedboworn²
and Kriangkrai Pattayakorn^{1*}

บทคัดย่อ: จากการศึกษาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ Ferric ion reducing antioxidant power assay (FRAP) ในใบหม่อน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และ สกลนคร 72 ผลการศึกษาพบว่าใบหม่อนทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยแอลกอฮอล์กับน้ำ ความชื้นอยู่ในช่วง 4.0-4.2 เปอร์เซ็นต์ และมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ 2,433.31-2,127.18 µg Gallic acid equivalent/g extract, 74.81-76.73% และ 107.09-117.98 mg Trolox equivalent/g extract ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าการสกัดใบหม่อนด้วยน้ำอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระต่ำอยู่ในช่วง 488.29-805.09 µg Gallic acid equivalent/g extract, 36.67-42.56% และ 3.30-6.49 mg Trolox equivalent/g extract ตามลำดับ

คำสำคัญ: ใบหม่อน, สารประกอบฟีนอลิก, ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ABSTRACT: In this study, total phenolic compound and the antioxidant activity determined by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and ferric ion reducing antioxidant power assay (FRAP) in 2 mulberry leaves cultivar (Buriram 60 and Sakon Nakhon 72). The results showed that the compare extraction between alcohol and water of 2 cultivar had moisture content at 4.0-4.2% and had the highest antioxidant activity determined is 2,433.31-2,127.18 µg Gallic acid equivalent/g extract, 74.81-76.73% and 107.09-117.98 mg Trolox equivalent/g extract, respectively. Furthermore, hot water (100°C) had lower antioxidant activity is 488.29-805.09 µg Gallic acid equivalent/g extract, 36.67-42.56% and 3.30-6.49 mg Trolox equivalent/g extract, respectively.

Keywords: Mulberry leaves, Phenolic compounds, Antioxidant activity

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนาการ, คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร, สกลนคร, 47000

Department of Food Technology and Nutrition, Faculty of Natural Resources and Agro-Industry, Kasetsart University, Chalermphrakiat Sakon Nakhon Province Campus, Sakon Nakhon, 47000

² ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตรและการจัดการ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิทยาเขตปทุมธานี, ปทุมธานี, 25230

Department of Agro-Industry Technology and Management, Faculty of Agro-Industry, King Mongkut's University of Technology North Bangkok (Prachinburi Campus), Prachinburi, 25230

* Corresponding author: csnkpk@ku.ac.th

บทนำ

หม่อน หรือ มัลเบอร์รี่ (Mulberry) เป็นไม้ยืนต้นจำพวกไม้พุ่ม (Tree, shrub) อยู่ในวงศ์ Moraceae จีนัส Morus มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Morus alba* L. ซึ่งใบหม่อนยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนและกรดอะมิโน (Machii, 1989) ใบ เปลือก ราก และกิ่งของหม่อน ถูกใช้เป็นยาพื้นบ้านมานานเพื่อลดไข้ ป้องกันโรคตับ ช่วยในการมองเห็น เสริมสร้างความแข็งแรงของข้อต่อ ขับปัสสาวะ และลดความดันโลหิต (Chang et al., 2011) นอกจากนี้ ใบหม่อนยังมีเมลาโทนิน (melatonin) ซึ่งมีสมบัติในการต้านการเกิดออกซิเดชันและแก้อักเสบ (Tan et al., 2003) ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญในการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพ อาหารและเครื่องดื่มน้ำเพื่อสุขภาพถูกผลิตและจำหน่ายในรูปของอาหารสำเร็จรูป และอาหารเสริมต่างๆ ทั้งนี้สารอาหารดังกล่าวมีแหล่งที่มาจากพืชผักและผลไม้ ข้าวและธัญพืช เป็นต้น ประโยชน์ของอาหารเสริมสุขภาพที่ผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้ความสำคัญ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ที่ให้สารอาหารที่มีฤทธิ์ในการต้านโรค ขาใบหม่อนเป็นหนึ่งในเครื่องดื่มที่ผู้บริโภคให้ความสนใจ เนื่องจากชาที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญคือสารประกอบโพลีฟีนอลในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน (Yuan et al., 2011) ทำให้ชาที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพมากมาย ซึ่งงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพในใบหม่อน 2 สายพันธุ์

วิธีการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างใบหม่อน

นำใบหม่อนสดมาล้างให้สะอาดเล็กน้อย 0.5 ซม. อบในเครื่องตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างใบหม่อนไปบดด้วยเครื่องบดละเอียดและร่อนด้วยตะแกรงร่อนขนาด 80 mesh เก็บตัวอย่างในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ ปิดให้สนิท เก็บที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปสกัด

การวิเคราะห์ค่าความชื้น ตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) โดยชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ลงในถ้วยอะลูมิเนียม นำไปอบด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักหลังอบ แล้วคำนวณเป็นค่าความชื้นตัวอย่าง

การสกัดตัวอย่าง

มี 2 วิธี คือ การสกัดด้วยเอทานอลและการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยนำตัวอย่าง 5 กรัม ไปสกัดด้วยน้ำเดือด 50 มิลลิลิตรเป็นเวลานาน 5 และ 30 นาที และสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 5 และ 30 นาที จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ด้วยน้ำและเอทานอลไปเซนตริฟิวส์ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บตัวอย่างใส่ขวดปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิก วิเคราะห์ตามวิธีของ Hou et al. (2003) โดยนำสารสกัดที่เตรียมไว้ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม น้ำ 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu Reagent ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและเติม 7% Na_2CO_3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 748 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid โดยใช้เครื่อง Micro Plate Readers (BioTek Instruments รุ่น 270544)

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

วิธี DPPH radical scavenging activity ดัดแปลงจาก Prapairat et al. (2011) ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็กเติมสารละลาย 200 μM DPPH ใน 80% เอทานอล 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย 80% เอทานอล เป็น Blank เทียบกับกราฟ

มาตรฐานของสารมาตรฐาน Trolox โดยใช้เครื่อง Micro Plate Readers (BioTek Instruments รุ่น 270544) รายงานผลเป็นค่า % radical scavenging activity คำนวณดังสมการ

$$\% \text{ radical scavenging activity} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

วิธี Ferric Reducing Antioxidant power (FRAP) ดัดแปลงจาก Benzie and Strain, (1996) โดยนำสารสกัด 0.3 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร โดย Blank คือ FRAP 3 มิลลิลิตร ทำการวัดตัวอย่าง 3 ซ้ำ เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Trolox โดยใช้เครื่อง Micro Plate Readers (BioTek Instruments รุ่น 270544)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการนำใบหม่อนสดมาผ่านกระบวนการทำให้แห้ง พบว่าเปอร์เซ็นต์ผลที่ได้หลังจากการทำแห้ง (%Yield) และเปอร์เซ็นต์ความชื้น (Moisture) ของใบหม่อน สายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และ สกลนคร 72 มีค่าใกล้เคียงกัน (Table 1)

Table 1 Percentage of yield and moisture content.

Mulberry Varieties	% Yield	%Moisture
Buri Rum 60	19.5	4.0
Sakon nakhon 72	19.0	4.2

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าตัวอย่างสายพันธุ์สกลนคร 72 และบุรีรัมย์ 60 ที่สกัดด้วยเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด อยู่ในช่วง 2,127.18 - 2,433.31 μg Gallic acid equivalent/g extract ตามด้วยการสกัดด้วยน้ำร้อนที่เวลา 30 และ 5 นาที ตามลำดับ (Table 2) เมื่อเปรียบเทียบพันธุ์ของหม่อนพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.5$) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ นันทิดา และคณะ (2557) ที่ได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในใบหม่อนพบว่า การสกัดด้วยเอทานอลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

จากการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของใบหม่อนทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ สกลนคร 72 และบุรีรัมย์ 60 ที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 30 นาที พบว่าใบหม่อนทั้ง 2 สายพันธุ์ มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอยู่ในช่วง 74 - 77 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนนาน 5 และ 30 นาที ที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระต่ำ อยู่ในช่วง 36-42 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าสายพันธุ์ของหม่อนที่ใช้ในการสกัดไม่มีผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) ของใบหม่อนทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ สกลนคร 72 และ บุรีรัมย์ 60 พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ที่สกัดด้วยเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} มากที่สุดโดยมีปริมาณ Fe^{2+} เท่ากับ 107.09 - 117.98 mg Trolox equivalent/g extract ตามลำดับ โดยใบหม่อนสายพันธุ์สกลนคร 72 และ บุรีรัมย์ 60 ที่สกัดด้วยน้ำร้อน เวลา 5 และ 30 นาที มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ต่ำกว่าการสกัดด้วยเอทานอลนาน 30 นาที โดยมีปริมาณ Fe^{2+} อยู่ในช่วง 3.30- 6.49 mg Trolox equivalent/g extract ดังนั้นใบหม่อนที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพและความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} ทั้ง 2 สายพันธุ์

Table 2 Total phenolic compound and antioxidant activity in 2 Mulberry (*Morus alba* L.) leaves cultivar.

		Total Phenolic Compound	% Radical	FRAP assay
		(μg Gallic acid	scavenging	(mg Trolox equivalent/g
Mulberry		equivalent/g extract)	activity	extract)
Varieties	Extraction			
Buri Rum 60	Ethanol 30 min	2,433.31 $\pm$ 0.03 ^a	76.73 $\pm$ 0.01 ^a	117.98 $\pm$ 0.03 ^a
	Water 5 min	488.29 $\pm$ 0.05 ^b	40.50 $\pm$ 0.05 ^b	4.40 $\pm$ 0.02 ^b
	Water 30 min	805.09 $\pm$ 0.04 ^b	42.56 $\pm$ 0.11 ^b	6.49 $\pm$ 0.04 ^b
Sakon nakhon 72	Ethanol 30 min	2,127.18 $\pm$ 0.02 ^a	74.81 $\pm$ 0.04 ^a	107.09 $\pm$ 0.06 ^a
	Water 5 min	588.72 $\pm$ 0.02 ^b	37.99 $\pm$ 0.01 ^b	3.74 $\pm$ 0.02 ^b
	Water 30 min	542.74 $\pm$ 0.10 ^b	36.67 $\pm$ 0.04 ^b	3.30 $\pm$ 0.08 ^b

Values in the same column that were denoted with different superscript letters were significantly among groups (P<0.05)

สรุป

การสกัดด้วยเอทานอลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ โดยปริมาณมากที่สุดในช่วง 2,127.18 - 2,433.31 μg Gallic acid equivalent/g extract และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH และ FRAP อยู่ในช่วง 74 - 77 %, 107.09 - 117.98 mg Trolox equivalent/g extract ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบพันธุ์พบว่าไม่มีผลต่อปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตาม การสกัดด้วยน้ำร้อนสามารถสกัดสารฟีนอลิกออกมาได้ปริมาณน้อยกว่าการสกัดด้วยเอทานอล โดยพบว่า ระยะเวลาในการสกัดด้วยน้ำร้อนที่สูงขึ้น ส่งผลต่อปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเพียงเล็กน้อย

เอกสารอ้างอิง

- นันทิศา ลิ้มเสถียร. 2557. สารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ใบชา ใบหม่อน และใบมะขาม. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.
- A.O.A.C. 1990. Official Method of Analysis. 19th The Association of Official Analysis Chemical Chemists, Washington D.C.
- Benzie, F., and J. Strain. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. Analytical Biochemistry. 239: 70-76.

- Chang, L., W. Juang, L.J. Wang, B.S. Wang, M.Y. Tai, H. M. Hung, W.J. Chen, and Y.J. Huang. 2011. Antioxidant and Antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. Food and Chemical Toxicology. 49: 785-790.
- Hou, W.C., R.D. Lin, K.T. Cheng, Y.T. Hung, C.H. Cho, C.H. Chen, S.Y. Hwang, and M.H. Lee. 2003. Free radical-scavenging activity of Taiwanese native plants. Phytomedicine. 10: 170.
- Katsube, T., Y. Tsurunaga, M. Sugiyama, T. Furuno and Y. Yamasaki. 2009. Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. Food Chemistry. 113: 964-969.
- Machii, H. 1989. Varietal differences of nitrogen and amino acid contents in mulberry leaves. Acta Sericologica et Entomologica. 1: 51-61.
- Prapairat, S., S. samchai, A. Thongsom, S. sunaart, B. Kiemsanmuang, and K. Chakuton. 2011. DPPH Radical Scavenging Activity and Total Phenolics of Phellinus Mushroom Extracts Collected from North-east of Thailand. 9(6): 0441- 0445.
- Tan, D.X., R. Hardeland, L.C. Manchester, B. Poeggeler. S. Lopez-Burillo, and J.C. Mayo. 2003. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. Journal of Pineal Research. 34(4): 249-259.
- .Yuan, J.M., C. Sun, and L.M. Butler. 2011. Tea and cancer prevention: Epidemiological studies. Pharmacological Research. 64: 123-135.