

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเปลือกผลลิ้งแซเพื่อใช้ประโยชน์ทางผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

จารุวรรณ ประดับแสง^{1*}, ชูรายา ดีมะ², พงษ์พันธ์ สุขสุพันธ์³, สุพัฒน์ ศรีสวัสดิ์⁴

Received: 25 January 2017

Accepted: 21 April 2017

บทคัดย่อ

บทนำ: ต้นลิ้งแซ (*Baccaurea macrocarpa* (Miq.) Müll. Arg) จัดอยู่ในวงศ์ Euphobiaceae เป็นผลไม้เฉพาะถิ่นของภาคใต้ มีรสชาติดี ลิ้งแซสามารถให้ผลผลิตไม่น้อยกว่า 300-500 กิโลกรัมต่อต้น ทำให้มีแนวโน้มที่จะมีเศรษฐกิจเหลือทิ้ง เช่น เปลือกผลลิ้งแซเพิ่มมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสารพฤษเคมีเบื้องต้น ศึกษาหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และศึกษาหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปลือกผลลิ้งแซ เพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเปลือกผลลิ้งแซ **วิธีดำเนินการวิจัย:** ทำการสกัดเปลือกผลลิ้งแซด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล ตรวจสอบสารทางพฤษเคมีเบื้องต้น หาปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และปริมาณแทนนินทั้งหมด และทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP **ผลการวิจัย:** ค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดจากเปลือกผลลิ้งแซด้วย 95%เมทานอลมีค่ามากที่สุด (12.33 %) จากการทดสอบหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่าสารสกัดจากเปลือกลิ้งแซด้วย 95%เอทานอลมีค่ามากที่สุด (0.14±0.05 mg GAE/g sample) ทดสอบปริมาณแทนนินทั้งหมด พบว่าปริมาณสารคอนเดนส์แทนนินทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากเปลือกลิ้งแซด้วย 50%เอทานอลมีค่ามากที่สุด (0.54±0.07 mg GAE/g sample) และปริมาณสารไฮโดรไลซ์แทนนินของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลลิ้งแซด้วย 95%เมทานอล มีค่ามากที่สุด (0.60±0.02 mg GAE/g sample) และพบว่าปริมาณสารฟีนอลิกของสารสกัดหยาบจากเปลือกลิ้งแซด้วย 95%เมทานอล มีค่ามากที่สุด (2.13±0.21 mg GAE/g sample) การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี พบว่าสารสกัดหยาบด้วย 95% เมทานอล ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด **สรุปผลการวิจัย:**จากการศึกษานี้พบว่า สารสกัดจากเปลือกผลลิ้งแซสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อลดการใช้สารเคมีและเพิ่มมูลค่าสมุนไพรพื้นบ้านอีกทางหนึ่ง

คำสำคัญ: ลิ้งแซ, ฟลาโวนอยด์, แทนนิน, ฟีนอลิก, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2560; 13 (ฉบับพิเศษ): 41-51

^{1,3} อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

² นักศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

⁴ ผศ.ดร. มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ อ.เมือง จ.นราธิวาส

* **ติดต่อผู้พิมพ์:** จารุวรรณ ประดับแสง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์
โทร. 088-7902504 e-mail: bowling077@gmail.com

Study of bioactive compound and their bioactivities from Langkhae (*Baccaurea macrocarpa* (Miq.) Müll. Arg) peel extract for application of natural product

Charuwan Pradabsang^{1*}, Suraya Deema², Pongpan Suksupan³, Supath Srisawat⁴

Abstract

Introduction: Langkhae (*Baccaurea macrocarpa* (Miq.) Müll. Arg) is a plant belonging to family Euphobiaceae. It is a fruit in the southern of Thailand and can high yield 300-500 Kg/tree. This research aimed to compare of phytochemical screening, bioactive compound and antioxidants activity of Langkhae peel extract. **Methods:** The phytochemical screening was analyzed by colorimetric methods. The total phenolic content of the crude extracts was measured by Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity was measured by DPPH, ABTS and FRAP assays. **Results:** The percentage of yield of 95% methanol crude extract of *B. macrocarpa* showed the highest yield (12.33%). The test determination of Flavonoids contents found that an 95% ethanol crude extract is the highest (0.14±0.05 mg GAE/g sample). The condensed tannins contents of 50% ethanol crude extract is the highest (0.54±0.07 mg GAE/g sample). The hydrolysable tannins found that 95% methanol crude extract is the highest (0.60±0.02 mg GAE/g sample). The phenolic compound found that and 95% methanol crude extract is 2.13±0.21 mg GAE/g sample. The antioxidant activity of three methods found that 95% methanol crude extract is the highest. **Conclusion:** Fortunately, these results suggest the potential of several parts from Langkhae peel extract as medicine or cosmetic agent free radical.

Keywords: *Baccaurea macrocarpa*, Flavonoids, Tannins, Phenolic compound, Antioxidants activity

IJPS 2017; 13 (Supplement): 41-51

^{1,3} Lecturer, Faculty of Science and Technology, Princess of Naradhiwas University, Narathiwat

² Bachelor of Science, Faculty of Science and Technology, Princess of Naradhiwas University, Narathiwat

⁴ Ph.D., Princess of Naradhiwas University, Narathiwat

* **Corresponding author:** Charuwan Pradabsang, Faculty of Science and Technology, Princess of Naradhiwas University, Narathiwat, Tel. 088-7902504 e-mail: bowling077@gmail.com

บทนำ

ลิ้นแข (*Baccaurea macrocarpa* (Miq.) Müll. Arg) จัดอยู่ในวงศ์ Euphobiaceae เป็นผลไม้เฉพาะถิ่นทางภาคใต้ของประเทศไทย สามารถพบได้ในแถบประเทศมาเลเซีย ประเทศอินโดนีเซีย ผลลิ้นแขมีรสชาติดีเป็นที่นิยมรับประทานกันอย่างแพร่หลายในสามจังหวัดชายแดนภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส ให้ผลผลิตออกสู่ตลาดในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงกันยายนของทุกปี และสามารถให้ผลผลิตไม่น้อยกว่า 300-500 กิโลกรัมต่อต้น แต่สิ่งที่เกิดขึ้นคือเปลือกผลลิ้นแขที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์เกิดเป็นขยะ และมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนต่างๆ จากผลลิ้นแขทั้งส่วนของเปลือก และเนื้อผล พบว่าส่วนของเปลือกสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคเช่น *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* เป็นต้น ในประเทศมาเลเซียมีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเนื้อผล เปลือก และเมล็ดของผลลิ้นแข พบว่าส่วนของเปลือกมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ในปริมาณสูงกว่าส่วนของเนื้อ และเมล็ด อีกทั้งยังให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด (Mohd et al., 2014) ในขณะเดียวกันในประเทศไทย ก็ได้มีงานวิจัยที่ทำการเปรียบเทียบผลลิ้นแขระหว่างเนื้อผล และเปลือก พบว่าส่วนของเปลือกให้ฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay อย่างไรก็ดีตามการศึกษาหาสารพฤษเคมีเบื้องต้นของผล ลิ้นแข ยังมีไม่มากนัก รวมทั้งการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และศึกษาหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกของผลลิ้นแข เพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีส่วนผสมที่สกัดจากเปลือก

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสารพฤษเคมีเบื้องต้น ศึกษาหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และศึกษาหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกของผลลิ้นแข เพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีส่วนผสมที่สกัดจากเปลือก

ผลลิ้นแข อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของพืชในท้องถิ่นได้อีกทางหนึ่ง

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างพืช

ทำการสำรวจอนุกรมวิธานของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง คือ ลิ้นแข และรับรองพืชสมุนไพรตัวอย่างจากผู้เชี่ยวชาญทางพฤกษศาสตร์ โดยมีการเก็บส่วนของเปลือกผลลิ้นแข จากตลาดสด อำเภอเมือง จังหวัดนราธิวาส ในช่วงเดือนกันยายน พ.ศ.2559

การเตรียมสารสกัด

เปลือกผลลิ้นแข นำมาอบที่อุณหภูมิ 60 ± 2 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (hr) นำตัวอย่างที่ได้ มาบดให้ละเอียด ชั่งผลลิ้นแขส่วนเปลือกมา 50 กรัม (g) ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร (mL) สำหรับตัวทำละลาย 50% ethanol, 70% ethanol, 95% ethanol และ 95% methanol จะใช้วิธีการสกัดสารเช่นเดียวกับตัวทำละลายด้วยน้ำกลั่น ปิดฝาให้สนิท เขย่าบน Water bath shaker ความเร็ว 150 รอบ/นาที (รอบ/min) เป็นเวลา 24 hr ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนด นำไปกรองแยกสารสกัดหยาดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารที่สกัดได้มาระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน เมื่อได้สารสกัดนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C นาน 12 hr แล้วนำมาทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dry) จะได้สารสกัดหยาด ซึ่งน้ำหนักของสารที่สกัดได้นำไปคำนวณหาร้อยละของสารสกัด (%yield)

การทดสอบหาพฤษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น จะใช้ปฏิกิริยาการเกิดสี หรือการตกตะกอน (Rimjhim et al., 2014)

ทดสอบสารอัลคาลอยด์ ด้วยวิธี**Wagner's test**

เตรียมสารสกัด 50 มิลลิกรัม (mg) ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วกรองเอาส่วนที่ไม่ต้องการออก นำส่วนที่กรองได้ มาหยดน้ำยา Wagner's reagents ลงไป 2-3 หยด ลงไปในหลอดทดลอง สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น หากเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก

ทดสอบสารคาร์โบไฮเดรตและไกลโคไซด์

เตรียมสารสกัด 50 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 1.5 mL แล้วกรองเอาส่วนที่ไม่ต้องการออก นำส่วนที่กรองได้มาทดสอบหาคาร์โบไฮเดรตและไกลโคไซด์

ทดสอบสารคาร์โบไฮเดรต ด้วยวิธี**Fehling's test**

นำสารสกัดใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 mL เติมน้ำยา A และ B แล้วนำไปต้มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 80 °C, 2 min แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีและการตกตะกอน

ทดสอบสารไกลโคไซด์ ด้วยวิธี**Benedict's test**

นำสารสกัดใส่หลอดทดลองหลอดละ 0.5 mL เติมน้ำยา Benedict's reagent 0.5 mL ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 80 °C, 2 min แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีและการตกตะกอน

ทดสอบสารซาโปนิน ด้วยวิธี Foam test

เตรียมสารสกัด 50 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 20 mL ลงในกระบอกตวง แล้วเขย่า 15 min วัดปริมาณฟองที่เกิดขึ้น หากมีขนาด 2 cm แสดงว่าเป็นสารกลุ่มซาโปนิน

ทดสอบหาสารโปรตีนและกรดอะมิโน**ด้วยวิธี Biuret test**

เตรียมสารสกัด 50 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 mL แล้วกรองเอาส่วนที่ไม่ต้องการออก นำส่วนที่กรองได้ ใส่หลอดทดลองหลอดละ 2 mL หยด 2%

คอปเปอร์ซัลเฟต และ 95% เอทานอล 1 mL จากนั้นเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เพียวเลต 1-2 ก้อน แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีเป็นสีชมพูและเกิดการแบ่งชั้น แสดงว่าเป็นสารกลุ่มโปรตีน

ทดสอบสารกลุ่มไขมัน ด้วยวิธี Spot test

นำสารสกัดมาวางบนกระดาษกรองแล้ววางไปเรื่อยๆ สังเกตคราบน้ำมันบนกระดาษกรอง หากมีคราบน้ำมัน แสดงว่าเป็นสารกลุ่มไขมัน

ทดสอบสารกลุ่มฟีนอลิกและแทนนิน**ทดสอบสารกลุ่มฟีนอลิก ด้วยวิธี Ferric****chloride test**

เตรียมสารสกัด 50 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 mL หยด 5% เฟอริกคลอไรด์ ผสมให้เข้ากัน แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวเข้ม แสดงว่าเป็นสารกลุ่มฟีนอลิก

ทดสอบสารกลุ่มแทนนิน ด้วยวิธี**Lead acetate test**

เตรียมสารสกัด 50 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 mL เติม 10% ลีดอะซิเตต 3 mL ผสมให้เข้ากัน แล้วสังเกตการเกิดตะกอนขาวขุ่น แสดงว่าเป็นสารกลุ่มแทนนิน

ทดสอบกลุ่มสารมีเมือก ด้วยวิธี**Alcohol 95% test**

เตรียมสารสกัด 100 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 mL เติมเอทานอล 25 mL ผสมให้เข้ากัน แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีเป็นสีขาวขุ่น

การศึกษาหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ**ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total****Phenolic compounds) (Hou et al., 2003)**

นำสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/mL) มาเจือจางด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้นในช่วงต่างๆ ปีเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (μL) ผสมกับ Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 μL ผสมให้เข้ากัน

และทิ้งไว้ 1 min ที่อุณหภูมิห้อง เดิม 7.5% (w/v) Sodium bicarbonate (Na_2CO_3) ปริมาตร 80 μL ผสมให้เข้ากัน และทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่อุณหภูมิห้อง 30 min วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (nm) และแสดงเป็นหน่วย มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมสารสกัด (mg GAE/g sample)

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid content)

นำสารละลายมาตรฐาน Quercetin เข้มข้น 1 mg/mL มาเจือจางด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นในช่วงต่างๆ ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 25 μL ผสมกับ 95% Ethanol ปริมาตร 75 μL ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ 1 min ที่อุณหภูมิห้อง เดิม 10% Aluminum Chloride ปริมาตร 5 μL , 1M Potassium acetate ปริมาตร 5 μL และน้ำกลั่น ปริมาตร 140 μL ผสมให้เข้ากัน และทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่อุณหภูมิห้อง 30 min วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm โดยใช้ Quercetin เป็นสารมาตรฐาน และแสดงเป็นหน่วย มิลลิกรัมเคอควิทิน/กรัม สารสกัด (mg QE/g sample)

ปริมาณสารแทนนินทั้งหมด (Total Tannin content)

Condensed tannin content

นำสารละลายมาตรฐาน Epicatechin เข้มข้น 1 mg/mL มาเจือจางด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นในช่วงต่างๆ ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 20 μL ผสมกับ 1% vanillin ปริมาตร 50 μL และ 25% H_2SO_4 ปริมาตร 50 μL ผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาอุณหภูมิห้องในที่มืด 15 min วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm โดยใช้ Epicatechin เป็นสารมาตรฐาน และแสดงเป็นหน่วย มิลลิกรัมสมมูลอิพิคาทีชิน/กรัมสารสกัด (mg ECE/g sample)

Hydrolysable tannin content

นำสารละลายมาตรฐาน Gallotannin เข้มข้น 1 mg/mL มาเจือจางด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นในช่วงต่างๆ ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 μL ผสมกับ Folin-Ciocalteu reagent (เจือจาง 10 เท่า) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ 1 min ที่อุณหภูมิห้อง เดิม 7.5% (w/v) Sodium bicarbonate ปริมาตร 80 μL ผสมให้เข้ากัน และทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่อุณหภูมิห้อง 30 min วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm โดยใช้ Gallotannin เป็นสารมาตรฐาน และแสดงเป็นหน่วย มิลลิกรัมแกลโลแทนนิน/กรัมสารสกัด (mg GE/g sample)

ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

DPPH assay (Schlesier et al., 2002)

นำสารละลายมาตรฐาน Trolox เข้มข้น 1 mg/mL มาเจือจางด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นในช่วงต่างๆ ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 μL ผสมกับ สารละลาย DPPH ปริมาตร 190 μL ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว และทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 30 min วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน

ABTS assay (Re et al., 1999)

นำสารละลายมาตรฐาน Trolox เข้มข้น 1 mg/mL มาเจือจางด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นในช่วงต่างๆ เตรียมสารละลาย ABTS^{•+} : ปิเปตสารละลาย ABTS ผสมกับ Potassium persulphate อัตราส่วน 1 : 1 เจือจาง ABTS^{•+} ด้วย Phosphate buffer (pH 7.0) ในอัตราส่วน 1:20 (v/v) ให้มีค่าดูดกลืนแสงไม่เกิน 1,000 nm ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 μL ผสมกับ สารละลาย ABTS ปริมาตร 190 μL ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว และทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 15 min

วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน

FRAP assay (Ronald et al., 2005)

นำสารละลายมาตรฐาน Trolox เข้มข้น 1 mg/mL มาเจือจางด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นในช่วงต่างๆ เตรียมสารละลาย FRAP : ปิเปตสารละลาย TPTZ 1 mL ผสมกับสารละลาย Ferric chloride 1 mL และ Sodium acetate buffer 10 mL ผสมให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 μ L ผสมกับ สารละลาย FRAP ปริมาตร 190 μ L ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว และทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 15 min วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน

สถิติที่ใช้ทดสอบ

ผลการศึกษาที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ ตัวแปรชนิดตัวเลข (Numerical Variable) ถูกนำเสนอในรูปแบบ mean $\pm$ SD การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of varice, ANOVA) ถูกใช้เพื่อหาค่านัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

ลักษณะของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลและร้อยละของสารสกัดต่อน้ำหนักแห้ง

นำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลแห้ง ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ, เมทานอล และเอทานอล โดยแบ่งเป็น 3 ความเข้มข้นคือ 50%, 70% และ 95% เอทานอล ได้สารสกัดหยาบ 5 ชนิด พบว่าสารสกัดที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 1) ซึ่งสารสกัดหยาบจากเปลือกผลแห้งทั้ง 5 ชนิด ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบเยือกแข็ง สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นผงค่อนข้างหยาบ สีส้ม-แดงอิฐ นำค่าที่ได้ไปคิดร้อยละน้ำหนักแห้งจากผลผลิตร้อยละของเปลือกผลแห้ง (% yield) พบว่า สารสกัดหยาบทั้ง

5 ชนิด มีค่า % yield อยู่ในช่วง 2.326-12.33 โดยพบว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกผลแห้งด้วย 95% เมทานอลให้ค่า % yield มากที่สุดคือ 12.33 และสารสกัดหยาบจากเปลือกผลแห้งด้วยน้ำ ให้ค่า % yield น้อยที่สุดคือ 2.326

การตรวจสอบทางพฤกษศาสตร์เคมีเบื้องต้น

จากการทดสอบหาพฤกษศาสตร์เคมีเบื้องต้น (ตารางที่ 2) พบว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกผลแห้งทั้ง 5 ชนิด พบสารกลุ่ม Alkaloids, Carbohydrate & glycoside และ Phenolic compounds & Flavonoids แต่สารสกัดหยาบด้วยน้ำ พบสารกลุ่ม Gum & Mucilages, สารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอล, 70% เอทานอล, 95% เอทานอล และ 95% เมทานอล พบสารกลุ่ม Proteins & Amino acid และ สารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอล และ 70% เอทานอล พบสารกลุ่ม Saponin

การศึกษาหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

จากการตรวจหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compound) ในสารสกัดหยาบจากเปลือกผลแห้ง พบว่าปริมาณสารฟีนอลิกแต่ละตัวทำละลายคือ 95% เมทานอล, 70% เอทานอล และ 50% เอทานอล มีค่าเท่ากับ 2.13 ± 0.21 , 1.87 ± 0.18 และ 1.76 ± 0.04 mg GAE/g sample ตามลำดับ

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

จากการตรวจหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid contents) ในสารสกัดหยาบจากเปลือกผลแห้ง พบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์แต่ละตัวทำละลายคือ 95% เอทานอล น้ำ และ 50% เอทานอล มีค่าเท่ากับ 0.14 ± 0.05 , 0.13 ± 0.03 และ 0.13 ± 0.06 mg QE/g sample ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ปริมาณสารแทนนินทั้งหมด

จากการตรวจหาปริมาณแทนนินทั้งหมด (total tannin content) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ Condensed tannins และ Hydrolysable tannins

Condensed tannins 95% เอทานอล และ 70% เอทานอล มีค่าเท่ากับ
จากการวิเคราะห์ปริมาณ Condensed tannins (proanthocyanidin) พบว่าปริมาณสาร
Condensed tannins แต่ละตัวทำละลายคือ 50% เอทานอล, 0.54 ±0.07, 0.39±0.04 และ 0.36±0.11 mg ECE/g sample ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลลิ้นแขและร้อยละของสารสกัดต่อน้ำหนักแห้ง

ตัวทำละลาย	ลักษณะของสารสกัด	ร้อยละของสารสกัด
50% เอทานอล		5.646
70% เอทานอล		5.081
95% เอทานอล		5.302
95% เมทานอล		12.33
น้ำกลั่น		2.326

Hydrolysable tannins
จากการวิเคราะห์ปริมาณ Hydrolysable tannins พบว่าปริมาณสาร Hydrolysable tannins ของสารสกัด 95% เมทานอล, 70% เอทานอล และ 50% เอทานอล มีค่าเท่ากับ 0.60±0.02, 0.58±0.02 และ 0.55±0.03 mg GE/g sample ตามลำดับ

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกผลลิ้นแขด้วย 3 วิธี คือ DPPH

assay, ABTS assay และ FRAP assay จากการวิเคราะห์ทั้ง 3 วิธี พบว่า สารสกัดหยาบด้วย 95% เมทานอล ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด มีค่า 14.10±0.22, 403.34±1.78 และ 2.38±0.06 mg TEAC/g sample ตามลำดับ ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า สารสกัดหยาบจาก 70% เอทานอล, 50% เอทานอล, 95% เอทานอล และน้ำ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบทางพฤกษศาสตร์เคมีเบื้องต้น

Phytochemical Screening test	H ₂ O	EtOH 50%	EtOH 70%	EtOH 95%	MeOH 95%
Alkaloids					
> wagner's reagent	+	+	+	+	+
Carbohydrates & glycosides					
> Fehling's test	+	+	+	+	+
> Benedict's test	+	+	+	+	+
Saponins					
> Form test	-	+	+	-	-
Proteins & Amino acids					
> Biured reagent	-	+	+	+	+
Fixed oils & Fat					
> Spot test	-	-	-	-	-
Phenolis compound & Flavonoids					
> Ferric chloride test	+	+	+	+	+
> Lead acetate test	+	+	+	+	+
Gums & Mucilages					
> Alcohol 95% test	+	-	-	-	-

(-) Negative , (+) Positive

ตารางที่ 3 ศึกษาหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกผลลิ้นแข

ตัวทำละลาย	ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ			
	TPC (mg GEA/g sample)	TFC (mg QE/g sample)	Proanthrocyanidin (mg ECE/g sample)	Hydrolyze tannins (mg GE/g sample)
น้ำกลั่น	0.98 ± 0.06 ^d	0.13 ± 0.03	0.18 ± 0.04 ^c	0.31 ± 0.02 ^d
50% เอทานอล	1.76 ± 0.04 ^c	0.13 ± 0.06	0.54 ± 0.07 ^{b,c}	0.55 ± 0.03 ^c
70% เอทานอล	1.87 ± 0.18 ^{b,c}	0.13 ± 0.04	0.36 ± 0.11 ^b	0.58 ± 0.02 ^b
95% เอทานอล	1.53 ± 0.02 ^{a,b}	0.14 ± 0.05	0.39 ± 0.04 ^{a,b}	0.42 ± 0.01 ^{a,b}
95% เมทานอล	2.13 ± 0.21 ^a	0.13 ± 0.03	0.30 ± 0.09 ^a	0.60 ± 0.02 ^a

(mean±SD); n=5 ค่าในแต่ละคอลัมน์มีอักษรยกในแต่ละชนิดของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลลิ้นแขแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพโดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกผลลิ้นแข

ตัวทำละลาย	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (mg TEAC /g sample)		
	DPPH assay	ABTS assay	FRAP assay
น้ำกลั่น	8.54 ± 0.64 ^c	360.03 ± 8.43 ^b	2.37 ± 0.05
50% เอทานอล	9.70 ± 0.30 ^c	391.08 ± 2.73 ^b	2.23 ± 0.03
70% เอทานอล	10.41 ± 0.21 ^b	401.31 ± 1.03 ^a	2.33 ± 0.04
95% เอทานอล	8.47 ± 0.26 ^b	370.86 ± 1.78 ^a	2.37 ± 0.12
95% เมทานอล	14.10 ± 0.22 ^a	403.34 ± 1.78 ^a	2.38 ± 0.06

(mean±SD); n=5 ค่าในแต่ละคอลัมน์มีอักษรยกในแต่ละชนิดของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลลิ้นแขแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

สารสกัดหยาบจากเปลือกผลลิ้นแข ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำกลั่น, 95% เมทานอล ส่วนเอทานอล จะแบ่งเป็น 3 ความเข้มข้น คือ 50%, 70% และ 95% เอทานอล ซึ่งตัวทำละลายเหล่านี้ มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว (Polar Protic Solvents) โดยจากการทดสอบด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยหรือไม่มีขั้ว พบว่า สารสกัดที่ได้มีปริมาณน้อยมาก เนื่องจากโครงสร้างของสารสกัดไม่เหมาะสมต่อตัวทำละลาย ดังนั้นจึงเลือกตัวทำละลายที่มีขั้วแทน ได้สารสกัดหยาบ 5 ชนิด พบว่า สารสกัดที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกัน คือมีลักษณะเป็นผงค่อนข้างหยาบ สีส้ม-แดงอิฐ น้ำค่าที่ได้ไปคิดร้อยละน้ำหนักแห้งจากผลผลิตร้อยละของเปลือกผลลิ้นแข (% yield) พบว่า สารสกัดหยาบทั้ง 5 ชนิด มีค่า (% yield) อยู่ในช่วง 2.326-12.33 ส่วนการศึกษาหาพฤษเคมีเบื้องต้น พบว่า สารสกัด

หยาบจากเปลือกผลลิ้นแขทั้ง 5 ชนิด พบสารกลุ่ม Alkaloids, Carbohydrate & glycoside และ Phenolic compounds & Flavonoids แต่สารสกัดหยาบด้วยน้ำกลั่น พบสารกลุ่ม Gum & Mucilades, สารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอล, 70% เอทานอล, 95% เอทานอล และ 95% เมทานอล พบสารกลุ่ม Proteins & Amino acid ส่วนสารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอล และ 70% เอทานอล พบสารกลุ่ม Saponin

จากการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 3 กลุ่ม คือ การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ปริมาณแทนนินทั้งหมด และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยการหาปริมาณแทนนินทั้งหมด แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ condensed tannins (proanthocyanidin) พบว่า สารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอลมีค่าเท่ากับ 0.54±0.07 mg ECE/g sample และวิธี Hydrolysable tannins พบว่า สาร

สกัดหยาบด้วย 95%เมทานอล มีค่าเท่ากับ 0.6 ± 0.02 mg GE/g sample การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มฟลาโวนอยด์จากสารสกัดหยาบด้วย 95% เมทานอล มีค่าเท่ากับ 0.14 ± 0.05 mg QE/g sample ส่วนในวิธีหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า สารสกัดหยาบด้วย 95% เมทานอล มีค่าเท่ากับ 2.13 ± 0.21 mg GAE/g sample ซึ่งมีค่าน้อยกว่างานวิจัยของ Mohd Fazelly et al., (2014) พบว่า ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มฟลาโวนอยด์ ในสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย 80% เมทานอล มีค่าเท่ากับ 44.68 ± 0.67 mg CE/g sample และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มฟีนอลิก คือ 60.04 ± 0.53 mg GAE /g sample ส่วนการเปรียบเทียบความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลลิ้นแฉโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่า สารสกัดแต่ละชนิดมีการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน โดยวิธี DPPH สารสกัดที่ให้ไฮโดรเจนอะตอมในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดี คือ สารสกัดหยาบด้วย 95% เมทานอล มีค่าเท่ากับ 14.10 ± 0.22 mg TEAC/g sample ส่วนวิธี FRAP สารสกัดที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ดีเพื่อเปลี่ยนรูปให้อยู่ในสถานะที่เสถียรที่สุด คือ สารสกัดหยาบด้วย 95% เมทานอล เช่นเดียวกัน โดยมีค่าเท่ากับ 2.38 ± 0.06 mg TEAC/g sample ซึ่งค่าที่ได้มีค่าน้อยกว่างานวิจัยของ Mohd Fazelly et al., (2014) พบว่า วิธี DPPH มีค่าเท่ากับ 196.94 ± 0.43 mg AEAC/g sample และ วิธี FRAP มีค่าเท่ากับ 102.88 ± 0.57 mg AEAC/g sample ส่วนในวิธี ABTS สารสกัดที่กำจัดอนุมูลอิสระชนิดเปอร์ออกไซด์ได้ดี คือ สารสกัดหยาบด้วย 95% เมทานอล มีค่าเท่ากับ 403.34 ± 1.78 mg TEAC/g sample ซึ่งค่าที่ได้มีค่ามากกว่างานวิจัยของ Mohd Fazelly et al.,

(2014) ซึ่งพบว่า สารสกัดหยาบด้วย 80% เมทานอล โดยวิธี ABTS มีค่าเท่ากับ 9.97 ± 0.30 mg AEAC/g sample อาจเนื่องมาจากตัวทำละลายที่ใช้ทดสอบมีความแตกต่างกัน ส่งผลให้การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด วิธี DPPH และ วิธี FRAP มีค่าน้อยกว่างานวิจัยของ Mohd Fazelly et al., (2014) ส่วน วิธี ABTS ค่าที่ได้มีค่ามากกว่างานวิจัยของ Mohd Fazelly et al., (2014) เนื่องจากใช้ตัวทำละลาย 80% เมทานอล นอกจากนี้สารสกัดจากเปลือกผลลิ้นแฉที่มีปริมาณสารไฮโดรไลซ์แทนนินสูงที่ได้จากการทดสอบด้วยตัวทำละลาย 95% เมทานอล ส่งผลให้ความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี คือ DPPH, ABTS และ FRAP สูงขึ้นตามไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ให้ผลสูงสุด เนื่องจากสารสกัดหยาบจากเปลือกผลลิ้นแฉที่ได้ศึกษาอาจจะประกอบด้วยสารหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรวมกันแต่สารออกฤทธิ์ที่เป็นหลักในการต้านอนุมูลอิสระ โดยส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มฟีนอลิก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อปกป้องส่งเสริมสุขภาพมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง และห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัยและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและห้องปฏิบัติการในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

References

- Hou WC. Lin RD. Cheng KT. Hung YT. Chou C. H. Chen, et al., Free radical –

- scavenging activity of Taiwanese native plant. Journal of Phytomedicine 2003;10(2-3):170.
- Mohd FAB, Nor EA, Fifulaya AK, Syazlina S. Phytochemicals and Antioxidative Properties of Borneo Indigenous Liposu (*Baccaurea lanceolata*) and Tampoi *Baccaurea macrocarpa*) Fruits. Antioxidants 2014;3:516-525.
- Re R. Pellegrini N. Protaggente A. Pannala A. Yang M. Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improve ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 1999;26:1231-1237.
- Rimjhim S, Kumari N, Jainendra K. Preliminary Phytochemicals Screening of Methanolic Extract of *Clerodendron infortunatum*. Journal of Applied Chemistry 2014;7(1):10-13.
- Ronald L.P. Xianli W. Karen S. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Food and Dietary Supplements. Journal of agricultural and food chemistry 2005;53:4290-4305.
- Schlesier K. Harwat M. Bohm V. Bitsch R. Assesment of antioxidant activity by using different in vitro methods. Journal of Society for Free Radical Research 2002;36(2):177-187.