



ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของส่วนแยกย่อยจาก เปลือกลำต้นของส้มควาย

Total phenolic contents and antioxidant activities of sub-fractions from stem barks of *Garcinia pedunculata*

เบญจมาศ ไชยลาภ และ ธเนศวร นวลไย*

สาขาวิชาศึกษาทั่วไป คณะศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ วิทยาเขตวังไกลกังวล
ประจวบคีรีขันธ์ 77110

Benjamat Chailap and Thanesuan Nuanyai*

Department of General Education, Faculty of Liberal Arts, Rajamangala University of Technology
Rattanakosin Wang Klai Kangwon Campus, Prachuap Khiri Khan 77110

Received: 13 September 2021/ Revised: 22 December 2021/ Accepted: 26 December 2021

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบและส่วนแยกย่อยจากเปลือกลำต้นของส้มควาย ส่วนแยกย่อยหกส่วน (Fr1-Fr6) สามารถแยกออกจากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทของเปลือกลำต้นส้มควาย (*Garcinia pedunculata*) ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยการเพิ่มหัวของตัวชะ สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท และส่วนแยกย่อยทั้งหกส่วนถูกวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH จากผลการทดสอบพบว่า สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทและส่วนแยกย่อย 1 -3 (Fr1 - Fr3) มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ส่วนแยกย่อย 4-6 (Fr4 - Fr6) มีค่าต้านอนุมูลอิสระที่ระดับค่า IC_{50} ในช่วง 43.19-92.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค ABTS พบว่าสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทและส่วนแยกย่อย 1 -2 (Fr1 - Fr2) มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ส่วนแยกย่อย 3-6 (Fr3 - Fr6) มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ระดับค่า IC_{50} ในช่วง 7.71- 65.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทและส่วนแยกย่อย 1-6 (Fr1 - Fr6) อยู่ในช่วงตั้งแต่ 1.96 - 275.96 mgGAE/gDW โดยส่วนแยกย่อยที่ 4 (Fr4) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด

คำสำคัญ: การต้านอนุมูลอิสระ ส่วนแยกย่อย คอลัมน์โครมาโตกราฟี ส้มควาย ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด



Abstract

The objective of this research was to compare the antioxidant activity of crude extracts and sub-fractions from the stem bark of *Garcinia pedunculata*. Six sub-fractions (Fr1-Fr6) were separated from ethyl acetate crude extract of *Garcinia pedunculata* stem bark using the column chromatography technique by the gradually increasing polarity of the eluent. The antioxidant activities of the ethyl acetate crude extract and six sub-fractions were evaluated using DPPH and ABTS techniques. It was found that, the ethyl acetate crude extract and sub-fractions 1 -3 (Fr1-Fr3) showed IC_{50} values greater than 100 $\mu\text{g/mL}$, while sub-fractions 4-6 (Fr4-Fr6) displayed IC_{50} values in the range of 43.19 -92.49 $\mu\text{g/mL}$. In addition, the antioxidant activity examined using the ABTS technique exhibited that the ethyl acetate crude extract and sub-fractions 1 -2 (Fr1-Fr2) showed IC_{50} values greater than 100 $\mu\text{g/mL}$ while sub-fractions 3-6 (Fr3-Fr6) showed IC_{50} values in the range of 7.71-65.71 $\mu\text{g/mL}$. Total phenolic compounds of ethyl acetate crude extract and sub-fractions 1-6 (Fr1-Fr6) were ranged from 1.96 to 275.96 mg mgGAE/gDW. The sub-fraction 4 (Fr4) showed the highest antioxidant activities and total phenolic content.

Keyword: Antioxidant, Sub-fraction, Column chromatography, *Garcinia pedunculata*, Total phenolic contents

บทนำ

จากรายงานการวิจัยของความสัมพันธ์ระหว่างอนุมูลอิสระในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และกระบวนการเสื่อมของเซลล์ที่ผ่านมามีความเป็นเรื่องที่น่าสนใจให้มีความสำคัญอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากการเสื่อมของเซลล์เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ร่างกายของมนุษย์อ่อนแอทำให้เกิดโรค และเสียชีวิตในที่สุด [1] มีความพยายามในการใช้สารต้านอนุมูลอิสระหลากหลายชนิดเพื่อชะลอหรือยับยั้งกระบวนการการเสื่อมของเซลล์อันเนื่องมาจากปฏิกิริยาออกซิของอนุมูลอิสระในเซลล์ ส่วนผสมสำหรับเป็นสารปรุงแต่งในอาหารและเครื่องสำอางหลากหลายชนิดสำหรับเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ถูกคิดค้นเป็นจำนวนมาก สารเหล่านี้ส่วนมากเป็นสารที่ผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี และอาจเป็นสารที่ไม่ได้มาจากธรรมชาติหรือการสังเคราะห์เลียนแบบธรรมชาติ ทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้บริโภค สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์บางชนิดถูกจำกัดการใช้ในบางประเทศอันเนื่องมาจากการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษต่อสุขภาพของผู้บริโภค [2] ด้วยเหตุผล

ดังกล่าวมีการศึกษาค้นคว้าสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติมากขึ้น โดยคำนึงถึงความปลอดภัยและประโยชน์ต่อสุขภาพสำหรับผู้บริโภค [3] ส้มแขกเป็นพืชในตระกูล CLUSIACEAE (Guttiferae) ซึ่งเป็นต้นไม้พื้นเมืองทางภาคใต้ของประเทศไทย โดยพืชสามสายพันธุ์ที่นิยมเรียกกันทั่วไปว่า “ส้มแขก” คือ *Garcinia gummi-gutta* (ส้มแขกสายพันธุ์อินโดนีเซีย), *Garcinia atroviridis* (ส้มแขกสายพันธุ์ภาคใต้ตอนล่าง) และ *Garcinia pedunculata* (ส้มแขกสายพันธุ์ภาคใต้ตอนกลาง) ผลแห้งทั้งสามสายพันธุ์ใช้สำหรับปรุงรสเพิ่มความเปรี้ยวให้กับอาหาร จึงนิยมนำมาปรุงเป็นอาหารพื้นบ้านภาคใต้ *G. pedunculata* เป็นสายพันธุ์ของส้มแขกที่พบได้ในภาคใต้ตอนกลางของประเทศไทยในเขตจังหวัดกระบี่ สตูล ภูเก็ต สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช มีผลใหญ่กว่าสายพันธุ์ *G. atroviridis* แต่รสชาติมีความเปรี้ยวคล้ายคลึงกันทำให้เกิดความสับสนในเรื่องของสายพันธุ์ ด้วยขนาดที่ใหญ่กว่าส้มแขกจึงเรียกในภาษาท้องถิ่นตามขนาดที่ใหญ่กว่าส้มแขก (*G. atroviridis*) ว่า “ส้มควาย” [4]

เมแทบอลิซึมของสัสมควาย ได้แก่ สารกลุ่มแซนโทน ฟลาโวนอยด์ เบนโซฟีโนน แลคโตน และกรดฟีนอลิก ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น การต้านอนุมูลอิสระ [5, 6] การต้านเนื้องอก [7, 8] การต้านเชื้อรา [9] และด้านการกลายพันธุ์ [7] นอกจากนี้ผลของสัสมควายยังมีใบเตาแคโรทีนและกรดแอสคอร์บิกสูง ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะใช้สารสกัดของผลสัสมควายในทางการแพทย์ อาหาร และเครื่องสำอาง [10] จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดหยาบจากผลมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย [11] การลดอาการเบาหวานในหนูทดลอง [12] และการต้านอนุมูลอิสระ [13] แต่โดยส่วนมากจะมีการศึกษาในส่วนผลที่นิยมใช้ในการปรุงอาหาร การค้นคว้าวิจัยในส่วนลำต้นยังมีข้อมูลงานวิจัยค่อนข้างจำกัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดและส่วนแยกย่อยของเปลือกลำต้นสัสมควายโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและใช้การสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและน้ำ และนำชั้นเอทิลอะซิเตตซึ่งมีความเหมาะสมในการละลายสารกลุ่มแซนโทนมาแยกเป็นส่วนแยกย่อยด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี เพื่อนำข้อมูลวิจัยที่ได้รับจากการศึกษาพัฒนาสารสกัดจากเปลือกลำต้นสัสมควายซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ของจังหวัดภูเก็ต ซึ่งอาจนำไปใช้ในส่วนผสมอาหารและเครื่องสำอางที่จะเพิ่มมูลค่าให้กับพืชในท้องถิ่นในอนาคต

วิธีดำเนินงานวิจัย

สารเคมีและตัวทำละลาย

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเช่น 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, ซึ่งจากบริษัทซิกม่าอัลดริชประเทศสิงคโปร์ (Sigma Aldrich, Singapore) ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ซึ่งจากบริษัทอาร์ซีโอ แล็บสแกนจำกัด สารเคมีและตัวทำละลายที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเกรดวิเคราะห์ (analytical reagent grade; AR)

ตัวอย่างสัสมควาย

เก็บตัวอย่างเปลือกลำต้นสัสมควายเมื่อเดือนตุลาคม 2562 ซึ่งเป็นช่วงติดผล จากอำเภอกะทู้ จังหวัดภูเก็ต ประเทศไทย ตัวอย่างไม้อัดแห้งได้ถูกพิสูจน์เอกลักษณ์และเก็บไว้ที่หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กรุงเทพมหานคร (BKF No. 194897)

การสกัดและแยกส่วนแยกย่อย

เปลือกลำต้นของสัสมควาย (7.5 กิโลกรัม) ถูกทำให้แห้งด้วยอากาศเป็นเวลาห้าวันและอบด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท ตัวอย่างถูกบดให้อนุภาคมีขนาด 40-60 เมช ซึ่งจะได้ผงเปลือกลำต้นแห้งหนัก 5.0 กิโลกรัม นำผงเปลือกลำต้นสัสมควายแช่ในเมทานอล (MeOH) ปริมาตร 20.0 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน สารละลายถูกแยกออกและนำกากสกัดใหม่อีกสองครั้ง รวมสารละลายเมทานอลและระเหยโดยใช้เทคนิคการลดความดัน (RV10, IKA, Germany) สกัดสารสกัดหยาบเมทานอลด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต (EtOAc) และน้ำที่อุณหภูมิห้อง ชั้นเอทิลอะซิเตตถูกรวมกันและระเหยแห้ง ซึ่งทำให้ได้สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตหนัก 18.99 กรัม

สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตหนัก 18.99 กรัม ถูกละลายในตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทนและเมทานอล (1:1) สารละลายถูกทำให้แห้งบนซิลิกาเจลและใช้เทคนิคการแยกแบบโครมาโตกราฟีคอลัมน์ (ซิลิกาเจลขนาด 70-230 เมช) โดยใช้คอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 มิลลิเมตร ยาว 400 มิลลิเมตร ใช้ตัวทำละลายชะโดยเพิ่มหัวของตัวทำละลายตั้งแต่ร้อยละ 5 ถึง 100 โดยปริมาตรของอะซิโตนและเฮกเซน โดยใช้ปริมาตร 1.0 ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 30 มิลลิลิตร ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเพื่อรวมส่วนแยกย่อยที่มีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายกันโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin-layer chromatography) สามารถได้ส่วนแยกย่อยทั้งหมดทั้งหมด 6 ส่วนแยกย่อย (Fr1-Fr6)



การต้านอนุมูลอิสระชนิดดีพีพีเอช (DPPH Assay)

สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตและส่วนแยกย่อย (Fr1-Fr6) ละลายด้วยเอทานอลให้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน (Trolox) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับสารละลายดีพีพีเอช (2,2-diphenyl -1-picrylhydrazyl radical) ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอล ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในจาน 96 หลุม เขย่าให้เข้ากัน

เป็นเวลา 3 นาที (Eppendorf, ThermoMixer C, Germany) ทั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร (Biochrome, EZ2000, UK) [14] เพอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของดีพีพีเอชคำนวณตามสมการ (1) สำหรับค่า IC_{50} คำนวณโดยใช้การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นของความเข้มข้นของตัวอย่างที่ต่างกัน (10, 30, 50, 70 และ 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

$$\text{ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ} = \left\{ \frac{A_{\text{ควบคุม}} - (A_{\text{ตัวอย่าง}} - A_{\text{เบงค์}})}{A_{\text{ควบคุม}}} \right\} \times 100\% \quad (1)$$

$A_{\text{ควบคุม}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH 150 μ L + Ethanol 50 μ L

$A_{\text{ตัวอย่าง}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH 150 μ L + Sample/standard 50 μ L

$A_{\text{เบงค์}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ Ethanol 150 μ L + Sample/standard 50 μ L

การต้านอนุมูลอิสระชนิดเอบีทีเอส (ABTS Assay)

ผสมสารละลายเอบีทีเอส (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ที่มีความเข้มข้น 7.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร กับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ที่มีความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 88 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน ทั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เจือจางสารละลายเอบีทีเอสด้วยเอทานอลให้มีระดับการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.70 ± 0.05 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ ถูกละลายด้วยสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)

ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้สารตัวอย่างมีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายเอบีทีเอส ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ในจาน 96 หลุม เขย่าและทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร [11] และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของตัวอย่างตามสมการ (2) สำหรับการหาค่า IC_{50} ทำเช่นเดียวกัน แต่ใช้ความเข้มข้นของสารตัวอย่างในช่วง 10 - 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

$$\text{ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ} = \left\{ \frac{A_{\text{ควบคุม}} - (A_{\text{ตัวอย่าง}} - A_{\text{เบงค์}})}{A_{\text{ควบคุม}}} \right\} \times 100\% \quad (2)$$

$A_{\text{ควบคุม}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ 150 μ L ABTS + 50 μ L 50%DMSO

$A_{\text{ตัวอย่าง}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ 150 μ L ABTS + 50 μ L Sample/standard

$A_{\text{เบงค์}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ 150 μ L Water + 50 μ L Sample/standard

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content; TPC)

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ของสารสกัดจากส้มควายได้รับการทดสอบโดยใช้วิธีการของ Oliveira [11] โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อยดังนี้ นำสารสกัดหยาบหรือส่วนแยกย่อยที่ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และน้ำยา Folin-Ciocalteu ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ในจาน 96 หลุม และเขย่าเป็นเวลา 3 นาที (Eppendorf, ThermoMixer C, Germany) เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัว (Na_2CO_3) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เขย่าเป็นเวลา 3 นาที

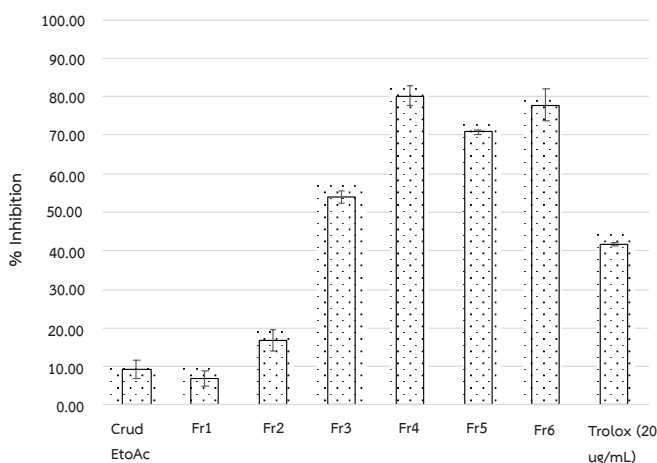
ตั้งทิ้งไว้ในที่ที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของส่วนผสมด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (Biochrome, EZ2000, UK) ที่ 720 นาโนเมตร โดยค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดถูกเทียบเป็นกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้น 10-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการวิจัย

จากการอบแห้งเปลือกลำต้นส้มควายพบว่ามีปริมาณน้ำร้อยละ 33.33 ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยสะดวกต่อการทำแห้ง และป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราในกระบวนการทำแห้งของวัตถุดิบในการสกัด เมื่อสกัดผงเปลือกลำต้นส้มควายแห้งด้วยตัวทำละลายเมทานอลและเอทิลอะซิเตตเมื่อขึ้นสารละลายเอทิลอะซิเตตถูกระเหยแห้งพบสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต จำนวน 18.99 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.25 และ 0.37 ของน้ำหนักเปลือกลำต้นส้มควายสดและแห้งตามลำดับ จากการแยกส่วนแยกย่อยโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วยการเพิ่มความมีขั้วของตัวชะและรวมส่วนแยกย่อยที่มียอดประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกันโดยเทคนิคThin Layer Chromatography สามารถแยกส่วนแยกย่อยได้ทั้งหมด 6 ส่วนแยกย่อย ซึ่งมีน้ำหนักของส่วนแยกย่อยเท่ากับ 0.13, 0.46, 1.21, 5.03, 0.98 และ 0.13 กรัม สำหรับส่วน

แยกย่อยที่ 1-6 (Fr1 – Fr6) ตามลำดับ แสดงการเปรียบเทียบในภาพที่ 1 จากการแยกส่วนแยกย่อยพบว่าเมื่อมีการเพิ่มความมีขั้วของตัวชะปริมาณของส่วนแยกย่อยจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการใช้ตัวชะระบบอะซิโตนและเฮกเซนในอัตราส่วนร้อยละ 50 โดยปริมาตร พบว่าน้ำหนักของส่วนแยกย่อยเริ่มลดลง และในส่วนแยกย่อยที่ 4 (Fr4) มีปริมาณมากที่สุดซึ่งเป็นช่วงของตัวชะซึ่งใช้ตัวทำละลาย อะซิโตนและเฮกเซนในอัตราส่วนร้อยละ 30-50 โดยปริมาตร

การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบและส่วนแยกย่อยเปลือกลำต้นส้มควายแสดงในภาพที่ 1 โดยสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตแสดงการต้านอนุมูลอิสระแบบดีฟิฟิเอชที่ระดับร้อยละ 9.23 ± 2.20 ในขณะที่ส่วนแยกย่อยทั้ง 6 (Fr1 – Fr6) แสดงการต้านอนุมูลอิสระแบบดีฟิฟิเอชที่ระดับ 6.89 ± 1.82 , 16.89 ± 2.75 , 54.07 ± 1.55 , 80.23 ± 2.70 , 70.84 ± 0.64 และ 77.85 ± 4.28 ตามลำดับ โดยส่วนแยกย่อยที่ 4 (Fr4) แสดงการต้านอนุมูลอิสระแบบดีฟิฟิเอชมากที่สุดซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับส่วนแยกย่อยที่ 5 (Fr5) และ 6 (Fr6) ในขณะที่ส่วนแยกย่อยที่ 1 (Fr1) มีการแสดงการต้านอนุมูลอิสระแบบดีฟิฟิเอชต่ำที่สุด สำหรับสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตมีการต้านอนุมูลอิสระแบบดีฟิฟิเอชที่ใกล้เคียงกับส่วนแยกย่อยที่ 1

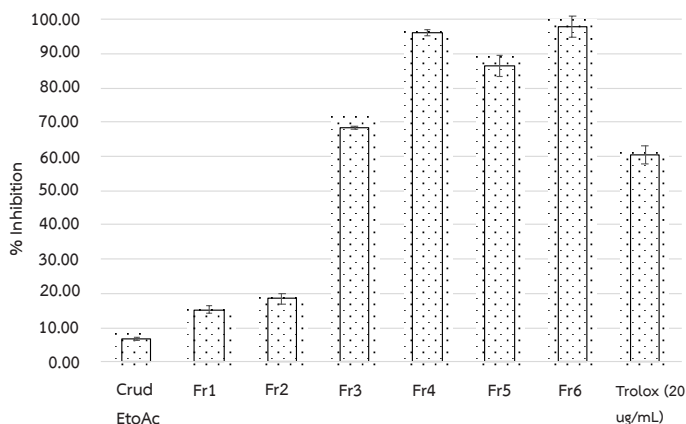


ภาพที่ 1 แสดงการต้านอนุมูลอิสระแบบดีฟิฟิเอช (DPPH) ของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต, ส่วนแยกย่อย 1 – 6 (Fr1 – Fr6) จากเปลือกลำต้นส้มควายและสารมาตรฐาน Trolox



ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบและส่วนแยกย่อยของเปลือกลำต้นส้มควายโดยเทคนิคเอบีทีเอส (ABTS) แสดงในภาพที่ 2 โดยสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตแสดงการต้านอนุมูลอิสระแบบเอบีทีเอสที่ระดับร้อยละ 6.72 ± 0.40 ในขณะที่ส่วนแยกย่อยทั้ง 6 (Fr1 – Fr6) แสดงการต้านอนุมูลอิสระแบบเอบีทีเอสที่ระดับ 15.29 ± 1.09 ,

18.47 ± 1.67 , 68.47 ± 0.52 , 95.92 ± 0.91 , 86.57 ± 3.04 และ 97.96 ± 3.16 ตามลำดับ โดยส่วนแยกย่อยที่ 6 (Fr6) แสดงการต้านอนุมูลอิสระแบบเอบีทีเอสมากที่สุด ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับส่วนแยกย่อยที่ 4 (Fr4) และ 5 (Fr5) ในขณะที่สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตมีการต้านอนุมูลอิสระแบบเอบีทีเอสที่ต่ำที่สุด



ภาพที่ 2 แสดงการต้านอนุมูลอิสระแบบเอบีทีเอส (ABTS) ของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต, ส่วนแยกย่อย 1 – 6 (Fr1 – Fr6) จากเปลือกลำต้นส้มควายและสารมาตรฐาน Trolox

จากการวิเคราะห์ข้อมูลการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นพบว่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบและส่วนแยกย่อยที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อาจเป็นค่าที่เกิดความคลาดเคลื่อนซึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นของการต้านอนุมูลอิสระที่สูงเกินไปทำให้การเปรียบเทียบ

ข้อมูลผิดพลาดโดยเฉพาะอย่างยิ่งการต้านอนุมูลอิสระของส่วนแยกย่อยที่ 4 – 6 (Fr4 – Fr6) จึงทดลองหาค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ซึ่งแสดงข้อมูลในตารางที่ 1



ตารางที่ 1 แสดงค่าความเข้มของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต ส่วนแยกย่อย 1 – 6 (Fr1 – Fr6) จากเปลือกลำต้นส้มควายและสารมาตรฐาน Trolox

Sample	Antioxidant activities (IC_{50} ; $\mu\text{g/mL}$)	
	DPPH	ABTS
Crude EtOAc	>100	>100
FR1	>100	>100
FR2	>100	>100
FR3	>100	65.71 $\pm$ 4.89
FR4	50.80 $\pm$ 2.47	7.71 $\pm$ 1.51
FR5	92.49 $\pm$ 2.59	35.74 $\pm$ 2.70
FR6	43.19 $\pm$ 0.71	53.39 $\pm$ 3.20
Trolox	24.04 $\pm$ 0.25	18.32 $\pm$ 1.20

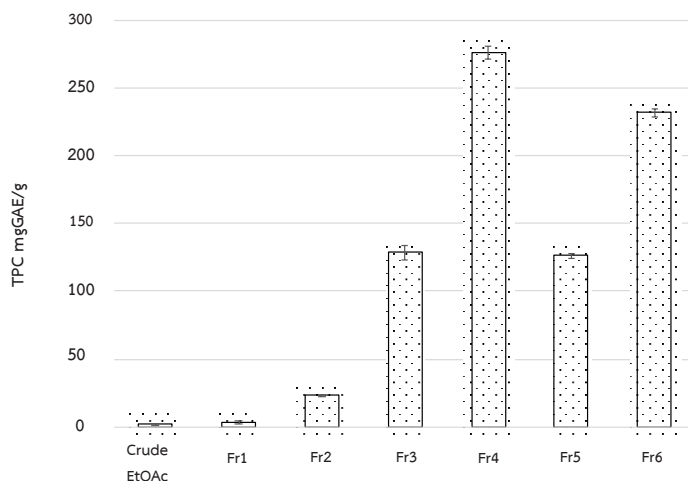
จากตารางที่ 1 การต้านอนุมูลอิสระแบบดีฟิฟิเอซ ส่วนแยกย่อยที่ 6 (Fr6) มีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระแบบดีฟิฟิเอซที่ดีที่สุด โดยแสดงค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 43.19 $\pm$ 0.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในขณะที่ส่วนแยกย่อยที่ 4 (Fr4) มีค่า IC_{50} ที่ใกล้เคียงกันที่ระดับความเข้มข้น 50.80 $\pm$ 2.47 ในขณะที่การต้านอนุมูลอิสระแบบเอบีทีเอส ส่วนแยกย่อยที่ 4 (Fr4) มีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระแบบเอบีทีเอสที่ดีที่สุดที่ระดับ 7.71 $\pm$ 1.51 ในขณะที่ความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระแบบเอบีทีเอสจะลดลง ดังจะเห็นได้จากค่า IC_{50} ของส่วนแยกย่อยที่ 5 (Fr5) และส่วนแยกย่อยที่ 6 (Fr6) ที่มีระดับค่า IC_{50} ที่ระดับความเข้มข้น 35.74 $\pm$ 2.70 และ 53.39 $\pm$ 3.20 ตามลำดับ

จากผลการทดลองข้างต้นปัจจัยของปริมาณสารฟีนอลิกน่าจะมีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบและส่วนแยกย่อยซึ่งปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบและส่วนแยกย่อยแสดงในตารางที่ 2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตอยู่ที่ระดับ 1.96 $\pm$ 0.25 mgGAE/gDW ในขณะที่ส่วนแยกย่อยทั้ง 6 (Fr1 – Fr6) มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่ระดับ 3.52 $\pm$ 0.77, 23.11 $\pm$ 0.44, 128.56 $\pm$ 5.13, 275.96 $\pm$ 4.38, 126.36 $\pm$ 2.04 และ 231.53 $\pm$ 3.35 mgGAE/gDW ตามลำดับ โดยส่วนแยกย่อยที่ 4 แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดซึ่งสอดคล้องกับผลการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี



ตารางที่ 2 แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตและส่วนแยกย่อย 1 – 6 (Fr1 – Fr6)

Sample	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mgGAE/gDW)
Crude EtOAc	1.96±0.25
FR1	3.52±0.77
FR2	23.11±0.44
FR3	128.56±5.13
FR4	275.96±4.38
FR5	126.36±2.04
FR6	231.53±3.35



ภาพที่ 3 แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตและส่วนแยกย่อย 1 – 6 (Fr1 – Fr6)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของส้มควาย (*G. pedunculata*) มีรายงานการวิจัยค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับส้มแขก (*G. atroviridis*) และจากการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของเปลือกลำต้นส้มควายพบว่า ในสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำมาก เมื่อผ่านโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ในส่วนแยกย่อยมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจ ปริมาณสารสกัดหยาบที่ใช้ตัวชะในระบบอะซีโตน/เฮกเซนพบว่าในส่วนแยกย่อยที่ 4 (Fr4) ให้น้ำหนักมากที่สุดที่ระดับ 5.03 กรัม คิดเป็นร้อยละต่อสารสกัดหยาบ

เอทิลอะซิเตตเท่ากับ 26.48 แสดงให้เห็นถึงปริมาณของสารในกลุ่มที่มีขั้วปานกลางค่อนข้างมากในส่วนของเปลือกลำต้นส้มควาย นอกจากนี้การต้านอนุมูลอิสระแบบดีพีพีเอช (DPPH) ของส่วนแยกย่อยที่ 4 (Fr4) ยังแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระแบบดีพีพีเอชที่สูงที่สุดที่ระดับ 80.23 ± 2.70 ในขณะที่สารสกัดหยาบส่วนเอทิลอะซิเตตแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระแบบดีพีพีเอชที่ระดับ 9.23 ± 2.20 ซึ่งมีประสิทธิภาพน้อยกว่าส่วนแยกย่อยที่ 4 (Fr4) ประมาณ 8 เท่า เช่นเดียวกับการต้านอนุมูลอิสระแบบเอบีทีเอส (ABTS) จากผลการทดลองดังกล่าวน่าจะเกิดจากสารสำคัญบางชนิดที่มีปริมาณสูงในส่วนแยกย่อยที่ 4 (Fr4)

น่าจะเป็นสารกลุ่มแซนโทนซึ่งมีสภาพความมีชีวิตใกล้เคียงกัน และสารกลุ่มแซนโทนมีปริมาณการต้านอนุมูลอิสระที่สูง [15] ซึ่งสารกลุ่มแซนโทนสามารถพบได้ในส่วน เนื้อไม้ [16] และ ลำต้น [17] ในส่วนผลพบสารกลุ่มแซนโทนค่อนข้างน้อย เมื่อเพิ่มความมีชีวิตของตัวสารกลุ่มแซนโทนน่าจะถูกชะออกมาในส่วนแยกย่อยที่ 1 – 3 (Fr1 – Fr3) แต่อาจมีปริมาณที่ไม่มากพอที่จะแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ และเมื่อผ่านส่วนแยกย่อยที่ 4 (Fr4) ไปแล้วการเพิ่มความมีชีวิตของตัวสารจะทำให้สารกลุ่มแซนโทนที่มีชีวิตสูงขึ้นถูกชะออกมาแต่น่าจะมีปริมาณสัดส่วนที่น้อยลงทำให้การแสดงผลประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่าส่วนแยกย่อยที่ 4 (Fr4) ซึ่งประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของส่วนแยกย่อยที่ 4 มีประสิทธิภาพที่สูง สำหรับส่วนแยกย่อยที่ 3 และ 5 แม้ว่าจะมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดใกล้เคียงกันแต่มีความแตกต่างของประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระอาจจะเกิดจากสารในกลุ่มฟีนอลิกบางชนิดอาจแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำ ดังนั้นการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมในอนาคต โดยการใช้การทำให้บริสุทธิ์และพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสาร ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ทดสอบการต้านอนุมูลอิสระเพื่อยืนยันผลการวิจัยอีกครั้ง เพื่อที่นำข้อมูลที่ได้มาพัฒนาสารสกัดจากเปลือกลำต้นส้มควายเพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือเครื่องสำอาง โดยส้มควาย (*G. pedunculata*) ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นของ จังหวัดทางภาคใต้ตอนกลางแถบจังหวัด สุราษฎร์ธานี กระบี่ ภูเก็ต และนครศรีธรรมราช ซึ่งลักษณะทางพฤกษศาสตร์มักทำให้เกิดความสับสนกับส้มแขก (*G. atroviridis*) ส้มควายเป็นพืชที่มีความน่าสนใจในด้านเอกลักษณ์เชิงพื้นที่ และจากการทดลองในครั้งนี้จะผลักดันให้สารสกัดจากส้มควายเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นหรือสามารถพัฒนาเป็นสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (Geographical Indications) ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2562 (เลขที่สัญญา C-1/2562)

เอกสารอ้างอิง

1. Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. Compr Rev Food Sci Food Saf 2004;3(1):21-33.
2. Buxiang S, Fukuhara M. Effect of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxy anisole and flavonoid on the activation of mutagens and drugs-metabolizing enzymes in mice. Toxicology 1997;122(1-2):61-72.
3. Kim SY, Jeong SM, Park WP, Nam KC, Ahn DU, Lee SC. Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. Food Chem 2006;97(3):472-749.
4. Gardner S, Sidisunth P, Chayamarit K. Forest trees of southern Thailand volume 1 (Acanthaceae to Escalloniaceae). Bangkok: Torch publishing project; 2015.
5. Sharma A, Joseph GS, Singh RP. Antioxidant and antiplatelet aggregation properties of bark extracts of *Garcinia pedunculata* and *Garcinia cowa*. J Food Sci Technol 2014;51(8):1626-31.
6. Mudoi T, Deka DC, Devi R. *In vitro* antioxidant activity of *Garcinia pedunculata*, an indigenous fruit of North Eastern (NE) region of India. Int J Pharmtech Res 2012;4(1):334-42.
7. Jayaprakasha GK, Negi PS, Jena BS. Antioxidative and antimutagenic activities of the extracts from the rinds of *Garcinia pedunculata*. Innov Food Sci Emerg Technol 2006;7(3):246-50.
8. Vo HT, Ngo NTN, Bui TQ, Pham HD, Nguyen LHD. Geranylated tetra oxygenated xanthenes from the pericarp of *Garcinia pedunculata*. Phytochem Lett 2015;13(2):119-22.



9. Joseph GS, Jayaprakasha GK, Selvi AT, Jena BS, Sakariah KK. Antiaflatoxic and antioxidant activities of *Garcinia* extracts. *Int J Food Microbiol* 2005;101(2):153-60.
10. Islam MZ, Hoque MM, Asif SM, Monalisa K. Chemical composition, Antioxidant capacities and storage stability of *Citrus macroptera* and *Garcinia pedunculata* fruits. *Emir J Food Agric* 2015;27(3):275-82.
11. Zoliansanga, Lalfakzuala R. Antibacterial activity and phytochemical screening of *Garcinia pedunculata* Roxb. ex Buch. - Ham. fruit extract by HPLC-ESI-MS. *J Pure Appl Microbiol* 2021;15(4):2183-94.
12. Biswajit S, Chandra GB. Study of the effect of *Garcinia pedunculata* fruit pulp on normal and alloxan induced diabetic mice. *Res J Chem Environ* 2021;25(6):142-7.
13. Kureshi AA, Hussain T, Mirgal A, Salvi SP, Barua PC, Talukdar M, et al. Comparative evaluation of antioxidant properties of extracts of fruit rinds of *Garcinia* species by *in vitro* assays. *Indian J Hortic* 2019;76(2):338-43.
14. Oliveira AS, Cercato LM, Souza MTS, Melo AJO, Lima BS, Duarte MC, et al. The ethanol extract of *Leonurus sibiricus* L. induces antioxidant, antinociceptive and topical anti-inflammatory effects. *J Ethnopharmacol* 2017;206:144-51.
15. Zafar S, Jian YQ, Li B, Peng CY, Choudhary MI, Rahman A, et al. Antioxidant nature adds further therapeutic value: an updated review on natural xanthenes and their glycosides. *Dig Chin Med* 2019;2(3):166-92.
16. Rao AVR, Sarma MR, Venkataraman K, Yemul SS. A benzophenone and xanthone with unusual hydroxylation patterns from the heartwood of *Garcinia pedunculata*. *Phytochem* 1974;13(7): 1241-4.
17. Vo HT, Nguyen NTT, Maas G, Werz UR, Pham HD, Nguyen LHD. Xanthenes from the bark of *Garcinia pedunculata*. *Phytochem Lett* 2012;5(4):766-9.