ปริมาณฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดรากมะพูด

Total Phenolic Content, Antioxidant and Antityrosinase Activities of *Garcinia dulcis* Root Extract

ปริชาติ เทพทอง[1*] และฐิติยา ลูกแป้น[2]

Parichat Thepthong[1*] and Titiya Lookpan[2]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อย (A-J) รากมะพูด ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลรากมะพูดมีปริมาณฟีนอลิกรวม 338.42 ± 6.08 mg GAE/g Extract แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC_{50} 71.07 ± 0.02 µg/ml) ABTS (IC_{50} 28.08 ± 0.01 µg/ml) และสามารถรีดิวซ์เหล็กเฟอริก (235.40 ± 3.44 mg AAE/g Extract) ได้ในระดับดี และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (IC_{50} 354.15 ± 0.13 µg/ml) โดยส่วนสกัดย่อย E และ I แสดงฤทธิ์ได้ดีที่สุดและดีกว่าสารสกัดหยาบ ซึ่งสารหลักที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย E คือ 12b-hydroxy-des-*D*-garcigerin A และ Globuxanthone สารหลักที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย I คือ Symphoxanthone ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าส่วนสกัดย่อยรากมะพูดเป็นแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางได้

คำสำคัญ: ฟีนอลิก สารต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส มะพูด

Abstract

The objective of this study is to investigate total phenolic content, antioxidant and antityrosinase activities of *G.dulcis* root extract and fractions (A-J). It found that the total phenolic content of the crude extract was 338.42 ± 6.08 mg GAE/g extract. The extract showed good activity against DPPH (IC_{50} 71.07 ± 0.02 µg/ml), ABTS (IC_{50} 28.08 ± 0.01 µg/ml) and good ferric reducing antioxidant power (235.40 ± 3.44 mg AAE/g extract). It also showed inhibitory activity toward tyrosinase enzyme (IC_{50} 354.15 ± 0.13 µg/ml). Fractions E and I showed better activity than the extract and other fractions in all tested. 12b-hydroxy-des-*D*-garcigerin A

[1] อ.ดร., สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

[2] นิสิตปริญญาตรี หลักสูตร วท.บ. (เคมี), สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

[1] Lecturer, Dr., Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University, Phattalung, 93210, Thailand

[2] Undergraduate Student, B.Sc. in Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University, Phattalung, 93210, Thailand

[*] Corresponding author: Tel.: 08-6686-4300. E-mail address: tsu_parichat@hotmail.com

(Received: June 5, 2020; Revised: July 16, 2020; Accepted: July 21, 2020)

and globuxanthone are major components from fraction E and symphoxanthone was obtained from fraction I. The result indicated that fraction from *G.dulcis* root extract is a natural antioxidant and antityrosinase source with potential for use as active ingredients in cosmetics.

Keywords: Phenolic, Antioxidant, Antityrosinase, *Garcinia dulcis*

บทนำ

อนุมูลอิสระที่มีมากเกินสมดุลในร่างกาย ก่อให้เกิดภาวะที่ไม่พึงประสงค์ เช่น ผิวหมองคล้ำ ริ้วรอย จุดด่างดำ และอาจสร้างความเสียหายต่อส่วนประกอบของเซลล์ ดีเอ็นเอ โปรตีน และเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดโรคได้หลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ มะเร็ง ต้อกระจก จอประสาทตาเสื่อม เป็นต้น อนุมูลอิสระที่มากเกินสมดุลนี้เป็นผลมาจากการดำรงชีวิตท่ามกลางมลพิษ แสงแดด และความเครียด เป็นช่วงเวลานาน มีงานวิจัยระบุว่าการได้รับแสงแดดที่แรงเป็นเวลานานยังส่งผลกระตุ้นการทำงานของไซโตไคน์ ซึ่งสารชนิดนี้มีส่วนช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนทำให้เกิดการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ถ้าผิวหนังมีปริมาณเมลานินมากเกินไป จะส่งผลให้เกิดผิวหมองคล้ำ จุดด่างดำ กระ และฝ้า [1] การป้องกันการเกิดผิวหมองคล้ำทำได้โดยการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ช่วยป้องกันแสงแดดและทำให้ผิวดูกระจ่างใส ซึ่งปัจจุบันมีเครื่องสำอางหลายชนิดที่สามารถป้องกันแสงแดด ชะลอการเกิดริ้วรอย และทำให้ผิวกระจ่างใส โดยนำสารสกัดจากธรรมชาติที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

มะพูด (*Garcinia dulcis* Kurz.) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางในวงศ์ Clusiaceae มีลักษณะต้นคล้ายมังคุด อาจรู้จักในชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ เช่น ตะพูด จำพูด ปะพูด พะวาใบใหญ่ เป็นต้น พบมากในป่าดิบชื้นและพื้นที่ริมน้ำในป่าเบญจพรรณทางภาคตะวันออก ผลมะพูดมีสรรพคุณแก้อาการไอ เจ็บคอ ขับเสมหะ เป็นยาระบายอ่อนๆ ขับถ่ายโลหิตเสีย แก้อาการช้ำใน ส่วนรากเป็นยาแก้ไข้ แก้ร้อนใน ช่วยถอนพิษ [2] การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในส่วน ดอก ใบ กิ่ง ผล เมล็ด เปลือกต้น และรากของมะพูด พบสารประเภทฟีนอลิกกลุ่มแซนโทน (Xanthones) เป็นสารหลัก และรองลงมาคือสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) โดยในส่วนรากยังมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีค่อนข้างน้อย และสารที่พบในส่วนรากมีรายงานเพียงสารกลุ่มแซนโทนเท่านั้น [3,4] ซึ่งสารกลุ่มนี้ แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ ต้านจุลชีพ ต้านออกซิเดชัน ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และต้านเชื้อ HIV [5] เป็นต้น สารสกัดหลายชนิดที่มีสารประเภทฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีและยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีอีกด้วย เช่น การรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีความสัมพันธ์สอดคล้องกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดกิ่งและรากของมัลเบอรี่ [6] และเมล็ดลิ้นจี่ [7]

ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนดอก ผล และเมล็ดมะพูด [8-10] แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนราก ประกอบกับข้อมูลของสารองค์ประกอบที่พบในส่วนรากนั้นเป็นสารฟีนอลิกกลุ่มแซนโทน [3-4] ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านออกซิเดชัน และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดรากมะพูดที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อประเมินศักยภาพของสารสกัดรากมะพูดในการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านเครื่องสำอางต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีและวัสดุ

เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน อะซิโตน และ เอทานอล (เกรดอุตสาหกรรม โดยนำมากลั่นก่อนใช้) Silica Gel C60 จากบริษัท Silicycle; Silica Gel 100, TLC Aluminum Plate, Folin-Cicocalteu Reagent, Abs. Ethanol, Potassium Peroxodisulfate และ Ascorbic Acid จากบริษัท Merck; 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), ABTS-$(NH_4)_2$, Tyrosinase f. Mushroom Lyophilized Powder, L-DOPA และ Gallic Acid จากบริษัท Sigma-Aldrich

การเตรียมตัวอย่างพืช

ตัวอย่างรากมะพูด (*Garcinia dulcis* Kurz) จาก อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช ซึ่งเก็บมาจากต้นที่ผ่านการยืนยันชนิดพืชโดยผู้เชี่ยวชาญด้านพืชจากภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์แล้ว (หมายเลขตัวอย่าง 0012652 เก็บในพิพิธภัณฑ์พืช ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) นำมาล้างและสับเป็นชิ้นขนาดเล็ก ผึ่งให้แห้งในที่ร่ม นำไปบดให้เป็นชิ้นขนาดเล็กลง และวางในที่ร่มจนมีน้ำหนักคงที่

การเตรียมสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อย

นำรากมะพูดบดแห้ง น้ำหนัก 682.59 กรัม มาสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน กรองสารละลาย และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน แบ่งสารสกัดหยาบน้ำหนัก 25.05 กรัม มาแยกเป็นส่วนย่อยด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีแบบรวดเร็ว โดยใช้ซิลิกาเจล C60 เป็นตัวอยู่กับที่ และใช้ 0-50 % เอทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวเคลื่อนที่ วิเคราะห์ส่วนย่อยที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีแผ่นบาง และนำส่วนย่อยที่มีลักษณะโครมาโทแกรมเหมือนกันรวมเข้าด้วยกันได้เป็นส่วนสกัดย่อยจำนวน 10 ส่วน (A-J)

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม

ดัดแปลงวิธีจาก Singleton และคณะ [11] โดยการสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิคที่ความเข้มข้น 100 80 60 40 20 10 5 และ 2.5 mg/ml และเตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้น 10 mg/ml ในเอทานอล วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมทำโดยนำสารตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 ml มาเติม 10 % Folin - Ciocalteu Reagent ปริมาตร 2.5 ml ผสมให้เข้ากัน และวางทิ้งไว้ 8 นาที จากนั้นเติม 20 % Sodium Carbonate ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน และวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที (ชุดควบคุมเตรียมโดยการเติมเอทานอลแทนสารตัวอย่าง) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ทำซ้ำ 3 ชุดการทดลอง และคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/g Extract) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Assay

ดัดแปลงตามวิธีของ Manok และ Limcharoen (2015) [12] โดยเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 M และ สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 1.0-0.1 mg/ml (Stock Solution) การทดสอบทำโดยการนำสารละลาย DPPH ปริมาตร 3 ml ผสมกับสารตัวอย่าง ปริมาตร100 µl และวางในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที (ชุดควบคุมเตรียมโดยการเติมเอทานอลแทนสารตัวอย่าง) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm (A_{sample}) ทำซ้ำ 3 ชุดการทดลอง ใช้กรดแอสคอร์บิคเป็นสารมาตรฐาน และคำนวณ

หาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสูตร

$$\% \text{ การต้านอนุมูลอิสระ DPPH} = [(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100$$

นำค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระมาเขียนกราฟเทียบกับความเข้มข้นในหลอดทดลอง โดยแกน X เป็นความเข้มข้นในหลอดทดลอง แกน Y เป็นค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ และใช้สมการเส้นตรงคำนวณหาค่า IC_{50}

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS Assay

ดัดแปลงตามวิธีของ Re และคณะ [13] โดยเตรียมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ (นำสารละลาย 7 mM ABTS และ 2.45 mM $K_2S_2O_8$ ผสมในอัตราส่วน 2:1 และวางไว้ในที่มืด 15 ชั่วโมง และทำการเจือจางสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยเอทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ในช่วง 0.7 ± 0.03) เตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 1.0-0.1 mg/ml (Stock Solution) การทดสอบทำโดยนำสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ปริมาตร 0.9 ml มาผสมกับสารตัวอย่างปริมาตร 0.1 ml วางทิ้งไว้ 6 นาที (ชุดควบคุมเตรียมโดยการเติมเอทานอลแทนสารตัวอย่าง) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm (A_{sample}) ทำซ้ำ 3 ชุดการทดลอง ใช้กรดแอสคอร์บิคเป็นสารมาตรฐาน และคำนวณหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS จากสูตร

$$\% \text{ การต้านอนุมูลอิสระ ABTS} = [(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100$$

นำค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระมาเขียนกราฟเทียบกับความเข้มข้นในหลอดทดลอง โดยแกน X เป็นความเข้มข้นในหลอดทดลอง แกน Y เป็นค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ และใช้สมการเส้นตรงคำนวณหาค่า IC_{50}

การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกโดยวิธี FRAP Assay

ดัดแปลงตามวิธีของ Benzie และ Strain (1996) [14] โดยการสร้างกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้น 100, 80, 60, 40 และ 20 mg/ml นำสารละลาย FRAP Reagent 290 µl (เตรียมโดยนำ Acetate Buffer pH 3.6 มาผสมกับสารละลาย Ferric Chloride และ สารละลาย 2,4,6-tri-2-pyridyl-2-triazine (TPTZ) อัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ) ผสมกับสารตัวอย่างความเข้มข้น 1.0-0.1 mg/ml (Stock Solution) ปริมาตร 10 µl ในถาดหลุม 96-well วางไว้ 5 นาที และนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm (ชุดควบคุมเตรียมโดยใช้เอทานอลแทนสารตัวอย่าง) ทำซ้ำ 3 ชุดการทดลอง โดยมี BHT เป็นสารมาตรฐาน และคำนวณความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก (FRAP Value) โดยเปรียบเทียบค่ากับกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคและรายงานค่า FRAP Value ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิคต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (mg AAE/g Extract)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ทดสอบด้วยวิธี Dopachrome โดยใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้น ดัดแปลงตามวิธีของ Alam และคณะ [15] โดยนำสารละลาย Phosphate Buffer (pH 6.8) ปริมาตร 80 µl มาผสมกับสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 100 unit/ml ปริมาตร 40 µl และสารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้น 7.5-0.5 mg/ml ละลายใน 20% EtOH) ปริมาตร 40 µl ในถาดหลุม 96-well นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 3 mM L-DOPA ปริมาตร 40 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C 20 นาที นำสารละลาย

ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader ทำซ้ำ 3 ชุดการทดลอง โดยมีกรดแอสคอร์บิคเป็นสารมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสูตร

$$\% \text{ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส} = ([(A-B)-(C-D)] / (A-B)) \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มีสารตัวอย่าง (ใส่แทนด้วยตัวทำละลาย) และมีเอนไซม์
B คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มีสารตัวอย่าง และไม่มีเอนไซม์ (ใส่แทนด้วยตัวทำละลาย)
C คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีสารทดสอบ และมีเอนไซม์
D คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีสารทดสอบ และไม่มีเอนไซม์ (ใส่แทนด้วยตัวทำละลาย)

นำค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมาเขียนกราฟเทียบกับความเข้มข้นของสารตัวอย่างในถาดหลุม โดยแกน X เป็นความเข้มข้นในถาดหลุม แกน Y เป็นค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และใช้สมการเส้นตรงคำนวณหาค่า IC_{50}

การแยกสารบริสุทธิ์ของส่วนสกัดย่อย

นำส่วนสกัดย่อย E และ I ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ในระดับดีมาแยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ โดยส่วนสกัดย่อย E (1.19 g) นำมาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (CC) โดยใช้ซิลิกาเจล 100 เป็นตัวอยู่กับที่ และใช้ 20 % อะซิโตนในเฮกเซนเป็นตัวเคลื่อนที่ สามารถแยกเป็นส่วนย่อยได้จำนวน 6 ส่วน (E1-E6) โดยส่วนย่อย E4 (0.29 g) ซึ่งเป็นส่วนที่มีสารองค์ประกอบหลัก (Major compound) นำมาแยกให้ได้สารหลักที่บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค CC โดยใช้ซิลิกาเจล 100 เป็นตัวอยู่กับที่ และใช้ 15 % อะซิโตนในเฮกเซนเป็นตัวเคลื่อนที่ได้ผลึกสีเหลืองส้มซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ 1 (16 mg) ส่วนย่อย E6 (0.22 g) นำมาแยกด้วยเทคนิค CC โดยใช้ซิลิกาเจล 100 เป็นตัวอยู่กับที่ และใช้ 20 % อะซิโตนในเฮกเซนเป็นตัวเคลื่อนที่ได้ส่วนย่อย 3 ส่วน (E6.1-E6.3) นำส่วนย่อย E6.2 (0.10 g) มาแยกด้วยเทคนิค CC อีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล 100 เป็นตัวอยู่กับที่ และใช้ 15 % อะซิโตนในเฮกเซนเป็นตัวเคลื่อนที่ ได้สารบริสุทธิ์ 2 (9 mg) ซึ่งเป็นของแข็งสีเหลือง

นำส่วนสกัดย่อย I (1.95 g) มาแยกด้วยเทคนิค CC โดยใช้ซิลิกาเจล 100 เป็นตัวอยู่กับที่ และใช้ 35 % อะซิโตนในเฮกเซนเป็นตัวเคลื่อนที่สามารถแยกเป็นส่วนย่อยได้จำนวน 5 ส่วน (I1-I5) โดยส่วนย่อย I3 (0.38 g) มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก จึงนำมาแยกต่อด้วยเทคนิค CC โดยใช้ซิลิกาเจล 100 เป็นตัวอยู่กับที่ และใช้ 30 % อะซิโตนในเฮกเซนเป็นตัวเคลื่อนที่ได้ของแข็งสีเหลืองซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ 3 (12 mg) ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย J (2.35 g) ซึ่งแสดงฤทธิ์ในระดับดี ไม่ได้นำมาแยกหาสารบริสุทธิ์ เนื่องจากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ไม่ปรากฏสารหลักที่ชัดเจน

ผลการทดลอง

รากมะพูดแห้งน้ำหนัก 682.59 กรัม นำไปสกัดด้วยเอทานอล ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หลังจากระเหยตัวทำละลายออก ได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะเป็นของหนืดสีน้ำตาลดำ น้ำหนัก 64.30 กรัม คิดเป็นร้อยละ 9.42 เมื่อแบ่งสารสกัดหยาบน้ำหนัก 25.05 กรัม มาแยกให้เป็นส่วนย่อยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว โดยใช้ซิลิกาเจล ชนิด C60 เป็นตัวอยู่กับที่ และใช้ 0-50 % เอทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวเคลื่อนที่ ได้ส่วนสกัดย่อยจำนวน 10 ส่วน (A-J)

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยรากมะพูดโดยใช้ Folin-Ciocalteu Assay สามารถคำนวณเทียบปริมาณฟีนอลิกได้จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค $y = 0.002x + 0.2867$ ($R^2 = 0.9979$) ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบรากมะพูดเท่ากับ 338.42 ± 6.08 mg GAE/g Extract และของส่วนสกัดย่อยในช่วง 24.65-892.09 mg GAE/g Extract ดังแสดงในตารางที่ 1

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยโดยวิธี DPPH และ ABTS Assay ดังตารางที่ 1 พบว่า สารสกัดหยาบแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 71.07 ± 0.02 µg/ml และ 28.080.01 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งด้อยกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค (IC_{50} : DPPH 11.44 ± 0.02 µg/ml, ABTS 2.700.02 µg/ml) อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่การทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อย A-J ที่ความเข้มข้น 1.0-0.1 mg/ml (Stock Solution) พบว่าส่วนสกัดย่อย E แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้ดีที่สุดด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 29.7 ± 0.05 µg/ml และ 7.90 ± 0.02 µg/ml ตามลำดับ

ประสิทธิภาพในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก (FRAP Value) ของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยที่ความเข้มข้น 1.0-0.1 mg/ml (Stock Solution) สามารถคำนวณค่า FRAP Value ได้จากการเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค $y = 0.5518x + 0.218$ ($R^2 = 0.9988$) ซึ่งผลการทดลองพบว่าค่า FRAP Value ของสารสกัดหยาบ เท่ากับ 235.40 ± 3.44 mg AAE/g Extract ในขณะที่ส่วนสกัดย่อยมีค่า FRAP Value ในช่วง 47.35-686.96 mg AAE/g Extract โดยส่วนสกัดย่อย E แสดงความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกได้ดีที่สุด (686.96 ± 9.24 mg AAE/g Extract) และดีกว่าสารสกัดหยาบ 3 เท่า แต่ฤทธิ์ยังด้อยกว่า BHT (1,045.00 ± 10.63 mg AAE/g Extract) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดรากมะพูด

สารตัวอย่าง	Phenolic Content (mg GAE/g Extract)	DPPH Assay IC_{50} (µg/ml)	ABTS Assay IC_{50} (µg/ml)	FRAP Assay (mg AAE/g Extract)	Anti-tyrosinase Activity IC_{50} (µg/ml)
สารสกัดหยาบ	338.42 ± 6.08	71.07 ± 0.02	28.08 ± 0.01	235.403.44	354.15 ± 0.13
ส่วนย่อย A	24.65 ± 2.11	ND	ND	47.35 ± 2.61	ND
ส่วนย่อย B	147.73 ± 7.38	ND	42.09 ± 0.01	178.44 ± 3.22	ND
ส่วนย่อย C	246.21 ± 5.62	70.18 ± 0.02	35.43 ± 0.06	189.80 ± 4.96	ND
ส่วนย่อย D	398.15 ± 12.04	54.46 ± 0.02	26.47 ± 0.03	292.52 ± 5.32	692.72 ± 1.23
ส่วนย่อย E	892.09 ± 18.96	29.79 ± 0.05	7.90 ± 0.02	686.96 ± 9.24	324.56 ± 0.29
ส่วนย่อย F	389.27 ± 9.18	60.38 ± 0.08	15.47 ± 0.01	272.60 ± 1.28	444.23 ± 0.64
ส่วนย่อย G	369.08 ± 10.03	74.24 ± 0.01	23.00 ± 0.01	255.92 ± 4.91	394.04 ± 0.42
ส่วนย่อย H	387.15 ± 12.14	63.30 ± 0.05	19.61 ± 0.02	269.76 ± 3.74	330.56 ± 0.19
ส่วนย่อย I	467.43 ± 14.63	47.98 ± 0.04	11.70 ± 0.01	321.68 ± 4.88	32.20 ± 0.30
ส่วนย่อย J	455.46 ± 13.56	49.66 ± 0.02	12.53 ± 0.02	317.56 ± 3.69	50.00 ± 0.49

ตารางที่ 1 ปริมาณฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดรากมะพูด (ต่อ)

สารตัวอย่าง	Phenolic Content (mg GAE/g Extract)	DPPH Assay IC_{50} (µg/ml)	ABTS Assay IC_{50} (µg/ml)	FRAP Assay (mg AAE/g Extract)	Anti-tyrosinase Activity IC_{50} (µg/ml)
กรดแอสคอร์บิค	-	11.44 ± 0.02	2.70 ± 0.02	-	33.82 ± 0.23
BHT	-	-	-	1,045.00 ±10.63	-

ND คือ ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้ที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ - คือ ไม่ได้ทำการทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดรากมะพูดที่ความเข้มข้น 7.5-0.5 mg/ml (Stock solution) พบว่าสารสกัดหยาบแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 354.15 ± 0.13 µg/ml โดยส่วนสกัดย่อย I มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 32.20 ± 0.30 µg/ml ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดหยาบ และมีศักยภาพใกล้เคียงกับกรดแอสคอร์บิค (IC_{50} 33.82 ± 0.23 µg/ml)

การนำส่วนสกัดย่อย E และ I ซึ่งแสดงฤทธิ์ได้ดีและมีสารหลักที่มองเห็นบนแผ่น TLC อย่างชัดเจนมาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์จำนวน 3 สาร (สาร 1-3) ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 1 โดยมีข้อมูลทางกายภาพและข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีดังนี้

สาร 1 เป็นผลึกสีเหลืองส้ม (m.p. 200-201°C) ข้อมูล UV (EtOH) λ_{max} (nm) (logε) : 238 (2.09), 255 (1.42), 317 (0.86) ข้อมูล FT-IR (Neat) ν (cm^{-1}) : 3541 (O-H ยืด), 1685 (C=O ยืด) ข้อมูล ^{1}H NMR (Acetone-d_6, 300 MHz) : δ 12.75 (OH-1, *s*); 7.28 (H-3, *s*); 7.22 (H-6, *dd,* 7.8, 2.1 Hz); 7.15 (H-7, *t,* 7.8 Hz); 7.56 (H-8, *dd,* 7.8, 2.1 Hz); 6.18 (H-2′, *dd*, 17.4, 10.5 Hz); 4.87 (H-3′*cis*, *dd*, 10.5, 1.2 Hz), 4.90 (H-3′*trans*, *dd*, 17.4, 1.2 Hz); 1.40 (CH_3-1′, *s*)

สาร 2 เป็นของแข็งสีเหลือง (m.p. 222-223°C) ข้อมูล UV (EtOH) λ_{max} (nm) (logε) : 248 (0.99), 313 (0.53), 367 (0.28) ข้อมูล FT-IR (Neat) ν (cm^{-1}) : 3502 (O-H ยืด), 1730 (C=O ยืด) ข้อมูล ^{1}H NMR (Acetone-d_6, 300 MHz) : δ 12.57 (OH-1, *s*); 7.36 (H-3, *s*); 7.24 (H-6, *dd,* 7.8, 1.5 Hz); 7.18 (H-7, *t,* 7.8 Hz); 7.68 (H-8, *dd,* 7.8, 1.5 Hz), 6.31 (H-2′, *dd*, 17.4,10.5 Hz); 5.12 (H-3′*cis*, *dd*, 10.5, 1.2 Hz), 5.26 (H-3′*trans*, *dd*, 17.4, 1.2 Hz); 1.45 (CH_3-1′, *s*)

สาร 3 เป็นของแข็งสีเหลือง (m.p. 210-211°C) ข้อมูล UV $(EtOH)_{max}$ (nm) (logε) : 250 (2.70), 322 (0.84) ข้อมูล FT-IR (Neat) ν (cm^{-1}) : 3304 (O-H ยืด), 1598 (C=O ยืด) ข้อมูล ^{1}H NMR (Acetone-d_6, 300 MHz) : δ 12.77 (OH-1, *s*); 7.3 (H-3, *s*); 6.97 (H-7, *d,* 9.0 Hz); 7.73 (H-8, *d,* 9.0 Hz); δ 6.41 (H-2′, *dd*, 17.4, 10.5 Hz); 5.18 (H-3′*cis*, *dd*, 10.5, 1.2 Hz); 5.34 (H-3′*trans*, *dd*, 17.4, 1.2 Hz); 1.58 (CH_3-1′, *s*)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเอทานอลรากมะพูดและส่วนสกัดย่อยในการต้านการออกซิเดชันและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาและประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยเริ่มจากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อย ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารที่มีสมบัติต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดดเด่นกว่าสารจากธรรมชาติใน

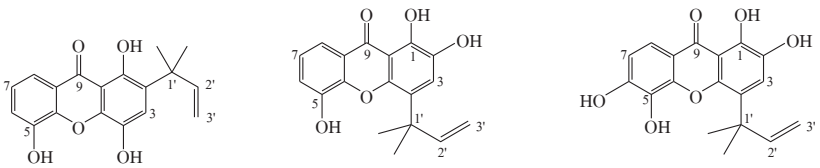
กลุ่มอื่นๆ นั่นคือความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจะขึ้นกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดนั้น จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยรากมะพูดมีสมบัติที่ดีในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยสารสกัดหยาบมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 338.42 ± 6.08 mg GAE/g Extract ซึ่งมีปริมาณค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับปริมาณฟีนอลิกรวมในผลมะขามป้อม (260.20 mg GAE/g dw) [16] และปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัด 80 % เมทานอลเปลือกผลมะพูด (56.52 mg GAE/g Extract) [17] โดยค่าตัวเลขมีความแตกต่างกับสารสกัดเปลือกผลมะพูดค่อนข้างมาก อาจเนื่องจากวิธีการทดลอง อายุของพืชตัวอย่างและส่วนของพืชที่นำมาศึกษามีความแตกต่างกัน ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย D-J ซึ่งเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วยตัวเคลื่อนที่ที่มีสภาพขั้วในช่วง 2-50 % เอทานอลในไดคลอโรมีเทน มีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดหยาบ โดยส่วนสกัดย่อย E มีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด (892.09 ± 18.96 mg GAE/g Extract)

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อย A-J ด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP Assay (ตารางที่ 1) พบว่า สารสกัดหยาบแสดงประสิทธิภาพในการให้ไฮโดรเจนแรดิคัล ($H^{\cdot}$) หรือเข้ารวมตัวกับอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้ในระดับดี ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 71.07 ± 0.02 μg/ml และ 28.08 ± 0.01 μg/ml ตามลำดับ บ่งชี้ว่าสารสกัดหยาบเอทานอลรากมะพูดน่าจะมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเมื่อทดสอบกับส่วนสกัดย่อย พบว่าส่วนสกัดย่อย E ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด มีสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ลดลงร้อยละ 50 ปริมาณมากที่สุด ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 29.79 ± 0.05 μg/ml และ 7.90 ± 0.02 μg/ml ตามลำดับ ซึ่งแสดงฤทธิ์ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบประมาณ 2.5 เท่า และ 3.5 ตามลำดับ แต่ทั้งนี้ส่วนสกัดย่อย E ยังคงมีประสิทธิภาพด้อยกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค (IC_{50} เท่ากับ 11.44 ± 0.02 μg/ml และ 2.70 ± 0.02 μg/ml ตามลำดับ) นั่นคือน่าจะมีสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีเป็นองค์ประกอบอยู่ในส่วนสกัดย่อย E ซึ่งประสิทธิภาพในการให้ไฮโดรเจนแรดิคัลของสารฟีนอลิกในส่วนสกัดย่อย E ยังให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก ด้วยวิธี FRAP Assay ซึ่งส่วนสกัดย่อย E มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกได้ดีที่สุด โดยวิเคราะห์จากการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ Fe^{3+}-TPTZ ไปเป็น Fe^{2+}-TPTZ ถ้าสารที่ทดสอบสามารถให้อิเล็กตรอนได้ดี ก็จะทำให้เหล็กเฟอริกเกิดการรีดักชันได้มาก ค่า FRAP Value ก็จะสูง โดยส่วนสกัดย่อย E มีค่า FRAP Value เท่ากับ 686.96±9.24 mg AAE/g Extract ซึ่งสูงกว่าค่า FRAP Value ของสารสกัดหยาบ (235.40 ± 3.44 mg AAE/g Extract) และจากตัวเลขค่า FRAP Value ของส่วนสกัดย่อย E ที่ค่อนข้างสูง แสดงให้ทราบว่าส่วนสกัดย่อย E มีสารองค์ประกอบที่มีศักยภาพที่ดีมากในการต้านออกซิเดชันหรือเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี (ผลสอดคล้องกับการทดสอบโดยวิธี DPPH และ ABTS Assay) ซึ่งส่วนสกัดย่อย E แสดงฤทธิ์ด้อยกว่าสารมาตรฐาน BHT (1,045.00 ± 10.63 mg AAE/g Extract) เพียง 1.5 เท่า เท่านั้น

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยรากมะพูด ด้วยวิธี DOPAchrome โดยใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้น ซึ่งเอนไซม์ไทโรซิเนสจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยเปลี่ยน L-DOPA เป็น DOPAquinone และ DOPAquinone จะถูกเปลี่ยนเป็น DOPAchrome ด้วยกระบวนการ Auto-oxidation [18] ถ้าสารสกัดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีจะส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์ DOPAchrome ในปริมาณน้อย จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ค่อนข้างน้อย ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 354.15 ± 0.13 μg/ml โดยส่วนสกัดย่อย I มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 32.20 ± 0.30 μg/ml ซึ่งแสดงฤทธิ์

ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบมากกว่า 10 เท่า และยังแสดงฤทธิ์ได้ดีกว่ากรดแอสคอร์บิค (IC_{50} 33.82 ± 0.23 μg/ml) อีกด้วย และจากผลการศึกษาทำให้ทราบว่าการนำสารสกัดรากมะพูดไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดควรที่จะทำการแยกเป็นส่วนสกัดย่อยก่อนการนำไปใช้ เพื่อเป็นการกำจัดสารที่มีขั้วต่ำที่อาจไม่ใช่สารประเภทฟีนอลิกออกไป

ผลการทดสอบฤทธิ์พบว่าส่วนสกัดย่อยที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วย นั่นคือส่วนสกัดย่อย E มีศักยภาพสูงที่สุดในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ในระดับที่น่าพอใจ ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย I และ J ก็มีศักยภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และยังแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ในระดับที่น่าพอใจอีกด้วย จึงได้นำสารสกัดหยาบ E และ I มาแยกเพื่อเอาสารหลักที่เป็นองค์ประกอบออกมาด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟี (ส่วนสกัดย่อย J ไม่ปรากฏสารหลักที่ชัดเจน จึงไม่ได้ทำการแยก) ได้สารที่เป็นของแข็งสีเหลืองจำนวน 3 สาร เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (UV IR และ ^{1}H NMR) และเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัมและจุดหลอมเหลวกับสารที่เคยมีการรายงาน สรุปได้ว่า สาร 1 คือ 12b-hydroxy-des-*D*-garcigerin A สาร 2 คือ Globuxanthone และ สาร 3 คือ Symphoxanthone [5] ซึ่งสารทั้ง 3 เป็นสารฟีนอลิกประเภทแซนโทนที่เคยมีรายงานในส่วนเปลือกต้นมะพูด [2] ดังแสดงโครงสร้างในภาพที่ 1 โดยสารทั้งสามชนิดนี้ มีรายงานว่าแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดี แต่ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 1 2 และ 3

การที่ส่วนสกัดย่อย E แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด อาจเนื่องจากมีสาร 1 และ 2 เป็นสารองค์ประกอบหลัก ซึ่งเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของสารจะเห็นว่าเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในตำแหน่ง 1,2- และ 1,4- (ตำแหน่ง *Ortho* และ *Para*) ซึ่งไฮโดรเจนแรดิคัลบนหมู่ไฮดรอกซิลที่สองตำแหน่งนี้จะหลุดออกได้ง่าย และเมื่อหลุดออกไปแล้วจะเกิดเป็นสารประกอบ *Ortho*-quinone และ *Para*-quinone ที่มีเสถียรภาพ จึงมีความเป็นไปได้ที่สารหลักเหล่านี้จะเป็นสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย I ซึ่งมีสาร 3 เป็นสารองค์ประกอบหลักแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่า แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดหลายประการทำให้ยังไม่ได้นำสารหลักเหล่านี้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยรากมะพูด พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีความสอดคล้องกับปริมาณสารฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบ โดยสารสกัดย่อย E, I และ J ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกมากแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดี และมีศักยภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารสกัดหยาบและส่วนสกัดย่อยอื่นๆ ซึ่งปริมาณส่วนสกัดย่อยดังกล่าวคิดเป็นร้อยละ 4.75 7.78 และ 9.38

ตามลำดับ ของสารสกัดหยาบ นั่นคือส่วนสกัดย่อยจากมะพูดมีศักยภาพที่ดีหรือมีความเหมาะสมในการนำประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านสุขภาพและเครื่องสำอางต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากเงินอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยทักษิณ

References

[1] El-Abaseri, T. B., Hammiller, B., Repertinger, S. K., & Hansen, L. A. (2013). The epidermal growth factor receptor increases cytokine production and cutaneous inflammation in response to ultraviolet irradiation. *ISRN Dermatology*, *2013*, 848705. DOI: 10.1155/2013/ 848705.

[2] Thepthong, P., Phongpaichit, S., Carroll, A. R., Voravuthikunchai, S. P., & Mahabusarakam, W. (2017). Prenylated xanthones from the stem bark of *Garcinia dulcis*. *Phytochemistry Letters*, *21*, 32–37. DOI:10.1016/j.phytol.2017.05.014.

[3] Iinuma, M., Tosa, H., Ito, T., Tanaka, T., & Riswan, S. (1996). Three new benzophenone-xanthone dimers from the root of *Garcinia dulcis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *44*(9), 1744–1747. DOI:10.1248/cpb.44.1744.

[4] Iinuma, M., Ito, T., Tosa, H., Tanaka, T., & Riswan, S. (1996). Five new xanthones from *Garcinia dulcis*. *Journal of Natural Products*, *59*(5), 472–475. DOI:10.1021/np960340r.

[5] Thepthong, P. (2017). *Xanthones and other phenolics from the stem bark of Garcinia dulcis with antioxidative and antibacterial activities*. Doctoral Dissertation, Prince of Songkla University.

[6] Chang, L. W., Juang, L. J., Wang, B. S., Wang, M. Y., Tai, H. M., Hung, W. J., Chen, Y. J., & Huang, M. H. (2011). Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. *Food and Chemical Toxicology, 49*(4), 785–790. DOI: 10.1016/ j.fct.2010.11.045.

[7] Nagendra Prasad, K., Yang, B., Yang, S., Chen, Y., Zhao, M., Ashraf, M., & Jiang, Y. (2009). Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) seeds. *Food Chemistry, 116*(1), 1–7. DOI: 10.1016/j. foodchem.2009.01.079.

[8] Deachathai, S., Mahabusarakam, W., Phongpaichit, S., & Taylor, W. C. (2005). Phenolic compounds from the fruit of *Garcinia dulcis*. *Phytochemistry*, *66*(19), 2368–2375. DOI:10.1016/j. phytochem.2005.06.025.

[9] Deachathai, S., Mahabusarakam, W., Phongpaichit, S., Taylor, W. C., Zhang, Y. J., & Yang, C. R. (2006). Phenolic compounds from the flowers of *Garcinia dulcis*. *Phytochemistry*, *67*(5), 464–469. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.10.016.

[10] Deachathai, S., Phongpaichit, S., & Mahabusarakam, W. (2008). Phenolic compounds from the seeds of *Garcinia dulcis*. *Natural Product Research*, *22*(15), 1327–1332.DOI: 10.1080/14786410601130406.

[11] Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R.M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, *299*, 152–178. DOI:10.1016/S0076-6879(99)99017-1.

[12] Manok, S., & Lincharoen, P. (2015). Investigating antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP assay and total phenolic compounds of herbal extracts in Ya-Hom Thepphachit. *Advanced Science*, *15*(1), 106–117.

[13] Re, R., Pellegrini. N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, *26*(9-10), 1231–1237. DOI: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.

[14] Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70–76. DOI:10. 1006/abio.1996.0292.

[15] Alam, N., Yoon, K. N., & Lee, T. S. (2011). Evaluation of the antioxidant and antityrosinase activities of three extracts from *Pleurotus nebrodensis* fruiting bodies. *African Journal of Biotechnology*, *10*(11), 2978–2986. DOI: 10.5897/AJB10.2660.

[16] Pancoke, J., Kerdchoechuen, O., & Laohakunjit, N. (2012). Antioxidant capacity and total phenolics of 3 plant extracts. *Agricultural Science Journal*, *43*(2)(suppl.), 381–384.

[17] Gogoi, N., Gogoi, A., Neog, B., Baruah, D., & Singh, K. D. (2017). Evaluation of antioxidant and hepatoprotective activity of fruit rind extract of *Garcinia dulcis* (Roxburgh) Kurz. *Pharmacognosy Research*, *9*(3), 266–272. DOI: 10.4103/0974-8490.210330.

[18] Ito, S., & Wakamatsu, K. (2008). Chemistry of mixed melanogenesis-pivotal roles of dopaquinone. *Photochemistry and Photobiology*, *84*(3), 582–592. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2007.00238.x.