ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากผลมะตาดด้วยวิธีการดักจับอนุมูลเอบีทีเอส

The Antioxidant Activity of Aqueous Extract from *Dillenia indica* Fruits using ABTS Scavenging Assay

อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล[1*] และยุทธชัย อุสุพานิชย์[1]

[1]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม
[*]arunrat28@webmail.npru.ac.th

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากผลมะตาดแห้งด้วยวิธีการดักจับอนุมูลเอบีทีเอส ผลพบว่าสารสกัดน้ำออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระดับปานกลาง มีความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูลเอบีทีเอสได้ร้อยละ 50 (ค่า IC_{50}) เท่ากับ 44.60±0.55 มิลลิกรัมต่อลิตร เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.82±0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้ทราบว่าการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำสกัดจากผลมะตาดเป็นส่วนประกอบสามารถช่วยลดอัตราเสี่ยงของโรคที่มีสาเหตุของอนุมูลอิสระได้

คำสำคัญ: มะตาด แอปเปิ้ลมอญ ดิลลิเนียซีอี ต้านอนุมูลอิสระ เอบีทีเอส

Abstract

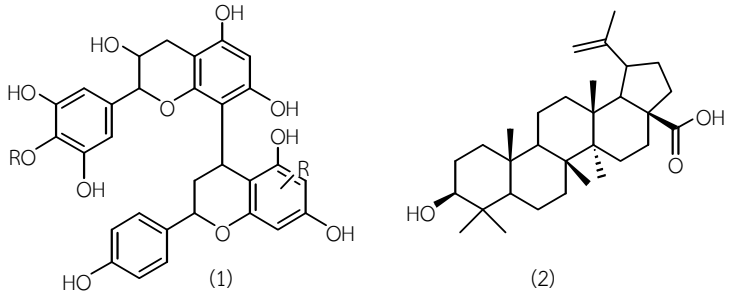
This study was aimed to analyze antioxidation activity of aqueous extract from the dried Dillenia indica fruits according to ABTS radical scavenging assay. The result showed that the extract possessed moderately antioxidant activity with a half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 44.60±0.55 mg/L by comparison with trolox as a standard compound that exhibited an IC_{50} of 5.82±0.02 mg/L. According to this result, a consumption of food and beverage prepared from D. indica fruits as an ingredient could reduce the risk of disease caused by a free radical.

Keywords: dillenia indica, elephant apple, dilleniaceae, antioxidation, ABTS

1. บทนำ

มะตาดหรือแอปเปิ้ลมอญ (elephant apple) เป็นพืชท้องถิ่นชุมชนชาวมอญ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dillenia indica* วงศ์ Dilleniaceae จัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ใบเป็นรูปใบหอกหรือรูปไข่กลับ ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย กว้างประมาณ 8-12 เซนติเมตร และยาวประมาณ 25-30 เซนติเมตร ดอกมีสีขาวนวล ผลเป็นผลเดี่ยว เป็นรูปทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-15 เซนติเมตร ผลอ่อนมีสีเขียว ส่วนผลแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม ผลมีกลิ่นเฉพาะตัว มีเมือกเหนียวและมีรสเปรี้ยวอมฝาด ชาวบ้านชุมชนชาวมอญโดยเฉพาะพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรีและอำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรีนิยมนำผลมะตาดมาประกอบอาหารแกงส้ม แกงคั่ว หรือใช้ผลสดจิ้มกับน้ำพริก ซึ่งมีสรรพคุณช่วยระบบขับถ่าย แก้อาการไอและช่วยขับเสมหะได้ ส่วนวุ้นในผลมะตาดมีลักษณะเหนียวลื่นช่วยเคลือบแผลในกระเพาะและลำไส้ และส่วนใบจะมีรสฝาดสามารถใช้เป็นยาสมานแผลได้ดี (เทคโนโลยีชาวบ้าน, 2561)

การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของส่วนผลมะตาดพบองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ กลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) กลุ่มคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides) และกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloids) (รัตนา เฉลิมกลิ่น ผานิตตา อัจฉริยนนท์ ปราณี ปิ่นเงิน และพัฒนพงศ์ จินดามงคล, 2549) สารบริสุทธิ์ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (ภาพที่ 1) ที่แยกได้จากส่วนผล ได้แก่ โปรแอนโทไซยานิน (proanthocyanin) ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แรง (Fu et al., 2015) และกรดเบทูลินิก (betulinic acid) ซึ่งเป็นสารกลุ่มเทอร์พีนออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937, HL60 และ K562 (Kumar et al., 2010) ซึ่งมีสาเหตุจากอนุมูลอิสระด้วยเช่นกัน และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) (Biwas et al., 2017)



ภาพที่ 1 โครงสร้าง (1) โปรแอนโทไซยานิน และ (2) กรดเบทูลินิก

ในปี 2005 Abdile et al. นำผลมะตาดแห้งสกัดด้วยเมทานอล เอทิลอะซีเตต และน้ำ ตามลำดับ โดยการแช่ที่อุณหภูมิห้อง ทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนมูลของสารสกัดต่าง ๆ ด้วยวิธี phosphomolypdenum และวิธี β-carotene-linolenate model system มีค่าร้อยละการยับยั้ง เท่ากับ 45-80 และ 30-80 ตามลำดับ และทดสอบวิธี DPPH radical scavenging activity มีค่า IC_{50} เท่ากับ 25-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในปี 2012 Das et al. เตรียมสารสกัดผลมะตาดด้วยเมทานอลและปิโตรเลียมอีเทอร์โดยเครื่องสกัดซอกห์เลต (Soxhlet extractor) และสารสกัดน้ำโดยการแช่ที่อุณหภูมิห้อง ทดสอบโดยวิธี DPPH radial scavenging assay, hydroxyl radical, oxygen radical, nitric oxide inhibitions และ reducing ability มีค่า IC_{50} เท่ากับ 31-66, 50-59, 51-93, 40-72 และ 40-102 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2. วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากผลมะตาดด้วยวิธีดักจับอนุมูลเอบีทีเอส

3. อุปกรณ์และวิธีการ/วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีการทดลองทั่วไป

ความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) และค่าการดูดกลืนแสง (A) วิเคราะห์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ บริษัท Hitachi U -1800 และคิวเวตต์เป็นพลาสติก ตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน และเอทานอล นำมากลั่นก่อนใช้เป็นตัวทำละลาย สกัด สารมาตรฐานโทรลอกซ์ (trolox) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ความบริสุทธิ์ >97% เอบีทีเอส (ABTS) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich และโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต (potassium persulfate) ยี่ห้อ Pan Reac Apply Chem

3.2 แหล่งวัตถุดิบ

เก็บตัวอย่างประกอบด้วยกิ่งที่มีใบและดอกที่สมบูรณ์ จากหมู่บ้านโบอ่อง ตำบลปิล็อก อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560 นำมาจัดเรียงและตัดแต่งตัวอย่างบนกระดาษหนังสือพิมพ์ขนาดไม่เกิน 25x42 เซนติเมตร โดยจัดแสดงส่วนต่าง ๆ ให้ชัดเจน ทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์อีกชั้น ทำให้แห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิไม่เกิน 70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้งสนิท ส่งพิสูจน์และเก็บตัวอย่างพืชอัดแห้งอ้างอิงเลขที่ BKF no. 194726 ไว้ที่สำนักหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

3.3 การเตรียมสารสกัดจากผลมะตาด

นำผลมะตาดสดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-15 เซนติเมตร ผ่าเอาเมล็ดออกก่อนนำมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วอบให้แห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (ปริมาณน้ำร้อยละ 89.94) ชั่งผงมะตาดแห้งบดละเอียดหนัก 7.767 กรัม สกัดต่อเนื่องด้วยเครื่องสกัดซอกห์เลตด้วยเฮกเซนเพื่อกำจัดไขมันออกก่อน แล้วนำกากเดิมมาสกัดต่อด้วยน้ำกลั่น จนกระทั่งได้สารสกัดใสไม่มีสี นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกจนกระทั่งแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งลดความดันแบบหมุน คิดเป็นร้อยละผลได้ของสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบน้ำ เท่ากับ 0.5021 และ 30.6810 ตามลำดับ

3.4 วิธีดักจับอนุมูลเอบีทีเอส (ABTS radical scavenging assay)

อ้างอิงวิธีการทดสอบจาก Zhou et al. (2019) โดยผสมสารละลาย ABTS เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟตเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 14-16 ชั่วโมง จะได้สารละลายสต๊อก (stock solution) ของอนุมูลแคตไอออออนเอบีทีเอส (ABTS radical cation, $ABTS^{+\bullet}$) จากนั้นเจือจางสารละลายสต๊อกของ $ABTS^{+\bullet}$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 36 มิลลิลิตร ได้สารละลายใช้งาน (working solution) ของ $ABTS^{+\bullet}$ วัดค่าการดูดกลืนแสง ($A_{control}$) ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ที่ λ_{max} เท่ากับ 734 นาโนเมตร มีค่า $A_{control}$ เท่ากับ 0.700±0.002 จากนั้นผสมสารละลายใช้งานของ $ABTS^{+\bullet}$ ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร กับสารละลายของสารสกัดน้ำจากผลมะตาด (ความเข้มข้นในช่วง 0-500 มิลลิกรัมต่อลิตร) ความเข้มข้นละ 0.6 มิลลิลิตร (วิเคราะห์ 3 ซ้ำ) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (A_{sample}) ที่ λ_{max} เท่ากับ 734 นาโนเมตร แล้วคำนวณร้อยละการดักจับอนุมูลเอบีทีเอส (%ABTS radical scavenging) ดังสมการ (1)

$$\%\text{ABTS radical scavenging} = [(A_{control} - A_{sample})/A_{cotrol}] \times 100 \quad (1)$$

เมื่อ $A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายใช้งานของ $ABTS^{+\bullet}$

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

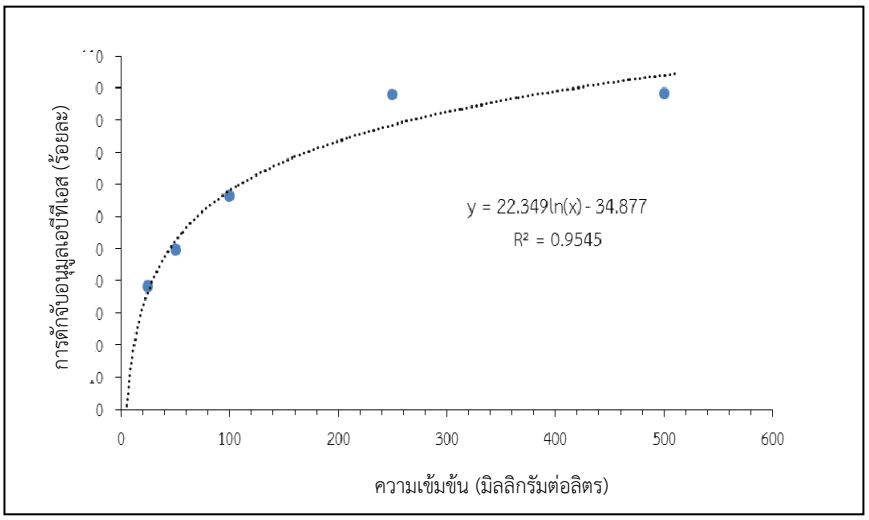
การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะพิจารณาจากความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูลเอบีทีเอสได้ร้อยละ 50 (Half Maximal Inhibitory Concentration, IC_{50}) โดยเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (ความเข้มข้นในช่วง 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร)

4. ผลการวิจัยและอภิปราย

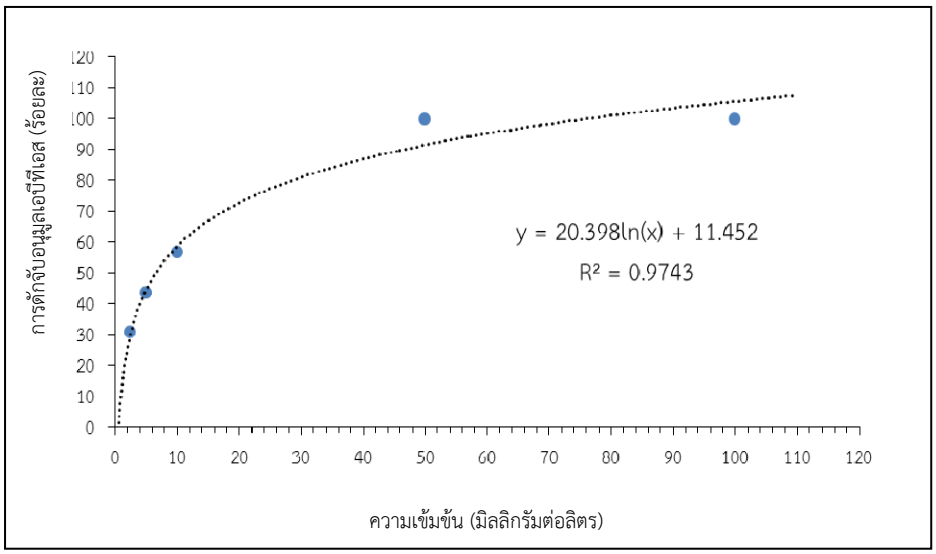
ผลการทดสอบการดักจับอนุมูลเอบีทีเอสในสารสกัดจากผลมะตาดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 1 แล้วเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (แกน X) และการดักจับอนุมูลเอบีทีเอส (แกน Y) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 44.60±0.55 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 2) เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.82±0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 3) การเกิดปฏิกิริยาเคมีระหว่าง $ABTS^{+\bullet}$ และสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากผลมะตาด ดังภาพที่ 4 โดยในขั้นตอนแรก ABTS กับปฏิกิริยากับโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต เกิด $ABTS^{+\bullet}$ (Moon and Shibamoto, 2009) จากนั้นโปรแอนโทไซยานิน (Fu et al., 2015) กรดเบทูลินิก (Kumar et al., 2010) หรือสารประกอบฟีนอลิกซึ่งพบในผลมะตาด ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ โดยส่วนโครงสร้างของสารเหล่านั้นประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, OH) บนวงเบนซีน เมื่อทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{+\bullet}$ โครงสร้างจะเปลี่ยนเป็นอนุมูลที่มีความเสถียร

ตารางที่ 1 ผลการดักจับอนุมูลเอบีทีเอสของสารสกัดน้ำจากผลมะตาด

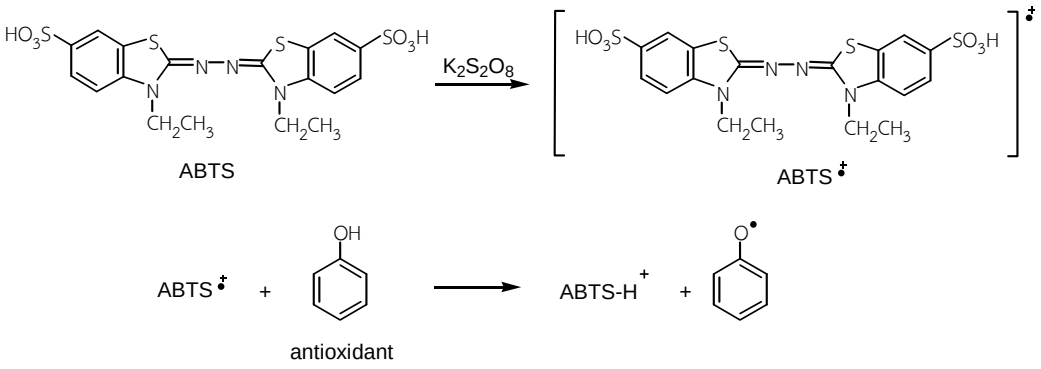
ตัวอย่าง	**ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)**	**การดักจับอนุมูลเอบีทีเอส (ร้อยละ)**	**IC_{50} (มิลลิกรัมต่อลิตร)**
สารสกัดน้ำ	0	0.00±0.00	44.60±0.55
	25	38.24±0.17	
	50	49.45±0.46	
	100	66.19±0.36	
	250	98.04±0.22	
	500	98.28±0.38	
โทรลอกซ์	0	0.00±0.00	5.82±0.02
(สารมาตรฐาน)	2.5	30.47±0.28	
	5	43.39±0.30	
	10	56.68±0.31	
	25	98.75±0.22	
	50	99.47±0.17	



ภาพที่ 2 ร้อยละการดักจับอนุมูลเอบีทีเอสของสารสกัดน้ำจากผลมะตาดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 3 ร้อยละการดักจับอนุมูลเอบีทีเอสของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาสารต้านอนุมูลอิสระกับ $ABTS^{+\bullet}$

องค์ประกอบทางเคมีในผลมะตาดพบโปรแอนโทไซยานิน ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งผู้วิจัยและคณะได้วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolics content) และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoids content) ของสกัดน้ำจากผลมะตาด มีค่าเท่ากับ 15.7596±0.10 มิลลิกรัมสมมูลแกลลิกต่อพืชแห้ง 1 กรัม และ 12.1592±0.13 มิลลิกรัมสมมูลแคทีชินกต่อพืชแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ (การะเกตุ โบอ่องเจริญลาภ สรีวรรณ อ่อนบัว และอรุณรัตน์ สัณฐิติ-กวินสกุล, 2561) โดยผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Das et al. (2012) วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมได้ เท่ากับ ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก ซึ่งโครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีเหล่านั้นมีสภาพมีขั้ว (polarity) ค่อนข้างมาก สามารถใช้น้ำซึ่งมีสภาพขั้วมากเช่นกันจึงสกัดสารที่มีสภาพขั้วมากออกมาได้ ซึ่งสารเล่านั้นมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระจึงให้ผลการทดลอบการดักจับอนุมูลเอบีทีเอสได้ โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Das et al. (2012) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากผลมะตาด ทดสอบโดยวิธี DPPH radial scavenging assay, hydroxyl, oxygen, nitric oxide inhibition และ reductive ability มีค่า IC_{50} เท่ากับ 74.73, 75.10, 92.44, 71.87 และ 102.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับในปี 2005 Abdile et al. ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radial scavenging assay ของสารสกัดน้ำจากผลมะตาด มีค่าร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 8-18

5. บทสรุป

สารสกัดน้ำจากผลมะตาดออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ในระดับปานกลาง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 44.60±0.55 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งทดสอบโดยวิธีดักจับอนุมูลเอบีทีเอส อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยจะได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและวิเคราะห์ปริมาณของกรดเบทูลินิก หรือสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ในสารสกัดน้ำ รวมทั้งทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการต่าง ๆ เพื่อเป็นการยืนยันผลต่อไป เพื่อจะได้นำองค์ความรู้พัฒนาต่อยอดเป็นสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ (OTOP) ได้แก่ อาหารและน้ำดื่มสมุนไพรที่ทำจากผลมะตาด อีกทั้งยังเป็นการอนุรักษ์ภูมิปัญญาพืชสมุนไพรไทยของชุมชนชาวมอญต่อไปอีกด้วย

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม งบประมาณประจำปี 2561

7. เอกสารอ้างอิง

การะเกตุ โบอ่องเจริญลาภ สรีวรรณ อ่อนบัว และอรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล. (2561). **ปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดน้ำจากผลมะตาด**. ใน งานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ครั้งที่ 10 (The 10th NPRU national conference) ระหว่างวันที่ 29 - 30 มีนาคม 2561, หน้า 55-62.

รัตนา เฉลิมกลิ่น ผานิตตา อัจฉริยนนท์ ปราณี ปิ่นเงิน และ พัฒนพงศ์ จินดามงคล. (2549). **การพัฒนาแหล่งเรียนรู้การจัดการอนุรักษ์พรรณไม้อายุยืนของชุมชนเกาะเกร็ด: ต้นมะตาด** (รายงานผลการวิจัย). กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม.

เทคโนโลยีชาวบ้าน. (2561). **มะตาดหรือแอปเปิ้ลมอญ**. ค้นเมื่อ 9 เมษายน 2562 จาก https://www.technologychaoban.com/folkways/article_47924

Abdile, M. H., Singh, R. P., Jayaprakasha, G. H., & Jena, B. S. (2005). Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, 90, 891-896.

Biwas, R., Chanda, J., Kar, A., & Mukherjee, P. K. (2017). Tyrosinase inhibitory mechanism of betulinic acid from *Dillenia indica*. **Food Chemistry**, 232, 689-696.

Das, M., Sarma, B. P., Ahmed, G., Nirmala, C. B., & Choudhury, M. K. (2012). In vitro antioxidant activity total phenolics content of *Dillenia indica*, *Garcinia penducalata*, commonly used fruits in Assamese cuisine. **Free Radicals and Antioxidants**, 2, 30-36.

Fu, C., Yang, D., Peh, W. Y. E., Lai, S., Feng, X., & Yang, H. (2015). Structure and antioxidant acitivties of proanthocyanins from elephant apple (*Dillenia indica* Linn.). **Journal of Food Science**, 80, C2191-C2199.

Kumar, D., Mallick, S., Vedasiromoni, J. R., & Pal, B. C. (2010). Anti-leukemic activity of *Dillenia indica* L. fruit extract and quantification of betulinic acid by HPLC. *Phytomedicine*, 17, 431-435.

Moon, J.-K. and Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 57, 1655–1666.

Zhou, S.-D., Xu, X., Lin, Y.-F., Xia, H.-Y., Huang, L., & Dong, M.-S. (2019). On-line screening and identification of free radical scavenging compounds in *Angelica dahurica* fermented with *Eurotium cristatum* using an HPLC-PDATriple-TOF-MS/MS-ABTS system. **Food Chemistry**, 272, 670–678.