

# ฤทธิ์ทางชีวภาพและฟีนอลิกของสารสกัดเมล็ดและเปลือกของยางสด BIOACTIVITIES AND PHENOLIC OF *LANSIUM DOMESTICUM* CORR. EXTRACTS (SEED AND PEEL)

สุทธิดา วิทนาลัย\*

Suttida Wittanalai\*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์

Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University

\*corresponding author e-mail: suttida.wit@uru.ac.th

(Received: 14 February 2022; Revised: 30 March 2022; Accepted: 31 March 2022)

## บทคัดย่อ

ส่วนของเมล็ดและเปลือกยางสด (*Lansium domesticum* Corr.) ได้ถูกนำมาสกัด โดยใช้ เมทานอล เอทานอล และน้ำ และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay ฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาไกลโคเจน ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี HPLC ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดเปลือกยางสดด้วยเมทานอล มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ( $48.80 \pm 0.09$  mg TE/g DW) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ( $181.05 \pm 11.09$   $\mu$ g KAE/g DW) และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ( $27.62 \pm 1.37$  mg GAE/g DW) สูงที่สุด ในขณะที่ สารสกัดเปลือกยางสดด้วยน้ำ มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ( $128.30 \pm 1.41$  mg TE/g DW) ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก ( $0.88 \pm 0.07$  mg TE/g DW) และฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาไกลโคเจนสูงที่สุด ( $24.26 \pm 5.89$  % AGE inhibition) นอกจากนี้สารสกัดเมล็ดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus* sp. ดีที่สุด ผลการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี HPLC พบสาร protocatechuic acid เป็นส่วนประกอบของส่วนเปลือกและเมล็ดของยางสด งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเปลือกยางสดมีความเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ที่มีส่วนประกอบเป็นสารสกัดธรรมชาติได้

**คำสำคัญ:** ยางสด ฤทธิ์ทางชีวภาพ ฟีนอลิก

## Abstract

The seed and peel of Langsat (*Lansium domesticum* Corr.) were extracted with methanol ethanol and water as solvent and tested for their biological activities. The extracts were tested for their properties included antioxidant activity (DPPH assay, ABTS assay and FRAP assay), antiglycation activity, tyrosinase inhibitor, antibacterial activity, total phenolic contents and HPLC determination of phenolic compounds. The results revealed that methanol peel extract was the most effective extract which showed the highest DPPH radical scavenging activity ( $48.80 \pm 0.09$  mg TE/ g DW), tyrosinase inhibitor ( $181.05 \pm 11.09$   $\mu$ g KAE/g DW) and total phenolic contents ( $27.62 \pm 1.37$  mg GAE/ g DW). While the peel water extract showed the highest ABTS radical scavenging activity ( $128.30 \pm 1.41$  mg TE/ g DW), ferric reducing antioxidant power ( $0.88 \pm 0.07$  mg TE/ g DW ) and antiglycation activity ( $24.26 \pm 5.89$  % AGE inhibition). In addition, the seed methanol extract revealed the highest antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus* sp. The determination of phenolic compounds by HPLC found only protocatechuic acid in both seed and peel extracts. This study indicated that the peel extracts of Langsat was suitable for cosmeceutical product, pharmaceutical products and dietary supplements development with natural ingredient.

**Keywords:** Lansat, Bioactivity, Phenolic

## บทนำ

ลางสาด (*Lansium domesticum* Corr.) โดยจัดอยู่ในวงศ์ Meliaceae เป็นไม้ผลเขตร้อน ข้อมูลจากกรมส่งเสริมการเกษตร รายงานว่าในปีพ.ศ. 2559 จังหวัดอุดรธานีเป็นจังหวัดที่มีเนื้อที่ปลูกลางสาดมากที่สุดในประเทศไทย ลักษณะเฉพาะที่เป็นจุดเด่นลางสาด คือ มีกลิ่นหอมติดจมูกติดลิ้น เมื่อแกะเปลือกออกจะพบยางสีขาวและเหนียว ซึ่งเปื้อนติดเล็บและมือได้ง่าย เมื่อลางสาดยังไม่สุกงอม เนื้อจะกรอบและอมเปรี้ยว แต่เมื่อสุกงอมเปลือกจะอ่อนนิ่ม และเนื้อนุ่มหวานมากขึ้น ไม่กรอบ แต่ข้อเสียของลางสาดที่สุกงอม คือ ร่วงจากพวงและเน่าเสียผิวดำเร็วมาก ประมาณ 1-2 วัน จากรายงานวิจัยที่เกี่ยวกับพืชตระกูลลางสาด พบว่า ส่วนเนื้อมีส่วนรบกวนในการลดความร้อนที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย เมื่อกินเป็นประจำจะช่วยป้องกันไม่ให้เป็นไข้ตัวร้อน และช่วยไม่ให้เกิดอาการร้อนในในปาก รวมถึงแก้ปวดท้องและท้องเสีย ส่วนเมล็ดในสมัยโบราณใช้เป็นยาขับพยาธิ รักษาอาการไข้และเป็นยาฤทธิ์ฝาดสมาน ส่วนเปลือกผลมีสรรพคุณในการนำมาใช้รักษาโรคท้องร่วงและอาการปวดท้อง ส่วนเปลือกต้นใช้เป็นยาต้มกินรักษาเกี่ยวกับโรคลำไส้และ

มีการนำมาสกัดเพื่อใช้รักษาโรคมาลาเรียและแก้พิษแมงป่อง และส่วนใบมีการศึกษาฤทธิ์เพื่อใช้ประโยชน์ทางยา เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย เป็นต้น (สารโรจน์, 2555) ในการบริโภคหรือการแปรรูปลงสาบทำให้มีผลพลอยได้จากกระบวนการแปรรูป เช่น เปลือก เมล็ด ซึ่งมีรายงานว่าส่วนผลพลอยได้เหล่านี้เป็นแหล่งที่ดีของสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในธรรมชาติ

ผู้บริโภคในปัจจุบันให้ความสำคัญเกี่ยวกับสุขภาพจึงทำให้กระแสด้านความนิยมและความต้องการผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น รวมถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) หมายถึง สารที่พบในธรรมชาติจากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ ที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพ (Biological activity) และทางเภสัชวิทยา (Pharmacological activity) เช่น ความสามารถในการต้านหรือชะลอการเกิดออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ และต้านเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น (Carocho et al., 2013) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) เป็นสารที่มีความสำคัญทั้งในเชิงการแพทย์เนื่องจากมีศักยภาพทางด้านเภสัชวิทยา และเชิงคุณค่าทางโภชนาการที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น คุณสมบัติในการยับยั้งกระบวนการไกลเคชัน (Antiglycation activity) ซึ่งกระบวนการไกลเคชัน (Glycation) เกิดจากการจับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนหรือไขมัน กับน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่ง ผลผลิตสุดท้ายของปฏิกิริยานี้ที่ไม่ใช่เอนไซม์นี้จะได้ advanced glycation end products; AGEs ทั้งนี้ AGEs สามารถเกิดขึ้นได้ในภาวะปกติ และเกิดได้มากขึ้นเมื่อมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง การสะสมของ AGEs ในเซลล์ต่างๆ จะมีผลต่อโครงสร้าง และหน้าที่ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ AGEs จึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเบาหวานและโรคที่เกี่ยวข้องกับอายุ (ปรีญรัทธ์, 2559) ดังนั้นสารสกัดธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งกระบวนการไกลเคชันจึงสามารถต่อยอดในการพัฒนาเป็นยาสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานในอนาคต

นอกจากนี้คุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibition) และยับยั้งการสร้างเมลานินของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติ สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ เนื่องจากเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase, EC 1.14.18.1) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในธรรมชาติทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการสร้างเม็ดสี (Melanin) เป็นเอนไซม์สำคัญที่ของการเกิดสีผิว และความผิดปกติของผิวหนังในมนุษย์ เช่น ผื่น กระ จุดต่างด่าง รวมถึงมะเร็งผิวหนัง ซึ่งการยับยั้งเอนไซม์นี้จะทำให้ผิวขาวขึ้นและลดความผิดปกติของผิวหนังได้ (อินทิตรา และพัชรพรรณ, 2561) ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity) ในสารสกัดธรรมชาติสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารได้ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ ทำให้ผู้บริโภคมีความปลอดภัยในการบริโภคอาหาร

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในส่วนต่างๆ ของผลไม้ เช่น ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) แทนนิน (Tannins) คาเทชิน (Catechins) เบต้าแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) วิตามินซี และวิตามินอี เป็นต้น (ปรีญรัทธ์, ทิพวรรณ, และราตรี, 2554) มีรายงานเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในพืชสกุล

กลางสาต เช่น Klungsupya et al. (2015) พบว่า สารสกัดจากเปลือกขององุ่นมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการทำลาย DNA และพบสารฟีนอลิก ได้แก่ Scopoletin Rutin และ Chlorogenic acid จากการศึกษาของ Ragasa et al. (2006) ได้รายงานว่า สาร Terpenoids ที่สกัดจากเปลือก *Lansium domesticum* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยสามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ได้ดี ยับยั้ง *Bacillus subtilis* ได้ปานกลาง และยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้น้อย และสารโรจัน (2555) พบว่า สารประกอบที่แยกได้จากพืชสกุลกลางสาตเป็นสารประกอบไตรเทอร์พีนและสารระเหยง่าย มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการกิน ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ต้านการสร้างเมลานิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดกลางสาตที่สกัดจากเมล็ดและเปลือก เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดกลางสาตไปใช้ประโยชน์ ซึ่งเป็นการแนวทางในการเพิ่มมูลค่าให้เกิดประโยชน์สูงสุดของกลางสาต ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นที่มีชื่อเสียงของจังหวัดอุตรดิตถ์อย่างยั่งยืนต่อไป

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การเตรียมตัวอย่างและสกัดสารจากเมล็ดและเปลือกของกลางสาต

ตัวอย่างกลางสาตที่ใช้ในการวิเคราะห์ เป็นตัวอย่างกลางสาตในอำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์ นำผลกลางสาตมาล้างทำความสะอาดแล้วแยกออกเป็นส่วเปลือกและเมล็ด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนแห้ง แล้วบั่นให้ละเอียด วิธีการสกัดสารจากเมล็ดและเปลือกของกลางสาต โดยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล เมทานอล และน้ำ ดัดแปลงจากวิธีการของ Jung et al. (2011) นำตัวอย่างบดแห้งของเมล็ดและเปลือกของกลางสาตตัวอย่างละ 50 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด 350 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ได้สารสกัดเมล็ดกลางสาตที่สกัดด้วยเอทานอล (SE) เมทานอล (SM) น้ำ (SW) และสารสกัดเปลือกกลางสาตที่สกัดด้วยเอทานอล (PE) เมทานอล (PM) น้ำ (PW) เก็บสารสกัดในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

### 2. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

#### 2.1 การวิเคราะห์ศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH assay)

การวิเคราะห์ศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นอนุมูลอิสระตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Gülçin et al. (2003) โดยใช้โทรลอคซ์ (Trolox) เป็นสารมาตรฐาน ผสมสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง คำนวณร้อยละฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH (% DPPH radical scavenging activity) ดังสมการที่ 1

$$\% \text{ DPPH radical scavenging activity} = [(A_o - A_s)/A_o] \times 100 \quad (1)$$

เมื่อ  $A_o$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ของชุดควบคุม

$A_s$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ผสมกับสารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน Trolox

นำค่าร้อยละฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH ที่ได้ เทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox ( $R^2 = 0.9785$ ) เพื่อหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่ทดสอบ แสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของ Trolox ในตัวอย่างแห้งน้ำหนัก 1 กรัม (mg Trolox equivalent/ g dried weight; mg TE/ g DW)

## 2.2 การวิเคราะห์ศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS assay)

การวิเคราะห์ศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ Reagent คือ 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium salt (ABTS) เป็น Stable cation radical ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Re et al. (1999) โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน ผสมสารสกัดที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับสารละลาย ABTS (ที่เตรียมจาก 7 มิลลิโมลาร์ ABTS ใน 2.45 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต) แล้วเก็บในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง และสารละลาย ABTS จะถูกเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง  $0.7 \pm 0.02$  ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง คำนวณร้อยละฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS (% ABTS cation radical scavenging activity) ดังสมการที่ 2

$$\% \text{ ABTS cation radical scavenging activity} = [(A_o - A_s)/A_o] \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ  $A_o$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ของชุดควบคุม

$A_s$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ผสมกับสารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน Trolox

นำค่าร้อยละฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS ที่ได้ เทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox ( $R^2 = 0.9988$ ) เพื่อหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่ทดสอบ แสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของ Trolox ในตัวอย่างแห้งน้ำหนัก 1 กรัม (mg Trolox equivalent/ g dried weight; mg TE/ g DW)

### 2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระหรือวิธี Ferric reducing antioxidant power; FRAP assay เป็นวิธีหนึ่งในการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน คือ เมื่อสารประกอบเชิงซ้อน Ferric tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน แล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน Ferrous tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน วิธี FRAP assay วิเคราะห์ตามวิธีที่ดัดแปลงวิธีของ Li et al. (2006) สารละลาย FRAP เตรียมจาก 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ผสมกับสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ pH 3 โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งและอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส ก่อนการทดสอบ โดยนำสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ FRAP reagent ปริมาตร 1.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรลอกซ์ ( $R^2 = 0.9987$ ) เพื่อหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่ทดสอบ แสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของไทโรลอกซ์ในตัวอย่างแห้งน้ำหนัก 1 กรัม (mg Trolox equivalent / g dried weight; mg TE/ g DW)

### 3. การวิเคราะห์การยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชัน (Antiglycation activity)

การวิเคราะห์การยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชัน ในระบบ *in vitro* ทำตามวิธีของ Kaewnarin et al. (2013) เตรียมสารละลายผสมของ Bovine serum albumin; BSA กับ Methylglyoxal; MGO โดยปีเปตสารละลาย 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ BSA ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ของ MGO ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์, pH 7.4) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เติมสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆ (50–500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Sodium azide ที่มีความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยเครื่อง Luminescence microplate reader (Excitation, 370 นาโนเมตร; Emission, 440 นาโนเมตร) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชันในรูปร้อยละของการยับยั้งการเกิด Advance glycation endproducts; AGEs ดังสมการที่ 3

$$\% \text{ AGE inhibition} = [(A_o - A_s)/A_o] \times 100 \quad (3)$$

เมื่อ  $A_o$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ของชุดควบคุม

$A_s$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารสกัด

#### 4. การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibition)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เทียบกับสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid) ดัดแปลงตามวิธีของ Chang et al. (2007) โดยใช้สารละลาย 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) เป็นสารตั้งต้น โดยเติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 1,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร กับสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1.8 มิลลิลิตร ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วย 96-well Microplate Readers จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังสมการที่ 4

$$\% \text{ tyrosinase inhibition} = [(A_o - A_s)/A_o] \times 100 \quad (4)$$

เมื่อ  $A_o$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

$A_s$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

หาค่าของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดโคจิก แสดงผลเป็นค่า มิลลิกรัมสมมูลของกรดโคจิกในตัวอย่างแห้งน้ำหนัก 1 กรัม ( $\mu\text{g}$  kojic acid equivalent /g dried weight;  $\mu\text{g}$  KAE/ g DW)

#### 5. การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Antimicrobial activity)

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดและเปลือกกลางสาดด้วยวิธี Agar well diffusion ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ อมรรรัตน์ และคณะ (2559) โดยนำแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus* sp. เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วเจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้นประมาณ  $1.5 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเชื้อมาเกลี่ยบนอาหาร Nutrient agar แล้วใช้ Cock borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 มิลลิเมตร เจาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 5 หลุม แล้วนำสารสกัดปิเปตใส่ในหลุมทั้ง 4 หลุม ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  โดยให้หลุมกลางเป็น Control ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

#### 6. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents)

วิเคราะห์โดยใช้ Folin-Ciocalteu Reagent ดัดแปลงจากวิธีของ Thitilertdecha et al. (2008) โดยการปิเปตสารสกัดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 7.9 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu Reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วเติม 20% โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟ

มาตรฐานของกรดแกลลิก ( $R^2=0.9978$ ) เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยแสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกในตัวอย่างแห้งน้ำหนัก 1 กรัม (mg gallic acid equivalent/ g dried weight ; mg GAE/ g DW)

### 7. การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี HPLC

นำสารสกัดเมล็ดและเปลือกกลางสาตที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ มาวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค High performance liquid chromatograph; HPLC ด้วยเครื่อง 1200 HPLC instrument (Agilent, Waldbronn, Germany) ดัดแปลงจากวิธีการของ Fecka & Turek (2008); Hossain (2010) โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้ คอลัมน์ Eclipse –  $C_{18}$  (ขนาด 5.0  $\mu\text{m}$ , 150x4.6 mm) ตัวตรวจวัดแบบ Diode array detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ ประกอบด้วย mobile phase A: 0.1% Formic acid in deionized water และ Mobile phase B: 100% Acetonitrile โดยใช้ระบบการชะแบบ Gradient ดังนี้ Mobile phase B ที่เวลา 0–10 นาที 0–6% 10–30 นาที 19% และ 30–40 นาที 100% อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่ง HPLC chromatogram ของสารตัวอย่างจะถูกเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานฟีนอลิกที่เวลาเดียวกันเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ

สารมาตรฐานฟีนอลิก 20 ชนิดที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ Gallic acid Protocatechuic acid Catechin Vanillic acid Caffeic acid Syringic acid Chlorogenic acid Rutin Sinapic acid Ferulic acid M–coumaric acid Hydroxycinnamic acid Ellagic acid Myrecetin O–coumaric acid Rosmarinic acid Quercetin Luteolin Kaempferol Isorhamnetin และ Apigenin

### 8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's multiple range test; DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

## ผลการวิจัย

### 1. ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดและเปลือกของกลางสาตทั้ง 6 ชนิด ด้วยวิธี DPPH assay ABTS assay และ FRAP assay ให้ค่าการทดสอบที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดเมล็ดและเปลือกของกลางสาตมีค่าอยู่ในช่วง  $48.80 \pm 0.09$  ถึง  $15.52 \pm 1.41$  mg TE/g DW โดยสารสกัด PM มีศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ  $48.8 \pm 0.09$  mg TE/ g DW รองลงมา คือ สารสกัด PW SM SE PE และ SW ตามลำดับ การวิเคราะห์ศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ของสารสกัดเมล็ดและเปลือกของกลางสาตมีค่าอยู่ในช่วง  $128.30 \pm 1.41$



ถึง  $9.94 \pm 0.48$  mg TE/ g DW โดยสารสกัด PW มีศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ  $128.3 \pm 1.41$  mg TE/ g DW รองลงมาคือสารสกัด PM SW SM SE และ PE ตามลำดับ ส่วนความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay พบว่า สารสกัด PW มีศักยภาพในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระสูงที่สุด ( $0.88 \pm 0.07$  mgTE/ g DW) รองลงมาคือ สารสกัด PM ( $0.29 \pm 0.01$  mgTE/ g DW) และสารสกัด SW ( $0.25 \pm 0.01$  mgTE/ g DW sample) ตามลำดับ

**ตารางที่ 1** ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดและเปลือกกลางสาต

สารสกัด	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (mg TE/ g DW)		
	DPPH assay	ABTS assay	FRAP assay
SM	$44.40 \pm 0.58^a$	$15.67 \pm 0.30^d$	$0.02 \pm 0.00^d$
SE	$30.51 \pm 0.13^b$	$15.26 \pm 0.42^d$	$0.07 \pm 0.01^c$
SW	$15.52 \pm 1.41^d$	$61.88 \pm 1.53^c$	$0.25 \pm 0.01^b$
PM	$48.80 \pm 0.09^a$	$88.89 \pm 1.45^b$	$0.29 \pm 0.01^b$
PE	$20.01 \pm 3.72^c$	$9.94 \pm 0.48^e$	$0.07 \pm 0.00^c$
PW	$45.22 \pm 0.19^a$	$128.30 \pm 1.41^a$	$0.88 \pm 0.07^a$

หมายเหตุ <sup>a-d</sup> ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน ( $P < 0.05$ )

## 2. ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่น (Antiglycation activity)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่นของสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกกลางสาต โดยใช้ระบบ BSA-MGO reaction ผลวิเคราะห์ดังตารางที่ 2 สารสกัดมีค่าการยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่นอยู่ในช่วง  $24.26 \pm 5.89$  ถึง  $19.27 \pm 1.78$  % AGE inhibition โดยสารสกัด PW มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่นสูงที่สุด (% AGE inhibition =  $24.26 \pm 5.89$ ) รองลงมา คือ สารสกัด PE PM PW SE และ SM ตามลำดับ

## 3. ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Antityrosinase activity)

การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตัวอย่างสารสกัดเมล็ดและเปลือกกลางสาตทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 2 สารสกัด PM มีปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด ( $181.05 \pm 11.09$  µg KAE/ g DW) รองลงมา คือ สารสกัด SM ( $45.51 \pm 3.75$  µg KAE/ g DW) สารสกัด SW ( $35.38 \pm 4.10$  µg KAE/ g DW) และสารสกัด SE ( $34.55 \pm 2.74$  µg KAE/ g DW) ตามลำดับ ทั้งนี้ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดเปลือก PE

**ตารางที่ 2**ฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่นและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมล็ดและเปลือกกลางสาต

สารสกัด	การยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่น (% AGE inhibition)	การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ( $\mu\text{g KAE} / \text{g sample}$ )
SM	22.14±2.90 <sup>ab</sup>	45.51±3.75 <sup>b</sup>
SE	22.32±2.12 <sup>ab</sup>	34.55±2.74 <sup>b</sup>
SW	20.44±1.43 <sup>bc</sup>	35.38±4.10 <sup>b</sup>
PM	19.27±1.78 <sup>c</sup>	181.05±11.09 <sup>d</sup>
PE	19.56±1.12 <sup>c</sup>	ND
PW	24.26±5.89 <sup>d</sup>	18.95±2.42 <sup>c</sup>

หมายเหตุ <sup>a-c</sup> ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน (P<0.05)

ND คือ Not detected

#### 4. ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Antimicrobial activity)

การศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* และ *Staphylococcus* sp. พบว่า สารสกัด SM สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้มากที่สุด มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 9.43±4.30 มิลลิเมตร รองลงมา คือ สารสกัด PM SE และ PE ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และเมื่อพิจารณาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus* sp. พบว่า สารสกัด SM สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus* sp. ได้มากที่สุด มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 13.23±1.31 มิลลิเมตร รองลงมาคือสารสกัด PM PE และ SE ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่สารสกัดที่ใช้มาเป็นตัวทำละลาย ได้แก่ สารสกัด SW และ PW ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ดังตารางที่ 3

**ตารางที่ 3** ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดและเปลือกกลางสาต

สารสกัด	เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.
SM	9.43±4.30 <sup>ab</sup>	13.23±1.31 <sup>a</sup>
SE	4.57±0.70 <sup>d</sup>	8.18±0.55 <sup>abc</sup>
SW	NI	NI
PM	5.50±1.70 <sup>ac</sup>	13.17±2.00 <sup>bd</sup>
PE	4.48±0.25 <sup>bcd</sup>	12.48±1.83 <sup>cd</sup>
PW	NI	NI

หมายเหตุ <sup>a-d</sup> ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน (P<0.05)

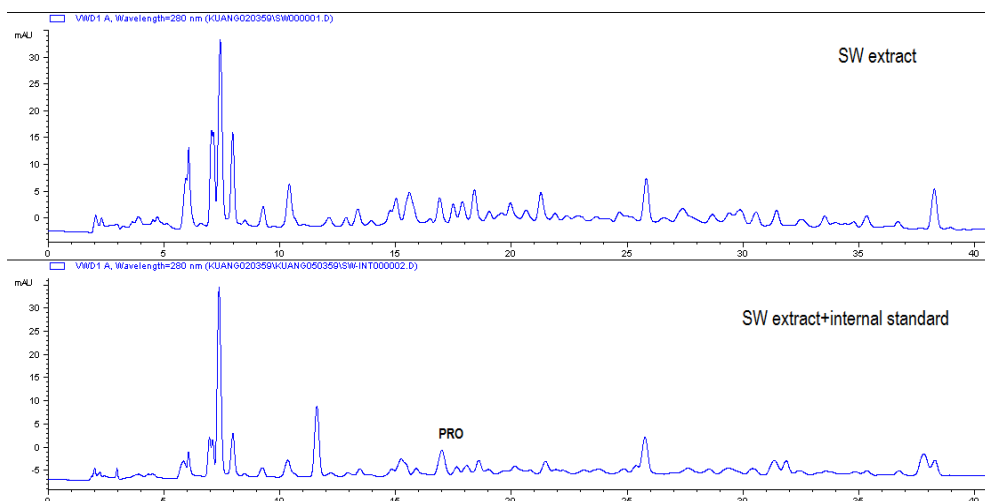
NI คือ No inhibition zone

## 5. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents)

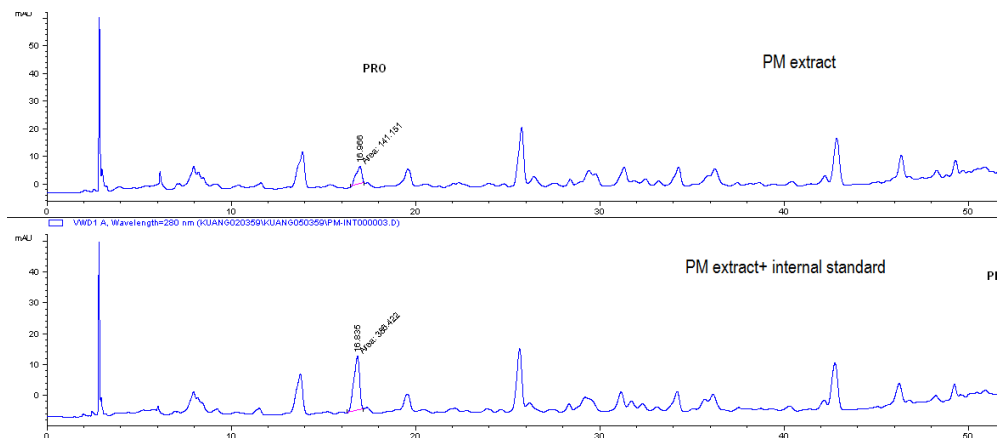
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างสารสกัดเมล็ดและเปลือกกลางสาดทั้งหมด 6 ตัวอย่าง โดยวิธี Folin-ciocalte พบว่า สารสกัด PM มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสูงที่สุด  $27.62 \pm 1.37$  mg GAE /g DW รองลงมา คือ สารสกัด PW ( $23.96 \pm 3.02$  mg GAE /g DW) และสารสกัด PE ( $13.58 \pm 0.71$  mg GAE /g DW) ซึ่งสารสกัดเมล็ดกลางสาดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายได้น้อยกว่า สารสกัดเปลือกกลางสาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ดังตารางที่ 4

## 6. ผลการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี HPLC

จากการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดเมล็ดและเปลือกกลางสาดทั้ง 6 ตัวอย่าง โดยใช้ HPLC เทียบกับสารมาตรฐานฟีนอลิกทั้งหมด 20 ชนิด ได้แก่ Gallic acid Protocatechuic acid Catechin Vanillic acid Caffeic acid Syringic acid Chlorogenic acid Rutin Sinapic acid Ferulic acid *M*-coumaric acid Hydroxycinnamic acid Ellagic acid Myrecetin *O*-coumaric acid Rosmarinic acid Quercetin Luteolin Kaempferol Isorhamnetin และ Apigenin พบสารประกอบฟีนอลิก 1 ชนิด คือ Protocatechuic acid ในสารสกัด 2 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ สารสกัด SW และสารสกัด PM ดังภาพที่ 1 และภาพที่ 2 ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณ Protocatechuic acid เทียบกับกราฟมาตรฐาน Protocatechuic acid ( $R^2 = 0.9661$ ) พบว่า สารสกัด PM มีปริมาณ Protocatechuic acid เท่ากับ  $995.44 \pm 4.89$   $\mu$ g /100g DW มากกว่าสารสกัด SW ( $463.06 \pm 8.45$   $\mu$ g /100g DW) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ดังตารางที่ 4



ภาพที่ 1 HPLC chromatogram แสดง retention time (นาทีที่ 16. 835) ของ Protocatechuic acid ในของสารสกัด SW และยืนยันผลด้วยการเติม Internal standard



**ภาพที่ 2** HPLC chromatogram แสดง retention time (นาทีที่ 16. 835) ของ Protocatechuic acid ในของสารสกัด PM และยืนยันผลด้วยการเติม internal standard

**ตารางที่ 4** การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalte และปริมาณ Protocatechuic acid ด้วยวิธี HPLC

สารสกัด	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE /g DW)	ปริมาณ protocatechuic acid (µg /100g DW)
SM	8.30±0.05 <sup>c</sup>	ND
SE	1.95±0.08 <sup>d</sup>	ND
SW	8.78±0.19 <sup>c</sup>	463.06±8.45 <sup>b</sup>
PM	27.62±1.37 <sup>a</sup>	995.44±4.89 <sup>a</sup>
PE	13.58±0.71 <sup>b</sup>	ND
PW	23.96±3.02 <sup>a</sup>	Nd

**หมายเหตุ** <sup>a-b</sup> ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน (P<0.05)  
ND คือ Not detected

### อภิปรายผล

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อนำส่วนเหลือทิ้งของผลผลิตทางการเกษตรมาทำให้เกิดประโยชน์ โดยนำเปลือกและเมล็ดของกลางสาตซึ่งเป็นไม้ผลที่ปลูกมากในพื้นที่จังหวัดอุดรดิตถ์ นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและสารประกอบฟีนอลิกเพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในอนาคต เช่น การนำสารสกัดผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง อาหารเสริม ยา และอื่นๆ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้ ดังนี้ 1) ฤทธิ์ที่

เกี่ยวข้องกับเครื่องสำอาง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 2) ฤทธิ์เกี่ยวกับยารักษาโรคเบาหวาน ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Oxidative stress) และฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาไกลโคเซชัน และ 3) ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้เป็นสารนอมอาหารหรือรักษาโรคทางเดินอาหาร

ผลการทดลองฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับเครื่องสำอาง พบว่า สารสกัดส่วนเปลือกแสดงฤทธิ์ที่ดีกว่าเมล็ด โดยเทคนิค DPPH assay แสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุดในสารสกัดส่วนเปลือกที่สกัดด้วยเมทานอล (PM) แสดงค่าการยับยั้งเท่ากับ  $48.8 \pm 0.09$  mg TE/ g DW ส่วนเทคนิค ABTS assay และ FRAP assay แสดงค่าการยับยั้งที่ดีที่สุด คือ สารสกัดเปลือกที่สกัดด้วยน้ำ (PW) แสดงค่าการยับยั้งเท่ากับ  $128.3 \pm 1.41$  mg TE/ g DW และ  $0.88 \pm 0.07$  mgTE/ g DW ตามลำดับ สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า สารสกัดเปลือกที่สกัดด้วยเมทานอล (PM) แสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุดมีค่าเท่ากับ  $181.05 \pm 11.09$   $\mu$ g KAE/ g DW จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดเปลือกที่สกัดด้วยเมทานอล (PM) มีผลการทดสอบที่ดีสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ แต่ควรพิจารณาความปลอดภัยในการใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ซึ่งจากผลการทดลองฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และเมื่อพิจารณาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมล็ดและเปลือกกลางสาตกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งมีรายงานจากงานวิจัยของ จันทิมาและคณะ (2553) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ( $IC_{50}$ ) ของสารสกัดผลมะขามป้อม พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เช่นกัน

การศึกษาการยับยั้งกระบวนการไกลโคเซชัน ซึ่งเป็นฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับยารักษาโรคเบาหวาน พบว่า สารสกัดเปลือกกลางสาตด้วยน้ำ (PW) มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยาไกลโคเซชันสูงที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดเมล็ดกลางสาตด้วยเอทานอล (SE) และสารสกัดเมล็ดกลางสาตด้วยเมทานอล (SM) ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกกลางสาตมีฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาไกลโคเซชันค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้มีรายงานว่า มีพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ และสามารถยับยั้งการเกิด AGEs ได้แก่ มะขามป้อม สมอไทย ลูกยอ กระชายดำ คาวทอง กระเทียม ชา มะระขี้นก ตำลึง และผักเชียงดา เป็นต้น (ชมนาด และไมตรี, 2560) นอกจากนี้การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity) ซึ่งเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียที่ก่อโรคทางเดินอาหารหรือมีส่วนในการทำให้อาหารเน่าเสีย จึงสามารถนำสารสกัดไปพัฒนาเป็นสารนอมอาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหารหรือใช้ในการรักษาโรคทางเดินอาหารที่เกิดจากแบคทีเรีย ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่า สารสกัดเมล็ดและเปลือกกลางสาตด้วยเมทานอลและเอทานอล สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* (แกรมลบ)

และ *Staphylococcus* sp. (แกรมบวก) ได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ เนื่องจากตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เกือบทุกชนิด เพราะเป็นสารที่มีขั้วปานกลาง จึงสามารถเข้าไปจับกับคาร์บอนของสารประกอบ Onoseranoid triterpene ที่พบในเมล็ดพืชตระกูลกลางสาด ได้สาร Kokosanolide และเกิดการออกซิเดชัน ได้สารประกอบ Dukonolides ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ สารโรจน (2555) ได้รายงานว่ สารสกัดเปลือกกลางสาดที่สกัดด้วยเอทานอล มีสาร Lamesticumins A–F, Lansic acid 3-ethyl ester และ Ethyl lansiolate ซึ่งสารเหล่านี้สามารถเข้าไปทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียและยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ อย่างไรก็ตามสารสกัดเมล็ดและเปลือกกลางสาดที่สกัดด้วยน้ำไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Staphylococcus* sp. ได้ สอดคล้องกับรายงานของ สุคนธ์, เทียนชัย, และเพชรลดดา (2555) พบว่า สารสกัดเปลือกมังคุด เปลือกส้มเขียวหวาน และเปลือกกล้วยน้ำว้าไม่สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *E. coli* และ *Salmonella typhimurium* ได้ และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารสกัดเมล็ดและเปลือกกลางสาด พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อชั้นนอก (Outer membrane) และ Periplasmic space ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียแกรมบวก สารไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบชั้นนอกจะเป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารได้ดี ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบไม่มีโครงสร้างเหล่านี้ สารต่างๆ จึงซึมผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (สุคนธ์, เทียนชัย, และเพชรลดดา, 2555)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดเปลือกและเมล็ดของกลางสาด พบว่า สารสกัดเปลือกกลางสาดด้วยเมทานอล (PM) มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ( $27.62 \pm 1.37$  mg GAE /g DW) เนื่องจาก รองลงมา คือ สารสกัดเปลือกด้วยน้ำ (PW) และสารสกัดเปลือกด้วยเอทานอล (PE) และสารสกัดเมล็ดกลางสาดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยกว่าสารสกัดเปลือกกลางสาด ซึ่งการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) ต้องพิจารณาทั้งสมบัติและปริมาณของสารที่ต้องการสกัด รวมทั้งชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ให้เหมาะสม เพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณมากที่สุด โดยใช้ตัวทำละลายน้อยที่สุด เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารมีขั้ว ดังนั้นเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีความมีขั้วแตกต่างกันจึงได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแตกต่างกัน ซึ่งน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงและมีไฮโดรเจนที่สามารถแตกตัวได้สูงเช่นเดียวกับเอทานอล แต่เอทานอลและเมทานอลมีความเป็นขั้วต่ำกว่าน้ำ จากผลการทดลองสารสกัดเมล็ดและเปลือกของกลางสาดที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายได้มากกว่าการสกัดด้วยน้ำและเอทานอลตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ สุริยา และจิตรา (2560) ที่ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแก่นตะวันทีเก็บเกี่ยวในระยะเวลาแตกต่างกัน พบว่า สารสกัดของแก่นตะวันทีสกัด

ด้วยน้ำมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าที่สกัดด้วย 95% เอทานอล แต่ สุกอนซ์, เทียนชัย, และเพชรลดา (2555) ได้รายงานผลการศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากเปลือกผลไม้ ได้แก่ เปลือกทุเรียน เปลือกมังคุด เปลือกส้มเขียวหวาน เปลือกกล้วยน้ำว้า และเปลือกหมากสง พบว่า สารสกัดเปลือกผลไม้ด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย นอกจากนี้ในการศึกษานี้ได้ทำจากการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกกลางสาด โดยใช้ HPLC เทียบกับสารมาตรฐานฟีนอลิก 20 ชนิด พบสารประกอบฟีนอลิกเพียงชนิดเดียว คือ Protocatechuic acid ในสารสกัด 2 ชนิด เท่านั้น คือ สารสกัดเมล็ดกลางสาดด้วยน้ำ (SW) และสารสกัดเปลือกกลางสาดด้วยเอทานอล (PE) ซึ่ง Protocatechuic acid เป็นสารฟีนอลิกในกลุ่ม Benzoic มีรายงานว่า พบในพืชผัก ผลไม้ หลายชนิด เช่น ข้าว หัวหอม พลัม องุ่น ถั่ว โทงเทง (Gooseberry) โรสแมรี่ อัลมอนต์ เห็ด เป็นต้น (Kallar & Bois, 2014) ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น Antioxidant activity Antibacterial activity Anticancer activity Antiulcer activity Antidiabetic activity Antiaging activity Antifibrotic activity Antiviral activity Anti-inflammatory activity Analgesic activity Neurological และ Nephron-protective activity เป็นต้น (Kallar & Bois, 2014) ซึ่งปริมาณ ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในพืชแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อุณหภูมิ สภาพภูมิอากาศ สถานที่ปลูก และอายุการเก็บเกี่ยว

### สรุปผลการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมล็ดและเปลือกกลางสาด พบว่า สารสกัดเปลือกกลางสาด มีทั้งสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการยับยั้งปฏิกิริยาไกลโคเซชันสูงกว่าสารสกัดเมล็ดกลางสาด แต่อย่างไรก็ตามในการทดลอง พบว่า สารสกัดเมล็ดกลางสาดมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *E. coli* และ *Staphylococcus sp.* ได้ดีกว่าสารสกัดเปลือกกลางสาด ทั้งนี้ฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกันของเมล็ดและเปลือกกลางสาด ตัวทำละลายที่ใช้ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัด เป็นต้น จากผลการศึกษาสามารถใช้เป็นข้อมูลองค์ความรู้ในการพัฒนาสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกกลางสาดเพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป และควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับรูปแบบในการเตรียมสารสกัดเพื่อให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมและประสิทธิภาพสูงที่สุด

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

**เอกสารอ้างอิง**

- จันทิมา หอมกลีบ, สุพนิดา วิมิจฉัย, ททัยรัตน์ ริมศิริ, นคร เหลืองประเสริฐ, และวิชัย หฤทัยธนาสันต์. (2553). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของ สารสกัดเอทิลอะซีเตตจากผลมะขามป้อมจากแหล่งในประเทศไทย. ใน **การประชุมวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48** (น. 91–99) กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชมนาด สิงห์หันต์, และไมตรี สุทธจิตต์. (2560). การยับยั้งออกซิเดชันและไกลเคชันในโรคเบาหวานโดยผักพื้นบ้านไทย. **Naresuan University Journal: Science and Technology**, 25(3), 1–11.
- ปริญญ์ชต์ ธนวิฑูรย์ภักดี. (2559). ไกลเคชันกับการเกิดโรคในมนุษย์. **วารสารพิษวิทยาไทย**, 31(2), 84–96.
- สาโรจน์ จีนประชา. (2555). องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชสกุลกลางสาด. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**, 14(4), 42–52.
- สุคนธ์ ต้นดีโพบุลย์วุฒิ, เทียนชัย น่วมเศรษฐี, และเพชรลดา เดชาเย็นง. (2555) ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของ สารสกัดจากเปลือกผลไม้บางชนิด. **วารสารวิจัย มช**, 17(6), 880–894.
- สุรียา หุดปอ, และจิตรา สิงห์ทอง. (2560). สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของแก่น ตะวันที่มีอายุการเก็บเกี่ยวต่างกัน. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**, 19(3), 45–57.
- อมรรัตน์ ลีสุกอง, กัลยาภรณ์ จันตรี, และศรีสุดา หาญภาคภูมิ. (2559). การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ สารสกัดจากวัชพืชบางชนิด. **วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 11(1), 69–82.
- อินทิรา ชุตแก้ว, และพัชรพรธม สุคนธ์ขจร. (2561). สมบัติต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ ลำต้น ใบ ดอกและเมล็ดจากเทียนบ้าน. **แก่นเกษตร**, 46(ฉบับพิเศษ 1), 1242–1247.
- Carocho, M. & Ferreira, C.F.R. (2013). A reviews on antioxidants, prooxidants and related controversy. Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, 51. 15–25.
- Chang, T.S., Ding, H.Y., Tai, S.S.K., & Wu, C.Y. (2007). Mushroom tyrosinase inhibitory effects of isoflavones isolated soygerm koji fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC32288. **Food Chemistry**, 105(4), 1430–1438.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., & Küfreviölu, Ö.İ. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. **Food Chemistry**, 83(3), 371–382.
- Jung, K.L., Lee, S.U., Kozukie, N., Levin, C.E., & Fredman, M. (2011). Distribution of phenolic compounds and antioxidative activities in parts of sweet potato (*Ipomoea batata* L.) plants and in home processed roots. **Journal of Food Composition and Analysis**, 24(1), 29–37.
- Kaewnarin, K., Shank, L., Niamsup, H., & Rakariyatham, N. (2013). Inhibitory effects of Lamiaceae plants on the formation of advanced glycation endproducts (AGEs) in model proteins. **Journal of Medical and Bioengineering**, 2(4), 224–227.



- Kallar, S., & Bais, S. (2014). A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. **ISRN Pharmacology**, 2014, 952943, 9 pages.
- Klungsupya, P., Suthepakul, N., Muangman, T., Rerk-Am, U., & Thongdon-A, J. (2015). Determination of Free Radical Scavenging, Antioxidative DNA Damage Activities and Phytochemical Components of Active Fractions from *Lansium domesticum* Corr. Fruit. **Nutrients**, 7, 6852–6873.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. **Food Chemistry**, 96(2), 254–260.
- Ragasa, C.Y., Labrador, P., & Rideout, J.A. (2006). Antimicrobial Terpenoids from *Lansium domesticum*. **The Philippine Agricultural Scientist**, 89(1), 101–105.
- 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 and Medicine**, 26(9–10), 1231–1237.
- Thitilertdecha, N., Teerawutgulrag, A., & Rakariyatham, N. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of *Nephaliium lappacium* L. extracts. **LWT–Food Science and Technology**, 41(10), 2029–2035.