ปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากใบหว้าหิน
Total Phenolic and Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity from the Leaves of *Syzygium claviflorum*

อุไรวรรณ เพ็ชรกูล[*1] ฐิติกร พรหมบรรจง[1] อวยพร วงศ์กูล[1] ไพลิน บุญลิปตานนท์[1] เพียงออ ยีสา[1] กนกวรรณ ขวัญยืน[2] และ เกวลี ชัยชาญ[1]

Uraiwan Phetkul[*1], Thitikorn Prombanchong[1], Auyporn Vongkul[1], Phailin Bunliptanon[1], Peang-or Yeesa[1], Kanokwan Khwanyuen[2] & Kewalee Chaichan[1]

[1]สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
[2]สาขาศึกษาทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
[1]Department of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya
[2]Department of General Education, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya

Submitted 02/05/2023 ; Revised 11/06/2023 ; Accepted 17/06/2023

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอลรวมทั้งส่วนแยกย่อย (CS-A ถึง CS-O) จากใบหว้าหิน ผลการวิจัยพบว่าปริมาณฟีนอลรวมของส่วนแยกย่อย CS-M มีปริมาณฟีนอลรวมมาก (568.08 ± 9.38 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด) และส่วนแยกย่อย CS-C มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด (139.85 ± 12.52 มิลลิกรัม สมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารสกัด) ผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสกัดหยาบ CS และส่วนแยกย่อย CS-O มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.16 ± 0.01และ 1.76 ± 0.01ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (IC_{50} ของสารมาตรฐาน เท่ากับ 3.79 ± 0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ผลที่ได้แสดงให้เห็นศักยภาพของสารสกัดและบางส่วนแยกย่อยจากใบหว้าหินมีปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวมที่สูงและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี เหมาะสำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมสุขภาพและเวชสำอางในอนาคต

คำสำคัญ: หว้าหิน ปริมาณฟีนอลรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

[*]ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)
E-mail: uraiwan.p@rmutsv.ac.th

Abstract

The aims of this research were to analyze total phenolic contents, total flavonoid contents and antioxidant activity from the leaves extract (CS) and the isolated fractions (CS-A–CS-O) of *Syzygium claviflorum*. The results showed that fraction CS-M had the highest total phenolic content (568.08 ± 9.38 mg GAE/g extracts) while fraction CS-C showed the highest total flavonoids content (139.85 ± 12.52 mg QE/g extract). Antioxidant activity evaluated by DPPH radical scavenging assay indicated that the crude extract (CS) and fraction CS-O showed good activity with IC_{50} values of 2.16 ± 0.01 and 1.76 ± 0.01 µg/ml, respectively (IC_{50} value of standard 3.79 ± 0.06 µg/ml). These data indicate that the leaves extract and some fractions of *S. claviflorum* had high total phenolic and total flavonoid contents, and good antioxidant activity which were suitable to be developed to health promotion products and medical cosmetics in further.

Keywords: *Syzygium claviflorum*, total phenolic content, total flavonoid content, antioxidant activity

บทนำ

ปัจจุบันประชาชนหันมาใส่ใจดูแลสุขภาพและความงามมากขึ้น เนื่องจากปัจจัยนอกที่ต้องเผชิญในการใช้ชีวิตประจำวัน เช่น แสงอาทิตย์ ฝุ่นละออง ควันจากท่อไอเสีย ควันบุหรี่ แอลกอฮอล์ และปัจจัยภายใน ได้แก่ ความเครียด ซึ่งมีส่วนสำคัญที่ทำให้ได้รับอนุมูลอิสระ (free radical) หรือเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายมากขึ้น อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนขาดหรือเกินที่ไม่เข้าคู่ (unpaired electron) จึงทำให้มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาให้หรือดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลที่อยู่ภายในเซลล์ และเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ [1] ทำให้สารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอถูกทำลาย ส่งผลให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อได้รับความเสียหาย เกิดความผิดปกติและเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคแพ้ภูมิตัวเอง โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคชราก่อนวัย โรคหลอดเลือดแข็งตัว และโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน [2-3] พืชชนิดต่าง ๆ รวมถึงพืชสมุนไพรหลายชนิด นอกจากมีสารอาหารแล้วยังมีสารพฤกษเคมี (phytochemicals) เป็นองค์ประกอบ เช่น สารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenols) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) อัลคาลอยด์ (alkaloids) คูมาริน (coumarins) เทอร์ปีน (terpenes) เป็นต้น สารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการให้อิเล็กตรอนหรือรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระ มีผลทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่สิ้นสุดลง [4] การรับประทานพืชผักผลไม้รวมถึงสมุนไพรจึงช่วยส่งเสริมสุขภาพ ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคต่าง ๆ ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระได้ [5]

ทั้งนี้จากการค้นคว้าวารสารวิชาการและฐานข้อมูล SciFinder scholar พืชในสกุล *Syzygium* แสดงฤทธิ์ชีวภาพที่ดีและมีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลาย [6-9] หว้าหินมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Syzygium claviflorum* เป็นต้นไม้ขนาดใหญ่ ทรงพุ่มกลมหนาทึบ อยู่ในวงศ์ Myrtaceae จากการสืบค้นข้อมูลการศึกษาพบว่า Fujioka และคณะได้รายงานการแยกสารบริสุทธิ์สองตัว คือ betulinic acid และ platanic acid จากสารสกัดเมทานอลของใบหว้าหินและสารบริสุทธิ์ทั้งสองมีฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวี [10] ต่อมามีรายงานของ Shilpa และคณะที่ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (NCIM 2079 *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) *Escherichia coli* (NCIM 2931) *Pseudomonas aeruginosa* (NCIM 2200) *Klebsiella pneumoniae* (NCIM 2957) และ *Proteus vulgaris* (NCIM 2813) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบและเปลือกของหว้าหินซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ที่ดี [11] จากรายงานเหล่านี้จะเห็นได้ว่าการศึกษาฤทธิ์ชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่าง ๆ ของหว้าหินยังมีอยู่น้อยมาก ผู้วิจัยจึงสนใจวิเคราะห์สารพฤกษเคมี ได้แก่ สารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเลือกศึกษาจากส่วนที่เป็นใบ เพราะสามารถหาได้ง่าย มีทุกฤดูกาล การนำไปใช้ไม่ส่งผลกระทบต่อจำนวนพืชในท้องถิ่น และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านความงาม เครื่องสำอาง อาหารหรือใช้ในด้านเภสัชกรรม ตลอดจนเพื่อเป็นข้อมูลที่สนับสนุนการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอลและส่วนแยกย่อยจากใบหว้าหิน

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

ใบหว้าหินถูกเก็บจากอำเภอสะเดา จังหวัดสงขลา ช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2562 ยืนยันชื่อท้องถิ่น โดยปราชญ์ชาวบ้านในอำเภอสะเดา และได้รับการยืนยันสายพันธุ์และชื่อวิทยาศาสตร์โดยนายพงศ์ธร บรรณโศภิษฐ์ และนายอธิวรรธน์ บุญฤทธิ์ นักวิชาการป่าไม้ปฏิบัติการ สำนักงานบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 5 (นครศรีธรรมราช)

การสกัดใบหว้าหิน

นำใบหว้าหินล้างน้ำให้สะอาดและผึ่งลม หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำมาสกัดแช่เป็นเวลา 7 วัน ด้วยเอทานอล ในอัตราส่วนใบแห้ง 500 กรัมต่อเอทานอล 8 ลิตร กรองเอาสารละลายส่วนใส ส่วนกากใบที่ได้จากการสกัดจะถูกสกัดซ้ำด้วยวิธีการเดียวกันอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งรวมกัน ไประเหยตัวทำละลายเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ (CS) ที่ได้และคำนวณร้อยละผลได้ (% yield)

การแยกสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบ (CS) น้ำหนัก 6.893 กรัม มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography; CC) โดยเฟสคงที่เป็น silica gel และเฟสเคลื่อนที่เริ่มต้นจาก 30% CH_2Cl_2/hexane จนถึง 100% CH_2Cl_2 จากนั้นชะด้วยเฟสเคลื่อนที่ CH_2Cl_2/MeOH โดยเพิ่มปริมาณ MeOH จนถึง 100% MeOH รวมส่วนย่อยต่าง ๆ ที่มีลักษณะโครมาโทแกรมของโครมาโทรกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography; TLC) เหมือนกันเข้าด้วยกันได้ทั้งหมด 15 ส่วนแยกย่อย (CS-A ถึง CS-O) นำสารสกัดหยาบและส่วนแยกย่อยที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) เก็บสารสกัดหยาบและส่วนแยกย่อยไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลและสารฟลาโวนอยด์รวมและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทำโดยใช้วิธีการ Folin-Ciocalteu เป็นการวัดค่าจากปฏิกิริยาการรีดิวซ์สารละลาย Folin-Clocalteu สารประกอบฟีนอลในตัวอย่างทำให้สารละลายเกิดเป็นสีน้ำเงินมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ปฏิกิริยาในการทดสอบดัดแปลงจากวิธีการของ Singleton [12] โดยผสมสารละลายของสารสกัดที่ละลายในเมทานอล ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรกับ 10%v/v Folin-Ciocalteu's reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืดนาน 7 นาที แล้วเติมสารละลาย 10% w/v Na_2CO_3 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ได้ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer แล้วนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาคำนวณหาปริมาณฟีนอลรวม รายงานค่าในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก (gallic acid) ต่อกรัมของสารสกัด (mg GAE/g extract)

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมดำเนินการตามวิธีของ Biju [13] โดยใช้สารตัวอย่างความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรทำปฏิกิริยากับสารละลาย 5% w/v $NaNO_2$ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10% w/v $AlCl_3$ ที่ละลายในเอทานอล ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย 1 โมลาร์ NaOH ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มนาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานของ

สารละลายเควอเซติน (quercetin) ช่วงความเข้มข้น 0 - 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รายงานผลในรูปมิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารสกัด (mg QE/g extract)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH°)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดัดแปลงจากวิธีการของ Blois [14] ปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลารในเอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างที่ช่วงความเข้มข้น 0.5-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Libra Biochrome, UK) โดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายอ้างอิง (blank) คำนวณร้อยละการยับยั้งโดยมีสูตรดังนี้ ร้อยละการยับยั้ง = $(A_{control}-A_{sample})/A_{control}$) x100 โดยที่ $A_{control}$ และ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีและมีสารสกัดตามลำดับ นำค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัด เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารสกัดและร้อยละการยับยั้ง วิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เทียบกับ IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ butylated hydroxy toluene (BHT)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (statistical analysis)

ในการทดลอง ทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n = 3) แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ Duncan's new multiple range test (DMRT) โดยมีระดับความความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficients)

ผลการวิจัย

จากการศึกษาสารสกัดจากใบหว้าหิน ได้สารสกัดหยาบร้อยละของผลที่ได้เท่ากับ 4.01 เมื่อแบ่งสารสกัดหยาบ (CS) 6.893 กรัมที่ได้มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าได้ส่วนแยกย่อยที่มีลักษณะ TLC โครมาโทแกรมคล้ายกันทั้งหมด 15 ส่วนแยกย่อย (CS-A ถึง CS-O) แต่ละส่วนแยกย่อยมีน้ำหนัก ดังนี้ 337.8 mg (CS-A) 184.0 mg (CS-B) 213.7 mg (CS-C) 131.7 mg (CS-D) 186.1 mg (CS-E) 188.2 mg (CS-F) 674.1 mg (CS-G) 838.2 mg (CS-H) 304.0 mg (CS-I) 193.7 mg (CS-J) 399.8 mg (CS-K) 541.8 mg (CS-L) 148.2 mg (CS-M) 122.0 mg (CS-N) และ 135.1 mg (CS-O)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดหยาบ (CS) และส่วนแยกย่อย (CS-A ถึง CS-O) ที่แยกได้จากใบหว้าหินด้วยวิธี Folin-Clocalteu พบว่าในสารสกัดหยาบ (CS) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลเท่ากับ 170.43 ± 1.41 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และส่วนแยกย่อยที่มีปริมาณฟีนอลรวมมากที่สุด คือ ส่วนย่อย CS-M เท่ากับ 568.08 ± 9.38 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด รองลงมาคือส่วนแยกย่อย CS-J และ CS-N ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 1

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในส่วนสกัดต่าง ๆจากใบหว้าหิน โดยสารสกัดหยาบ (CS) มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 61.32 ± 0.46 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารสกัด และส่วนแยกย่อย CS-C มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดเท่ากับ 139.85 ± 12.52 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารสกัด รองลงมามีสามส่วนแยกย่อยที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมไม่แตกต่างกัน คือ ส่วนแยกย่อย CS-H CS-D และ CS-O ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการทดลอง สารสกัดหยาบ (CS) และส่วนแยกย่อย (CS-A ถึง CS-O) มีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยแสดงฤทธิ์อยู่ในช่วง 1.76 ± 0.01 ถึง 222.16 ± 0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1 และพบว่ามีสองส่วนสกัดจากใบหว้าหินแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าตัวมาตรฐาน BHT (IC_{50} = 3.79 ± 0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) คือ ส่วนสกัดหยาบ CS และส่วนแยกย่อย CS-O โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.16 ± 0.01 และ 1.76 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มี 6 ส่วนแยกย่อยแสดงฤทธิ์ต้าน DPPH ในระดับที่น่าสนใจ ในช่วง 15-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้แก่ CS-J CS-M CS-N CS-H CS-F และ CS-I ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 16.55 ± 0.04 16.86 ± 0.10 17.53 ± 0.10 31.63 ± 0.37 41.22 ± 0.73 และ 43.37 ± 0.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์รวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตัวอย่าง	ฟีนอลรวม (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด)	ฟลาโวนอยด์รวม (มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารสกัด)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
CS	170.43 ± 1.41^{h}	61.32 ± 0.46$^{c\,d\,e}$	2.16 ± 0.01^{a}
CS-A	15.32 ± 0.47^{l}	18.05 ± 8.43^{g}	62.86 ± 0.45^{e}
CS-B	249.3 ± 4.88^{f}	51.46 ± 2.31$^{c\,d\,e}$	222.16 ± 0.35^{i}
CS-C	75.94 ± 2.00^{k}	139.85 ± 12.52^{a}	60.23 ± 0.76^{e}
CS-D	96.71 ± 2.40$^{i\,j}$	93.57 ± 0.77^{b}	76.02 ± 5.46^{f}
CS-E	325.82 ± 5.69^{d}	57.31 ± 0.58$^{c\,d\,e}$	61.72 ± 1.13^{e}
CS-F	224.41 ± 7.76^{g}	64.49 ± 6.81$^{c\,d}$	41.22 ± 0.73^{d}
CS-G	260.56 ± 9.76$^{e\,f}$	53.3 ± 4.26$^{c\,d\,e}$	90.80 ± 1.31^{g}
CS-H	86.38 ± 1.08$^{j\,k}$	108.1 ± 34.42^{b}	31.63 ± 0.37^{c}
CS-I	105.16 ± 2.40^{i}	45.61 ± 13.00$^{d\,e}$	43.37 ± 0.49^{d}
CS-J	520.66 ± 4.30^{b}	67.34 ± 8.12^{c}	16.55 ± 0.04^{b}
CS-K	269.01 ± 6.14^{e}	52.63 ± 4.34$^{c\,d\,e}$	62.85 ± 0.82^{e}
CS-L	226.76 ± 4.23^{g}	40.94 ± 5.52$^{e\,f}$	126.82 ± 2.77^{h}
CS-M	568.08 ± 9.38^{a}	52.46 ± 2.09$^{c\,d\,e}$	16.86 ± 0.10^{b}
CS- N	380.75 ± 29.56^{c}	24.06 ± 7.81$^{f\,n}$	17.53 ± 0.10^{b}
CS-O	267.61 ± 7.32^{e}	111.61 ± 1.26^{b}	1.76 ± 0.01^{a}
BHT	-	-	3.79 ± 0.06^{a}

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดย DMRT

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการวิจัยการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม และการหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมระหว่างตัวอย่างของสารสกัดหยาบเอทานอล (CS) และส่วนแยกย่อย (CS-A ถึง CS-O) จากใบหว้าหิน พบว่าระหว่างตัวอย่างสารสกัดหยาบแต่ละส่วนที่แตกต่างกันมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสารพฤกษเคมีและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยแปลค่าความสัมพันธ์ (r) สามารถอธิบายได้ดังรายละเอียดต่อไปนี้ คือ ค่า r = (+/–) 0.600–1.000 มีความสัมพันธ์ระดับสูงมาก ค่า r=(+/–)0.400-0.599 ความสัมพันธ์ในระดับปานกลาง ค่า r = (+/)0.000–0.399 มีความสัมพันธ์ในระดับต่ำ และค่า r = 0.00 ไม่มีความสัมพันธ์กันเชิงเส้นตรง [15-16] ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดหว้าหินกับค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และระหว่างปริมาณฟลาโวนอยด์รวมกับค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สันมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ r = -0.187 และ -0.179 ตามลำดับ นั่นคือความสัมพันธ์ของสารสกัดหยาบและส่วนย่อยที่แยกได้จากใบหว้าหินมีความสัมพันธ์เชิงลบในระดับต่ำ กล่าวคือฤทธิ์การต้านออกซิเดชันไม่แปรผันกับปริมาณสารประกอบฟีนอลหรือฟลาโวนอยด์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Souri และคณะ [17] กล่าวว่าสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ในพืชมีความหลากหลาย บางชนิดแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูง บางชนิดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ต่ำ และบางชนิดไม่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน [18, 19]

สารสกัดหยาบใบหว้าหินมีปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ 170.43 ± 1.41 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 61.32 ± 0.46 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารสกัด และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระดับดีมาก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.16 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดีกว่า BHT (3.79 ± 0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และส่วนแยกย่อยมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงเช่นกัน ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 1.76 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากข้อมูลวิจัยพบว่าปริมาณฟีนอลและปริมาณฟลาโวนอยด์ของส่วนสกัดหยาบและส่วนแยกย่อย CS-O มีปริมาณน้อยกว่าบางส่วนแยกย่อย แต่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hajimahmoodi และคณะ [20] กล่าวว่าสารประกอบฟีนอลหรือฟลาโวนอยด์ในส่วนสกัดดังกล่าวอาจเป็นชนิดที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูง หรือสารที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันอาจเป็นสารกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่สารกลุ่มฟีนอลหรือฟลาโวนอยด์ เช่น สารประกอบเทอร์ปีน น้ำมันหอมระเหย (essential oils) แคโรทีนอยด์ (carotenoids), กรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) เป็นต้น ซึ่งมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชัน [21, 22]

ส่วนย่อยที่มีปริมาณฟีนอลรวมมากที่สุด คือ ส่วนแยกย่อย CS-M เท่ากับ 568.08 ± 9.38 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และส่วนแยกย่อย CS-C ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดเท่ากับ 139.85 ± 12.52 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารสกัด แต่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำเช่นเดียวกับส่วนแยกย่อย CS-B CS-E ถึง CS-G และ CS-J ถึง CS-N มีปริมาณฟีนอลิกค่อนข้างรวมสูง แต่ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมน้อย อีกทั้งประสิทธิภาพในการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่ดี จากผลการวิจัยวิเคราะห์ได้ว่า ค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบและส่วนแยกย่อยที่แยกได้จากใบหว้าหินนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์แต่น่าจะเกิดจากความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมี ความแตกต่างทางโครงสร้าง จำนวนและตำแหน่งของหมู่แทนที่ที่อยู่ในโครงสร้างโมเลกุล

ของสารประกอบฟีนอลหรือฟลาโวนอยด์ ทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกัน หรือหมู่แทนที่ที่เป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนอาจไม่ได้อยู่ในตำแหน่งที่ส่งเสริมต่อการต้านอนุมูลอิสระ หรืออาจมีหมู่แทนที่ที่เกะกะขัดขวางการทำปฏิกิริยา ทำให้ประสิทธิภาพในการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนแยกย่อยดังกล่าวมีค่าน้อย

จากรายงานของ Ahmed และคณะ [23] ได้ศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดและเนื้อผลจากหว้าหิน พบว่า ในเมล็ดมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 1.37 ± 0.23 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารตัวอย่างแห้ง ปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 206.61 ± 3.78 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารตัวอย่างแห้ง ในขณะที่ส่วนเนื้อผลมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและปริมาณฟีนอลรวมน้อยมาก เท่ากับ 7.25 ± 0.65 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารตัวอย่างแห้ง 0.28 ± 0.06 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ และผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดจากเมล็ดมีค่า IC_{50} ดีกว่า ascorbic acid และ BHT ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 11.78 ± 0.08 และ 3.80 ± 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลวิจัยกับงานวิจัยดังกล่าว พบว่างานวิจัยนี้ส่วนสกัดหยาบจากใบมีค่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวม 61.32 ± 0.46 มิลลิกรัม สมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารสกัดและสูงกว่าในเมล็ดมาก แต่มีค่าปริมาณฟีนอลิกรวมน้อยกว่าเล็กน้อย ในขณะที่ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและปริมาณฟีนอลิกรวมในใบสูงกว่าในเนื้อผลมาก อีกทั้งความสามารถในการฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบและบางส่วนแยกย่อยมีค่า IC_{50} ดีกว่าและดีกว่า BHT (3.79 ± 0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนี้ ส่วนสกัดหยาบ CS และส่วนแยกย่อย CS-O ดังนั้นหากต้องการสารสกัดจากหว้าหินที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์และปริมาณฟีนอลิกรวม พร้อมทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีใบของหว้าหินนับเป็นตัวเลือกที่ดีกว่า การศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากใบหว้าหินสกัดด้วยเอทานอลและส่วนย่อยรายงานครั้งแรกในงานวิจัยนี้

สรุปผลการวิจัย

การสกัดใบหว้าหินมีร้อยละผลได้เท่ากับ 4.01 เมื่อนำสารสกัดหยาบไปแยกด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟี โดยชะด้วยตัวชะที่มีความมีขั้วแตกต่างกัน ได้ส่วนแยกย่อย 15 ส่วน (CS-A ถึง CS-O) พบว่าสารสกัดหยาบ CS มีปริมาณฟีนอลรวมและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูง ในขณะที่ส่วนแยกย่อย CS-M และ CS-C มีปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดหยาบ CS และส่วนแยกย่อย CS-O ดีกว่า BHT จากการศึกษาครั้งนี้ สารองค์ประกอบในส่วนแยกย่อย CS-J CS-M CS-N และ CS-O มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี ควรผ่านกระบวนการแยกสารบริสุทธิ์ออกฤทธิ์ และทดสอบฤทธิ์ชีวภาพก่อนที่จะนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ ผลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตเครื่องสำอาง ความงาม หรืออุตสาหกรรมอาหาร อีกทั้งยังเป็นการเผยแพร่คุณประโยชน์และเพิ่มมูลค่าให้กับพืชสมุนไพร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2562

เอกสารอ้างอิง

[1] Fang, Y. Z., Yang. S., & Wu, G. (2002). Free radical, antioxidant, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.

[2] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.

[3] Cornish, M. L., & Garbary, D. J. (2010). Antioxidant from microalgae: potential application in human health and nutrition. *Free Radical Biology & Medicine*, 25, 155-171.

[4] Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). Free radicals in biology and medicine, 3rd Edition, *Oxford University Press, Oxford*, 1-25.

[5] Chaithada, P., Supapan, J., Rodthuk, P., & Chainarong, S. (2018). Total flavonoids, total phenolic content and antioxidant activity from fruits, leaves, twigs and flowers of *Mesua ferrea* L. *Walailak Journal of Science and Technology*, 15(4), 295-304.

[6] Shafi, P. M., Rosamma, M. K., Jamil, K., & Reddy, P. S. (2002). Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. *Fitoterapia*, 73, 414-416.

[7] Ravi, K., Ramachandran, B., & Subramanian, S. (2004). Protective effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on tissue antioxidants in streptozotocin induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull*, 27, 1212–1217.

[8] Bajpai, M., Pande, A., Tewari, S. K., & Prakash, D. (2005). Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *Int J Food Sci Nutr*, 56, 287–291.

[9] Benherlal, P. S., & Arumughan, C. (2007). Chemical composition and in vitro antioxidant studies on *Syzygium cumini* fruit. *J Sci Food Agric*, 87, 2560–2569.

[10] Fujioka, T., Kashiwada, Y., Kilkuskie, R. E., Cosentino, L. M., Ballas, L. M., Jiang, J. B., Janzen, W. P., Chen, I. S., & Lee, K. H. (1994). Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *J Nat Prod*, 57(2), 243-247.

[11] Shilpa, K. J., Krishnakumar, G., & Sooryaprakash, S. (2014). Phytochemical composition, antioxidant, and antibacterial activities of two *Syzygium* spp. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 20, 45–54.

[12] Singleton, V. L., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomo-lybdicphos-phortungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

[13] Biju, J., Sulaiman, C. T., Satheesh, G., & Reddy, V. R. K. (2014). Total phenolics and flavonoids in selected medicinal plants from kerala. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 406-408.

[14] Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 4617, 1199-1200.

[15] Evans, J. D. (1996). Straightforward statistics for the behavioral sciences. USA: Brooks/ Cole Publishing.

[16] Ngamdee, P., Wichai, U., & Jiamyangyuen, S. (2016). Correlation between phyto-chemical and mineral contents and antioxidant activity of black glutinous rice bran, and its potential chemopreventive property. *Food Technol Biotechnol*, 54(3), 282–289.

[17] Souri, E., Amin, G., Farsam, H., & Barazandeh T.M. (2008). Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(2), 83-87.

[18] Koodkaew, I., & Limpichotikul, P. (2017). Study of antioxidant activity and correlation of antioxidant compounds in eight species of garden herbs. *Journal of Food Health and Bioenvironmental Science*, 10, 137-152.

[19] Thepthong, P., Boontaworn, B., & Saewan, N. (2022). Total phenolics, antioxidant, anti-tyrosinase, anti-collagenase and cell proliferation activities of *Chrysophyllum cainito* green fruit extract. *PKRU SciTech Journal*, 6(1), 24-33.

[20] Hajimahmoodi, M., Mohammadi, N., & Soltani, N. (2010). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *J Appl Phycol*, 22(1), 43–50.

[21] Ruberto, G., & Baratta, M. T. (2000) Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems, *Food Chem*, 69, 167–174.

[22] Chaisri, P., & Laoprom, N. (2016). Antioxidant properties and total phenolic content of selected traditional thai medicinal plants. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 12(1), 10-18.

[23] Ahmed, S., Jubair, A., Hossain, M. A., Hossain, M. M., Azam, M. S., & Biswas, M. (2021). Free radical-scavenging capacity and HPLC-DAD screening of phenolic compounds from pulp and seed of *Syzygium claviflorum* fruit. *Journal of Agriculture and Food Research*, 6, 100203.