

สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะแปม Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Earcinia Gragilis Pierre* Extracts

สุนันท์ นวลเพ็ง¹ กษมา ชารีโคตร² และ จรียา นีวงศ์³
Nuanpeng, S.¹, Chareekhot, K.² and Niwongsa, J.³

Abstract

This research aimed to study the ethanolic extraction of *Earcinia Gragilis Pierre*, a plant found in Bueng Khong Long District, Bueng Kan Province. The ethanol was varied from 0, 50, 75 and 100% (v/v) and analyzed phenolic compounds, antioxidant activity and anthocyanin content. The results of the study showed that ethanol extraction at a concentration of 75% (v/v) gave the maximum phenolic compound content of 794.20±9.90 µgGAE/g. Maximum antioxidant activity was 266.99±6.01 µgGAE/g. The total anthocyanin content was 52.05±0.01 µg equivalent cyanidin-3-glucoside per gram.

Keywords: ethanol extraction, antioxidant, Phenolic compound, *Earcinia Gragilis Pierre*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดมะแปมด้วยเอทานอล ซึ่งเป็นพืชที่พบในได้พื้นที่อำเภอบึงโขงหลง จังหวัดบึงกาฬ โดยการสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 0, 50, 75 และ 100% (v/v) และทำการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารแอนโทไซยานิน ผลการศึกษาพบว่า การสกัดมะแปมด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 75% (v/v) ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ 794.20±9.90 µg GAE/g ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ 266.99±6.01 µg GAE/g และพบว่ามีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด เท่ากับ 52.05±0.01 ไมโครกรัมสมมูล cyanidin-3-glucoside ต่อกรัม

คำสำคัญ: การสกัดด้วยเอทานอล สารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก มะแปม

คำนำ

มะแปม (*Earcinia gragilis Pierre*) เป็นไม้ยืนต้น อยู่ในวงศ์ Guttiferae มีความสูง 3-5 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยว ผลมีสีแดงคล้ายมังคุด พบในจังหวัดบึงกาฬ โดยเฉพาะในเขตรักษาเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงโขงหลง ผลมะแปมมีลักษณะคล้ายกับมังคุด ซึ่งมีรายงานพบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีสารต้านอนุมูลอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกสูง โดยเฉพาะแทนนิน ฟาโวนอยด์ และแซนโทรอน ในรูปของ p-mangostin (Yu และคณะ, 2007) นอกจากนี้หลายงานวิจัย พบว่าสารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้ ทำให้ในปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากสารสกัดจากเปลือกมังคุดในด้านต่างๆ เช่น เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ยาสมุนไพร เป็นต้น (Pothitirat และคณะ, 2009) Kittipat และคณะ (2008) พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุด สามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ซึ่งทำให้เมล็ดเน่าในถั่วเขียวได้

วิธีการสกัดเป็นกระบวนการที่สำคัญเพื่อใช้ในการสกัดของสารประกอบฟีนอลิกจากวัสดุจากพืช เนื่องจากความซับซ้อนของสารประกอบฟีนอลิกและเชื่อมกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของพืช (Naczka และ Shahidi, 2006; Contini, 2008) มีหลายปัจจัยสามารถมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดรวมถึงวิธีการสกัดชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นขนาดอนุภาค ระยะเวลาในการสกัด อุณหภูมิ อัตราส่วนตัวทำละลายต่อของแข็ง และ pH ในการสกัด (Chirinos และคณะ, 2007) Pothitirat และคณะ (2009) ศึกษาการสกัดเปลือกมังคุด พบว่าการสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 50% (v/v) ได้สารประกอบฟีนอลิก และแทนนินสูงที่สุด งานวิจัยของ Do และคณะ (2014) พบว่าการสกัดผักแขยงโดยใช้เมทานอล เอทานอล และน้ำ พบว่าการสกัดด้วยเอทา

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ศูนย์สามพร้าว 234 หมู่ 12 ตำบลสามพร้าว อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี 41000

Program in Biotechnology, Faculty of Technology, Udon Thani Rajabhat University Sam Phrao Center, 234 Moo 12, Sam Phrao Sub district, Muang District, Udon Thani Province 41000

² สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ศูนย์สามพร้าว 234 หมู่ 12 ตำบลสามพร้าว อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี 41000

Program in food Science and technology, Faculty of Technology, Udon Thani Rajabhat University Sam Phrao Center, 234 Moo 12, Sam Phrao Sub district, Muang District, Udon Thani Province 41000

³ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ศูนย์สามพร้าว 234 หมู่ 12 ตำบลสามพร้าว อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี 41000

Program in Biotechnology, Faculty of Technology, Udon Thani Rajabhat University Sam Phrao Center, 234 Moo 12, Sam Phrao Sub district, Muang District, Udon Thani Province 41000

นอล 100% (v/v) ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดที่สูงที่สุด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการสกัดผลมะแปมด้วยเอทานอล โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดมะแปมด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ และวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก รวมถึงสารประกอบอื่นๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างมะแปม

ซังมะแปม 200 กรัม แช่ในเอทานอลที่ความเข้มข้น 0, 50, 75 และ 100% (v/v) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองเอาส่วนใสไปทำการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดวิเคราะห์โดยวิธี Folin Ciocalteu method (Singleton and Rossi, 1965) โดยปิเปตสารละลายของสารสกัด 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1.9 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin – Ciocalteu Reagent 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (7.5% w/v) 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer และการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของ Butsat และ Siriamornpun, 2010

วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH

วิธี DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging assay) (Brand- Williams และคณะ, 1995) ผสมสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 100 μ l กับสารละลายดีพีพีเอช 2,900 μ l ใน หลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm โดยใช้แกแลกเป็นสารมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานิน

วิเคราะห์โดยใช้วิธี pH differential (Giusti and Wrolstad, 2001) โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV1800 บริษัท Shimadzu วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 และ 700 นาโนเมตร ปริมาณแอนโธไซยานินคำนวณในรูปของไซยานิดิน -3- กลูโคไซด์ต่อ น้ำหนักสดกรัม และค่า extinction coefficient เท่ากับ $26,900 \text{ Lcm}^{-1}\text{mol}^{-1}$ และมวลโมเลกุลมีค่าเท่ากับ 449.2 gmol^{-1}

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาการสกัดผลมะแปมด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 0, 50, 75 และ 100% (v/v) ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลในการสกัด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารแอนโทไซยานิน มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น และการสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 75% (v/v) ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุดเท่ากับ $764.20 \pm 10.47 \mu\text{g GAE/g}$ (Figure 1) $267.00 \pm 1.20 \mu\text{g GAE/g}$ (Figure 2) และ $52.05 \pm 0.12 \mu\text{g GAE/g}$ (Figure 2) ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 100% (v/v) พบว่าปริมาณสารต่างๆ มีค่าลดลง ทั้งนี้เนื่องจากน้ำที่ผสมลงไปในตัวทำละลายเพื่อปรับความเข้มข้นของตัวทำละลายนั้นจะไปช่วยเพิ่มความแข็งแรงของพันธะไฮโดรเจนที่หมู่ไฮดรอกซิล ทำให้ความเป็นขั้วของตัวทำละลายสูงมากขึ้นส่งผลให้สารแอนโธไซยานินซึ่งเป็นสารที่มีขั้วละลายออกมาอยู่ในตัวทำละลายได้ดีขึ้นและดีกว่าการใช้ตัวทำละลายบริสุทธิ์หรือตัวทำละลายความเข้มข้นสูง (Tiwari และคณะ, 2011, Bimakr และคณะ, 2011) นอกจากนี้งานวิจัยของ Kusmayadi และคณะ (2018) พบว่าการสกัดเปลือกมังคุดด้วย เอทานอล เมทานอล และอะซิโตน ให้ปริมาณแซนโทรอนทั้งหมดสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ แสดงให้เห็นว่าสภาพความมีขั้วปานกลาง มีประสิทธิภาพในการสกัดเปลือกมังคุดได้ดี ซึ่ง Metivier และคณะ (1980) รายงานผลการศึกษาการสกัดแอนโธไซยานินจากากองุ่นหลังการผลิตไวน์ พบว่าการสกัดด้วยเอทานอล มีประสิทธิภาพสูงกว่าน้ำ เอทานอลสามารถสกัดสารแอนโธไซยานินได้สูงกว่า เมื่อพิจารณาจากค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (dielectric constant) ซึ่งเป็นค่าที่วัดความมีขั้วของตัวทำละลาย โดยค่าคงที่ไดอิเล็กตริกของน้ำ และเอทานอล เท่ากับ 80 และ 24 ตามลำดับ ทำให้สามารถทำลายผนังเซลล์ของพืชซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะไม่มีขั้ว เมื่อผนังเซลล์แตกออกทำให้สารจำพวกฟีนอลิก รวมถึงแอนโธไซยานินที่อยู่ภายในผนังเซลล์สามารถออกมาจากเซลล์ (Lapornik และคณะ, 2005) และงานวิจัยของ Plainsirichai และคณะ (2015) พบว่าการศึกษาการสกัดเปลือกมังคุดด้วยเมทานอล และเอทานอล ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 27,138 และ 19,392 mgGAE/100 gDW ตามลำดับ ในขณะที่การสกัดด้วยน้ำให้ปริมาณต่ำเพียง 7,504 mgGAE/100 gDW

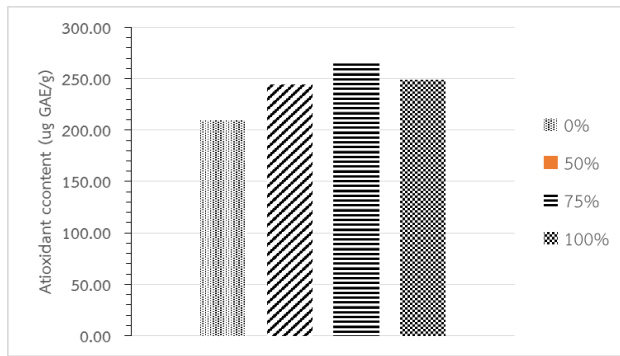


Figure 1. Phenolic content of *Earcinia Gragilis Pierre* extract

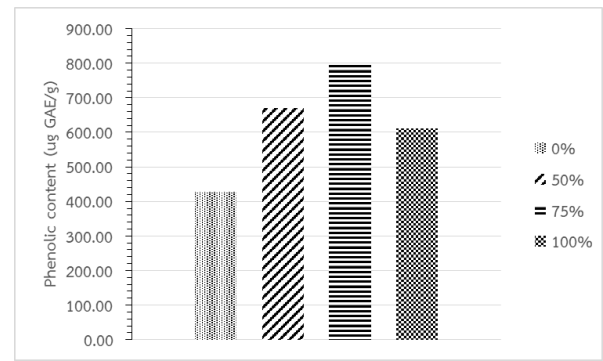


Figure 2. Antioxidant content of *Earcinia Gragilis Pierre* extract

Table 1 Total phenolics, antioxidant content and anthocyanin content of *Earcinia Gragilis Pierre*.

ethanolic extraction	Phenolic content (µg GAE/g)	Antioxidant content (µg GAE/g)	Anthocyanin content (µg GAE/g)
0: 100 (v/v)	428.20±7.07 ^c	209.97±3.47 ^d	23.38±0.10 ^c
50 : 50 (v/v)	669.20±8.49 ^b	244.77±6.93 ^b	24.87±0.11 ^c
75 : 25 (v/v)	794.20±9.90 ^a	266.99±6.01 ^a	52.05±0.12 ^a
100 : 0 (v/v)	611.20±14.14 ^b	249.35±5.08 ^c	43.15±0.10 ^b

ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ

วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยเครื่อง HPLC จะเห็นได้ว่าในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดจากมะแปมมีปริมาณของกรดคลอโรจีนิก (chlorogenic acid) มากที่สุด และรองลงมามีปริมาณของกรดเฟอร์ูลิก (ferulic acid) (Figure 4)

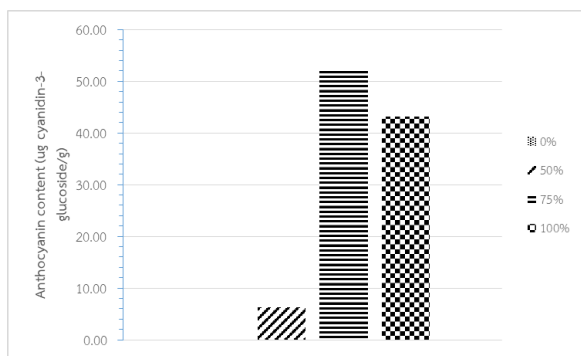


Figure 3. Anthocyanins content of *Earcinia Gragilis Pierre* extract

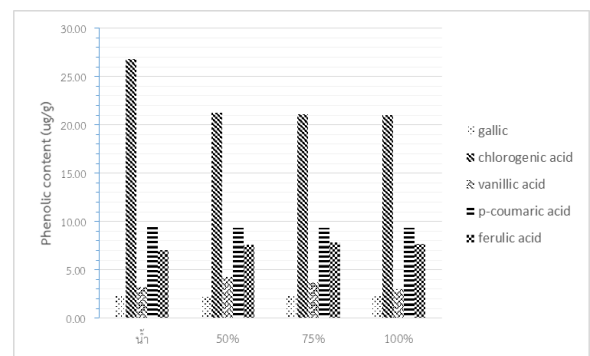


Figure 4. Phenolic content of *Earcinia Gragilis Pierre* extract

สรุป

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัดผลมะแปม คือ เอทานอล 75% (v/v) ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดเท่ากับ 794.20±9.90 µg GAE/g ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ 266.99±6.01 µg GAE/g และพบว่ามีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด เท่ากับ 52.05±0.01 µg cyanidin-3-glucoside/g

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือกลางมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์การเครื่องมือวิเคราะห์ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ และขอบคุณคุณกานดากร ไชยปากดี ที่ให้ความอนุเคราะห์ผลมะแปม ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Bimakr, M., Rahman, R.A., Taip, F.S., Ganjloo, A., Salleh, L.M., Selamat, J., Hamid, A. and Zaidul, I.S.M., 2011, Comparison of Different Extraction Methods for the Extraction of Major Bioactive Flavonoid Compounds from Spearmint (*Mentha spicata* L.) Leaves, Food and Bioproducts Processing, 89: 67-72.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995, Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, LWT-Food Science and Technology, 28: 25-30.
- Butsat, S. and Siriamornpun, S., 2010, Antioxidant Capacities and Phenolic Compounds of the Husk, Bran and Endosperm of Thai Rice, Food Chemistry, 119: 606–613.
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R. and Larondelle, Y., 2007, Optimization of Extraction Conditions of Antioxidant Phenolic Compounds from Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) Tubers, Separation and Purification Technology, 55(2): 217-225.
- Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R. and Anelli, G., 2008, Extraction of Natural Antioxidants from Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Shell and Skin Wastes by Long Maceration at Room Temperature, Food Chemistry, 110 (3): 659-669.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S. and Ju, Y. H., 2014, Effect of Extraction Solvent on Total Phenol Content, Total Flavonoid Content, and Antioxidant Activity of *Limnophila aromatic*, Journal of Food and Drug Analysis, 22: 296-302.
- Giusti, M.M. and Wrolstad, R.E., 2001, Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy: Current Protocols in Food Analytical Chemistry, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, F1.2.1-F1.2.13.
- Kittipat, S., Rangjaroen, C., and Nachapong, M., 2008, Efficiency of Mangosteen's Peel Crude Extract for Aromatizing *Aspergillus* spp., 34th Congress on Science and Technology of Thailand, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.
- Kusmayadi, A., Adriani, L., Abun, A., Muchtaridi, M., and Tanuwiri, U.H., 2018, The Effect of Solvents and Extraction Time on Total Xanthone and Antioxidant Yields of Mangosteen Peel (*Garcinia mangostana* L.) Extract, Drug Invention Today, 10(12): 2572-2576.
- Lapornik, B., Prošek, M. and Golc Wondra, A., 2005, Comparison of Extracts Prepared from Plant By-Products Using Different Solvents and Extraction Time, Journal of Food Engineering, 71: 214-222.
- Metivier, R.P., Francis, F.J. and Clydesdale, F.M., 1980, Solvent Extraction of Anthocyanins from Wine Pomace, Journal of Food Science, 45: 1099-1100.
- Naczki, M. and Shahidi, F., 2006, Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41 (5): 1523-1542.
- Plainsirichai, M., Prasomthong, N., Bussaman, P. and Wongsawas, M., 2015, Methanol, Ethanol, and Acetone Result in Non Different Concentration of Total Phenolic Content in Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Peel, Journal of Agricultural Science, 7(2): 131-134.
- Pothitirat, W., Chomnawang, M. T., Supabphol, R., and Gritsanapan, W., 2009, Comparison of Bioactive Compounds Content, Free Radical Scavenging and Anti-Acne Inducing Bacteria Activities of Extracts from the Mangosteen Fruit Rind at Two Stages of Maturity, Fitoterapia, 80: 442-447.
- Singleton, V.L., and Rossi, J.R., 1965, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144-157.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G. and Kaur, H., 2011, Phytochemical Screening and Extraction: A Review, International Journal of Pharmaceutical Sciences, 1: 98-106.
- Yu L., Zhao M., Yang B., Qiangzhong Z. and Jiang Y., 2007, Phenolics from Hull of *Garcinia mangostana* Fruit and Their Antioxidant Activities, Food Chemistry, 104: 176–181.