



ปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเมี และผลของสารสกัดต่อความจำเชิงพื้นที่ในหนูแรท

คมสรณ์ บรรเรืองทอง¹, จันทนา บุญยรัตน์², จริญญา อำคา เวลบาท¹,
นุชรินทร์ นิลเลิศ³, วณันท์ แป้นนางรอง^{1*}

¹สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²สาขาวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

Total Phenolic and Flavonoid Contents, Antioxidant Activity of *Antidesma Velutinosa* Extract and Effect of the Extract on Spatial Memory in Rats

Komsun Bunreungthong¹, Chantana Boonyarat², Jariya Umka Welbat¹,
Nutchareeporn Nillert³, Wanassanan Pannangrong¹

¹Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Khon Kaen University,
Khon Kaen 40002, Thailand

²Department of Pharmaceutical, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³Department of Applied Thai Traditional Medicine, School of Medicine,
Walailak University, Nakhon Si Thammarat 80160, Thailand

Received: 11 May 2023 / Revised: 12 June 2023 / Accepted: 14 June 2023

บทคัดย่อ

หลักการและวัตถุประสงค์: มะเมีถูกใช้อย่างแพร่หลายในการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาโรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคบิด และอาหารไม่ย่อย สารสกัดมะเมีฤทธิ์ปกป้องระบบประสาท ด้านการอักเสบ และด้านการตายของเซลล์ การศึกษาครั้งนี้เพื่อตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และผลต่อความจำเชิงพื้นที่ในหนูแรทของสารสกัดมะเมี

วิธีการศึกษา: ผงแห้งของผลมะเมีถูกสกัดด้วยเอทานอล 95% เพื่อให้ได้สารสกัดมะเมี ตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดมะเมีด้วยวิธีคลอริเมตริก นอกจากนี้ผลของสารสกัดมะเมีต่อความจำเชิงพื้นที่ในหนูแรทถูกประเมินด้วยการทดสอบ Morris water maze (MWM) และ open field test (OFT) หนูแรทเพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1: vehicle control ได้รับสารทำละลาย sodium carboxymethyl-cellulose กลุ่มที่ 2: Vit C ได้รับวิตามินซี ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว (mg/kg BW) กลุ่มที่ 3: AVE125 mg/kg BW ได้รับสารสกัดมะเมี ขนาด 125 mg/kg BW และกลุ่มที่ 4: AVE250 mg/kg BW ได้รับสารสกัดมะเมี ขนาด 250 mg/kg BW จากนั้นป้อนสารตามกลุ่มทดลองเป็นเวลา 16 วัน ประเมินการเรียนรู้และความจำเชิงพื้นที่ในช่วงวันที่ 13-16 ด้วย MWM และประเมินกิจกรรมการเคลื่อนไหวในวันที่ 16 ด้วย OFT

ผลการศึกษา: สารสกัดมะเมีมีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ $44.87 \pm 0.31 \mu\text{g GAE/mg}$ และ $17.88 \pm 0.46 \mu\text{g QE/mg}$ ตามลำดับ และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วย IC_{50} ที่ $504.65 \mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้การให้สารสกัดมะเมี ขนาด 125 และ 250 มก./กก. BW เป็นเวลา 16 วัน ในหนูสุขภาพดี ไม่ส่งผลกระทบต่อกิจกรรมการเคลื่อนไหว และไม่สามารถเพิ่มความจำเชิงพื้นที่ในหนูแรทได้

สรุป: สารสกัดมะเมีมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในระดับสูง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดี และไม่ส่งผลกระทบต่อกิจกรรมการเคลื่อนไหวในหนูแรท

คำสำคัญ: มะเมี, ฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

*Corresponding author: Wanassanan Pannangrong, E-mail: wankun@kku.ac.th

Abstract

Background and Objectives: Mamao is widely used in folk medicine to treat diabetes, hypertension, dysentery, and indigestion. Mamao extract has neuroprotective, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects. This study investigated the phenolic and flavonoid contents, antioxidant activity as well as the effect of *Antidesma velutinsum* extract (AVE) on spatial memory in rats.

Methods: AVE was extracted from dried powdered Mamao fruits with 95% ethanol. The colorimetric method was used to determine total phenolic contents, total flavonoid, and antioxidant activity. The effects of AVE on spatial memory and locomotor activity in rats were assessed using the Morris water maze test (MWM) and open field test (OFT). Male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups of 8 animals each: Group 1: vehicle control received sodium carboxymethylcellulose, Group 2: Vit C received 200 mg/kg BW of vitamin C, Group 3: AVE125 mg/kg BW received 125 mg/kg BW of AVE, and Group 4: AVE 250 mg/kg BW received 125 mg/kg BW of AVE. The assigned substances were administered to the rats according to the experimental groups for 16 days. Spatial memory was assessed on days 13-16 and locomotor activity was assessed on days 16.

Results: AVE contained total phenolic and flavonoid contents of 44.87 ± 0.31 μg GAE/mg and 17.88 ± 0.46 μg QE/mg, respectively, as well as showed DPPH antioxidant activity with an IC_{50} of 504.65 $\mu\text{g}/\text{ml}$. AVE administration for 16 days did not enhance spatial memory and did not affect locomotor activity in rats.

Conclusion: AVE contained high levels of total phenolic and flavonoid contents, and had good antioxidant activity, but did not affect spatial memory and locomotor activity in rats.

Keywords: Mamao, phenolic, flavonoid, antioxidant activity, locomotor activity, cognitive performance

บทนำ

มะเมี (Antidesma velutinsum Blume) เป็นพืชในวงศ์ *Stilaginaceae* สกุล *Antidesma*¹ พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะอำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร² ผลของมะเมีมีขนาดเล็กและเป็นพวง ผลดิบมีสีเขียว รสเปรี้ยว เมื่อสุกจะเปลี่ยนเป็นสีแดงอมม่วงดำ รสหวานอมเปรี้ยวผสมฝาด สามารถนำมารับประทานเป็นผลไม้ ทำเป็นสลัด หรือแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ เช่น แยม น้ำผลไม้ หรือไวน์³ ผลของมะเมียังถูกใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคบิด และอาหารไม่ย่อย เป็นต้น⁴ มีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ว่าสารสกัดมะเมีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปกป้องระบบประสาท โดยป้องกันความเสียหายของเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วยแอมิโลยด์บีต้าจากการศึกษาในหลอดทดลอง⁵ การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดมะเมี ขนาด 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถปรับปรุงความบกพร่องของความจำจากการเหนี่ยวนำด้วยสโคโปลามีน⁶ สารสกัดมะเมียังมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส-2 (COX-2) และยับยั้งการกระตุ้น nuclear factor kappa-B ในเซลล์ MCF10A¹ และการศึกษาในหลอดทดลองยังพบว่ามีฤทธิ์ด้านการตายโดยสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน PARP/caspase-3 cleavage และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน B-cell lymphoma-2¹ แม้ว่าการศึกษารูปร่างของสารสกัดมะเมีมาแล้ว⁶ แต่ผลมะเมีที่ถูกเก็บจากสถานที่ที่แตกต่างกันและระยะเวลาในการสกัดที่ต่างกัน อาจส่งผลให้สารสกัดมะเมีมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกันได้ และจากการนิยมนำมะเมีมารับประทานสดและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และผลต่อความจำเชิงพื้นที่ในหนูแรทของสารสกัดมะเมี ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำพืชชนิดนี้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่ได้จากธรรมชาติต่อไป

วิธีการศึกษา

การเตรียมสารสกัดมะเมี

สารสกัดมะเมี (*Antidesma velutinsum* extract; AVE) เก็บผลมะเมีสุกจากเขตอำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร ในช่วงเดือนกันยายน และสกัดโดยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยนำผงแห้งของผลมะเมีมาหมักด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% ทำการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันและคนสารสกัดเป็นระยะๆ จากนั้นสารสกัดจะถูกกรองและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40°C และถูกเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8°C จนกว่าจะนำไปใช้งาน

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents)

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดถูกวิเคราะห์โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ตัดแปลงวิธีจากการทดลองของ Natewong และคณะ⁷ โดยปิเปตสารละลาย Gallic acid หรือ AVE ในแต่ละความเข้มข้นอย่างละ 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารมาตรฐาน Folin-Ciocalteu reagent 75 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุมของ 96 well plate ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย sodium carbonate (Na_2CO_3) 7.5% (w/v) 75 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดแสดงเป็นไมโครกรัมของกรดแกลลิกเทียบเท่าต่อมิลลิกรัมของสารสกัดหยาบ (μg GAE/mg)

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid contents)

ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดถูกวิเคราะห์โดยวิธี aluminum chloride colorimetric method เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเคอควิทิน (Quercetin) ตัดแปลงวิธีจากการทดลองของ Tinchin และคณะ⁸ โดยปิเปตสารละลาย Quercetin หรือ AVE ในแต่ละความเข้มข้นอย่างละ 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย aluminum chloride (AlCl_3) 15 ไมโครลิตร สารละลาย sodium acetate (CH_3COONa) 20 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 145 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุมของ 96 well plate ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดแสดงเป็นไมโครกรัมของเคอควิทินเทียบเท่าต่อมิลลิกรัมของสารสกัดหยาบ (μg QE/mg)

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging activity

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเมี จากวิธีจากการทดลองของ Jaisin และคณะ⁹ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox โดยปิเปตสารมาตรฐาน Trolox หรือ AVE ในแต่ละความเข้มข้นอย่างละ 20 ไมโครลิตร และสารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 0.1 M 180 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุมของ 96 well plate ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของมะเมีแสดงเป็นค่าความเข้มข้นที่ทำให้ DPPH มีปริมาณเหลือ 50% (inhibitory concentration at 50%; IC_{50} $\mu\text{g}/\text{ml}$) ซึ่งคำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{DPPH radical scavenging \%} = [(A \times B)/A] \times 100$$

A ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

B ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Trolox หรือ AVE

สัตว์ทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้ใช้หนูแรท เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 6-8 สัปดาห์ จำนวน 32 ตัว จากบริษัทโนมูระ สยามอินเตอร์เนชั่นแนลจำกัด นำมาเลี้ยงที่ศูนย์สัตว์ทดลอง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีการควบคุมอุณหภูมิห้องประมาณ $23 \pm 2^\circ\text{C}$ มีระบบควบคุมแสงสว่างอย่างเพียงพออยู่ระหว่าง 350-400 ลักซ์ อัตราส่วนแสงสว่างกลางวันกับกลางคืน 12 ชั่วโมงมืด ต่อ 12 ชั่วโมงสว่าง มีระบบควบคุมเสียงไม่เกิน 85 เดซิเบล มีระบบระบายอากาศ 10-15 รอบต่อชั่วโมง หนูทดลองทุกตัว ได้รับอาหารเม็ดและน้ำสะอาดอย่างบริบูรณ์ และได้รับการพักฟื้นเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มทำการทดลองเพื่อให้ หนูทดลองปรับตัวให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมใหม่

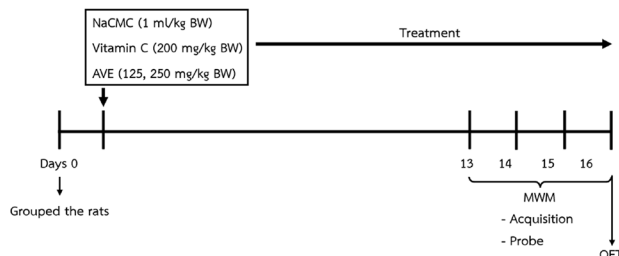
การขออนุมัติการทำวิจัยในสัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ได้รับอนุมัติการทำวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์ เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยยึดหลัก เกณฑ์จริยบรรณการใช้สัตว์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัย แห่งชาติ ในลำดับที่ จส.มข. 86/62 เลขที่ อว 660201.2.11/64

การออกแบบการทดลอง

หนูทดลองถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว ดังนี้
 กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Vehicle control; VC) ได้รับ สารทำลายลาย sodium carboxymethyl-cellulose (NaCMC) 0.5% ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว
 กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดสอบที่ได้รับวิตามินซี ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว (Vit C)¹⁰
 กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดสอบที่ได้รับสารสกัดมะเเฒ่า ขนาด 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว (AVE125)
 กลุ่มที่ 4 กลุ่มทดสอบที่ได้รับสารสกัดมะเเฒ่า ขนาด 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว (AVE250)⁵

ทำการป้อนสารตามกลุ่มทดลองวันละ 1 ครั้ง ในเวลา 9.00 น. ติดต่อกันเป็นเวลา 16 วัน ในช่วงระหว่างวันที่ 13-16 หนูทดลองถูกประเมินการเรียนรู้และความจำด้วย Morris water maze test (MWM) ดัดแปลงจากงานวิจัย¹⁰ และ ประเมินกิจกรรมการเคลื่อนไหวด้วย open field test (OFT) ดัดแปลงจากการศึกษาของ Morris¹⁰ ในวันที่ 16 (รูปที่ 1) สังเกตและติดตามพฤติกรรมของหนูทดลองด้วยกล้องถ่ายวิดีโอ



รูปที่ 1 การแบ่งกลุ่มหนูทดลองและลำดับขั้นตอนของการทดลอง

MWM

เป็นการประเมินความจำเชิงพื้นที่ (spatial memory) ในสัตว์ทดลอง โดยอาศัยสัญลักษณ์ที่อยู่ปลายทางเป็นตัวนำทาง จากตำแหน่งเริ่มต้นของสระว่ายน้ำไปยังแท่นยืน ที่ถูกซ่อน อยู่ใต้น้ำในตำแหน่งเป้าหมาย อุปกรณ์ในการทดสอบประกอบด้วย สระพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 เซนติเมตร ลึก 40 เซนติเมตร ใส่น้ำประปาอุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ที่ความลึก 20 เซนติเมตร และถูกแบ่งออกเป็น 4 ส่วน (quadrant) แต่ละส่วนติดสัญลักษณ์นำทาง ที่มีรูปร่างและสีแตกต่างกันไว้เหนือขอบสระ แท่นยืนถูกวางซ่อนอยู่ใต้ผิวน้ำประมาณ 2 เซนติเมตร ในส่วนที่ 3 เริ่มทดสอบโดยการปล่อยหนูทดลอง ในส่วนที่ 1 ซึ่งกำหนดให้เป็นตำแหน่งเริ่มต้น โดยให้หนูทดลอง หันหน้าเข้าไปยังขอบสระ จับเวลา 60 วินาที เพื่อให้หนูทดลอง ว่ายน้ำไปยังแท่นยืน หากครบระยะเวลาแต่หนูทดลองยังไม่ สามารถหาแท่นยืนเจอ ให้จับหนูทดลองไปวางไว้บนแท่นยืน เป็นเวลา 10 วินาที และนำหนูทดลองออกจากสระ ในขั้นตอน ของการฝึกการเรียนรู้ (acquisition phase) หนูทดลองแต่ละ ตัวจะถูกทดสอบซ้ำวันละ 4 รอบ ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน ในขั้นตอนของการทดสอบ (probe phase) แท่นยืนถูกนำออก ไปจากสระ หนูทดลองแต่ละตัวถูกปล่อยลงในสระอีกครั้ง เพื่อให้สำรวจหาแท่นยืน และจับเวลาที่หนูทดลองว่ายน้ำอยู่ใน ส่วนที่ 3 ที่เคยมีแท่นยืน ระยะเวลาที่หนูทดลองว่ายน้ำจาก ตำแหน่งเริ่มต้นไปยังแท่นยืนถูกนำมาใช้วิเคราะห์เป็น escape latency time และระยะเวลาที่หนูทดลองว่ายน้ำอยู่ในส่วนที่ 3 ถูกนำมาใช้วิเคราะห์เป็น time spent in the target quadrant ด้วยโปรแกรม Noldus EthoVision XT, 12 version

Open field test (OFT)

ใช้ประเมินกิจกรรมการเคลื่อนไหวในหนูทดลอง ซึ่งอาจ มีการเปลี่ยนแปลงหรือได้รับผลกระทบจากการได้รับยาหรือสาร สกัด อุปกรณ์ในการทดสอบนี้ประกอบด้วย กล่องไม้สี่เหลี่ยม ขนาด กว้าง 50 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร และสูง 40 เซนติเมตร หนูทดลองแต่ละตัวถูกวางลงในกล่องและ ปล่อยให้สำรวจภายในกล่องอย่างอิสระเป็นเวลา 5 นาที เมื่อ ครบระยะเวลาจึงนำหนูทดลองกลับเข้ากรงและทำความสะอาด กล่องด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% เพื่อกำจัดกลิ่น พฤติกรรมการสำรวจของหนูทดลองถูกบันทึกและนำมาวิเคราะห์

หาค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ (velocity) และระยะทางทั้งหมดที่หนูทดลองเคลื่อนที่ (total distance moved) ด้วยโปรแกรม Noldus EthoVision XT, 12 version

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการวิจัยถูกแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ SEM) และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ one-way ANOVA ตามด้วย Tukey post-hoc test ด้วยโปรแกรม SPSS version 23 โดยกำหนดค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษา

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเขือ

สารสกัดมะเขือ (AVE) แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 44.87 ± 0.31 μg GAE/mg ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 17.88 ± 0.46 μg QE/mg และยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยแสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้ DPPH มีปริมาณเหลือ 50% หรือ IC_{50} เท่ากับ 504.65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ซึ่งสูงกว่าค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Trolox เท่ากับ 31.29 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ตารางที่ 1)

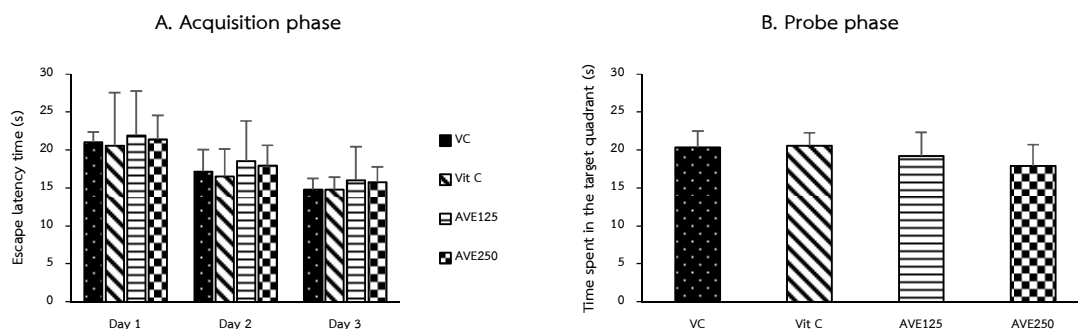
ตารางที่ 1 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเขือ

Plant Sample	Total phenolic content (μg GAE/mg)	Total flavonoids content (μg QE/mg)	IC_{50} of DPPH radical scavenging activity ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
AVE	44.87 ± 0.31	17.88 ± 0.46	504.65
Trolox	-	-	31.29

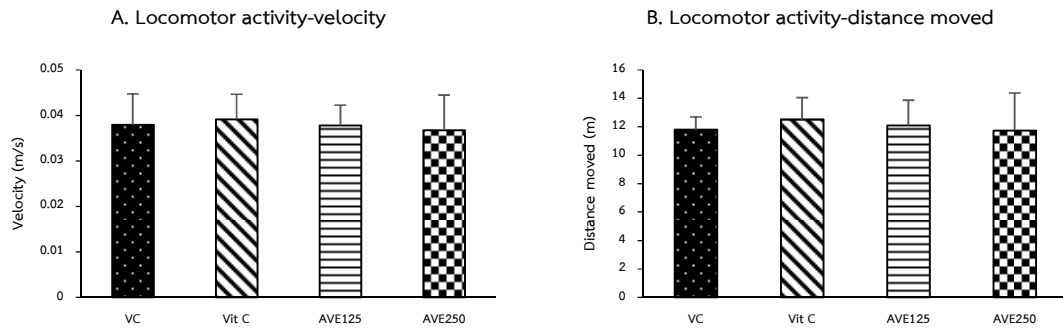
ผลของสารสกัดมะเขือต่อหน่วยความจำเชิงพื้นที่และกิจกรรมการเคลื่อนไหว

การทดสอบ Morris water maze ถูกแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน เพื่อประเมินผลของสารสกัดมะเขือต่อการเรียนรู้และความจำเชิงพื้นที่ในหนูสุภาพดี ในขั้นตอนของการฝึกการเรียนรู้ (acquisition phase) หนูทดลองที่ได้รับสารทุกกลุ่ม (Vit C, AVE125 และ AVE250) ใช้ระยะเวลาในการค้นหาแท่นยี่นลตลงอย่างต่อเนื่อง โดยแสดงค่า escape latency time ลดลงเรื่อยๆ ในแต่ละวัน คล้ายกับกลุ่มควบคุม (VC) (รูปที่ 2-A) ในขั้นตอนของการทดสอบ (probe phase) หนูทดลองที่ได้รับสาร

ทุกกลุ่ม ใช้ระยะเวลาว่ายน้ำในส่วนที่เคยมีแท่นยี่นลตลงเพียงเล็กน้อยกับกลุ่มควบคุม โดยแสดงค่า time spent in the target quadrant ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2-B) สำหรับการทดสอบ open field เพื่อประเมินผลของสารสกัดมะเขือต่อกิจกรรมการเคลื่อนไหวในหนูสุภาพดี พบว่าหนูทดลองทุกกลุ่มมีความเร็วและระยะทางในการเคลื่อนที่ใกล้เคียงกัน โดยแสดงค่า velocity (รูปที่ 3-A) และ total distance moved (รูปที่ 3-B) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 2 ผลของสารสกัดมะเขือต่อการเรียนรู้และความจำเชิงพื้นที่ในหนูทดลองถูกประเมินด้วย escape latency time ในขั้นตอนการฝึกการเรียนรู้ (A) และ time spent in the target quadrant ในขั้นตอนการทดสอบ (B) ด้วย MWM



รูปที่ 3 ผลของสารสกัดมะเขือต่อกิจกรรมการเคลื่อนไหวในหนูทดลอง แสดงในรูปของค่า velocity (A) และค่า total distance moved (B) จากการประเมินด้วย OFT

วิจารณ์

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้มากในพืชหลากหลายชนิด สารประกอบนี้แบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กรดฟีนอลิก (เช่น กรดแกลลิก) ฟลาโวนอยด์ (เช่น เควอซีทิน) แทนนิน และอื่นๆ¹¹ การศึกษาครั้งนี้พบว่า AVE แสดงปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในระดับสูง ($44.87 \pm 0.31 \mu\text{g GAE/mg}$ และ $17.88 \pm 0.46 \mu\text{g QE/mg}$) ซึ่งดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าสารสกัดมะเขือมีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ $12.17 \pm 0.09 \mu\text{g GAE/mg}$ และ $0.06 \pm 3.54 \mu\text{g QE/mg}$ ¹² นอกจากนี้ AVE ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลงเหลือเพียงครึ่งหนึ่ง ($\text{IC}_{50} = 504.65 \mu\text{g/ml}$) ซึ่งดีกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 10.94 mg/ml ⁷ ผลลัพธ์ที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาในการสกัด อุณหภูมิในการสกัด หรือความเข้มข้นของตัวทำละลายของแต่ละการศึกษาที่แตกต่างกัน¹ ปัจจัยเหล่านี้อาจนำไปสู่ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีค่าแตกต่างกัน

การศึกษาการเพิ่มพูนความจำในสัตว์ทดลองมักเน้นไปที่ความจำเชิงพื้นที่ที่เนื่องจากเป็นประเภทย่อยของความจำเชิงประกาศ (declarative memory) ที่พบในมนุษย์ การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดบางชนิดมีฤทธิ์ในการปรับปรุงความจำบกพร่องควบคู่ไปกับฤทธิ์ในการเพิ่มพูนความจำในหนูสุขภาพดี⁵ ขณะที่สารสกัดบางชนิดอาจมีฤทธิ์ในการปรับปรุงความจำบกพร่องแต่ไม่มีฤทธิ์ในการเพิ่มพูนความจำของหนูสุขภาพดี⁵ เคยมีรายงานว่าหนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR ที่ได้รับสารสกัดมะเขือ ขนาด 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว เป็นเวลา 11 วัน แสดงการเรียนรู้และความจำที่ดีขึ้นกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 3 และ 4 ของการทดสอบด้วย MWM ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสโคปอลามีน¹ ขณะที่การศึกษาครั้งนี้พบว่าหนูแรทที่ได้รับ AVE ขนาด 125 และ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว เป็นเวลา 15 วัน แสดงค่า escape latency time ลดลงอย่างต่อเนื่องในวันที่ 2 และ 3 ของการฝึกการเรียนรู้ ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม

บ่งชี้ว่าพัฒนาการด้านการเรียนรู้ที่ดีขึ้นเป็นผลมาจากการฝึกฝนซ้ำๆ ในแต่ละวัน โดยการให้ AVE ยังไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้ได้อย่างชัดเจน ในขั้นตอนการทดสอบหนูแรทที่ได้รับ AVE ทั้งสองกลุ่ม แสดงค่า time spent in the target quadrant ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมเช่นกัน บ่งชี้ว่าการให้ AVE เป็นเวลา 16 วัน ยังไม่สามารถเพิ่มความจำเชิงพื้นที่ในหนูแรทสุขภาพดีได้ อาจเป็นเพราะว่าการทดลองทั้ง 2 ครั้ง ใช้หนูทดลองคนละสายพันธุ์ และมะเขือที่ใช้ในการทดลองทั้ง 2 ครั้ง ถูกเก็บและสกัดในเวลาที่แตกต่างกัน ทำให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์แตกต่างกัน ผลการทดลองที่ได้จึงอาจแตกต่างกันด้วย เป็นที่น่าสนใจว่าหนูแรทที่ได้รับ AVE ทั้ง 2 ขนาด ไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่า velocity และ total distance moved เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ดังนั้นทั้ง 2 นี้บ่งชี้ผลกระทบต่องิจกรรมการเคลื่อนไหวในหนูทดลอง โดยสารสกัดบางชนิดอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของดัชนีเหล่านี้เพื่อเป็นการยืนยันว่าประสิทธิภาพด้านการเรียนรู้ความจำที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากสารสกัดหรือการฝึกฝน และไม่ได้เป็นผลกระทบมาจากกิจกรรมการเคลื่อนไหวที่ผิดปกติจึงต้องพิจารณาดัชนีทั้ง 2 นี้ร่วมด้วย การศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่าการให้ AVE แก่หนูแรทเป็นเวลา 16 วัน ไม่ส่งผลกระทบต่องิจกรรมการเคลื่อนไหว เช่นเดียวกับการวิจัยก่อนหน้านี้ในหนูเมาส์⁵

สรุป

สารสกัดมะเขือ (AVE) มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในระดับสูง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี และไม่ส่งผลกระทบต่อกิจกรรมการเคลื่อนไหวในหนูทดลอง จึงเหมาะสำหรับการนำไปศึกษาต่อในอนาคตเพื่อเป็นหนึ่งในตัวเลือกของอาหารเสริมสำหรับต้านอนุมูลอิสระ และบรรเทาความบกพร่องที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออก เชียงเหนือ คณะเภสัชศาสตร์และสาขาวิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือวิจัย รวมไปถึงผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง

ทุกท่านที่ช่วยให้การดำเนินการวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Puangprongpitag D, Yongvanit P, Boonsiri P, Suttajit M, Areejitranusorn P, Na HK, et al. Molecular mechanism underlying anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of Mamao (*Antidesma thwaitesianum* Müll. Arg.) polyphenolics in human breast epithelial cells. *Food Chem* 2011;127(4): 1450-8. doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.099
- Sripakdee T, Sriwicha A, Jansam N, Mahachai R, Chanthai S. Determination of total phenolics and ascorbic acid related to an antioxidant activity and thermal stability of the Mao fruit juice. *Int Food Res J* 2015;22(2):618.
- Sutharut J, Sudarat J. Total anthocyanin content and antioxidant activity of germinated colored rice. *Int Food Res J* 2012;19(1):215-21.
- Mungkunthod S, Tangsucharit P, Senggunprai L, Sripui J, Kukongviriyapan U, Pannangpetch P. Effect of Mamao Pomace Extract on Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Rats. *Srinagarind Med J* 2015; 35(Suppl): 87.
- Daodee S, Booyarat C, Chulikhit Y, Monthakantit O. Effects of Maprang and Mak Mao fruit extracts on memory impairment and depression and chemical constituent analysis. Bangkok: National Research Council of Thailand; 2012.
- Sithisarn P, Gritsanapan W, Jateleela S. Formulation and quality control of readily dissolving drink powder from *Antidesma ghaesembilla* fruits. *J Nat Sci* 2015;14(1):89-101. doi.org/10.12982/CMUJNS. 2015.0073
- Natewong S, Niwaspragrit C, Ratanachamnong P, Samatiwat P, Namchaiw P, Jaisin Y. Photo-Protective and Anti-Inflammatory Effects of *Antidesma thwaitesianum* Müll. Arg. Fruit Extract against UVB-Induced Keratinocyte Cell Damage. *Molecules* 2022;27(15):5034. doi.org/10.3390/molecules27155034
- Tinchan P, Sirijariyawat A, Prommakool A, Phattayakorn K, Pheungsomphane S, Tayuan C. *Antidesma thwaitesianum* Müll. Arg. Fruit Juice, Its Phytochemical Contents, Antimicrobial Activity, and Application in Chiffon Cake. *Int J Food Sci* 2022; 2022: 5183562. doi.org/10.1155/2022/5183562
- Jaisin Y, Ratanachamnong P, Kuanpradit C, Khumpum W, Suksamrarn S. Protective effects of γ -mangostin on 6-OHDA-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters* 2018; 665: 229-35. doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.059
- Morris RG. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning Motivation* 1981;12(2):239-60. doi.org/10.1016/0023-9690 (81)90020-5
- Denenberg VH. Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: A theory of infantile stimulation. *Psychological Rev* 1964;71(5):335. doi.org/10.1037/h0042567
- Phanphak J, Boonyarat C, Puthongking P, Welbat JU, Bunreungthong K, Nillert N, et al. Effect of *Nelumbo nucifera* Stamen Extract on Memory Deficits in $A\beta$ -induced Rat. *Srinagarind Med J* 2020;35(3):261-5.
- Albuquerque BR, Heleno SA, Oliveira MB, Barros L, Ferreira IC. Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food Funct* 2021;12(1):14-29. doi.org/10.1039/D0FO02324H
- Saeng-on S, Daodee S, Sakloetsakun D. Development of gummy jelly from Makmao (*Antidesma velutinsum* Blume) crude extract. *Isan J Pharm Sci* 2015;11(suppl):261-6.