

ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำสกัดมะเมาะที่ปลูกในแปลงอนุรักษ์สายต้น

Phytochemical and antioxidant activities in crude extract of *Antidesma thwaitesianum* Müll. Arg in situ

ประดับ มีสวัสดิ์¹, ไมตรี มัญยานนท์², ชลธิชา นิवासประกฤติ² และ ปิยานี รัตนชำนอง^{3*}

Pradup Mesawat¹, Maitree Munyanont², Cholticha Niwaspragrit² and Piyanee Ratanachamnong^{3*}

¹ หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

¹ Central Instrument Facility, Faculty of Science, Mahidol University

² ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมเกษตรสร้างสรรค์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

² Expert Center of Innovative Agriculture, Thailand Institute of Scientific and Technological Research

³ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

³ Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University

บทคัดย่อ: มะเมาะ (*Antidesma thwaitesianum* Müll. Arg.) พบทั่วไปในเขตร้อน ประเทศไทยปลูกแพร่หลายในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีการปลูกและนำมาใช้ประโยชน์เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในท้องถิ่น มีการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อย่างแพร่หลาย แต่การศึกษาคุณสมบัติสารสำคัญในแต่ละสายต้นเพื่อให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ประโยชน์โดยเฉพาะในการแปรรูปอาหารยังมีอยู่จำกัด การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณน้ำตาลและปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำสกัดมะเมาะ 8 สายต้น จากแปลงรวบรวมพันธุ์ (*in situ*) สถานีวิจัยลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมา ผลการศึกษาพบว่าสายต้นภูซางมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์สูงสุด สายต้นสร้างคือ 1 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทสสูงสุด สายต้นสร้างคือ 1 และสร้างคือ 2 มีปริมาณกรดทาร์ทาริกสูงสุด ในขณะที่มะเมาะมีปริมาณกรดซิตริกสูงสุด จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสายต้นภูซางมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด สายต้นภูพานเพชรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ($p < 0.01$) และการลดลงของปริมาณน้ำตาลกลูโคส ($p < 0.05$) และสารฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์กับการลดลงของปริมาณกรดซิตริก ($p < 0.05$)

คำสำคัญ: สารฟีนอลิกทั้งหมด; สารฟลาโวนอยด์; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; น้ำตาล; กรดอินทรีย์

ABSTRACT: Ma-Mao (*Antidesma thwaitesianum* Müll. Arg) is a pan – tropical fruit trees. In the North and North-East Thailand, Ma-Mao was widely grown and was locally important cash crops. The fruits were widely processed into various food products. However, there was limited research on chemical properties of each Ma-Mao clone especially for use in food processing. The objective of this study was to investigate main chemical constituents of Ma-Mao fruits i. e. total phenolic and flavonoid contents, antioxidant properties, sugar and organic contents in 8 Ma-Mao clones in collection plot, Lam Ta Khong Research Station, Nakhon Ratchasima Province. The results showed that Phu Song (PS) has the highest total polyphenol contents and flavonoid contents. Sang Kho1 (SK1) has the highest glucose and fructose contents. Sang Kho1 (SK1) and Sang Kho2 (SK2) have the highest tartaric acid contents, while Mao Khom (MK) has the highest citric acid content. Phu Song (PS) and Fa Pra Than (PPP) have the highest and lowest antioxidant properties, respectively. Results on main constituents in Ma-Mao fruits indicated that total phenolic contents were significantly related to DPPH radical scavenging activity ($p < 0.01$) and the decrease in glucose contents ($p < 0.05$). Flavonoid contents were significantly related to a decrease in citric acid contents ($p < 0.05$).

* Corresponding author: e-mail: piyanee.rat@mahidol.ac.th

Keywords: total polyphenol; flavonoid; antioxidant; sugar; organic acid

บทนำ

มะเมาะหรือหมากเมาะ (*Antidesma thwaitesianum* Müll. Arg.) เป็นพืชในสกุล *Antidesma* มีการกระจายตัวอยู่ในเขตร้อนของแอฟริกา โอเชียเนีย ออสเตรเลีย และ เอเชีย (Jansen et al., 1993) ในประเทศไทยปลูกอย่างแพร่หลายในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะในจังหวัดสกลนคร มะเมาะพันธุ์พื้นเมืองได้รับการพัฒนาและส่งเสริมให้เป็นพืชเศรษฐกิจในระดับท้องถิ่น ผลผลิตมีจำหน่ายทั้งในรูปผลสดและผลิตภัณฑ์แปรรูป เช่น ผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ แยมและไวน์ เป็นต้น ผลสุกอุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหารแร่ธาตุและวิตามินที่จำเป็นต่อร่างกายของมนุษย์หลายชนิดเช่น โพรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ไฟเบอร์ แคลเซียม เหล็ก วิตามินบี 1 บี 2 และ วิตามินอี (Poonam and Varsha, 2017) สารฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ เช่น กรดแกลลิก คาทีชิน แทนนิน รุทีน เควอซิติน ซาโปนิน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (Puangpronpitag et al., 2008; Butkhup and Samappito, 2011; Barcelo et al., 2016) มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมและมะเร็งปอด (Hansakul et al., 2015) ด้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus aureus* และเชื้อราสายพันธุ์ *Candida albican* (Tuyoien and Itharat, 2010) ช่วยลดน้ำตาลในเลือด (Lawag et al., 2012) มีปริมาณน้ำตาลค่อนข้างสูง (Sabularse et al., 2013)

การศึกษาปริมาณสารสำคัญของมะเมาะในแต่ละสายต้นในสภาพแวดล้อมเดียวกันยังมีอยู่ในวงจำกัด การศึกษาในครั้งนี้เป็นการรวบรวมมะเมาะที่มีความหลากหลายของพันธุกรรมจากเกษตรกรผู้ปลูกและจำหน่ายพันธุ์ มาปลูกไว้ที่แปลงรวบรวมพันธุ์ (*in situ*) สถานีวิจัยลำตะคอง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ตั้งแต่ปี 2556 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณกรดอินทรีย์ และปริมาณน้ำตาลจากมะเมาะ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการคัดเลือกสายต้นเพื่อส่งเสริมการปลูกให้เหมาะสมกับการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์และเป็นการเพิ่มศักยภาพในการพัฒนามะเมาะเป็นพืชเศรษฐกิจต่อไปในอนาคต



Figure 1 Collection of leaf and fruit of *A. thwaitesianum* varieties *in situ* conservation field in Lam Takhong Research Station, Nakhon Raschasima, Thailand. Phu Song (PS), Fa Pra Than (FPT), Sang Kho1 (SK1), Sang Kho2 (SK2), Mao Khom (MK), Ob Choei (OC), Phu Phan Phet (PPP), Phu Phan Thong (PPT).

วิธีการศึกษา

การปลูกพืชและการเตรียมตัวอย่าง

ทำการปลูกมะเฒ่าทั้งหมด 8 สายต้น สายต้นละ 3 ต้น ได้แก่ ภูโงง (PS), ฟ้าประทาน (FPT), สร้างค้อ 1 (SK1), สร้างค้อ 2 (SK2), อบเชย (OC), เม่าขม (MK), ภูพานเพชร (PPP) และภูพานทอง (PPT) (Figure 1) ที่แปลงรวบรวมพันธุ์ สถานีวิจัยลำตะคอง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา เก็บตัวอย่างผลมะเฒ่าระยะสุกผลสีแดงถึงแดงเข้ม ระหว่างเดือนกันยายน - ตุลาคม ปี 2562 โดยเก็บสายต้นละ 3 ต้น น้ำหนักรวมกันประมาณ 1-2 กิโลกรัม นำมาคั้นน้ำแล้วกรอง จากนั้นนำเข้าสู่กระบวนการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดดัดแปลงจากวิธีของ Slinkard and Singleton (1977) เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิกช่วงความเข้มข้น 100 - 500 µg/mL และสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 5 mg/mL เติมสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างปริมาตร 30 µL ในน้ำกลั่นปริมาตร 2,370 µL เติมสารละลาย Folin - Ciocalteu ปริมาตร 150 µL จากนั้นเติมสารละลาย saturated sodium carbonate (Na₂CO₃) ปริมาตร 450 µL ผสมให้เข้ากันตั้งบ่มไว้ในที่มืด 60 นาที วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer (Jasco V-630) ที่ความยาวคลื่น 765 nm นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) $y = 1.0337x - 0.015$ ($R^2 = 0.99$) แสดงผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg GAE/g DW)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ดัดแปลงจากวิธีของ Chang et al. (2002) เตรียมสารมาตรฐานของสารเคอเวอซิตินช่วงความเข้มข้น 20 - 120 µg/mL และสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 5 mg/mL เติมสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างปริมาตร 300 µL ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,680 µL เติมสารละลาย potassium acetate (C₂H₃O₂K) เข้มข้น 1 M ปริมาตร 60 µL สารละลายเอทานอลเข้มข้น 95% ปริมาตร 60 µL และเติมสารละลาย aluminium chloride (AlCl₃) เข้มข้น 10% ปริมาตร 60 µL ผสมให้เข้ากันตั้งบ่มไว้ในที่มืด 30 นาที จากนั้นวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer (Jasco V-630, Japan) ที่ความยาวคลื่น 415 nm นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารเคอเวอซิติน (quercetin) $y = 5.769x - 0.0475$ ($R^2 = 0.99$) แสดงผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของเคอเวอซิตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg QE/g DW)

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

เตรียมสารละลายตัวอย่างด้วยเมทานอลเข้มข้น 95% ให้มีความเข้มข้น 2.5, 5, 7.5 และ 10 mg/mL นำสารตัวอย่างปริมาตร 20 µL เติมลงใน 96 well plate จากนั้นเติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 100 mM ปริมาตร 180 µL ผสมให้เข้ากันบ่มไว้ในที่มืด 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง automated microplate reader (PerkinElmer, Germany) ที่ความยาวคลื่น 515 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณหา % DPPH radical scavenging activity และ ค่า IC₅₀ เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox และ vitamin C (Liu et al., 1997)

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

A = absorbance of control

B = absorbance of sample

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

เตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 50 mg/mL ในน้ำกลั่น กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บในที่มืด อุณหภูมิ -10 °C ตลอดการทดลอง

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วย HPLC-RI : เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟรุกโทส (fructose) กลูโคส (glucose) และซูโครส (sucrose) ความเข้มข้น 100 - 1000 µg/mL กรองสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างผ่าน filter membrane ชนิด Nylon ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 µm วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่น Waters 2690 Separations Module ยี่ห้อ Waters (USA) ตัวตรวจวัดสัญญาณด้วย Refractive index (RI) detector รุ่น Waters 2414 โดยใช้คอลัมน์ C18 reverse phase ชนิด Hypersil™ APS - 2 HPLC Column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 mm ความยาว 250 mm ขนาดอนุภาค 5 µm ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 50 °C เฟสเคลื่อนที่เป็นสารผสมระหว่างอะซิโตนไตรไฮไดรอลและน้ำปราศจากไอออน ชนิด HPLC grade กำหนดการไหลแบบคงที่ (isocratic elution) ที่สัดส่วน 80:20 (V/V) โดยกำหนดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 mL/min ปริมาตรของสารที่ฉีด 10 µL ระยะเวลาที่ใช้วิเคราะห์ (run time) 15 นาที วิเคราะห์แบบ External standard โดยที่ปริมาณน้ำตาลฟรุกโทสคำนวณจากสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโทส $Y = 4.85e + 003X$ ($R^2 = 0.99$) และส่วนปริมาณน้ำตาลกลูโคสคำนวณจากสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส $Y = 4.24e + 003X$ ($R^2 = 0.99$) (EL-Shehawi et al., 2013)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ด้วย HPLC-UV : เตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดออกซาลิก (oxalic acid) เข้มข้น 12.5 - 100 µg/mL กรดทาร์ทริก (tartaric acid) เข้มข้น 25 - 200 µg/mL กรดแลคติก (lactic acid) และกรดซิตริก (citric acid) ความเข้มข้น 100 - 800 µg/mL กรองสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างผ่าน filter membrane ชนิด Nylon ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 µm วิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่น Waters 2695 Separations Module ยี่ห้อ Waters (USA) ตัวตรวจวัดสัญญาณ รุ่น Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector ที่ความยาวคลื่น 210 nm และใช้คอลัมน์ชนิด Prevail™ Organic Acid Column (Grace) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 mm ความยาว 150 mm ขนาดอนุภาค 5 µm เฟสเคลื่อนที่ใช้ 25 mM KH₂PO₄, pH 2.5 โดยกำหนดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 mL/min ปริมาตรของสารที่ฉีด 10 µL ระยะเวลาที่ใช้วิเคราะห์ 10 นาที วิเคราะห์แบบ External standard โดยปริมาณกรดทาร์ทริกคำนวณจากสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานกรดทาร์ทริก $Y = 218e + 002X$ ($R^2 = 0.99$) ส่วนปริมาณกรดซิตริกคำนวณจากสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานกรดซิตริก $Y = 4.80e + 001X$ ($R^2 = 0.99$) (Shui และ Leong., 2002)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 11.5 (SPSS Inc., USA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) โดยแสดงข้อมูลด้วยค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์องค์ประกอบเชิงสำรวจ (Principal component analysis) พิจารณาความแปรปรวนจากความผันแปรของตัวแปรพร้อมที่มีค่า Eigen value > 1 กำหนดนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ และ $p < 0.01$

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดคำนวณจากสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่า ผลมะเมาะมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ระหว่าง $137.38 \pm 5.23 - 320.43 \pm 18.48$ mg GAE/g DW โดยสายต้นกุโง้งมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือ ฟ้าประทาน สร้างค้อ 2 เม่าชม สร้างค้อ 1 ภูพานทอง อบเชย และภูพานเพชร ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารฟลาโวนอยด์คำนวณจากสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานเคอควิซิน มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ระหว่าง $15.91 \pm 0.09 - 25.16 \pm 0.32$ mg QE/g DW โดยสายต้นกุโง้ง มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากที่สุดรองลงมาคือ สร้างค้อ 2 ภูพานเพชร สร้างค้อ 1 อบเชย เม่าชม ภูพานทอง และฟ้าประทาน ตามลำดับ (Table 1) สอดคล้องกับรายงานของ (Jorjong et al., 2015) รายงานว่ามะเมาะต่างสายพันธุ์มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารฟลาโวนอยด์แตกต่างกัน

Table 1 Total phenolic contents and flavonoid contents of *A. thwaitesianum*

Clone	Total polyphenol contents (mg GAE/g DW) ^{1/2/}	Flavonoid contents (mg QE/g DW) ^{1/2/}
PS	320.4 ± 18.4^a	25.2 ± 0.3^a
FPT	262.8 ± 19.2^b	15.9 ± 0.2^f
SK1	189.8 ± 13.3^d	21.1 ± 0.4^c
SK2	227.6 ± 25.9^c	22.5 ± 0.2^b
OC	143.2 ± 10.3^e	19.6 ± 0.2^d
MK	224.9 ± 8.5^c	19.3 ± 0.3^{de}
PPP	137.3 ± 5.2^e	21.7 ± 0.2^{bc}
PPT	198.0 ± 19.4^d	18.2 ± 0.2^e

^{1/} Results were expressed as mean \pm SD of at least triplicate experiments. Gallic equivalents (GAE, mg/g DW) for the total polyphenol contents. Quercetin equivalents (QE, mg/g DW) for the flavonoid contents where: Phu Song (PS), Fa Pra Than (FPT), Sang Kho1 (SK1), Sang Kho2 (SK2), Mao Khom (MK), Ob Choei (OC), Phu Phan Phet (PPP), Phu Phan Thong (PPT).

^{2/} Means followed by different letters in column are significantly different at $p < 0.05$

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สารตัวอย่างมะเมาะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสารที่เสถียรมีสีม่วง เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสีของสารละลาย DPPH จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทำให้การดูดกลืนแสงลดลง เปรียบเทียบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานที่ใช้ ascorbic acid และ trolox ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.07 ± 0.0 และ 0.11 ± 0.0 ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า สายต้นกุโง้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.40 ± 0.06 mg/mL ขณะที่สายต้นภูพานเพชรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.85 ± 0.09 mg/mL (Table 2)

Table 2 DPPH radical scavenging activity of *A. thwaitesianum* at different concentrations

Clone	The percentage of DPPH radical scavenging activity ^{1/}				IC ₅₀ ^{2/} (mg/mL)
	2.5 (mg/mL)	5 (mg/mL)	7.5 (mg/mL)	10 (mg/mL)	
PS	45.0 ± 1.9	73.3 ± 2.7	89.62 ± 2.2	95.57 ± 0.7	2.40 ± 0.1 ^a
FPT	28.7 ± 3.6	49.2 ± 1.2	63.47 ± 3.2	75.22 ± 4.2	5.58 ± 0.1 ^b
SK1	17.8 ± 1.0	33.1 ± 0.8	45.41 ± 0.4	56.55 ± 1.1	8.54 ± 0.2 ^d
SK2	28.7 ± 1.8	51.1 ± 2.9	66.92 ± 2.9	78.49 ± 2.8	5.30 ± 0.1 ^b
OC	16.5 ± 2.8	30.5 ± 2.9	40.99 ± 6.1	50.78 ± 7.8	9.63 ± 0.2 ^e
MK	27.5 ± 1.1	47.6 ± 2.4	61.83 ± 2.3	73.39 ± 2.8	5.82 ± 0.0 ^b
PPP	15.6 ± 1.3	29.5 ± 1.6	39.63 ± 2.7	50.00 ± 3.6	9.85 ± 0.1 ^e
PPT	24.7 ± 2.9	42.9 ± 2.2	56.49 ± 4.6	65.72 ± 3.1	6.72 ± 0.0 ^c
Ascorbic acid					0.07 ± 0.0
Trolox					0.11 ± 0.0

^{1/} Results were expressed as mean ± SD of at least triplicate experiments. Ascorbic acid and Trolox used as standard vary concentrations from 40 to 120 µl/ml

^{2/} Means followed by different letters in column are significantly different at p < 0.05

ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในมะเมีด้วย HPLC-RI พบน้ำตาลฟรุกโทสและกลูโคสในน้ำที่ 5.466 และ 6.012 ตามลำดับ (Figure 2) โดยผลมะเมีมีปริมาณน้ำตาลฟรุกโทสอยู่ระหว่าง 418.4 ± 37.4 - 483.3 ± 5.10 mg/g DW ปริมาณน้ำตาลกลูโคสอยู่ระหว่าง 383.3 ± 20.6 - 449.9 ± 4.0 mg/g DW สายต้นสร้างคือ 1 มีปริมาณน้ำตาลฟรุกโทสและกลูโคสมากที่สุด ขณะที่สายต้นสร้างคือ 2 มีปริมาณน้ำตาลฟรุกโทสน้อยที่สุด สายต้นภูโงมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสน้อยที่สุด (Table 3) ส่วนน้ำตาลซูโครสพบปริมาณน้อยมากซึ่งสอดคล้องกับ จิรายุและอัมพร (2013) ที่พบน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทสในผลมะเมี โดยผลมะเมีสีม่วงดำมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทสสูงกว่าผลมะเมีสีแดง

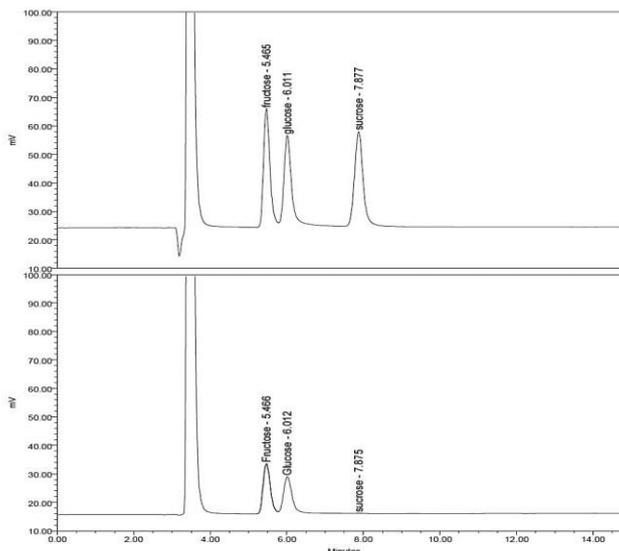


Figure 2 HPLC-RI chromatogram of the standards mixture (fructose; glucose; sucrose) for separation of *A. thwaitesianum* sugar using C₁₈ reverse phase (Hypersil™ APS - 2 column) with 80% ACN used as mobile phase, 50 °C temperature column by RI Detection

Table 3 Fructose and Glucose contents in crude extracts of *A. thwaitesianum*

Clone	Fructose ^{1/} (mg/g DW)	Glucose ^{1/} (mg/g DW)	Sucrose ^{1/, 2/} (mg/g DW)
PS	427.5 ± 14.4 ^{cd}	383.3 ± 20.6 ^e	ND
FPT	433.0 ± 25.9 ^{bc}	398.7 ± 21.9 ^{cd}	ND
SK1	483.3 ± 5.1 ^a	449.9 ± 4.4 ^a	< 1.0
SK2	418.4 ± 37.4 ^d	392.0 ± 33.6 ^{de}	ND
OC	454.0 ± 5.0 ^b	432.6 ± 7.0 ^{bc}	< 1.0
MK	439.7 ± 28.4 ^{bc}	403.2 ± 21.9 ^{cd}	< 5.0
PPP	445.1 ± 13.3 ^{bc}	415.0 ± 11.8 ^{bc}	ND
PPT	441.0 ± 15.7 ^{bc}	407.2 ± 14.1 ^{cd}	ND

^{1/} Means followed by different letters in column are significantly different at p < 0.05

^{2/} ND = Not Detected

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ด้วย HPLC-UV พบกรดทาร์ทาริกและกรดซิตริกในนาที่ที่ 3.30 และ 7.82 ตามลำดับ (Figure 3) โดยผลมะเข่ามีปริมาณกรดทาร์ทาริกอยู่ระหว่าง 19.7 ± 2.9 - 31.4 ± 7.1 mg/g DW และปริมาณกรดซิตริกอยู่ระหว่าง 23.6 ± 6.8 - 35.8 ± 3.5 mg/g DW โดยสายต้นสร้างคือ 1 และสร้างคือ 2 มีปริมาณกรดทาร์ทาริกมากที่สุด ส่วนสายต้นมะขมมีปริมาณกรดซิตริกมากที่สุดรองลงมาคือ ภูพานทองและฟ้าประทาน (Table 4) ซึ่งปริมาณกรดทาร์ทาริกและกรดซิตริกที่พบในผลมะเข่ามีปริมาณสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับผลไม้ที่มีรสหวานจำพวกลิ้นจี่ (Wang et al., 2006) กรดอินทรีย์ในผลไม้ นอกจากจะนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร เช่น สารกันบูด สารแต่งกลิ่น และสารปรุงรสแล้ว ยังมีรายงานการวิจัยว่า กรดทาร์ทาริกเพิ่ม

การดูดซึมในลำไส้และต้านเชื้อแบคทีเรีย (Lida et al., 2006; Smith et al., 2012) ในขณะที่กรดซิตริกมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและเป็นสารเพิ่มความแข็งแรงของกระดูก (Jeong et al., 2017; Ciriminna et al., 2017) อีกด้วย

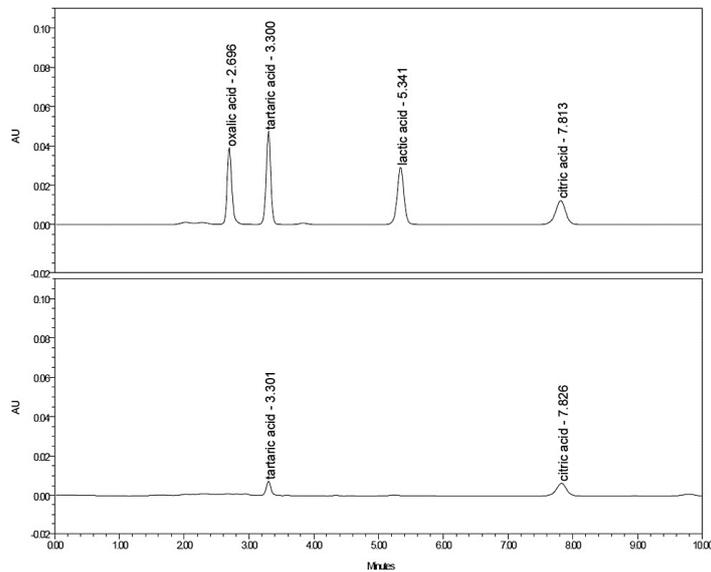


Figure 3 HPLC-UV chromatogram of the standards mixture (oxalic; tartaric; lactic; citric acid) for separation of *A. thwaitesianum* organic acid using Prevail™ Organic Acid column with 25 mM KH₂PO₄, pH 2.5 by Waters 2487 dual wavelength absorbance detector that was monitoring the absorbance at 210 nm

Table 4 Organic acid contents in crude extracts of *A. thwaitesianum*

Clone	Tartaric acid ^{1/} (mg/g DW)	Citric acid ^{1/} (mg/g DW)
PS	28.0 ± 3.5 ^b	23.6 ± 6.8 ^b
FPT	26.1 ± 7.3 ^b	33.9 ± 7.1 ^a
SK1	31.4 ± 7.1 ^a	23.8 ± 0.5 ^b
SK2	31.4 ± 0.5 ^a	25.4 ± 3.1 ^b
OC	29.1 ± 5.2 ^{ab}	27.0 ± 2.7 ^b
MK	19.7 ± 2.9 ^c	35.8 ± 3.5 ^a
PPP	27.9 ± 1.6 ^b	24.0 ± 2.3 ^b
PPT	26.4 ± 3.4 ^b	34.2 ± 5.5 ^a

^{1/} Means followed by different letters in column are significantly different at p < 0.05

^{2/} ND = Not Detected

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์องค์ประกอบโดยเทคนิค principal component analysis จากตาราง Correlation coefficient (Table 5) พิจารณาจากค่าความผันแปรของตัวแปรร่วมหรือค่า Eigen value ที่มากกว่า 1 พบว่าสารฟีนอลิกทั้งหมดมีค่า Eigen value เท่ากับ 3.53 และสามารถอธิบายความผันแปรของสารอื่นได้ 50.39% ส่วนฟลาโวนอยด์ มีค่า Eigen value เท่ากับ 2.3 และสามารถอธิบายความผันแปรของสารอื่นได้ 32.88% ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในผลมะเมาะมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

DPPH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% หมายถึงปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้น โดยพิจารณาจากค่า IC₅₀ ที่ต่ำลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Saeed et al. (2013) และ Butkhup and Samappito (2011) ที่พบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในมะเขามีสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเพิ่มขึ้นตามระยะการสุกแก่ของผล ขณะเดียวกันปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสและปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณกรดซิตริกที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อพิจารณาการวิเคราะห์องค์ประกอบจากแผนภาพ PCA (Figure 4) พบว่าสารฟีนอลิกทั้งหมดจะอยู่ในแกนที่ตรงกันข้ามกับน้ำตาลทั้งสองชนิด ขณะที่สารฟลาโวนอยด์ก็จะอยู่ในแกนที่ตรงกันข้ามกับกรดซิตริกเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจเกิดจากโมเลกุลของสารกลุ่มฟีนอลจะจับน้ำตาลในรูปไกลโคไซด์และกรดอินทรีย์ในผลไม้ก็จะไปจับโมเลกุลของน้ำตาลทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสอิสระและกรดซิตริกอิสระลดลง (Show and Lee, 2019)

Table 5 Correlation coefficient from seven variables of *A. thwaitesianum* qualities

PC	Eigen value	% variance		PC 1	PC 2	Flavonoid	Tartaric acid	Citric acid	Fructose	Glucose	IC ₅₀
1	3.53	50.39	Phenolic	-0.456	0.140	0.23	-0.17	0.11	-0.53	-0.71*	-0.97**
2	2.30	32.88	Flavonoid	-0.067	0.589		0.40	-0.79*	-0.13	-0.19	-0.29
3	0.63	8.98	Tartaric acid	0.222	0.488			-0.79*	0.22	0.32	0.21
4	0.48	6.79	Citric acid	-0.182	-0.609				-0.21	-0.23	-0.15
5	0.06	0.82	Fructose	0.453	-0.042					0.95**	0.66
6	0.01	0.15	Glucose	0.508	-0.055						0.82*

* 95% confidence interval, ** 99% confidence interval.

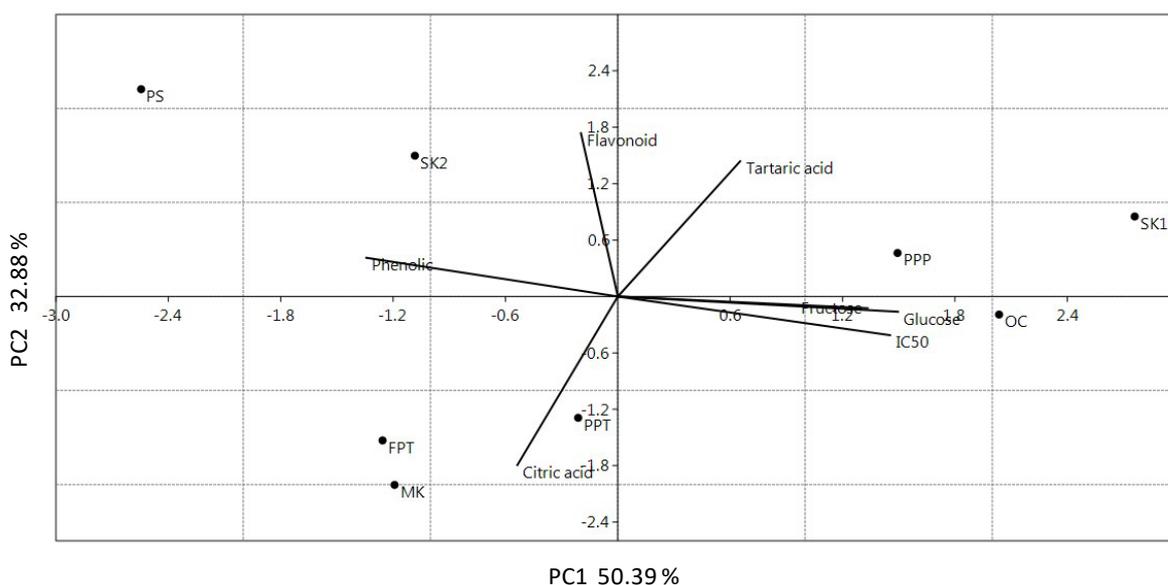


Figure 4 Principal component analysis based on correlation matrix classified *A. thwaitesianum* qualities

ปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อรสชาติของผลไม้ เช่น สายพันธุ์ ระดับความสุกแก่สภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศของพื้นที่ปลูก ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดยังสัมพันธ์กับช่วงอายุการเก็บเกี่ยวผลไม้ โดยช่วงอายุก่อนการเก็บเกี่ยว (immature stage) จะเป็นช่วงที่มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณกรดอินทรีย์มากที่สุด ซึ่งจะลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาการพัฒนาของผลจนถึงระยะสุกแก่

พร้อมกับความฝาดและขมก็ลดลงด้วยเช่นกัน (He et al., 2015) จากผลการศึกษาข้างต้นน่าจะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกมะเมาะให้ตรงกับวัตถุประสงค์ เช่น สายต้นภูโงงและสร้างค้อ 2 เป็นสายต้นที่มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูง น่าจะเหมาะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระ สายต้นฟ้าประทาน มะขม ภูพานทอง มีกรดซิดิก สายต้นภูพานเพชรและสร้างค้อ 1 พบกรดทาร์ทาริก ซึ่งอาจเหมาะสำหรับการนำไปเป็นวัตถุดิบผสมในอาหารเพื่อปรุงแต่งรสชาติ ส่วนสายต้นอบเชยแม้จะมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำที่สุดแต่มีปริมาณน้ำตาลฟรุทโทสและกลูโคสสูงที่สุดอาจเหมาะสำหรับผลิตเครื่องดื่มจำพวกน้ำผลไม้และไวน์ หรืออาจเลือกใช้มะเมาะต่างชนิดรวมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์

สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า มะเมาะที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้ง 8 สายต้น ปลูกอยู่ในสภาพภูมิอากาศเดียวกัน อายุของต้น ความสูงแก่ของผลใกล้เคียงกันและได้รับการดูแลทางการเกษตรเช่นเดียวกัน พบว่ามะเมาะแต่ละสายต้นยังคงมีคุณสมบัติและความโดดเด่นของสารสำคัญแตกต่างกัน ทั้งนี้สายต้นภูโงงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงน่าจะเป็นสายต้นที่เหมาะสมในการพัฒนาเพื่อใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต้านอนุมูลอิสระ ในขณะที่สายต้นสร้างค้อ 1 เป็นสายต้นที่มีปริมาณกรดทาร์ทาริก น้ำตาลฟรุทโทสและกลูโคสสูงน่าจะมีคุณสมบัติเหมาะสมในการพัฒนาเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการปรุงแต่งรสชาติของอาหาร ซึ่งข้อมูลนี้อาจเป็นประโยชน์ต่อการพิจารณาคัดเลือกสายต้นเพื่อให้ตรงกับความต้องการปลูกของเกษตรกรและผู้ผลิตที่ต้องการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ตามความต้องการรวมถึงเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลไม้พื้นบ้าน ทั้งนี้ควรศึกษาถึงปัจจัยภายนอกเช่น สภาพภูมิอากาศ ความอุดมสมบูรณ์ของดินและการดูแลรักษาที่อาจมีผลต่อคุณภาพของมะเมาะเพิ่มเติม

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ.ดร.อัญมณี อารุชานนท์ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านสถิติ และขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่สนับสนุนทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- จิรายุ มุสิกกา และอัมพร แซ่เอียว. 2013. ผลของสีและสายพันธุ์ของผลหมากเมาะต่อสมบัติกายภาพ เคมีและสารเชิงคุณภาพ. Graduate Research Conference. Khon Kaen University. 392-400.
- Barcelo, J. M., A.R.M. Nullar, J.K.P. Caranto, A.M. Gatchallan, and I.J.B. Aquino. 2016. Antioxidant and antimutagenic activities of ripe bignay (*Antidesma bunius*) crude fruit extract. Philippine e-Journal for Applied Research and Development. 6: 32-43.
- Butkhuup, L., and S. Samappito. 2011. Changes in physic-chemical properties, polyphenol compounds and antiradical activity during development and ripening of Moaluang (*Antidesma bunius* L. Spreng) fruits. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. 19: 85-99.
- Chang, C., M. Yang, H. Wen, and J. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis. 10: 178-182.
- Ciriminna, R., F. Meneguzzo, R. Delisi, and M. Pagliaro. 2017. Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. Chemistry Central Journal. 11: 1-9.
- El-Shehawi, A.M., M.A. Nagaty, and A.I. Fahmi. 2013. Gene expression profiling and fruit quality during ripening stages of Prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) in Taif. Life Science Journal. 10: 1267-1278.

- Hansakul, P., B. Dechayont, P. Phuaklee, O. Prajuabjinda, T. Juckmeta, and A. Itharat. 2015. Cytotoxic and antioxidant activities of *Antidesma thwaitesianum* Müll Arg (Euphorbiaceae) fruit and fruit waste extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 14: 627-634.
- He, M., H. Tian, X. Luo, X. Qi, and X. Chen. 2015. Molecular progress in research on fruit astringency. *Molecules*. 20: 1434-1451.
- Jansen, P.C.M., R.H.M.J. Lemmens, L.P.A. Oyen, J.S. Siemonsma, F.M. Stavast, and J.L.C.H. van Valkenburg. 1993. *Plant Resources of South-East Asia: Basic list of species and commodity grouping. Final version.* Pudoc. WUR.
- Jeong, H.Y., Y.S. Choi, J.K. Lee, B.J. Lee, W.K. Kim, and H. Kang. 2017. Anti-inflammatory activity of citric acid-treated wheat germ extract in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Nutrient*. 9: 730.
- Jorjong, S., L. Butkhup, and S. Samappito. 2015. Phytochemicals and antioxidant capacities of Mao-Lunag (*Antidesma bunius* L.) cultivars from Northeastern Thailand. *Food Chemistry*. 181: 248-255.
- Lawag, I.L., A.M. Aguinaldo, S. Naheed, and M. Mosihuzzaman. 2012. α -Glucosidase inhibitory activity of selected Philippine plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 144: 217-219.
- Lida, A., M. Tomita, Y. Idota, Y. Takizawa, and M. Hayashi. 2006. Improvement of intestinal absorption of P-glycoprotein substrate by D-tartaric acid. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 21: 424-428.
- Liu, F., V.E. Ooi, and S.T. Chang. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Science Journal*. 60: 763-671.
- Poonam, P., and J. Varsha. 2017. Nutritional and antioxidant assessment of fruits of *Antidesma acidum* Retz. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 8: 151-163.
- Puangpronpitag, D., P. Areejitranusorn, P. Boonsiri, M. Suttajit, and P. Yongvanit. 2008. Antioxidant activities of polyphenolic compounds isolated from *Antidesma thwaitesianum* Müll. Arg. seeds and marcs. *Journal of Food Science*. 73: 648-653.
- Saeed, N., M.R. Khan, and M. Shabbir. 2013. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 221: 1-12.
- Sabularse, V.C., M.D. Belina-Aldemita, E.I. Dizon, W.A. Hurtada, and M.A.O. Torio. 2013. Physicochemical properties of bignay [*Antidesma bunius* (L.) Spreng.] wine at different stages of processing. *Philippine Science Letters*. 6: 249-56.
- Samappito, S., and L. Butkhup. 2008. An analysis on flavonoids, phenolics and organic acids contents in brewed red wines of both non-skin contact and skin contact fermentation techniques of Mao Luang ripe fruits (*Antidesma bunius*) harvested from Phupan Valley in Northeast Thailand. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11: 1654-1661.
- Show, K.Y., and D.J. lee. 2019. *Biohydrogen: Bioreactor and bioprocess design for biohydrogen production*. 2nd Edition. Elsevier, AMS.
- Shui, G., and L.P. Leong. 2002. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 977: 89-96.

- Slinkard, K., and V.L. Singleton. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28: 49-55.
- Smith, J.G., A.J. Smith, R.M. Shelton, and P.R. Cooper. 2012. Antibacterial activity of dentine and pulp extracellular matrix extracts. *International Endodontic Journal*. 45: 749-755.
- Tuyoiem, T., and A. Itharat. 2010. Biological activities of *Antidesma thwaitesianum* Muell. *Thai Journal of Pharmacology*. 32: 126-8.
- Wang, H.C., H.B. Huang, X.M. Huang, and Z.Q. Hu. 2006. Sugar and acid compositions in the arils of *Litchi chinensis* Sonn.: cultivar differences and evidence for the absence of succinic acid. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 81(1): 57-62.