

**ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม
ของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย**

**Antioxidant Activity, Tyrosinase Inhibition Activity, Total Phenolic Content and
Total Flavonoid Content of Crude Extracts of Fruit and Leaf of *Terminalia chebula* Retz.**

ศุภรัตน์ ดวนใหญ่* จตุพร พันธ์ไธย อัจฉรา แก้วน้อย เพชรน้ำผึ้ง รอดโพธิ์ อาวุธ หงษ์ศิริ

บุญหลง ศรีบัว และ กวินท์ สาสาย

Supharat Duanyai* Jatuporn Panusnothai Atchara Kaewnoi Petnumpung Rodpo Arwut Hongsiri

Boonlong Sribua and Kawin Sasay

ภาควิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Science and Technology,

Bansomdejchaopraya Rajabhat University

*E-mail: suppharat.du@gmail.com

Received: Sep 05, 2023

Revised: Oct 10, 2023

Accepted: Oct 16, 2023

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากผลสมอไทยและใบสมอไทย ซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอลร้อยละ 95 เอทานอลร้อยละ 70 และเอทานอลร้อยละ 50 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทำโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radial scavenging capacity assay (DPPH assay), ABTS radical cation decolorization assay (ABTS assay) และ ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสทำโดยวิธี Dopachrome method การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมทำโดยวิธี Folin-Ciocalteu assay และการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทำโดยวิธี Aluminum chloride colorimetric assay จากการศึกษา พบว่า สารสกัดหยาบจากใบสมอไทยที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ด้วยวิธี DPPH ($IC_{50} = 8.064 \pm 0.19$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และวิธี FRAP assay (FRAP value = $1,238.211 \pm 2.47$ มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด) นอกจากนี้ยังพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุด ($IC_{50} = 0.327 \pm 0.10$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด (144.183 ± 6.73 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อกรัมสารสกัด) ส่วนสารสกัดหยาบใบสมอไทยที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 50 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดด้วยวิธี ABTS assay โดยมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ เท่ากับ 442.405 ± 12.16 มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อกรัมสารสกัด และมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด (418.007 ± 19.55 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าใบสมอไทยถือเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ซึ่งอาจเป็นสมุนไพรทางเลือกในการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเวชสำอาง และวิจัยต่อยอดด้านเภสัชวิทยาเพื่อการพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางยาต่อไป

คำสำคัญ: สมอไทย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ปริมาณสารฟีนอลิกรวม ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

Abstract

This research aimed to determine the antioxidant activity, tyrosinase inhibition activity, total phenolic content and total flavonoid content of crude extracts of fruit and leaf of *Terminalia chebula* Retz. The extracts were prepared by using three different solvents including 95% ethanol, 70% ethanol, and 50% ethanol. The antioxidant activity was determined by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radial scavenging capacity assay (DPPH

assay), ABTS radical cation decolorization assay (ABTS assay) and ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay. The tyrosinase inhibition activity was determined by using the Dopachrome method. Total phenolic content was analyzed by the Folin-Ciocalteu assay and total flavonoid content was analyzed by the Aluminum chloride colorimetric assay. From the results, it was found that the crude 95% ethanol extract of *Terminalia chebula* Retz. leaf exhibited the most potent antioxidant activity determined by DPPH assay ($IC_{50} = 8.064 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$) and by FRAP assay (FRAP value = $1,238.211 \pm 2.47 \text{ mM FeSO}_4 \text{ equivalent/g extract}$). Moreover, it exhibited the strongest tyrosinase inhibition activity ($IC_{50} = 0.327 \pm 0.10 \text{ mg/mL}$) and the highest total flavonoid content ($144.183 \pm 6.73 \text{ mg quercetin equivalent/g extract}$). On the other hand, the crude 50% ethanol extract of *Terminalia chebula* Retz. leaf exhibited the highest antioxidant activity determined by ABTS assay with the ABTS^{•+} scavenging activity of $442.405 \pm 12.16 \text{ mg ascorbic acid equivalent/g extract}$ and the highest phenolic content ($418.007 \pm 19.55 \text{ mg gallic acid equivalent/g extract}$). This research demonstrates that *Terminalia chebula* Retz. leaf is considered to be an interesting source of bioactive compounds. It may be an alternative herb for cosmetic applications and further research in pharmacology for the development of active drug compounds.

Keywords: *Terminalia chebula* Retz., Antioxidant activity, Tyrosinase inhibition activity, Total phenolic content, Total flavonoid content

1. บทนำ

ในปัจจุบันสมุนไพรถือเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายทั้งในด้านการบำบัดรักษาโรค การบำรุงร่างกาย เครื่องสำอางรวมทั้งผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร สมุนไพรส่วนใหญ่มีคุณสมบัติในการบำรุงร่างกายสามารถรักษาสมาคมของร่างกายได้โดยการไปเพิ่มการไหลเวียนเลือดในร่างกายช่วยให้ระบบย่อยอาหารเป็นปกติให้พลังงานแก่ร่างกาย และนอกจากนี้สมุนไพรยังมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยปกป้องร่างกายจากการทำลายของสารอนุมูลอิสระ (Free radical) ที่เกิดจากการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการเผาผลาญอาหารให้เป็นพลังงาน รวมถึงจากมลพิษทางอากาศ แสงแดด ความร้อน และสภาวะ ความเครียด เป็นต้น [1], [2] สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ คือสมุนไพรสมอไทย (*Terminalia chebula* Retz.) จัดอยู่ในวงศ์ Combretaceae ซึ่งเป็นสมุนไพรที่พบได้ทั่วไปในภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ผลสมอไทยมีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย เช่น ยาระบายอ่อน ๆ ถ่ายเสมหะ มีฤทธิ์เป็นยาผดผามานแก้ท้องเดิน ทั้งนี้มีรายงานว่า สารสกัดจากผลสมอไทยพบสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ปริมาณสูง เช่น Gallic acid, Ellagic acid, Chebulic acid และ Corilagin [3] ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีสรรพคุณทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกและ แกรมลบหลายชนิด ฤทธิ์ต้านไวรัส ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านเบาหวาน และต้านอนุมูลอิสระ [4] ในส่วนสารสกัด

เอทานอล (Ethanol) ของผลและใบสมอไทย ยังพบสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และ กลุ่มแทนนิน (Tannin) ซึ่งสารกลุ่มนี้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและชะลอความชรา [5], [6] นอกจากนี้ยังพบว่าผลของสมอไทยมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ได้ ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกระบวนการสร้างเม็ดสี (Melanogenesis) กระบวนการนี้ทำให้ผิวหนังมีสีหมองคล้ำลง โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะเร่งปฏิกิริยาในขั้นเริ่มต้นของกระบวนการคือเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสารตั้งต้น L-Tyrosine ให้เป็นสาร 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-dopa) และเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น DOPA-quinone ตามลำดับ ดังนั้นการป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างเม็ดสีดำของยูเมลานิน (Eumelanin) อีกวิธีหนึ่ง คือ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยจากรายงานวิจัย พบว่า สารสกัดผลสมอไทยยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 39.98 ± 0.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [7] จากข้อมูลสรรพคุณทางการแพทย์แผนไทย และจากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิกรวม และสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดสมุนไพรส่วนใหญ่เป็นสารสกัดส่วนของผลสมอไทย แต่รายงานการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดส่วนของใบสมอไทย ยังมีรายงานการวิจัยไม่มาก ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibition activity) รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

(Total phenolic content) และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content) ของสารสกัดหยาบ (Crude extract) จากผลสมอไทยและใบสมอไทย ซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 คือ เอทานอลร้อยละ 95 เอทานอลร้อยละ 70 และเอทานอลร้อยละ 50 ผลการศึกษาวินิจฉัยสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนในการนำส่วนต่าง ๆ ของสมอไทยไปใช้ในการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพื่อใช้ในการดูแลสุขภาพผิว และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสมอไทยในการพัฒนาเป็นเวชสำอาง

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

สมุนไพรสมอไทยที่ใช้ในการศึกษานี้เก็บจากอำเภอวังหิน จังหวัดศรีสะเกษ ตรวจระบุชนิดให้ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องตามหลักอนุกรมวิธานพืช โดยตรวจเอกลักษณ์พืชตาม Thai Herbal Pharmacopoeia, THP และอ้างอิงจากฐานข้อมูล The Plant list และเก็บตัวอย่างพืชแห้งไว้ที่พิพิธภัณฑ์เภสัชกรรมไทย มบส. (หมายเลขอ้างอิง BSRU TTMC0007) โดย อาจารย์แพทย์แผนไทยเพชรน้ำผึ้ง รอดโพธิ์ผู้เชี่ยวชาญด้านเภสัชกรรมไทย

การเตรียมสารสกัดสมุนไพรทำโดยนำสมุนไพรสมอไทยมาทำความสะอาด อบแห้ง และบดให้ละเอียด จากนั้นร่อนผ่าน Sieve เบอร์ 60 นำผงสมุนไพรมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร โดยนำผงสมุนไพร 30 กรัม ใส่ในตัวทำละลาย 300 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง [8] จากนั้นกรอง ทำให้แห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator และนำไป Freeze dry จะได้สารสกัดหยาบ จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารที่สกัดได้น้ำหนักแห้งของสมุนไพร (% Yield)

2.2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย โดยวิธี DPPH radical scavenging capacity assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย โดยวิธี DPPH radical scavenging capacity ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Chewchinda et al. [9] ทำโดยเตรียมสารละลายของสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างกัน 5-6 ความเข้มข้น จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาโดยใช้สารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย Methanolic DPPH ความเข้มข้น 152 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยเครื่อง Microplate spectrophotometer (Perkin Elmer®, รุ่น Em Sight 3400) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% Radical scavenging) ดังสมการ

$$\% \text{ Radical scavenging} = [(A_c - A_s)/A_c] \times 100$$

เมื่อ A_c = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (ไม่มีสารสกัด)

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดการทดลองที่มีสารสกัด

นำค่า % Radical scavenging และความเข้มข้นของสารสกัดจากสมอไทยมาสร้างกราฟเพื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ครึ่งหนึ่ง (The half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) โดยในการทดลองนี้ใช้สารมาตรฐานวิตามินซี (Ascorbic acid) และสารมาตรฐานบิวทิล ไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated hydroxytoluene) ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย โดยวิธี ABTS radical cation decolorization assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย โดยวิธี ABTS radical cation decolorization assay ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Srisorn et al. [10] ทำโดยเตรียมสารละลาย 2, 2'-azobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย Potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ผสมสารละลาย ABTS กับสารละลาย Potassium persulfate ในอัตราส่วน 1:0.5 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้หลังจากนั้นนำมาเจือจาง และวัดค่าการดูดกลืนแสง ให้ได้ 0.7 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นเตรียมสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอลปิเปตสารตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย ABTS^{•+} 10 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer (Perkin Elmer®, รุ่น Em Sight 3400) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของวิตามินซี โดยสร้างกราฟมาตรฐานของวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยกำหนดแกน y เป็น % Inhibition และแกน x เป็นความ

เข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินซี แสดงค่าในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อกรัมสารสกัด (mg ascorbic acid equivalent/g extract, mg AAE/g extract)

2.4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย โดยวิธี Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย โดยวิธี Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Benzie and Strain [11] ทำโดยเตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสมสารละลาย 300 มิลลิโมลาร์ Acetate buffer pH 3.6 กับสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ Ferric chloride (FeCl_3) และสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ 2,4,6-tri-2-pyridyl-2-triazine (10 mM TPTZ) ใน 40 มิลลิโมลาร์ Hydrochloric acid (40 mM HCl) ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ จากนั้นเตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล ปิเปตสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-well plate และเติม FRAP reagent ปริมาตร 180 ไมโครลิตร เขย่าสารให้เข้ากัน และบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer (Perkin Elmer®, รุ่น Em Sight 3400) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณค่าการดูดกลืนแสงจากสมการ

$$\text{Absorbance} = A - B - C$$

เมื่อ A = สารตัวอย่างผสม FRAP reagent

B = สารตัวอย่างผสม Acetate buffer

C = ตัวทำละลาย Ethanol ผสม FRAP reagent

จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ได้มาคำนวณความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (FRAP value) โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต (Ferrous sulfate, FeSO_4) ความเข้มข้นในช่วง 0.125-2.00 มิลลิโมลาร์ แสดงค่าในรูปของมิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด (mM FeSO_4 equivalent/g extract)

2.5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทยใช้วิธี Dopachrome

method โดยใช้สาร ไทโรซีน (Tyrosine) เป็นสารตั้งต้น (Substrate) วิธีที่ใช้นี้ดัดแปลงจากวิธีของ Itsarasook [12] ซึ่งทำโดยเตรียมสารละลายตัวอย่างของสารสกัดให้มีความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25, 0.625 และ 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาผสมกับ Mushroom tyrosinase ความเข้มข้น 100 ยูนิต (Unit) ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) pH 6.8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) pH 6.8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดลงใน 96-well plate และผสมสารละลาย จากนั้นนำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition activity) จากสมการ

$$\text{Tyrosinase inhibition activity (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่เติมสารสกัด

B = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารสกัด

คำนวณค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (Half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) โดยสร้างกราฟระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition activity) และความเข้มข้นของสารสกัด หรือสารควบคุมเชิงบวก (Positive control) ซึ่งในการทดลองนี้ใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารควบคุมเชิงบวก

2.6. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu assay

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu assay ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Dunkhunthod and Sittisart [13] ทำโดยเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาโดยใช้สารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu (โดยเจือจาง 1:10 ด้วยน้ำกลั่น) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ 3 นาที จากนั้นเติม Sodium carbonate ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer (Perkin Elmer®, รุ่น Em Sight 3400) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัด โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้นในช่วง 0.1-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงค่าในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg gallic acid equivalent, mg GAE/g extract)

2.7. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Sithisarn et al. [14] ซึ่งทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเคอซีทิน (Quercetin) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Stock solution) เจือจางให้ได้สารละลายความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม 2% $AlCl_3$ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer (Perkin Elmer®, รุ่น Em Sight 3400) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมจากกราฟมาตรฐานของสารเคอซีทิน แสดงค่าในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อกรัมสารสกัด (mg Quercetin equivalent, mg QE/g extract)

2.8. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลจากการทดลองทั้งหมดแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ($n = 3$) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS Statistics version 26 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่สกัดจากผลและใบสมอไทย ซึ่งเป็นอิสระต่อกัน ใช้ Independent samples t-test สำหรับข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ใช้ One way ANOVA ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดลอง และใช้ Duncan's new multiple range test (DMRT) ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่าง

3. ผลการวิจัย

3.1. ผลการเตรียมสารสกัดสมุนไพร

จากการสกัดสมุนไพรใบสมอไทยและผลสมอไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร พบว่า สารสกัดส่วนผลสมอไทยมีปริมาณสารสกัดมากกว่าสารสกัดใบสมอไทย โดยสารสกัดเอทานอลร้อยละ 50 ของผลสมอไทยมีปริมาณสารสกัดมากที่สุด คือ มีปริมาณร้อยละสารสกัด เท่ากับ 52.43 โดยน้ำหนักแห้ง รองลงมา คือ สารสกัดเอทานอลร้อยละ 70 และ เอทานอลร้อยละ 95 ของผลสมอไทย โดยมีร้อยละสารสกัด เท่ากับ 46.39 และ 36.50 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Percentage yields of crude extracts of fruit and leaf of *T. chebula* Retz.

Extract	Yield (% of dry weight)	
	Fruit	Leaf
95% Ethanol	36.50	17.41
70% Ethanol	46.39	24.45
50% Ethanol	52.43	20.04

3.2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย โดยวิธี DPPH assay

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลสมอไทย และใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร โดยวิธี DPPH assay ผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.064 ± 0.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัดใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 และเอทานอลร้อยละ 70 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.510 ± 0.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 12.803 ± 0.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนสารสกัดผลสมอไทย พบว่าสารสกัดผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 ให้ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.657 ± 1.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ สารสกัดผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 และเอทานอลร้อยละ 70 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.225 ± 0.21

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 14.095 ± 0.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดใบสมอไทยและผลสมอไทย พบว่า สารสกัดใบสมอไทยแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดจากผลสมอไทย ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี และสารมาตรฐานบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน พบว่า สารสกัดใบสมอไทยผลสมอไทยแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี และสารมาตรฐานบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (Table 2)

3.3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย โดยวิธี ABTS assay

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลสมอไทย และใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร โดยวิธี ABTS assay โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของวิตามินซี จากการสร้างกราฟมาตรฐานวิตามินซีได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของกราฟ ($R^2 = 0.999$) และสมการเส้นตรง ($y = 1174.1x + 15.177$) ผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 มีความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS^{•+} มากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 442.405 ± 12.16 มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 และเอทานอลร้อยละ 95 โดยมีความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS^{•+} มีค่าเท่ากับ 410.670 ± 10.94 และ 382.793 ± 2.22 มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ส่วนสารสกัดผลสมอไทย พบว่า สารสกัดผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 มีความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS^{•+} มากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 433.828 ± 3.93 มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 และ เอทานอลร้อยละ 95 โดยมีความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS^{•+} โดยมีค่าเท่ากับ 322.325 ± 2.57 และ 280.296 ± 1.96 มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อกรัมสารสกัด และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดใบสมอไทยและผลสมอไทยด้วยวิธี ABTS assay พบว่า สารสกัดใบสมอไทยแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดจากผลสมอไทยที่สกัดด้วย

ตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 และ เอทานอลร้อยละ 70 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 2)

3.4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย โดยวิธี FRAP assay

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลสมอไทย และใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร โดยวิธี FRAP assay โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต จากการสร้างกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของกราฟ ($R^2 = 0.9996$) และสมการเส้นตรง ($y = 0.6164x - 0.0629$) ผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนมากที่สุด โดยมีค่า FRAP value เท่ากับ $1,238.211 \pm 2.47$ มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 และเอทานอลร้อยละ 50 โดยมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอน โดยมีค่า FRAP value เท่ากับ $1,059.214 \pm 1.87$ และ 920.776 ± 4.29 มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ส่วนสารสกัดผลสมอไทย พบว่า สารสกัดผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนมากที่สุด โดยมีค่า FRAP value เท่ากับ 701.222 ± 4.29 มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 และเอทานอลร้อยละ 50 มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอน โดยมีค่า FRAP value เท่ากับ 641.196 ± 7.43 และ 597.934 ± 3.37 มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารสกัดใบสมอไทยและผลสมอไทย ด้วยวิธี FRAP assay พบว่า สารสกัดใบสมอไทยแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดจากผลสมอไทย ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 2)

3.5. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดผลสมอไทย และใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล

ที่ความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร โดยวิธี Dopachrome method โดยใช้สารไทโรซีน (Tyrosine) เป็นสารตั้งต้น (Substrate) ผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.327 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัดใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 และเอทานอลร้อยละ 70 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.489 ± 0.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 4.249 ± 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนการทดสอบกับสารสกัดผลสมอไทย พบว่า สารสกัดผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 และเอทานอลร้อยละ 70 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 41.295 ± 6.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 46.721 ± 5.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้น้อยกว่าสารสกัดเอทานอลร้อยละ 95 และสารสกัดเอทานอลร้อยละ 70 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 58.652 ± 5.42 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสระหว่างสารสกัดจากใบสมอไทยและผลสมอไทย พบว่า สารสกัดจากใบสมอไทยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้มากกว่าสารสกัดจากผลสมอไทย ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากใบสมอไทยและผลสมอไทย กับสารมาตรฐานกรดโคจิก พบว่า สารสกัดจากใบสมอไทย และผลสมอไทย แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้น้อยกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก (Table 3)

3.6. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย โดยวิธี Folin-ciocalteu assay

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากผลสมอไทย และ ใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร โดยวิธี Folin-ciocalteu assay โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) จากการสร้างกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($R^2 = 0.999$) โดยมีสมการเส้นตรง ($y = 4.6114X + 0.0488$) (Figure 1) ผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดจากใบสมอไทยที่สกัดด้วย

ตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากที่สุด คือ มีค่าเท่ากับ 418.007 ± 19.55 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดจากใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 และเอทานอลร้อยละ 95 พบปริมาณสารฟีนอลิกรวม เท่ากับ 353.674 ± 9.98 และ 294.256 ± 16.73 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนสารสกัดจากผลสมอไทย พบว่า สารสกัดผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากที่สุด คือ มีค่าเท่ากับ 261.728 ± 15.66 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 และเอทานอลร้อยละ 95 โดยมีปริมาณสารฟีนอลิกรวม เท่ากับ 259.270 ± 16.32 และ 191.178 ± 4.63 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารฟีนอลิกรวมระหว่างสารสกัดจากใบสมอไทยและผลสมอไทย พบว่า สารสกัดใบสมอไทยมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดจากผลสมอไทย ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 3)

3.7. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทย

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากผลสมอไทยและใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร วิเคราะห์ปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานเคอซีทิน จากการสร้างกราฟมาตรฐานของเคอซีทินได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($R^2 = 0.9997$) โดยมีสมการเส้นตรง ($y = 0.0118x - 0.0835$) (Figure 2) ผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดจากใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด คือ มีค่าเท่ากับ 144.183 ± 6.73 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อกรัมสารสกัด ส่วนสารสกัดจากใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 และ เอทานอลร้อยละ 50 พบปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 125.505 ± 4.49 และ 113.620 ± 8.48 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด คือ มีค่าเท่ากับ 14.361 ± 0.25 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อกรัมสารสกัด ส่วนสารสกัดผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลาย

เอทานอลร้อยละ 70 และเอทานอลร้อยละ 50 พบปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 12.748 ± 0.42 และ 12.211 ± 0.37 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมระหว่างสารสกัดจาก

ใบสมอไทยและผลสมอไทย พบว่า สารสกัดจากใบสมอไทยมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมมากกว่าสารสกัดจากผลสมอไทย ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 3)

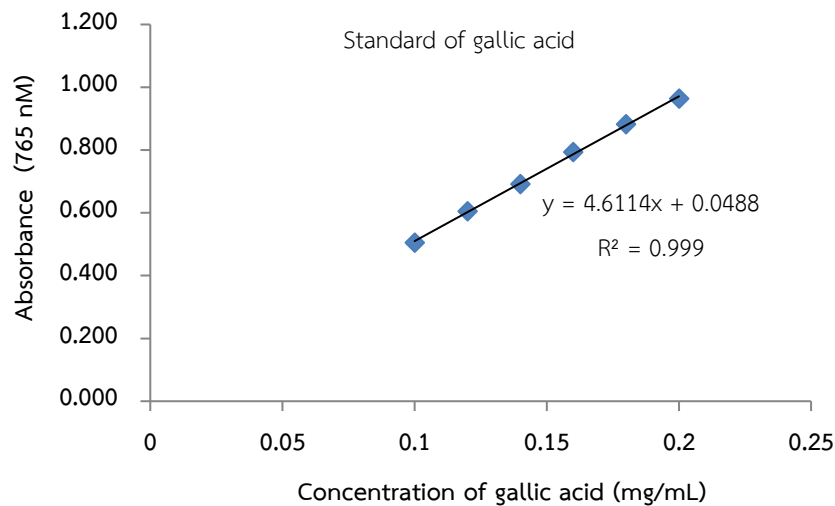


Figure 1 Standard curve of gallic acid

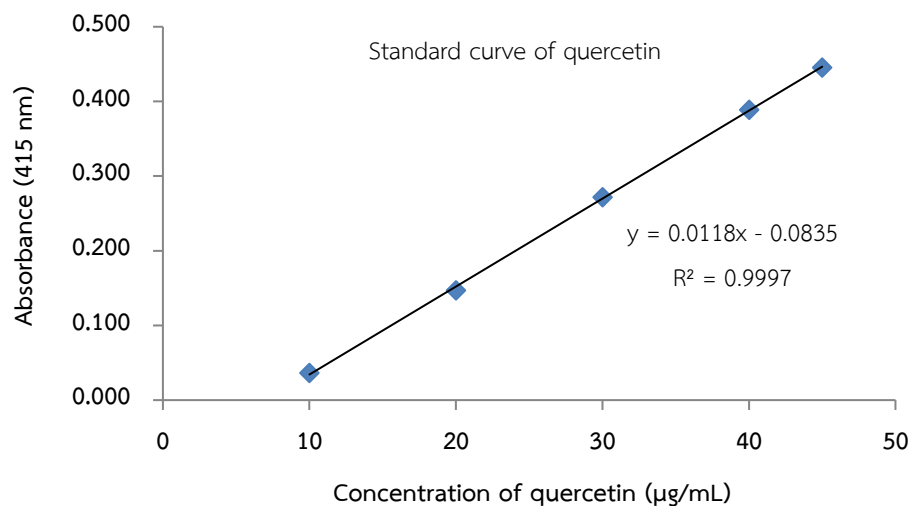


Figure 2 Standard curve of quercetin

Table 2 Antioxidant activity analyzed by DPPH, ABTS and FRAP assays of crude extracts of fruit and leaf of *T. chebula* Retz.

Extract	IC ₅₀ of DPPH assay		ABTS ^{•+} scavenging activity		FRAP value	
	(μg/mL)		(mg AAE/g extract)		(mM FeSO ₄ equivalent/g extract)	
	Fruit	Leaf	Fruit	Leaf	Fruit	Leaf
95% Ethanol	12.657±1.53 ^{b,A}	8.064±0.19 ^{a,A}	280.296±1.96 ^{b,C}	382.793±2.22 ^{a,C}	701.222±4.29 ^{b,C}	1,238.211±2.47 ^{a,C}
70% Ethanol	14.095±0.21 ^{b,A}	12.803±0.61 ^{a,C}	322.325±2.57 ^{b,B}	410.670±10.94 ^{a,B}	641.196±7.43 ^{b,B}	1,059.214±1.87 ^{a,B}
50% Ethanol	13.225±0.21 ^{b,A}	11.510±0.31 ^{a,B}	433.828±3.93 ^{a,A}	442.405±12.16 ^{a,A}	597.934±3.37 ^{b,A}	920.776±4.29 ^{a,A}
Ascorbic acid	2.408±0.11					
Butylated hydroxytoluene	4.692±0.30					

Mean values followed by different uppercase superscripts (A, B, C) within a column are significantly different using DMRT (p<0.05).

Mean values followed by different lower superscripts (a, b) within a row (of each assay) are significantly different using Independent samples t-test (p<0.05).

Table 3 Tyrosinase inhibition activity, total phenolic contents (TPC) and total flavonoid contents (TFC) of crude extracts of fruit and leaf of *T. chebula* Retz.

Extract	Tyrosinase inhibition activity		TPC		TFC	
	IC ₅₀ (μg/mL)		(mg GAE/g extract)		(mg QE/g extract)	
	Fruit	Leaf	Fruit	Leaf	Fruit	Leaf
95% Ethanol	41.295± 6.98 ^{b,A}	0.327±0.10 ^{a,A}	191.178± 4.63 ^{b,A}	294.256±16.73 ^{a,C}	14.361±0.25 ^{b,A}	144.183±6.73 ^{a,A}
70% Ethanol	46.721±5.02 ^{b,A}	4.249±0.30 ^{a,B}	259.270±16.32 ^{b,B}	353.674±9.98 ^{a,B}	12.748±0.42 ^{b,B}	125.505±4.49 ^{a,B}
50% Ethanol	58.652±5.42 ^{b,B}	3.489±0.63 ^{a,B}	261.728±15.66 ^{b,B}	418.007±19.55 ^{a,A}	12.211±0.37 ^{b,B}	113.620±8.48 ^{a,B}
Kojic acid	0.112±0.01					

Mean values followed by different uppercase superscripts (A, B, C) within a column are significantly different using DMRT (p<0.05).

Mean values followed by different lower superscripts (a, b) within a row (of each property) are significantly different using Independent samples t-test (p<0.05).

4. อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม และปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากผลและใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร พบว่า สารสกัดจากใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดหยาบจากผลสมอไทย ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay ABTS assay และ FRAP assay และยังพบว่าสารสกัดจากใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ปริมาณสารฟีนอลิกรวม และปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าสารสกัดหยาบจากผลสมอไทย ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังผลการทดลองที่แสดงใน Table 2 และ Table 3 จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดจากผลสมอไทยและใบสมอไทยมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากกว่าสารฟลาโวนอยด์รวม ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบสารสกัดจากใบสมอไทยมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากกว่าสารฟลาโวนอยด์รวม โดยมีค่าเท่ากับ 266.16 ± 7.81 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และ 29.23 ± 3.81 มิลลิกรัมสมมูลของเคอิกซินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ [6] และจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สารสกัดทั้งส่วนผล และใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay และพบปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay เป็นการทดสอบความสามารถของสารสกัดในการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ ซึ่งมีความจำเพาะต่อสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่ละลายได้ดีในสารละลายขั้วปานกลาง เช่น ตัวทำละลายในกลุ่มแอลกอฮอล์ ซึ่งสารที่ออกฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เน้นการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ ตัวอย่างเช่น สาร Kaempferol ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการให้ไฮโดรเจนและเปลี่ยนเป็น Phenoxyl Radical ซึ่ง Phenoxyl Radical สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ [15] ส่วนวิธี FRAP assay เป็นการทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระสังเคราะห์ เพื่อเป็นตัวแทนของอนุมูลที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการทำลาย

สารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ สารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP จะต้องสามารถรีดิวซ์อนุมูลอิสระได้ [16] จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 นี้ส่วนใหญ่มาจากสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และอาจจะเป็นสารกลุ่มอื่นที่นอกเหนือจากสารกลุ่มฟีนอลิก เช่น สารกลุ่มแทนนิน ไตรเทอร์พีน (Triterpene) ซึ่งมีรายงานการวิจัยทุกส่วนของพืชวงศ์ Combretaceae เช่น สมอไทย สมอเทศ จะพบสารกลุ่มแทนนิน ไตรเทอร์พีน และฟีนอลิกในปริมาณสูง และสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ [17] มีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากผลสมอไทยพบสาร Quinic acid, Chebulagic acid, Chebulinic acid, Ellagic acid และ Gallic acid [18] และสารสกัดจากใบสมอพิเภก พบสาร Ellagic acid, Gallic acid, Ursolic acid และ Beta-sitosterols ซึ่งสมุนไพรรสมอพิเภกเป็นสมุนไพรร้อยกว่าวงศ์ Combretaceae [19] ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับสมอไทย ส่วนสารสกัดจากผลและใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ด้วยวิธี ABTS assay และมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และ 70 โดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลิกมีหลากหลายชนิด ทั้งสารที่มีขั้วมีขั้วอ่อน ๆ และไม่มีขั้วบางส่วน จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากผลและใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากที่สุด และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay ได้ดีกว่าวิธี DPPH assay จึงอาจสรุปได้ว่าสารฟีนอลิกที่พบในสารสกัดจากผลและใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 นั้นส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มที่มีขั้วละลายในน้ำและแอลกอฮอล์ได้ดี เนื่องจากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และ 70 ซึ่งสารฟีนอลิกกลุ่มนี้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล ABTS^{•+} โดยอนุมูล ABTS^{•+} มักใช้กับสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถละลายน้ำได้ดีและตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง [15] โดยทั่วไปสารในกลุ่มฟีนอลิกมีโครงสร้างหลักประกอบด้วย Aromatic ring แทนที่ด้วย Hydroxy group กลไกของสารจำพวกสารประกอบฟีนอลิกที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคือ เมื่อมีอนุมูลอิสระมาดึงอิเล็กตรอนไป แต่ในโครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่น และสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน

ไปทั่วโครงสร้าง (Delocalization) ทำให้โครงสร้างเสถียร และสามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ดีโดยไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป [20] ปฏิกริยาถูกโซ่จึงสิ้นสุดลง และจากการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูง และสารฟลาโวนอยด์สูงส่งผลให้สารสกัดสมุนไพรนั้นมีแนวโน้มการต้านอนุมูลอิสระที่สูงด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารสกัดจากผลสมอไทย ซึ่งความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอาจมาจากสารกลุ่มฟีนอลและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น Kaempferol และ Quercetin ซึ่งจัดเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สำคัญ [21], [22] เนื่องจากโครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์มีหมู่แอลฟา-คีโต (Alpha-keto) หรือ 3-ไฮดรอกซี (3-Hydroxy) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับหมู่ไดไฮดรอกซีฟีนิล (Dihydroxyphenyl) ของ DOPA จึงทำให้จับคอปเปอร์ (Copper) ได้ [23]

5. บทสรุป

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม และสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากผลสมอไทย และใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95, 70 และ 50 พบว่า สารสกัดจากใบสมอไทย แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ดีกว่าสารสกัดจากผลสมอไทย และยังพบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ปริมาณสารฟีนอลิกรวม และสารฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าสารสกัดจากผลสมอไทย โดยสารสกัดของใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 แสดงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดด้วย ส่วนสารสกัดของใบสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 แสดงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ได้ดีที่สุด และพบปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากที่สุด ดังนั้นสารสกัดเอทานอลของใบสมอไทยจึงเป็นสารสกัดที่น่าสนใจเหมาะที่จะนำมาเป็นสมุนไพรทางเลือกในการใช้ประโยชน์ทางด้านเวชสำอาง เนื่องจากสมุนไพรสมอไทยเป็นสมุนไพรที่หาได้ง่ายพบได้ทั่วไปในภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

และควรมีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ สำคัญออกฤทธิ์ของสารสกัดใบสมอไทยเพิ่มเติม เพื่อการพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

7. References

- [1] Phansawan, B. 2014. Free radicals, antioxidants and antioxidant activity determination. **Thai Science and Technology Journal**. 21(3): 275-286. (in Thai)
- [2] Thaenkhom, A. and Padumanonda, T. 2019. The effectiveness and side effects of Ya Thor-Ra-Nee-San-Tha-Kat compared to naproxen tablets for the reduction of oxidative stress in patients with myofascial pain syndromes. **Huachiew Chalermprakiet Science and Technology Journal**. 5(1): 17-29. (in Thai)
- [3] Gupta, P.C. 2012. Biological and pharmacological properties of *Terminalia Chebula* Retz. (Haritaki) - An overview. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 4(3): 62-68.
- [4] Saenprakob, P. and Saengmanee, K. 2020. Development of facial cleansing anti-acne gel formulation using *Terminalia chebula* extract. **Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University**. 39(2): 87-100. (in Thai)
- [5] Buachoon, N. and et al. 2018. Antioxidant activity of crude extract from *Terminalia Chebula*. **VRU Research and Development Journal Science and Technology**. 13(2): 98-107. (in Thai)
- [6] Arya, A. 2012. Antioxidant and hypoglycemic activities of leaf extracts of three popular *Terminalia* Species. **E-Journal of Chemistry**. 9(2): 883-892.

- [7] Nittayajairom, W. and et al. 2014. Mutagenicity, antimutagenicity and tyrosinase inhibition activity of hydroglycol extracts from *Terminalia chebula* Retzius, *Terminalia bellerica* Roxb and *Rafflesia kerrii* Meijer. **International Journal of Phytomedicine**. 6 (1): 93-102.
- [8] Prompamorn, P. and Ratcharin, N. 2016. Evaluation of antibacterial activity and gel formulation development from *Terminalia chebula* Retz extract. **SDU Research Journal Science and Technology**. 9(1): 51-63. (in Thai)
- [9] Chewchinda, S., Kongkiatpaiboon, S. and Sithisarn, P. 2019. Evaluation of antioxidant activities total phenolic and total flavonoid contents of aqueous extracts of leaf, stem, and root of *Aerva lanata*. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences**. 18(3): 345-357.
- [10] Srisorn, P. and et al. 2020. Effect of frozen storage on quality of Chormuang dough contains pregelatinized Hom Nil flour. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**. 22(3): 92-102. (in Thai)
- [11] Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**. 239: 70-76.
- [12] Itsarasook, K. 2015. Free radical scavenging and tyrosinase inhibitory activity of Longkong leaves extract. **SDU Research Journal Science and Technology**. 8(3): 81-96. (in Thai)
- [13] Dunkhunthod, B. and Sittisart, P. 2022. Antioxidant activity and cytotoxicity against human cancer cell lines of the aqueous leaf extracts of *Smilax luzonensis*, *Hoya kerrii* and *Derris elliptica*. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**. 24(2): 1-11. (in Thai)
- [14] Sithisarn, P. and et al. 2015. Antioxidant activity and antibacterial effects on clinical isolated *Streptococcus suis* and *Staphylococcus intermedius* of extracts from several parts of *Cladogynos orientalis* and their phytochemical. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. (1-2): 908242.
- [15] Paduka, W. and et al. 2021. Determination of active constituents and antioxidant activity of *Premna trichostoma* Miq. leaf extract. **RMUTP Research Journal**. 15(2): 118-129. (in Thai)
- [16] Halee, A. and Rattanapun, B. 2017. Study of antioxidant efficacies of 15 local herbs. **KMUTT Research & Development Journal**. 40(2): 283-293. (in Thai)
- [17] Cock, I. 2015. The medicinal properties and phytochemistry of plants of the genus *Terminalia* (Combretaceae). **Inflammopharmacology**. 23: 203-229.
- [18] Singh, A. and et al. 2016. Comparative profiling of phenolic compounds from different plant parts of six *Terminalia* species by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with chemometric analysis. **Industrial Crops and Products**. 87: 236-246.
- [19] Rastogi, S. 2017. Phytochemical analysis, phenolic content and antioxidant properties of different parts of *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. - A comparative study. **Indian Journal of Traditional Knowledge**. 17(2): 370-375.
- [20] Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. 63: 1035-1042.
- [21] Kim, Y.J. and Uyama, H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic source: structure, inhibition mechanism and prospective for the future. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 62: 1707-1723.

- [22] Solano, F. and et al. 2006. Hypopigmenting agents: An updated review on biological, chemical and clinical aspects. **Pigment Cell Research**. 19: 550-571.
- [23] Ebanks, J.P., Wickett, R.R. and Boissy, R.E. 2009. Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration. **International Journal of Molecular Sciences**. 10(9): 4066-408.