JPAGS
Journal of Physics & General Science

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในมะม่วงหาวมะนาวโห่

Antioxidant Studies in Karanda (*Carissa carandas* Linn.)

ฮารีส มามะ นูรฮาพีซา อาตาลาฮา และปิยศิริ สุนทรนนท์ สินไชย*

Haris Mamat, Nurhafisa Atalaha and Piyasiri Soontornnon Sinchai*

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา จังหวัดยะลา

General Science Program, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University, Yala

*Corresponding author e-mail: piyasiri.s@yru.ac.th

(Received: October 16, 2019, Revised: November 23, 2019, Accepted: December 28, 2019)

บทคัดย่อ

สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน เช่น วิตามินซี วิตามินเอ ซึ่งมักพบในผักผลไม้ สำหรับการทำวิจัยนี้ได้ใช้ผลไม้พื้นบ้าน คือ มะม่วงหาวมะนาวโห่ (*Carissa carandas* Linn.) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาพบว่า สารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่มีปริมาณฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 31,282 ± 573.5 µg/ml โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายเควอเซติน (quercetin) สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ถูกรายงานด้วยค่า IC_{50} ซึ่งเท่ากับ 44.26 µg/ml เทียบกับสารมาตรฐาน butylated hydroxyanisole (BHA)

คำสำคัญ: มะม่วงหาวมะนาวโห่ ฟลาโวนอยด์ สารต้านอนุมูลอิสระ

Abstracts

Antioxidants that are currently interested in such as, vitamin A vitamin C, are often found in fruits and vegetables. The Karanda (*Carissa carandas* Linn.) was used in this research with the purpose of finding flavonoids and the antioxidant activity. The results revealed that the Karanda extracted contain the flavonoid, there were 31,282 ± 573.5 µg/ml, compared to the standard curve of the quercetin. Antioxidant activity was reported with IC_{50} that was 44.26 µg/ml compared with butylated hydroxyanisole (BHA) standard.

Keywords: Karanda, flavonoid, antioxidants

บทนำ

ปัจจุบันมนุษย์เราให้ความสนใจและเอาใจใส่เกี่ยวกับสุขภาพกันมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการรับประทาน อาหารของมนุษย์เราในปัจจุบันพบว่ามีความเสี่ยงต่อโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น การรับประทานอาหารประเภทเนื้อสัตว์เป็นประจำจะมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ หลอดเลือดแข็งตัวและมะเร็ง [1] ขณะที่ผู้รับประทานอาหารประเภทพืชและผักผลไม้เป็นประจำจะมีความเสี่ยงน้อยกว่า โดยพืชผักและผลไม้มีวิตามินและเกลือแร่ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สารต้านอนุมูลอิสระถือว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน [2]

มะม่วงหาวมะนาวโห่ (*Carissa carandas* L.) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Apocynaceae มีชื่อสามัญคือ Karanda, Carunda และ Christ's thorn หรือ ชื่อพื้นเมืองอื่น ๆ เช่น หนามแดง มะม่วงไม่รู้โห่ เป็นผลไม้โบราณพื้นเมืองชนิดหนึ่งที่สามารถเก็บเกี่ยวผลได้ตลอดทั้งปี แต่จะมีมากในช่วงประมาณเดือนพฤษภาคม–กรกฎาคม ดอกมีสีชมพูหรือแดงอ่อน และมีกลิ่นหอมอ่อน ๆ ออกดอกตลอดปี ผลอ่อนจะมีสีชมพูอ่อน ๆ และค่อย ๆ เข้มขึ้นเป็นสีแดง จนกระทั่งสุกจึงกลายเป็นสีดำ เมล็ดแบนมี

6 เมล็ด [3] ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในมะม่วงหาวมะนาวโห่ งานวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำวิจัยขึ้นเพื่อศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์และสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของมะม่วงหาวมะนาวโห่ เพื่อนำไปสู่การรู้คุณค่าและคุณประโยชน์ของพืชผักและผลไม้ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ และยังเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่ต้องการศึกษาเกี่ยวกับพืชชนิดนี้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่
2. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่

การดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่

ประยุกต์วิธีการของอรชร ไอสันเทียะ และกาญจนา วงศ์กระจ่าง [4] นำตัวอย่างสด 300 กรัม ปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด เติมเอทานอล 95 % ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 24 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง และนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 อีกครั้ง (ได้สารสกัดประมาณ 500 มิลลิลิตร) นำสารสกัดที่ได้ 200 มิลลิลิตร ไปสกัดด้วยตัวทำละลาย petroleum ether ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ในกรวยแยกสาร เขย่าเบา ๆ 3-5 นาที ระหว่างที่เขย่าให้เปิดวาล์วเพื่อปล่อยแก๊สที่เกิดขึ้น และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้น เกิดชั้น petroleum ether ประมาณ 200 มิลลิลิตร ไขชั้นล่างทิ้งและเก็บส่วนที่ใสไว้ (ส่วนของชั้นตัวทำละลาย petroleum ether) นำไประเหยแห้งแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 ºC ได้สารสกัดประมาณ 300 ไมโครลิตร

2. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์

ประยุกต์วิธีการของณัฐนนท์ อยู่สถิตย์ และชญาดา กลิ่นจันทร์ [5] นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 1 มาเจือจางที่ความเข้มข้น 1:2 และ 1:5 โดยใช้สารละลาย absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย นำสารสกัดที่เจือจางเรียบร้อยแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติม absolute ethanol 1 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร และ 5 % sodium nitrite 0.3 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ 5 นาที เติม 10 % aluminium chloride 0.3 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 6 นาที เติม 4 % sodium hydroxide 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.3 มิลลิลิตรให้ถึง 10 มิลลิลิตร และวางทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ซึ่งได้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เทียบกับหลอดแบลงค์ (blank) สำหรับหลอดแบงค์นั้น มีไว้เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลง ซึ่งใช้ absolute ethanol แทนสารสกัดเพื่อหาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดโดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานซึ่งเตรียมจากสารละลายเควอซีติน โดยวิธีการเจือจางแบบอนุกรม (serial dilution) จากความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125 และ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ดัดแปลงจาก [6])

1) วิธี DPPH radical scavenging activity

เตรียมสารละลายมาตรฐาน DPPH 0.125 mM โดยชั่งสารมาตรฐาน DPPH หนัก 0.005 กรัม ละลายด้วยเมทานอลในบีกเกอร์ คนให้สารละลายจนหมดแล้วเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml ปรับปริมาตรให้พอดีด้วยเมทานอล จึงได้ methanolic DPPH radical จากนั้น เตรียมสารละลายมาตรฐาน butylated hydroxyanisole (BHA) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย โดยแบ่งความเข้มข้นเป็นห้าระดับ แล้วเตรียมสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่

2) วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง UV

เติมสารละลาย methanolic DPPH radical ลงในเซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง (cuvette) ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร จากนั้น เติมสารลายมาตรฐานหรือสารสกัดตัวอย่างที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด โดยกำหนดเวลาในการวัดค่าดูดกลืนแสงเป็น 5, 10, 20, 30 และ 60 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 517 nm ซึ่งได้ทำการทดลอง 3 ครั้ง โดยใส่เมทานอลในหลอดแบลงค์ หลังจากนั้น คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และแสดงด้วยค่าของความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % (inhibitory concentration) หรือ IC_{50} โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHA

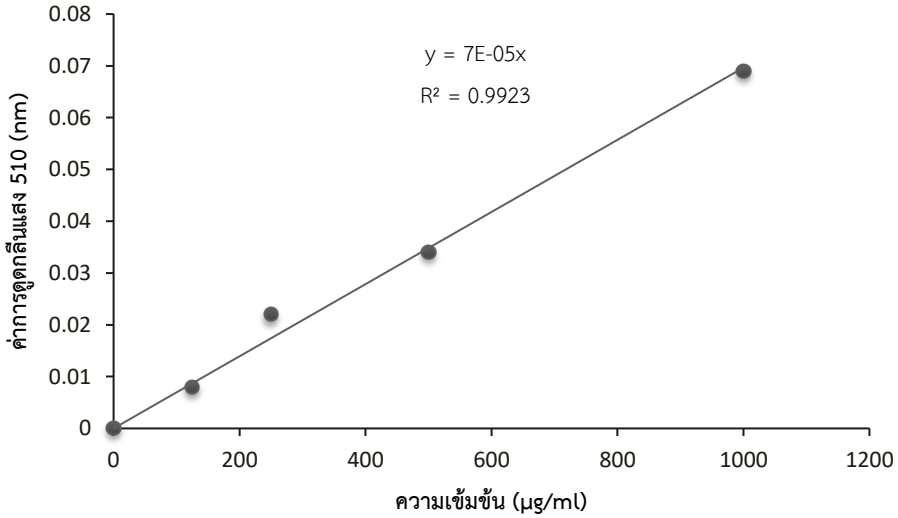
ผลการวิจัย

1. ปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัด

จากผลการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายเควอเซติน พบว่าในสารสกัดมีปริมาณฟลาโวนอยด์ 31,282 ± 573.5 µg/ml ซึ่งปริมาณที่ได้มาจากการคำนวณจากสมการของกราฟมาตรฐานของสารละลายเควอเซติน ดังภาพที่ 1 โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ของสารมาตรฐานเควอเซตินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ดูตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเควอเซตินความเข้มข้นต่าง ๆ

เควอเซติน (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm
0	0
125	0.008
250	0.022
500	0.034
1000	0.069



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานเควอเซตินที่ความเข้มข้นต่างกัน

2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ด้วยวิธี DPPH assay ซึ่งใช้ฟลาโวนอยด์ในการทดสอบ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm เปรียบเทียบกับ BHA ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่าสารมาตรฐาน BHA มีค่า IC_{50} เท่ากับ 33.27 µg/ml แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัด

จากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ที่มีค่า IC50 เท่ากับ 44.26 µg/ml ซึ่งได้จากสมการของกราฟมาตรฐาน BHA โดยใช้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเทียบกับสารมาตรฐาน โดยได้แสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่จากกราฟมาตรฐานเควอเซติน ดังตารางที่ 2 และได้แสดง BHA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่จากกราฟมาตรฐานเควอเซติน

ความเข้มข้น (µg/ml)	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	ค่าเฉลี่ย	S.D.
1: 5	30710	32210	30925	31282	±573.5

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารมาตรฐาน BHA ที่ความเข้มข้นต่างกัน

ตัวอย่าง (µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	สมการ	IC_{50} (µg /ml)
31.25	14.53	y = 28.469ln(x) - 49.775	33.27
62.5	17.00		
125	21.20		
250	69.77		
500	86.81		

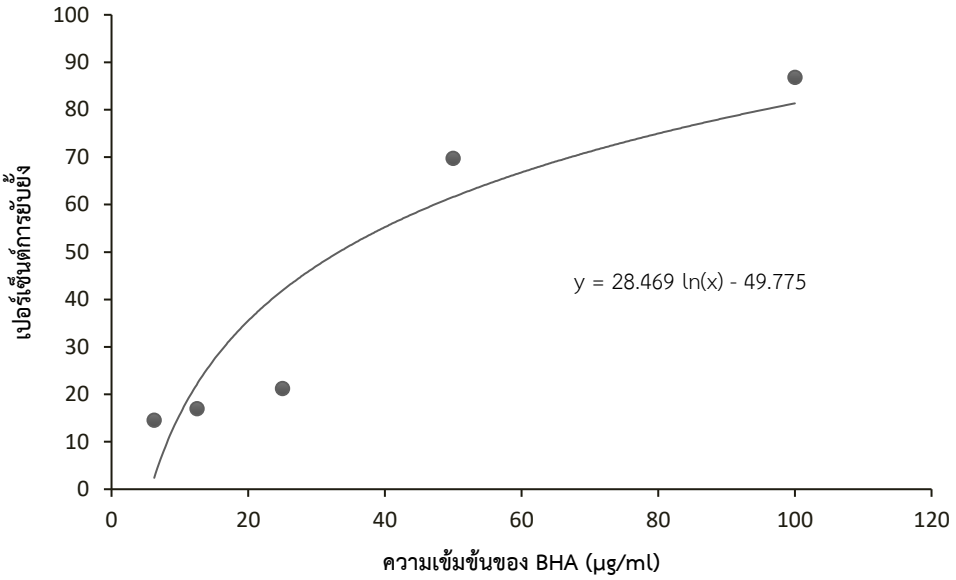
สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาหาปริมาณฟลาโวนอยด์ พบว่าในสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่มีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 31,282 ± 573.5 µg/ml และจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ เมื่อนำสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่มาศึกษาความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 44.26 µg/ml เมื่อนำมาเทียบกับสารมาตรฐาน BHA ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 33.27 µg/ml ถือว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์จากกราฟมาตรฐานเควอเซติน พบว่าฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่มีค่า 31,282 ± 573.5 µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของณพัฐอร บัวฉุน [3] ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกของเมล็ดและเนื้อมะม่วงไม่รู้โห่ และได้พบว่าในสารสกัดมีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบหลัก และจากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ พบว่าสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} เท่ากับ 44.26 µg/ml ซึ่งมีใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน BHA ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 33.27 µg/ml สารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ใกล้เคียงกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ จากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟลาโวนอยด์กับความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์สูง

ซึ่งฟลาโวนอยด์เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในมะม่วงหาวมะนาวโห่ นอกจากนั้น ได้แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไว้ในตารางที่ 4 และภาพที่ 3



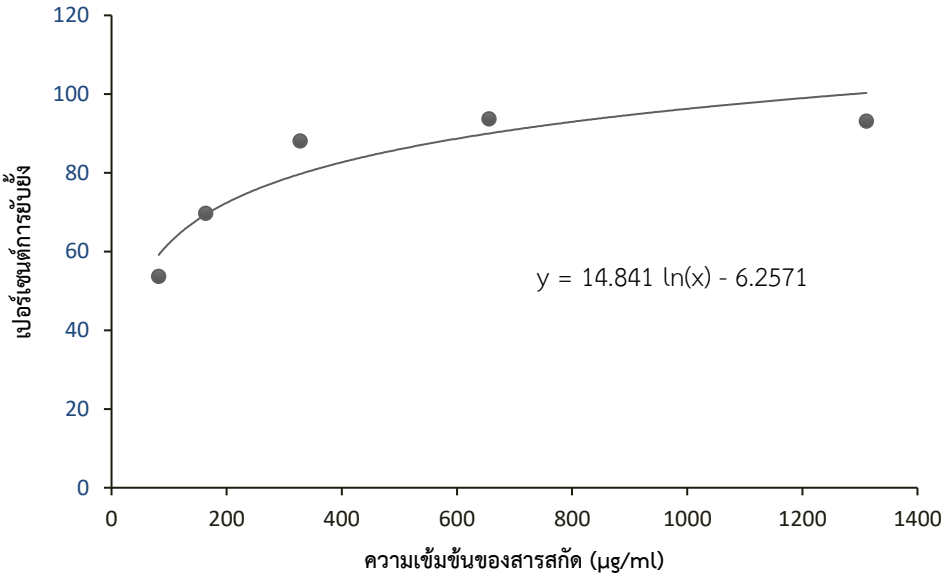
ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐาน BHA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ความเข้มข้นต่างกัน

ตัวอย่าง (µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	สมการ	IC_{50} (µg/ml)
31.25	53.74		
62.5	69.75		
125	88.12	y = 14.841 ln(x) - 6.2517	44.26
250	93.76		
500	93.17		

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาหาปริมาณฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ควรมีการเปรียบเทียบระหว่างผลสีแดงและผลสุกที่เป็นสีม่วง ในการวิจัยวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาหาปริมาณฟลาโวนอยด์ และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่เท่านั้น ผู้ที่สนใจควรศึกษาเกี่ยวกับผลไม้อื่น ๆ ในตระกูลเดียวกันเพิ่มเติมเพื่อเป็นข้อมูลในการต่อยอดงานวิจัยต่อไป



ภาพที่ 3 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

การนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำไปทำการวิจัยต่อยอดเพื่อนำไปผลิตยาสมุนไพรต่อไป

เอกสารอ้างอิง

[1] บุหรัน พันธุ์สวรรค์, "อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ," *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, ปีที่ 21, ฉ. 3, น. 275-286, 2556.

[2] พรพิมล บัวชุม, รัตติกาล วงศ์ศิริ และอรสา อินทร์น้อย, (2562, 21 มิถุนายน), การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักพื้นบ้านและผักทั่วไป, [ออนไลน์]. จาก: http://nestc.sci.ubu.ac.th/2015/upload/Poster/N2015313.pdf

[3] ณพัฐอร บัวฉุน, "ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกของเมล็ดและเนื้อมะม่วงไม่รู้โห่," *วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์*, ปีที่ 13, ฉ. 2, น. 55, 2561.

[4] อรชร ไอสันเทียะ และกาญจนา วงศ์กระจ่าง, "การศึกษาระบบตัวทำละลายของการสกัดสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดจากดอกดาวเรืองสด," *วารสารวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์*, ปีที่ 7, ฉ. 7, น. 29-40, 2558.

[5] ณัฐนนท์ อยู่สถิตย์ และชญาดา กลิ่นจันทร์, "การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในใบสะระแหน่ ใบทับทิม และใบว่านแร้งคอดำ เพื่อแปรรูปเป็นชาสมุนไพร," ใน *รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ครั้งที่ 3*, กำแพงเพชร, 2559, น. 322–338.

[6] บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ, "ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน," โครงการพิเศษปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ, 2549.