Agricultural Sci. J. 46 : 3/1 (Suppl.) : 79-83 (2015) ว. วิทย. กษ. 46 : 3/1 (พิเศษ) : 79-83 (2558)

ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดหยาบเอธานอลจากมะขามป้อมหลังการเก็บรักษาด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน

Free Radical Scavenging Capacity, Ascorbic Acid Content and Total Phenol Content in Ethanolic Extract of Indian Gooseberry Fruit after Storage in Different Conditions

มณีรัตน์ มีพลอย[1] นลินาสน์ จิตร์พรหม[1] ขนิษฐา ชวนะนรเศรษฐ์[1] ปนิดา บรรจงสินศิริ[1] ชลธิชา นิวาสประกฤติ[1] เนาวพันธ์ หนูจุ้ย[1] และไมตรี มัณยานนท์[1]

Maneerat Meeploy[1], Nalinas Jitprom[1], Khanittha Chawananorasest[1], Panida Banjongsinsiri[1], Choticha Niwaspragrit[1], Nowwapan Noojuy[1] and Maitree Munyanont[1]

Abstract

The free radical scavenging capacity, ascorbic acid content and total phenol content of the ethanolic extracts of five clones of Indian gooseberry fruits of five clones namely LTK3, KR1, KR2, KR3 and KR4, were evaluated every 2 weeks after storage under different conditions, including storage of fresh fruit at 4°C and preservation of fruits in 10% and 15% (w/v) sodium chloride solutions at 4°C for 12 weeks. It was found that KR4 had significantly lower free radical scavenging capacity than other clones, while storage conditions and storage duration had no significant effect on free radical scavenging capacity. The ascorbic acid contents in the extracts of all Indian gooseberry fresh fruits (week 0) were 14.1 - 24.7 mg/g extract and significantly decreased in week 2 (2.6 – 19.6 mg/g extract). The significant decrease in the ascorbic acid contents were also observed when Indian gooseberry fruits were preserved in 10% and 15% (w/v) sodium chloride solutions (week 0) (0.4 – 1.1 mg/g extract). Besides, clones of Indian gooseberry had significant effect on the total phenol content of extract. Among five clones, KR4 had the lowest total phenol content correlated with free radical scavenging capacity. No significant differences in the total phenol contents were observed for 12 weeks of storage and storage conditions.

Keywords: ethanolic extract of Indian gooseberry fruit, storage, ascorbic acid content

บทคัดย่อ

การศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดหยาบเอธานอลจากมะขามป้อม 5 สายต้น ได้แก่ LTK3 KR1 KR2 KR3 และ KR4 หลังจากเก็บรักษาด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ การเก็บรักษาผลสดที่อุณหภูมิ 4°C การดองในน้ำเกลือที่ความเข้มข้น 10% และ 15% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาสกัดด้วยเอธานอลทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าสารสกัดจากสายต้น KR4 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระน้อยกว่าสายต้น LTK3 KR1 KR2 และ KR3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่วิธีการเก็บรักษาและระยะเวลาการเก็บรักษาไม่มีผลต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัด ปริมาณกรดแอสคอร์บิกของสารสกัดจากมะขามป้อมสดในสัปดาห์ที่ 0 ทั้ง 5 สายต้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งอยู่ในช่วง 14.1 - 24.7 มิลลิกรัมต่อสารสกัด 1 กรัม และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 2 โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 2.6 – 19.6 มิลลิกรัมต่อสารสกัด 1 กรัม และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเก็บรักษาด้วยวิธีการดองในน้ำเกลือที่ความเข้มข้น 10% และ 15% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสัปดาห์ที่ 0 ซึ่งอยู่ในช่วง 0.4 – 1.1 มิลลิกรัมต่อสารสกัด 1 กรัม นอกจากนี้พบว่าสายต้นมะขามป้อมมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดจากสายต้น KR4 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดน้อยที่สุด ซึ่งมีความสอดคล้องกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ในขณะที่วิธีการเก็บรักษาและระยะเวลาการเก็บรักษาไม่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัด

คำสำคัญ: สารสกัดหยาบเอธานอลจากมะขามป้อม การเก็บรักษา ปริมาณกรดแอสคอร์บิก

[1] สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) 35 หมู่ 3 เทคโนธานี ต.คลองห้า อ. คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

[1] Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) 35 Mu 3, Tambon Khlong Ha, Amphoe Khlong Luang, Changwat Pathum Thani 12120

คำนำ

มะขามป้อม หรือ Indian gooseberry ชาวฮินดูเรียกว่า อะมะลา (amla) หรือ อะมะลากิ (amalaki) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Phyllanthus emblica* Linn. จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เป็นไม้ยืนต้นชนิดหนึ่งที่มีสรรพคุณทางยา คนจีนและอินเดียใช้เป็นยามานานนับพันปี จากงานวิจัยเกี่ยวกับมะขามป้อมตลอดหลายสิบปีที่ผ่านมาทำให้ทราบกันดีว่าผลมะขามป้อมสดประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (antiradical agents) หลายชนิด ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แทนนิน (tannins) ซึ่งจัดเป็นสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) ประเภทพอลิฟีนอล (polyphenol) รวมทั้งวิตามินซี อยู่ในปริมาณมาก

การสกัดสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) จากพืช เป็นขั้นตอนแรกของการเตรียมสารพฤกษเคมี (phytochemicals) โภชนเภสัช (nutraceuticals) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (dietary supplements) ส่วนผสมของอาหาร (food ingredients) ยา (pharmaceuticals) และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (cosmetic products) ในการสกัดสารประกอบฟีนอลสามารถสกัดได้ทั้งจากตัวอย่างสด ตัวอย่างแช่แข็งหรือตัวอย่างที่อบแห้งแล้ว โดยทั่วไปในการสกัดสารสำคัญจากพืชมักจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์สกัด เนื่องจากง่ายต่อการนำไปใช้ มีประสิทธิภาพการสกัดดี และสามารถนำสารสกัดที่ได้ไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมนำมาสกัดสารประกอบฟีนอล ได้แก่ เมธานอล เอธานอล อะซิโตน เอธิลอะซิเตด และตัวทำละลายที่เป็นส่วนผสมของตัวทำลายอินทรีย์กับน้ำในอัตราส่วนต่างๆ สำหรับเอธานอลนั้นจัดเป็นตัวทำละลายที่ดีชนิดหนึ่งที่ใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลและมีความปลอดภัยต่อมนุษย์ งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ปริมาณกรดแอสคอร์บิก และปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดหยาบเอธานอลจากมะขามป้อมหลังจากทำการเก็บรักษาผลมะขามด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน ว่ามีความสัมพันธ์ต่อกันอย่างไร และเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

นำผลมะขามป้อมสด 5 สายต้น ได้แก่ LTK3 KR1 KR2 KR3 และ KR4 ซึ่งเก็บมาจากสถานีวิจัยลำตะคอง (สพล.) มาล้างทำความสะอาด นำมาเก็บรักษาด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ เก็บรักษาผลสดที่อุณหภูมิ 4°C ดองในน้ำเกลือความเข้มข้น 10% และ 15% (w/v) ที่มีกรดซิตริกเข้มข้น 0.5% (w/v) และโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์เข้มข้น 500 ppm ที่อุณหภูมิ 4°C สุ่มเก็บตัวอย่างแต่ละสายต้นออกมาเตรียมสารสกัดหยาบเอธานอลเมื่อครบกำหนดเวลาในสัปดาห์ที่ 0 2 4 6 8 10 และ 12 โดยการแกะเนื้อออกจากเมล็ด อบเนื้อมะขามป้อมที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 21 ชั่วโมง นำมาบดละเอียด และสกัดด้วยเอธานอล 99.9% ในอัตราส่วนเนื้อมะขามป้อมแห้งบดละเอียดต่อเอธานอล 3 : 1 (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน ระเหยเอธานอลด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน นำสารสกัดหยาบเอธานอลจากมะขามป้อมที่ได้มาทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ตามวิธีของ Yamazaki *et al.* (1994) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Slinkard and Singleton (1977) และวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกด้วยเทคนิค RP-HPLC ตามวิธีที่ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Ullah *et al*. (2012) และ Brause *et al*. (2003) โดยใช้คอลัมน์ C18 (VertiSep™ GES C18 HPLC column, 250 mm x 4.6 mm I.D., 5 um, Vertical®) ในการแยกสาร ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด photodiode array ขนาด sample loop ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และระบบตัวทำละลาย (solvent system) ในการชะประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ KH_2PO_4 - H_3PO_4, pH 3.0 ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ต่อเมธานอล ในอัตราส่วน 80 : 20 โดยปริมาตร กำหนดการชะแบบ isocratic ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ L-ascorbic acid (99%) เป็นสารมาตรฐาน ตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

ผล

ผลการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และปริมาณกรดแอสคอร์บิกของสารสกัดหยาบเอธานอลจากมะขามป้อม 5 สายต้น ได้แก่ LTK3 KR1 KR2 KR3 และ KR4 หลังการเก็บรักษามะขามป้อมด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน ได้แก่ การเก็บรักษาผลสดที่อุณหภูมิ 4°C การดองในน้ำเกลือที่ความเข้มข้น 10% และ 15% (w/v) แสดงดังตารางที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ

Table 1 DPPH radical scavenging activity of ethanolic extract of Indian gooseberry fruit after storage of fresh fruit at 4°C or preservation of fruit in 10% (w/v) or 15% (w/v) sodium chloride solution at 4°C during 12 weeks. (n=3)

Clone	Storage condition	DPPH radical scavenging activity (EC_{50}, µg/ml)*						
		Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
LTK3	4°C	1.58±0.08^{2aA}	1.88±0.13^{1aA}	1.72±0.09^{2aA}	nd**	2.40±0.58^{2aA}	nd	4.14±0.41^{1A}
	10% NaCl	1.55±0.22^{2aA}	1.14±0.19^{1aA}	1.82±0.09^{2aA}	1.31±0.10^{2aA}	2.83±0.11^{2aA}	1.93±0.12^{1aA}	nd
	15% NaCl	1.32±0.04^{2aA}	1.55±0.04^{1aA}	1.64±0.17^{2aA}	1.59±0.10^{2aA}	3.29±0.38^{2aA}	2.10±0.07^{1aA}	nd
KR1	4°C	1.82±0.13^{2aA}	1.70±0.07^{1aA}	1.36±0.27^{2aA}	nd	1.54±0.50^{2aA}	nd	1.61±0.04^{1A}
	10% NaCl	5.85±0.27^{2aA}	1.79±0.09^{1aA}	1.79±0.08^{2aA}	2.23±0.25^{2aA}	2.39±0.40^{2aA}	2.25±0.05^{1aA}	nd
	15% NaCl	2.38±0.09^{2aA}	1.68±0.06^{1aA}	2.38±0.31^{2aA}	1.78±0.11^{2aA}	2.11±0.11^{2aA}	2.16±0.08^{1aA}	nd
KR2	4°C	1.61±0.07^{2aA}	2.02±0.39^{1aA}	1.75±0.09^{2aA}	nd	2.35±0.12^{2aA}	nd	2.18±0.21^{1A}
	10% NaCl	3.63±0.51^{2aA}	2.48±0.16^{1aA}	2.04±0.06^{2aA}	1.95±0.09^{2aA}	2.04±0.06^{2aA}	3.00±0.18^{1aA}	nd
	15% NaCl	2.80±0.32^{2aA}	1.54±0.05^{1aA}	1.79±0.54^{2aA}	2.03±0.23^{2aA}	1.98±0.23^{2aA}	2.40±0.07^{1aA}	nd
KR3	4°C	1.96±0.05^{2aA}	1.82±0.03^{1aA}	1.50±0.24^{2aA}	nd	1.87±0.12^{2aA}	nd	1.59±0.03^{1A}
	10% NaCl	2.18±0.04^{2aA}	3.24±0.18^{1aA}	1.57±0.29^{2aA}	1.88±0.05^{2aA}	1.75±0.01^{2aA}	2.17±0.10^{1aA}	nd
	15% NaCl	1.81±0.12^{1aA}	2.29±0.10^{1aA}	2.20±0.12^{2aA}	2.20±0.10^{2aA}	2.20±0.12^{2aA}	2.73±0.16^{1aA}	nd
KR4	4°C	4.77±0.40^{1aA}	1.78±009^{1aA}	5.41±0.48^{1aA}	nd	4.44±0.16^{1aA}	nd	3.20±0.21^{1A}
	10% NaCl	7.41±0.30^{1aA}	2.57±0.17^{1aA}	5.42±0.70^{1aA}	4.85±0.30^{1aA}	3.78±0.13^{1aA}	2.10±0.07^{1aA}	nd
	15% NaCl	7.20±0.59^{1aA}	4.91±0.29^{1aA}	5.68±1.30^{1aA}	5.85±0.48^{1aA}	5.39±0.29^{1aA}	4.42±0.04^{1aA}	nd

Table 2 Total phenol content of ethanolic extract of Indian gooseberry fruit after storage of fresh fruit at 4°C or preservation of fruit in 10% (w/v) or 15% (w/v) sodium chloride solution at 4°C during 12 weeks. (n=5)

Clone	Storage condition	Total phenol content (mg GAE/mg ethanolic extract of Indian gooseberry fruit)*						
		Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
LTK3	4°C	0.25±0.01^{1aA}	0.24±0.01^{1aA}	0.25±0.01^{1aA}	nd**	0.20±0.01^{1aA}	nd	0.20±0.00^{1A}
	10% NaCl	0.23±0.01^{1aA}	0.19±0.00^{1aA}	0.22±0.00^{1aA}	0.22±0.01^{1aA}	0.24±0.01^{1aA}	0.21±0.01^{1aA}	nd
	15% NaCl	0.21±0.01^{1aA}	0.21±0.01^{1aA}	0.23±0.00^{1aA}	0.21±0.01^{1aA}	0.23±0.01^{1aA}	0.20±0.01^{1aA}	nd
KR1	4°C	0.22±0.01^{1aA}	0.20±0.01^{1aA}	0.20±0.01^{1aA}	nd	0.13±0.00^{2aA}	nd	0.06±0.00^{1A}
	10% NaCl	0.09±0.01^{1aA}	0.17±0.01^{1aA}	0.20±0.01^{1aA}	0.20±0.00^{1aA}	0.18±0.00^{2aA}	0.20±0.01^{1aA}	nd
	15% NaCl	0.19±0.01^{1aA}	0.18±0.01^{1aA}	0.18±0.00^{1aA}	0.13±0.00^{1aA}	0.20±0.01^{2aA}	0.18±0.01^{1aA}	nd
KR2	4°C	0.22±0.01^{1aA}	0.24±0.02^{1aA}	0.24±0.00^{1aA}	nd	0.22±0.01^{12aA}	nd	0.17±0.00^{1A}
	10% NaCl	0.18±0.01^{1aA}	0.14±0.01^{1aA}	0.21±0.00^{1aA}	0.17±0.01^{1aA}	0.18±0.01^{12aA}	0.18±0.01^{1aA}	nd
	15% NaCl	0.15±0.01^{1aA}	0.17±0.00^{1aA}	0.18±0.01^{1aA}	0.19±0.01^{1aA}	0.18±0.00^{12aA}	0.18±0.00^{1aA}	nd
KR3	4°C	0.23±0.01^{1aA}	0.25±0.01^{1aA}	0.25±0.01^{1aA}	nd	0.19±0.00^{12aA}	nd	0.16±0.00^{1A}
	10% NaCl	0.18±0.01^{1aA}	0.16±0.01^{1aA}	0.21±0.01^{1aA}	0.19±0.01^{1aA}	0.21±0.00^{12aA}	0.22±0.00^{1aA}	nd
	15% NaCl	0.19±0.01^{1aA}	0.18±0.01^{1aA}	0.18±0.01^{1aA}	0.18±0.01^{1aA}	0.17±0.01^{12aA}	0.18±0.00^{1aA}	nd
KR4	4°C	0.12±0.01^{2aA}	0.12±0.00^{2aA}	0.08±0.00^{2aA}	nd	0.07±0.00^{3aA}	nd	0.04±0.00^{1A}
	10% NaCl	0.08±0.01^{2aA}	0.08±0.01^{2aA}	0.09±0.00^{2aA}	0.09±0.01^{2aA}	0.10±0.00^{3aA}	0.09±0.00^{2aA}	nd
	15% NaCl	0.08±0.01^{2aA}	0.08±0.01^{2aA}	0.09±0.00^{2aA}	0.09±0.00^{2aA}	0.08±0.00^{3aA}	0.09±0.00^{2aA}	nd

* Each value is expressed as the mean ± S.D.

** nd means not done.

Means within each row followed by the same uppercase letter are not significantly different ($P > 0.05$) from each other (storage duration). Means within each column followed by the same figure are not significantly different ($P > 0.05$) from each other (clone). Means within each column followed by the same lowercase letter are not significantly different ($P > 0.05$) from each other (storage condition).

Table 3 Ascorbic content of ethanolic extract of Indian gooseberry fruit after storage of fresh fruit at 4°C or preservation of fruit in 10% (w/v) or 15% (w/v) sodium chloride solution at 4°C during 12 weeks. (n=3)

Clone	Storage condition	Ascorbic acid content (mg/g ethanolic extract of Indian gooseberry fruit)*						
		Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
LTK3	4°C	23.61±0.32^{1aA}	7.03±0.171^{1aB}	0.96±0.00^{1aBC}	nd**	0.69±0.01^{12aC}	nd	2.21±0.22^{1C}
	10% NaCl	0.85±0.02^{1bA}	0.58±0.01^{1bA}	0.42±0.01^{1aA}	0.65±0.01^{12aA}	1.51±0.05^{12aA}	0.99±0.04^{1aA}	nd
	15% NaCl	0.61±0.03^{1bA}	0.66±0.02^{1bA}	0.47±0.00^{1aA}	0.75±0.05^{12aA}	0.77±0.00^{12aA}	0.85±0.03^{1aA}	nd
KR1	4°C	14.11±0.44^{1aA}	2.58±0.17^{1aB}	2.75±0.13^{1aBC}	nd	0.57±0.01^{12aC}	nd	0.21±0.01^{1C}
	10% NaCl	1.12±0.07^{1bA}	0.82±0.04^{1bA}	1.71±0.04^{1aA}	0.64±0.03^{1aA}	0.52±0.00^{12aA}	0.85±0.01^{1aA}	nd
	15% NaCl	1.12±0.03^{1bA}	1.12±0.03^{1bA}	1.03±0.04^{1aA}	1.26±0.04^{1aA}	0.67±0.02^{12aA}	0.94±0.01^{1aA}	nd
KR2	4°C	24.07±0.75^{1aA}	19.62±0.68^{1aB}	12.41±0.83^{1aBC}	nd	1.33±0.11^{1aC}	nd	2.29±0.12^{1C}
	10% NaCl	0.53±0.014^{1bA}	1.31±0.03^{1bA}	0.82±0.03^{1aA}	0.90±0.04^{12aA}	1.41±0.12^{1aA}	0.57±0.01^{12aA}	nd
	15% NaCl	0.63±0.03^{1bA}	0.87±0.01^{1bA}	0.68±0.02^{1aA}	0.83±0.01^{12aA}	0.65±0.01^{1aA}	0.64±0.00^{12aA}	nd
KR3	4°C	24.66±0.10^{1aA}	7.23±0.30^{1aB}	2.12±0.13^{1aBC}	nd	1.42±0.04^{12aC}	nd	0.76±0.01^{1C}
	10% NaCl	0.59±0.02^{1bA}	0.66±0.01^{1bA}	1.86±0.08^{1aA}	0.87±0.01^{12aA}	0.77±0.02^{12aA}	0.95±0.02^{12aA}	nd
	15% NaCl	0.73±0.00^{1bA}	1.35±0.00^{1bA}	0.65±0.05^{1aA}	0.84±0.01^{12aA}	0.58±0.04^{12aA}	0.54±0.03^{12aA}	nd
KR4	4°C	23.47±0.30^{1aA}	8.11±0.08^{1aB}	0.40±0.15^{1aBC}	nd	0.36±0.01^{2aC}	nd	0.22±0.01^{1C}
	10% NaCl	0.42±0.02^{1bA}	0.43±0.01^{1bA}	0.41±0.01^{1aA}	0.40±0.02^{2aA}	0.47±0.00^{2aA}	0.44±0.02^{2aA}	nd
	15% NaCl	0.69±0.04^{1bA}	0.30±0.01^{1bA}	0.42±0.03^{1aA}	0.43±0.03^{2aA}	0.36±0.01^{2aA}	0.43±0.01^{2aA}	nd

* Each value is expressed as the mean ± S.D.

** nd means not done.

Means within each row followed by the same uppercase letter are not significantly different ($P > 0.05$) from each other (storage duration). Means within each column followed by the same figure are not significantly different ($P > 0.05$) from each other (clone). Means within each column followed by the same lowercase letter are not significantly different ($P > 0.05$) from each other (storage condition).

วิจารณ์ผล

จากผลการทดลองจะเห็นว่าสารสกัดหยาบเอธานอลจากมะขามป้อมทุกตัวอย่างมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ดีมาก ซึ่งมีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 1.14 – 7.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.04 – 0.25 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม โดยที่วิธีการเก็บรักษาและระยะเวลาการเก็บรักษาไม่มีผลต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่เมื่อเก็บผลสดที่อุณหภูมิ 4°C ในสัปดาห์ที่ 2 กรดแอสคอร์บิกลดลงมากที่สุดถึง 82% และเมื่อเก็บรักษาด้วยวิธีการดองเกลือ ในสัปดาห์ที่ 0 กรดแอสคอร์บิกลดลงมากที่สุดถึง 98% จึงเป็นไปได้ว่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระเกิดจากฤทธิ์ของสารประกอบฟีนอลเป็นสำคัญ มากกว่าที่จะเกิดจากฤทธิ์ของกรดแอสคอร์บิก

จากหลักการของวิธี DPPH assay เมื่ออนุมูลอิสระ diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) ที่มีความเสถียรสูง ซึ่งให้สีม่วงเข้มในสารละลายเมธานอลหรือเอธานอล ถูกรีดิวซ์ด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ได้แก่ สารประกอบฟีนอล) ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ DPPH ทำให้อนุมูลอิสระ DPPH เปลี่ยนมาอยู่ในรูปของ reduced form คือ diphenylpicrylhydrazine (nonradical) ซึ่งให้สีเหลืองจางในสารละลายเมธานอลหรือเอธานอล Luqman and Kumar (2012) ได้รายงานว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดหยาบเอธานอลและน้ำจากมะขามป้อมมีความสัมพันธ์อย่างมากกับ reducing power (0.86, 0.91) และ DPPH (0.91, 0.94) โดยพบสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดหยาบเอธานอลและน้ำปริมาณเท่ากับ 318 ± 45.25 และ 336 ± 33.94 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม ตามลำดับ

นอกจากนี้จากการทดลองพบว่ากรดแอสคอร์บิกในมะขามป้อมสามารถต้านทานปฏิกิริยาออกซิเดชัน และความร้อนได้ค่อนข้างดี เนื่องด้วยยังพบว่ามีกรดแอสคอร์บิกเหลืออยู่ในสารสกัด โดยเฉพาะในสารสกัดที่ได้จากการเก็บรักษาผลสดที่อุณหภูมิ 4°C ในสัปดาห์ที่ 0 ถึงแม้ว่าจะผ่านขั้นตอนของการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C การสกัด และการระเหยเอธานอลออกจากสารสกัดที่อุณหภูมิ 40°C มาแล้วก็ตาม ซึ่งมีความสอดคล้องกับการทดลองของ Damodaran and Nari (1936) ที่ได้อธิบายไว้ว่าน้ำคั้นจากมะขามป้อมสดที่ไม่ได้เจือจางมีความต้านทานต่อการถูกออกซิไดซ์จากออกซิเจนในอากาศสูงมาก

ซึ่งแตกต่างจากน้ำคั้นจากพืชส่วนใหญ่ที่กรดแอสคอร์บิกสลายตัวอย่างรวดเร็วเมื่อตั้งทิ้งไว้ และยังพบว่ามีกรดแอสคอร์บิกเหลืออยู่ค่อนข้างมากแม้ว่าจะผ่านการทำแห้งแล้วก็ตาม โดยปัจจัยที่ป้องกันการถูกออกซิไดซ์น่าจะเกิดจากสารกลุ่มแทนนินซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลที่มีอยู่มากในมะขามป้อม และเมื่อปี 2009 Majeed *et al.* (2009) สามารถวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอร์บิกในสารสกัดมะขามป้อมซึ่งมีอยู่น้อยมากได้ด้วยเทคนิค HPLC และพบว่าสารประกอบที่ถูกชะออกมาพร้อมกับกรดแอสคอร์บิกคือ mucic acid gallates ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลที่สำคัญที่ออกฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน และมีความเห็นว่าการสังเคราะห์ mucic acid lactone และกรดแอสคอร์บิกในผลมะขามป้อมน่าจะมีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กัน

สรุป

สายต้นมะขามป้อมมีผลต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดหยาบเอธานอลจากมะขามป้อม โดยที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดมีความสอดคล้องกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ในขณะที่วิธีการเก็บรักษาและระยะเวลาการเก็บรักษาไม่มีผลต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับปริมาณกรดแอสคอร์บิกของสารสกัดหยาบเอธานอลจากมะขามป้อมสดในสัปดาห์ที่ 0 ทั้ง 5 สายต้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และมีปริมาณลดลงมากที่สุดถึง 82% ในสัปดาห์ที่ 2 และเมื่อเก็บรักษาด้วยวิธีการดองในน้ำเกลือที่ความเข้มข้น 10% และ 15% (w/v) ในสัปดาห์ที่ 0 ปริมาณกรดแอสคอร์บิกลดลงมากที่สุดถึง 98% จึงเป็นไปได้ว่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระเกิดจากฤทธิ์ของสารประกอบฟีนอลเป็นสำคัญมากกว่าที่จะเกิดจากฤทธิ์ของกรดแอสคอร์บิก นอกจากนี้สารกลุ่มแทนนินซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลน่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยต้านทานหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดแอสคอร์บิก เนื่องด้วยยังพบว่ามีกรดแอสคอร์บิกเหลืออยู่ในสารสกัด

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) สำหรับทุนสนับสนุนการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Brause, R. A., D. C. Woollard and H. E. Indyk. 2003. Determination of total vitamin C in fruit juices and related products by liquid chromatography: Interlaboratory study. Journal of AOAC International 86(2): 367-374.

Damodaran, M. and K. R. Nair. 1936. A tannin from the Indian gooseberry (*Phyllanthus emblica*) with a protective action on ascorbic acid. Biochemical Journal 30(6): 1014-1020.

Luqman, S. and R. Kumar. 2012. Correlation between scavenging property and antioxidant activity in the extracts *of Emblica officinalis* Gaertn., syn. *Phyllanthus emblica* L. fruit. Annals of Phytomedicine 1(1): 54-61.

Majeed, M., B. Bhat, A. N. Jadhav, J. S. Srivastava and K. Nagabhushanam. 2009. Ascorbic acid and tannins from *Emblica officinalis* Gaertn. Fruits- A revisit. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 220-225.

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.

Ullah, S., A. Hussain, J. Ali, Khaliqurrehman and A. Ullah. 2012. A simple and rapid HPLC method for analysis of vitamin-C in local packed juices of Pakistan. Middle-East Journal of Scientific Research 12 (8): 1085-1091.

Yamazaki, K., A. Hashimoto, Y. Kokusenya, T. Miyamoto and T. Sato. 1994. Electrochemical method for estimating the antioxidative effect of methanol extracts of crude drugs. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 42: 1663-1665.