Published Online: 9 AUG 2022

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดผักกูด ที่เตรียมจากวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น

Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. Extracts Obtained by Sequential Extraction Method

ฐิตาภา เอี้ยงปาน

อีเมล: 6251701256@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร.ปัญญวัฒณ์ ปินตาทอง

อีเมล: punyawatt.pin@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

ผักกูด (*Diplazium esculentum* (Retz.) Sw.) เป็นเฟินที่สามารถรับประทานได้ พบได้ทั่วไปในประเทศไทย นิยมนำส่วนใบอ่อนและยอดอ่อนมาปรุงรับประทานเป็นอาหาร โดยผักกูดมีสารสำคัญที่น่าสนใจคือ สารประกอบฟีนอลิกและพอลิแซ็กคาไรด์ ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางเครื่องสำอางได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบฟีนอลิกและสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น โดยใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ อะซิโตน, เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95, น้ำ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส, กรด (ไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล) หรือด่าง (โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาประเมินปริมาณฟีนอลิกและพอลิแซ็กคาไรด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ผลจากการศึกษาพบว่าสารสกัดฟีนอลิกมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสารสกัดฟีนอลิกที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.14±0.02 และ 0.14±0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยกรด (ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส) มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงสุด เท่ากับ 230.68±1.26 มิลลิกรัมสมมูลของกลูโคสต่อกรัมสารสกัด ขณะที่สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยด่าง (ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส) มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ 83.53±1.71 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด นอกจากนี้สารสกัด

พอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยด่าง (ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส) ยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดด้วยเช่นกัน ด้วยวิธี ABTS เท่ากับ 409.94±5.71 มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด ดังนั้นสารสกัดผักกูดจึงน่าสนใจมากที่จะนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในทางเครื่องสำอางต่อไป

คำสำคัญ: ผักกูด, การสกัดแบบลำดับขั้น, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Abstract

Paco fern (*Diplazium esculentum* (Retz.) Sw.) is an edible fern found throughout Thailand. The edible parts are young fronds and leaves, which are generally used as food. Paco fern contains phenolic compounds and polysaccharides that could be interesting in cosmetics. The objective of this research was to prepare phenolic and polysaccharide crude extracts of *Diplazium esculentum* using a sequential extraction method with different solvents, including acetone, ethanol, water at 55°C and 80°C, acid (0.1 N HCl) or alkaline (0.1 N NaOH) at 55°C and 80°C. All extracted were evaluated for total phenolic content, total polysaccharide content as well as antioxidant and tyrosinase inhibitory activities. The results indicated that phenolic extract had significantly higher tyrosinase inhibitory activity than polysaccharide extract ($p<0.05$). The acetone and ethanolic extract exhibited the highest tyrosinase inhibitory activity (IC_{50}) of 0.14±0.02 and 0.14±0.01 mg/ml, respectively. For polysaccharide extracts, acid extract (at 80°C) had the highest total polysaccharide (230.68±1.26 mg GE/g crude extract), while the highest total phenolic content (83.53±1.71 mg GAE/g crude extract) was present in alkaline extract (at 55°C). Furthermore, alkaline extract (at 55°C) exhibited the highest antioxidant activity when assayed by ABTS method (409.94±5.71 mg TEAC/g crude extract). Therefore, Paco fern extract could be more interesting for further use as an active ingredient in cosmetic products.

Keywords: *Diplazium esculentum*, Sequential Extraction, Antioxidant Activity
Tyrosinase Inhibitory Activity

บทนำ/หลักการและเหตุผล

จากกระแสรักษ์โลก อนุรักษ์ธรรมชาติ ทำให้ทั่วโลกให้ความสำคัญกับการดูแลสิ่งแวดล้อมและสุขภาพควบคู่กัน จึงหันมาเลือกใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ลง และในทางเครื่องสำอางมีการนำวัตถุดิบจากธรรมชาติเข้ามาใช้เป็นส่วนผสมมากขึ้น เพื่อลดหรือทดแทนการใช้ส่วนผสมที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งสารสกัดหรือส่วนผสมจากธรรมชาติมีฤทธิ์ทางชีวภาพ อาทิเช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสและไทโรซิเนส เป็นต้น (สินีนาฏ ภู่ระยับ และคณะ, 2564)

ผักกูด มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. เป็นพืชในตระกูลเฟิน จัดอยู่ในวงศ์ Athyriaceae เป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่ชื้นและสามารถเก็บผลผลิตได้ตลอดทั้งปี ทางการแพทย์พื้นบ้านนำมาใช้รักษาโรคต่าง ๆ ทั้งโรคเบาหวาน ท้องร่วง แก้ไข้ ปวดหัว บาดแผล เป็นต้น (Semwal et al., 2021) การศึกษาสารพฤกษเคมีพบสารสำคัญหลายกลุ่ม โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Akter et al., 2014) ที่เกี่ยวข้องในทางเครื่องสำอาง แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการใช้ประโยชน์ผักกูดในทางเครื่องสำอาง

ขั้นตอนวิธีการสกัดมีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของสารสกัดที่ได้ รวมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเช่นกัน จากการศึกษาของ Peasura (2015) ได้ทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้นในสาหร่ายไส้ไก่ (*Ulva intestinalis*) พบว่าการสกัดแบบลำดับขั้นทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะเตรียมสารสกัดผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น โดยผักกูดมีสารสำคัญที่น่าสนใจคือสารประกอบฟีนอลิก และพอลิแซ็กคาไรด์ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษา โดยเตรียมสารสกัดผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น เพื่อประเมินปริมาณฟีนอลิก และพอลิแซ็กคาไรด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน เพื่อนำข้อมูลจากการศึกษาไปประยุกต์ใช้ในทางเครื่องสำอางต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบฟีนอลิก และสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น
2. เพื่อประเมินปริมาณฟีนอลิก และพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดที่เตรียมได้จากผักกูด
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากสารสกัดจากผักกูด

ขอบเขตการวิจัย

1. เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบฟีนอลิก และสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากผักกูด ด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น โดยใช้ตัวทำละลาย คือ อะซิโตน, เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95, น้ำที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส, กรด (0.1 N HCl) หรือ ด่าง (0.1 N NaOH) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส

2. วิเคราะห์หาสารองค์ประกอบของสารสกัด

3. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ทบทวนวรรณกรรม

ผักกูด มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. จัดอยู่ในวงศ์ Athyriaceae กระจายพันธุ์ในเขตร้อนชื้นและพบได้ทั่วไปในไทย ในส่วนของก้านอ่อนละใบอ่อนพบสารสำคัญในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ (2R)-3-(4′-hydroxyphenyl) lactic acid, trans-cinnamic acid, protocatechuic acid, rutin และสารกลุ่ม ecdysteroids คือ amarasterone A1, makisterone C, ponasterone A (Watanabe et al., 2021) นอกจากนี้ Kunkeaw et al. (2021) และ Sirichai et al. (2022) ได้ศึกษาผักกูดโดยทดสอบ phenolic profile พบว่าผักกูดมีสารสำคัญในกลุ่มโพลีฟีนอล ได้แก่ quercetin, kaempferol, luteolin, rutin, และ rosmarinic acid สารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วน (ไลเปส), โดยเฉพาะอย่างยิ่งการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวาน (แอลฟา-กลูโคซิเดส และ แอลฟา-อะไมเลส) ที่มีค่าการยับยั้งที่สูง ในผักกูดยังมีสารเมือก ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถสกัดได้จากบริเวณก้านอ่อนและใบอ่อนของผักกูด การศึกษา Hayati et al. (2019) ได้ทำการสกัดสารเมือกจากผักกูดโดยใช้น้ำ กรด (1 M citric acid) และด่าง (1 M NaOH) พบว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

นำผักกูดมาล้างทำความสะอาด ซับให้แห้ง จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำตัวอย่างมาบดให้เป็นผงละเอียด ร่อนตัวอย่างผ่านตะแกรง จะได้ผงตัวอย่างที่ใช้ในการเตรียมสารสกัด

2. การเตรียมสารสกัดจากผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น

โดยใช้ตัวทำละลาย คือ อะซิโตน, เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95, น้ำ, กรด (0.1 N HCl) หรือด่าง (0.1 N NaOH) แสดงขั้นตอนดังภาพที่ 1 โดยการสกัดทุกลำดับขั้นจะใช้วิธีการเขย่า

ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เท่ากันทุกลำดับ โดยเริ่มต้นการสกัดด้วยอะซิโตนเป็นลำดับแรก อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 : 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อสกัดจนครบเวลาแยกส่วนใสและกากออก สารละลายส่วนใสนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดด้วยอะซิโตน (สารสกัดหยาบ 1) ส่วนกากที่เหลือนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำมาสกัดต่อด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 : 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อสกัดจนครบเวลา แยกส่วนใสและกากออก สารละลายส่วนใสนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (สารสกัดหยาบ 2)

กากที่เหลือนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำมาสกัดต่อด้วยน้ำ ตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 : 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 55 และ 80 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาแยกส่วนใสและกากออก สารละลายส่วนใสที่ได้นำมาตกตะกอนด้วยเอทานอล ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส (สารสกัดหยาบ 3 และสารสกัดหยาบ 4) และนำกากที่เหลือไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำมาสกัดต่อด้วยกรดหรือด่าง ตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 : 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 55 และ 80 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาแยกส่วนใสและกากออก สารละลายส่วนใสที่ได้มาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ แล้วนำมาตกตะกอนด้วยเอทานอล ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยกรด และสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยด่าง ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (สารสกัดหยาบ 5 และสารสกัดหยาบ 6) และ 80 องศาเซลเซียส (สารสกัดหยาบ 7 และสารสกัดหยาบ 8)

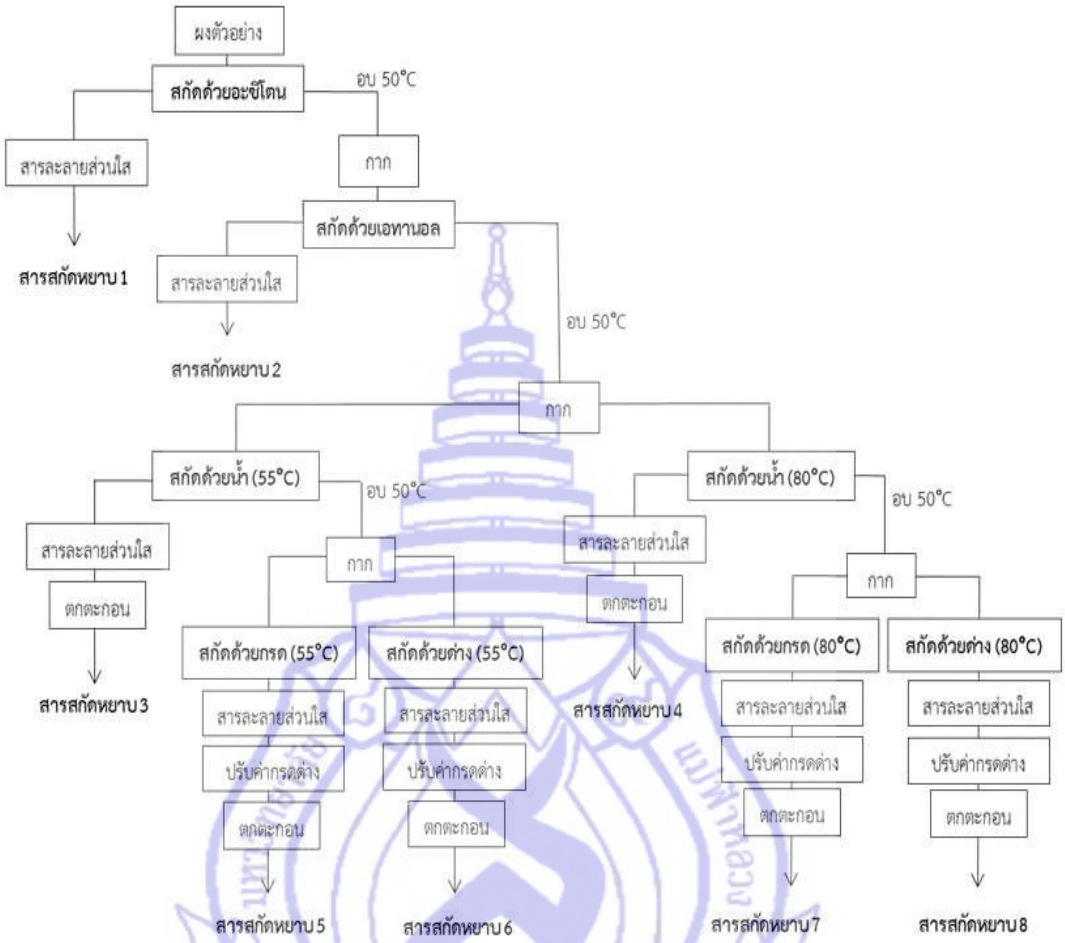
3. วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ และฤทธิ์ทางชีวภาพสารสกัดผักกูด

1) การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric (ดัดแปลงวิธีจาก Singleton et al., 1999) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร แสดงผลเป็นปริมาณมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด

2) การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี phenol–sulfuric acid (ดัดแปลงวิธีจาก DuBois et al., 1956) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร แสดงผลเป็นปริมาณมิลลิกรัมสมมูลของกลูโคสต่อกรัมสารสกัด

3) การวิเคราะห์ปริมาณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging activity (ดัดแปลงวิธีจาก Re et al., 1999) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร แสดงผลเป็นปริมาณมิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด

4) การวิเคราะห์หาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี dopachrome โดยใช้ substrate คือ L-dopa วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร แสดงผลเป็นปริมาณมิลลิกรัมสมมูลของกรดโคจิกต่อกรัมสารสกัด จากนั้นนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีค่าสูง มาหาค่า IC_{50} หรือความเข้มข้นที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50 เปอร์เซ็นต์



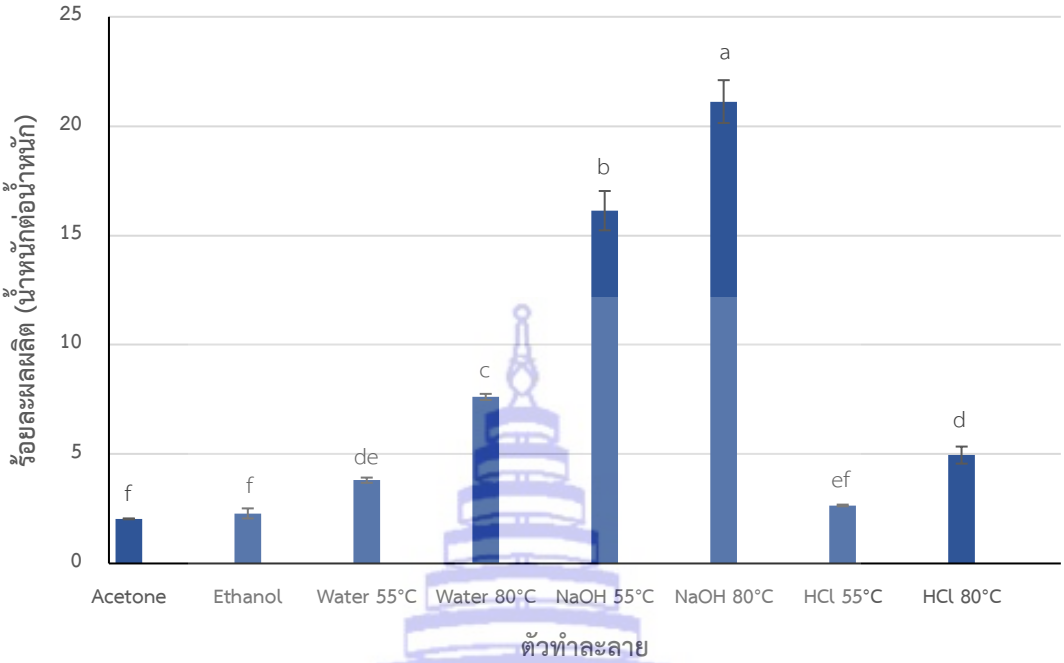
ภาพที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น

ผลวิจัยและอภิปราย

1. สารสกัดจากผักกูด

จากการเตรียมสารสกัดจากผักกูดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น พบว่าการสกัดด้วยอะซิโตนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 สารสกัดที่ได้มีสีเขียวเข้ม ส่วนการสกัดด้วยน้ำ กรด และด่าง (ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส) จะได้สารสกัดสีน้ำตาล และมีปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดผักกูดอยู่ในช่วง 2.04±0.02 ถึง 21.12±0.98 ดังภาพที่ 2 โดยการสกัดด้วยอะซิโตนมีปริมาณร้อยละผลผลิตต่ำสุด และปริมาณร้อยละผลผลิตสูงสุดเมื่อสกัดด้วยด่าง (ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส) กล่าวคือ ในสภาวะด่างจะเกิดการสกัดร่วม (co-extraction) ของเฮมิเซลลูโลส

โปรตีน โพลีฟีนอล หรือสารใดก็ตามที่อยู่ที่ผนังเซลล์ เมื่อสกัดด้วยด่างแล้วไปทำลายพันธะที่เชื่อมออกจากผนังเซลล์ แล้วเกิดการละลายออกมา



หมายเหตุ ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p<0.05$) ตาม Tukey's test

ภาพที่ 2 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดผักกูดที่เตรียมโดยวิธีการสกัดแบบลำดับขั้น

2. การวิเคราะห์ปริมาณสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผักกูด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสารสกัดผักกูด แสดงผลดังตารางที่ 1 จากการสกัดด้วยอะซิโตนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ทำให้ได้ free phenolic compound ละลายออกมา สำหรับการสกัดด้วยน้ำทำให้ได้ water-soluble phenolic ละลายออกมา และการสกัดด้วยด่างและกรด ทำให้ bound phenolic ละลายออกมา จากการวิเคราะห์พบว่าการสกัดด้วยด่าง มีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ 83.53±1.71 และ 74.85±1.06 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษา Zhou et al. (2020) ที่ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากใบของ *Apocynum venetum* ด้วยน้ำ กรด และด่าง พบว่าปริมาณฟีนอลิกจากการสกัดด้วยด่างสูงสุด กล่าวคือ การสกัดด้วยด่างทำให้เกิดการสกัดร่วมของพอลิแซ็กคาไรด์และโปรตีน รวมถึงโพลีฟีนอล โดยฟีนอลิกยึดเหนี่ยว (bound phenolic) ที่เกาะแน่นกับพอลิแซ็กคาไรด์ และเกาะแน่นกับโปรตีน ในสภาวะที่เป็นด่าง จึงถูกสกัดร่วมออกมา ส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกที่สกัดด้วยด่างมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด

การวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมจากสารสกัดผักกูด แสดงผลดังตารางที่ 1 จากข้อมูลพบว่าการสกัดด้วยกรดมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงสุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Peasura et al. (2015) พบว่าการสกัดด้วยกรด มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าน้ำและด่าง เนื่องจากการสกัดด้วยกรดจะไปทำลายพันธะไกลโคซิดิกของพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ที่ผนังเซลล์ ทำให้พอลิแซ็กคาไรด์หลุดออกจากผนังเซลล์ และเมื่อวัดปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จึงสูงกว่าตัวทำละลายน้ำและด่าง ซึ่งปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มีค่าสูงสุด แปรผกผันกับร้อยละผลผลิตที่มีปริมาณต่ำสุด ชี้ให้เห็นว่าร้อยละผลผลิตที่สูงจากการสกัดด้วยด่างมีสารอื่นผสมอยู่ เช่น โปรตีน หรือสารอื่นที่ละลายได้ดีในสภาวะด่าง จึงทำให้มีร้อยละผลผลิตสูงกว่าการสกัดด้วยกรด

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดผักกูด แสดงผลดังตารางที่ 1 จากข้อมูลพบว่าการสกัดด้วยด่างแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhou et al. (2020) ที่ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ reducing power พบว่าทั้ง 3 วิธีให้ผลเหมือนกันคือ การสกัดด้วยด่างแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกที่สูงขึ้น ทั้งนี้ผลการศึกษาไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Hayati et al. (2019) ที่ทำการสกัดผักกูดโดยใช้ตัวทำละลายน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส, กรด (1 M citric acid) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และด่าง (1 M NaOH) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แล้วพบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด อาจเนื่องจากวิธีการสกัด เวลา สภาวะ รวมถึงแหล่งของตัวอย่างที่ต่างกัน จึงทำให้ผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้ไม่สอดคล้องกัน

การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดผักกูด แสดงผลดังตารางที่ 2 จากการศึกษาพบว่าสารสกัดฟีนอลิกมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ โดยสารสกัดฟีนอลิกที่สกัดด้วยอะซิโตนและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 มีค่าเท่ากัน เท่ากับ 0.14±0.02 และ 0.14±0.01 ตามลำดับ อาจเป็นไปได้ว่าเป็นสารประกอบฟีนอลิกคนละกลุ่มกัน ซึ่งจากการศึกษาของ Kunkeaw et al. (2021) ได้ทำการสกัดสารจากผักกูดด้วยเอทานอล พบสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ rutin และ quercetin ส่วนสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำ กรด และด่าง ทำให้ได้สารประกอบฟีนอลิกกลุ่มที่สามารถละลายน้ำหรือที่ฝังแน่นอยู่ที่ผนังเซลล์หลุดออกมา ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่รวมอยู่กับพอลิแซ็กคาไรด์หรือน้ำตาลในรูปไกลโคไซด์ การมีน้ำตาลรวมอยู่ในโมเลกุลทำให้โครงสร้างหรือขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้น จำนวนน้ำตาลที่มากขึ้นยิ่งทำให้ขนาดโมเลกุลใหญ่มากขึ้น และขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้นนั้นจะไปขัดขวางการเข้าถึงบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้ความสามารถในการจับกับคอปเปอร์บริเวณเร่งน้อยลง ส่งผลให้ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำกว่าสารสกัดฟีนอลิก (Karioti et al., 2007; Yang et al., 2012)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักกูด

ตัวทำละลาย	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/g crude extract)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg GE/g crude extract)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (mg TEAC/g crude extract)
อะซิโตน	24.98 ± 1.11[e]	-	81.50 ± 0.50[f]
เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95	25.21 ± 0.31[e]	-	165.72 ± 0.60[e]
น้ำ (ที่อุณหภูมิ 55°C)	42.74 ± 1.81[d]	169.66 ± 16.48[c]	187.24 ± 1.25[d]
น้ำ (ที่อุณหภูมิ 80°C)	51.70 ± 0.19[c]	150.82 ± 5.28[c]	213.13 ± 2.60[c]
0.1 นอร์มัล NaOH (ที่อุณหภูมิ 55°C)	83.53 ± 1.71[a]	160.73 ± 5.08[c]	409.94 ± 5.71[a]
0.1 นอร์มัล NaOH (ที่อุณหภูมิ 80°C)	74.85 ± 1.06[b]	151.64 ± 4.43[c]	397.53 ± 3.89[b]
0.1 นอร์มัล HCl (ที่อุณหภูมิ 55°C)	8.01 ± 0.05[f]	197.42 ± 6.29[b]	30.15 ± 0.71[g]
0.1 นอร์มัล HCl (ที่อุณหภูมิ 80°C)	10.01 ± 0.37[f]	230.68 ± 1.26[a]	35.94 ± 0.83[g]

หมายเหตุ ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p<0.05$) ตาม Tukey's test

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดผักกูด

ตัวทำละลาย	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (mg KAE/g crude extract)	ร้อยละการยับยั้ง IC_{50} (mg/ml)
อะซิโตน	382.11 ± 9.67[a]	0.14 ± 0.02[a]
เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95	337.28 ± 5.29[b]	0.14 ± 0.01[a]
น้ำ (ที่อุณหภูมิ 55°C)	26.74 ± 0.90[c]	-
น้ำ (ที่อุณหภูมิ 80°C)	22.70 ± 1.66[c]	-
0.1 นอร์มัล NaOH (ที่อุณหภูมิ 55°C)	21.92 ± 1.94[c]	-
0.1 นอร์มัล NaOH (ที่อุณหภูมิ 80°C)	28.87 ± 3.00[c]	-
0.1 นอร์มัล HCl (ที่อุณหภูมิ 55°C)	3.22 ± 0.78[d]	-
0.1 นอร์มัล HCl (ที่อุณหภูมิ 80°C)	4.45 ± 3.00[d]	-
สารมาตรฐานกรดโคจิก		**0.0467 ± 0.006**

หมายเหตุ ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p<0.05$) ตาม Tukey's test

ข้อเสนอแนะ

ควรนำสารสกัดผักกูดไปวิเคราะห์สารประกอบในสารสกัดด้วยวิธี HPLC เพื่อหาสารประกอบสำคัญที่มีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบควรมากพอที่จะอธิบายผลที่ได้จากการศึกษา

รายงานอ้างอิง

สินีนาฏ ภู่ระยับ, ลภัสรดา มุ่งหมาย, เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, ณัฐวุฒิ หวังสมนึก, และดวงพร อมรเลิศพิศาล. (2564). ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากดอกเก๊กฮวยอินทรีย์เพื่อใช้ในเครื่องสำอาง. *วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร*, *38*(2), 46-56.

Akter, S., Hossain, M. M., Ara, I., & Akhtar, P. (2014). Investigation of in vitro antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity of *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, *3*(3), 723-733.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350-356.

Hayati, I. N., Suhaimi, A., & Bakar, N. F. (2019). Antioxidant activities and functional properties of complex polysaccharide (mucilage) in vegetable fern (*Diplazium esculentum*). *Asian Food Science Journal*, *6*(2), 1-8.

Karioti, A., Protopappa, A., Megoulas, N., & Skaltsa, H. (2007). Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum and Marrubium cylleneum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *15*(7), 2708-2714.

Kunkeaw, T., Suttisansanee, U., Trachootham, D., Karinchai, J., Chantong, B., Potikanond, S., . . . Temviriyanukul, P. (2021). *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. reduces BACE-1 activities and amyloid peptides accumulation in Drosophila models of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, *11*(1), 1-11.

Peasura, N. (2015). *Sulfated polysaccharide of Ulva intestinalis and their biological activities* (Doctoral dissertation). King Mongkut's University of Technology Thonburi.

Peasura, N., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., & Wanlapa, S. (2015). Characteristics and antioxidant of *Ulva intestinalis* sulphated polysaccharides extracted with different solvents. *International Journal of Biological Macromolecules*, *81*, 912–919.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.

Semwal, P., Painuli, S., Painuli, K. M., Antika, G., Tumer, T. B., Thapliyal, A., . . . Cho, W. C. (2021). *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw.: ethnomedicinal, phytochemical, and pharmacological overview of the himalayan ferns. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2021*, Article 1917890. https://doi.org/10.1155/2021/1917890

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic Press.

Sirichai, P., Kittibunchakul, S., Thangsiri, S., On-Nom, N., Chupeerach, C., Temviriyanukul, P., . . . Suttisansanee, U. (2022). Impact of drying processes on phenolics and in vitro health-related activities of indigenous plants in Thailand. *Plants*, *11*(3), 1-19.

Watanabe, M., Miyashita, T., & Devkota, H. P. (2021). Phenolic compounds and ecdysteroids of *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. (Athyriaceae) from Japan and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, *94*, Article 104211. https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104211

Yang, Z., Zhang, Y., Sun, L., Wang, Y., Gao, X., & Cheng, Y. (2012). An ultrafiltration high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry approach for screening and characterising tyrosinase inhibitors from mulberry leaves. *Analytica Chimica Acta*, *719*, 87-95.

Zhou, J., Zou, P., Jing, C., Xu, Z., Zhou, S., Li, Y., . . . Yuan, Y. (2020). Chemical characterization and bioactivities of polysaccharides from *Apocynum venetum* leaves extracted by different solvents. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *14*(1), 244-253.