ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ขององค์ประกอบของผลสุกพิลังกาสา

Free Radical Scavenging and Anti-mutagenic Activities of Constituents from *Ardisia elliptica* Thunb. Ripe Fruits

เมธิน ผดุงกิจ[1*], พรพรรณ เหล่าวชิระสุวรรณ[2], บรรลือ สังข์ทอง[3], สุนันทา สุวันลาสี[4], สีใส ปาละมี[5]

Methin Phadungkit[1], Pornpun Laowachirasuwan[2], Bunlue Sungthong[3], Sounantha Souvanlasy[4], Sesay Palamy[5]

Received: 29 April 2015 ; Accepted: 15 July 2015

บทคัดย่อ

พิลังกาสา (*Ardisia elliptica* Thunb.) เป็นพืชสมุนไพรไทยอยู่ในวงศ์ Myrsinaceae การแพทย์พื้นบ้านใช้ผลเป็นยารักษาอาการท้องเสีย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของผลสุกพิลังกาสา สกัดผลสุกพิลังกาสาแห้งด้วยการหมักด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ hexane, dichloromethane และ methanol การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)assay การทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ใช้วิธี Ames test ในเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* 2 สายพันธุ์คือ TA98 และ TA100 การศึกษาสารออกฤทธิ์จากสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีและสปคโตรสโกปี ผลการวิจัยพบว่าสารสกัด methanol ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดโดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 8.87±0.24 µg/mL สารสกัด dichloromethane ให้ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ได้ดีที่สุดในทั้งสองสายพันธุ์จากการศึกษาสารออกฤทธิ์จากสาร dichloromethane ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุด พบสารออกฤทธิ์คือ syringic acid และจากการนำสารดังกล่าวไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์พบว่ามีฤทธิ์ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดพิลังกาสา จากงานวิจัยในหลอดทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดพิลังกาสาและองค์ประกอบทางเคมีมีศักยภาพในการนำไปศึกษาต่อเพื่อที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ เช่นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้

คำสำคัญ : พิลังกาสา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ กรดไซรินจิก

Abstract

Ardisiae lliptica Thunb. is a Thai medicinal plant in the Myrsinaceae family. The fruits of this plant are traditionally used as anti-diarrheal agent. The current study aimed to test free radical scavenging and antimutagenic activities of the *A. elliptica ripe fruit* extracts. The dry fruits of this plant were extracted by the maceration method using hexane, dichloromethane and methanol as solvents. The free radical scavenging activity was performed using the DPPH (2,2-diphenyl- 1-picrylhydrazyl) assay. The antimutagenic actions were tested using the Ames test in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains. The bioactive compound from the active extract was investigated using the chromatographic and the spectroscopic techniques. The results showed that the methanol extract possessed the highest free radical scavenging activitywith IC_{50} value of 8.87±0.24 µg/mL and the dichloromethane extract showed the highest antimutagenic capacity both in TA98 and TA100 strains. The bioactive compound isolated from the dichloromethane extract was proposed as syringic acid. The isolated compound exhibited the strongest free radical scavenging and antimutagenic activities when compared withthe herbal extracts. From this in vitro study, it can be concluded that the *A. elliptica* extractsand its chemical component have excellent potential for further study as health products such as dietary supplements.

Keywords: *Ardisia elliptica*Thunb., free radical scavenging activity, antimutagenic activity, syringic acid

---

[1] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์*[2,3]*อาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ.กันทรวิชัย จ. มหาสารคาม 44150*

[4,5] *อาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ นครหลวงเวียงจันทน์ สาธารณรัฐประชาธิปไตย ประชาชนลาว*

[1] *Assist. Prof.,* [2,3] *Lecturers, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Kantharawichai District, MahaSarakham 44150, Thailand.*

[4,5] *Lecturers, Faculty of Pharmacy, University of Health Sciences, Vientaine Capital City, Laos, PDR.*

* *Corresponding author; Methin Phadungkit, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand.*

บทนำ

ปัจจุบันกระแสนิยมการใช้สมุนไพรมีมากขึ้นเนื่องจากเมื่อโลกมีความเจริญทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดมลภาวะของสิ่งแวดล้อม และมีการใช้สารสังเคราะห์ในชีวิตประจำวันมากขึ้น ทำให้ประชากรโลกกลัวอันตรายจากสิ่งแวดล้อมและจากสารสังเคราะห์ และหันมาใส่ใจด้านสุขภาพมากขึ้นโดยเฉพาะแนวโน้มการใช้สมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจึงมีมากขึ้นด้วย ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆของสมุนไพร เช่นใช้เพื่อเป็นยา อาหาร สารแต่งรสแต่งสี และอุตสาหกรรมอื่น ๆ ในด้านสุขภาพ มีการใช้สมุนไพรเพื่อรักษาและป้องกันโรคหลายชนิด รวมทั้งโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระ และโรคที่มีสาเหตุจากการกลายพันธุ์[1]

อนุมูลอิสระ (free radical) คืออะตอมหรือโมเลกุลที่ขาดอิเลคตรอนในวงนอกสุดไปหนึ่งตัว ทำให้ตัวมันไม่เสถียร จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีกับอะตอมหรือโมเลกุลอื่นได้อย่างว่องไว อนุมูลอิสระที่พบมากในร่างกายมนุษย์คือ Reactive Oxygen Species (ROS) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวสูง สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลที่อยู่รอบข้างเช่น ทำลายโครงสร้างของดีเอ็นเอ การเปลี่ยนสภาพโปรตีน การทำลายไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลทำให้องค์ประกอบของเซลล์เหล่านี้เสียหายและก่อให้เกิดโรคความผิดปกติและโรคต่าง ๆตามมา เช่น การเหี่ยวย่นของผิวหนัง[2] โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง โรคไต โรคอัลไซเมอร์[3] เป็นต้น

การกลายพันธุ์ (mutation) คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเซลล์โดยระดับของการเกิดสามารถเกิดได้ทั้งระดับยีนส์หรือโครโมโซม การกลายพันธุ์จะทำให้เกิดความผิดปกติของกระบวนการเมตาโบลิซึมของสิ่งมีชีวิต ส่งผลให้เกิดการเจ็บป่วยและการตายของสิ่งมีชีวิต การก่อกลายพันธุ์ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคที่สัมพันธ์กับอายุในมนุษย์รวมทั้งโรคมะเร็งด้วย[4] การกลายพันธุ์สามารถเกิดได้เองจากธรรมชาติ หรือเกิดจากสารที่เรียกว่า สารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) ตัวอย่างเช่นรังสีต่าง ๆ หรือสารเคมี จากการศึกษาพบว่าสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ จะทำให้มีโอกาสทำให้เกิดโรคมะเร็งมากขึ้น[5]ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจศึกษาหาสารต้านการก่อกลายพันธุ์จากธรรมชาติ (natural antimutagenics) เช่นจากพืชผักหรือสมุนไพรเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้จะมีประโยชน์คือเป็นสารป้องกันการเกิดโรคมะเร็งในมนุษย์[6] พิลังกาสาเป็นพืชสมุนไพรไทยชนิดหนึ่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Ardisiaelliptica* Thunb. อยู่ในวงศ์

Myrsinaceae ในการแพทย์พื้นบ้านใช้ผลสุกต้มกับน้ำเพื่อรักษาอาการท้องเสียที่มีไข้[7] และปัจจุบันได้นำผลของพิลังกาสามาทำเป็นผลิตภัณฑ์ไวน์เพื่อดื่มบำรุงร่างกายและป้องกันโรค จากการศึกษาด้านพิษวิทยาพบว่า จากการทดสอบพิษเฉียบพลันในหนู mice โดยการให้สารสกัดจากผลสุกของพิลังกาสาในความเข้มข้น 10 g/kg ทางปากและฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ไม่พบสิ่งผิดปรกติแต่อย่างใด[8]จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของผู้วิจัยพบว่าสารสำคัญที่พบในผลสุกของพิลังกาสาที่เป็นสารหลักคือ syringic acid ซึ่งเป็นสารจำพวกกรดฟีนอลิก (phenolic acid) สาร isorhamnetin และ quercetin ซึ่งเป็นสารจำพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoids)[7] Huang และคณะ[9] รายงานว่าสารจำพวกฟีนอลิกจากพืชผักหรือพืชสมุนไพร เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acids) ฟลาโวนอยด์ แทนนิน (tannins) สติลบีน (stillbene) มีฤทธิ์เป็นเป็นสารป้องกันมะเร็ง โดยพิจารณาจากสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ต้านสารก่อมะเร็ง (anticarcinogenic) ต้านการก่อกลายพันธุ์ (antimutagenic) และต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ผู้วิจัยจึงเห็นว่าผลสุกของพิลังกาสาซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีใช้ในการแพทย์แผนไทยมานาน มีองค์ประกอบทางเคมีหลักคือ phenolic compounds น่าจะมีศักยภาพในการเป็นสารป้องกันมะเร็งและโรคอื่นที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ

จากข้อมูลข้างต้น ผู้วิจัยจึงได้สนใจในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดผลสุกพิลังกาสา รวมทั้งศึกษาหาสารออกฤทธิ์ดังกล่าวด้วย ผลลัพธ์จากงานวิจัยครั้งนี้จะได้ข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาสรรพคุณพิลังกาสา ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพเพื่อป้องกันโรคมะเร็ง และเป็นข้อมูลทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ที่มีอยู่แล้วในขณะนี้ เช่นไวน์พิลังกาสาเป็นต้น

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลสุกพิลังกาสาที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดต่างกัน
2. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดผลสุกพิลังกาสาที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดต่างกัน
3. เพื่อแยกและพิสูจน์โครงสร้างของสารหลักจากสารสกัดพิลังกาสาที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีสุด

วิธีดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่าง

เก็บผลสุกจากต้นพิลังกาสา (*A. elliptica*) ที่ปลูกขึ้นในจังหวัดมหาสารคามในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2556 ตรวจ

เอกลักษณ์ตัวอย่างพืชโดยผู้วิจัย (ผศ.ดร. เมธิน ผดุงกิจ) และตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงถูกเก็บรักษาไว้ที่หน่วยวิจัยเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (No.MSU.PH-Myr-A01)นำผลสุกมาล้างให้สะอาด อบแห้งด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การสกัดสาร[7]

บดผลพิลังกาสาให้เป็นผง นำผงพิลังกาสา 500 กรัม สกัดสารด้วยการหมัก (maceration) ด้วยทำละลายแบบต่อเนื่องตามลำดับดังนี้ hexane, dichloromethane และ methanol (Merck, AR grade) โดยใช้ตัวทำละลายชนิดละ 1500 มิลลิลิตร โดยใช้เวลา 7 วันต่อชนิดตัวทำละลาย นำสารสกัดที่ได้ไปกรอง และระเหยตัวทำละลายให้แห้งด้วย rotary evaporator นำสารสกัดที่ได้ไปเก็บในภาชนะที่ปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4°C

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging ตามรายละเอียดดังนี้[10]

3.1 เตรียมสารสกัดพิลังกาสาให้มีความเข้มข้น7 ระดับ (3.9,7.8,15.6,31.2,62.5,125,500 μg/mL) ในตัวทำละลาย methanol

3.2 เตรียม DPPH ให้มีความเข้มข้น 60 μg/mL ในตัวทำละลาย methanol

3.3 ดูดสารสกัดในข้อ 3.1 จำนวน 125 μL และ DPPH จำนวน 125 μL ผสมกันใน 96 well plate ด้วย micro-pipette

3.4 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm

3.5 คำนวณค่า % radical scavenging จากสูตร % radical scavenging = (A ctrl – A sample x100)/A ctrl เมื่อ A ctrl คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ของสารละลาย DPPH และ A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผสมกับ DPPH

3.6 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging และความเข้มข้นของสารสกัด คำนวณหา ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถทำลาย DPPH ไปครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) และเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

4. การทดสอบฤทธิ์การต้านการก่อกลายพันธุ์โดยวิธี Ames test[11]

4.1 การเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ

นำเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA 100 และ TA 98 มาเลี้ยงในอาหาร oxoid nutrient broth (12 mL) แล้วนำมาเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C นาน 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเจือจางเชื้อลง 8 เท่า ด้วยสารละลาย 0.9 % NaCl เพื่อวัดค่า OD อ่านค่าที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร จะได้ประมาณ 0.3-0.4

4.2 การเตรียม nitrosated products

4.2.1 เตรียมหลอดทดลอง 2 หลอดสำหรับ TA 100 และ TA 98 แยกกัน เติม 0.2 N HCl 740 μL, 1-aminopyrine 10 μL และ 2 M $NaNO_3$ 250 μL ตามลำดับ สำหรับ TA 98 และเติม และ 0.2 N HCl 710 μL, 1-Aminopyrine 40 μL และ 2M $NaNO_3$ 250 μL ตามลำดับสำหรับ TA 100

4.2.2 นำหลอดทดลองทั้งสองหลอดในข้อ 4.2.1 ไปเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการแช่น้ำแข็งนาน 1 นาที

4.2.3 เติม 2M ammonium sulfamate 250 μL ลงในทั้งสองหลอดและแช่น้ำแข็งอีก 10 นาที

4.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านการก่อกลายพันธุ์

4.3.1 นำหลอดทดลองเติม nitosated products 100 μL และ Na_3PO_4-KCl buffer 500 μL และเติมสารสกัดพิลังกาสา ให้มีปริมาณสารสกัดปริมาณ12.5, 25, 50,100 และ 200 μg/plate และเชื้อ *S. typhimurium*TA 100 หรือ TA 98 จำนวน 100 μL เขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที

4.3.2 เติม Top agar ที่มี histidine ผสม biotin จำนวน 2 mL

4.3.3 นำไปเทบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง

4.3.4 นับจำนวนเชื้อที่เจริญ ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

4.3.5 คำนวณหา % modification จากสูตร % modification = (A-B) x 100/ (A-C)

เมื่อ A หมายถึงค่า revertant colonies ของ positive control คือเชื้อที่เติมสารก่อกลายพันธุ์

B หมายถึงค่า revertant colonies ของเชื้อที่เติมสารสกัดพิลังกาสาและสารก่อกลายพันธุ์

C หมายถึงค่า revertant colonies ของ negative control คือเชื้อที่เกิดตามธรรมชาติ

5. การแยกสารและพิสูจน์โครงสร้างของสารออกฤทธิ์จากสารสกัดพิลังกาสา

นำสารสกัด dichloromethane ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ดีที่สุด ไปศึกษาหาสารออกฤทธิ์ โดยนำสารสกัด

dichloromethaneไปแยกสารด้วยคอลัมน์แก้วที่มี silica gel Si-60 เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) และใช้ dichloromethane, ethyl acetate และ methanol เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) แบบ gradient นำ fractions 5-10 ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) ที่พบสารที่มีค่า Rfตรงกับสารมาตรฐาน syringic acid มารวมกัน และระเหย mobile phaseให้แห้งจะได้ผลึกสีขาว ทำการตกผลึกซ้ำจนได้สารบริสุทธิ์ (สาร A) นำสาร A ไปศึกษาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC), ^{1}H และ^{13}C Nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{1}H และ^{13}C- NMR) และนำสาร A ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ต่อไป

6. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของค่าเฉลี่ย IC_{50}ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่โดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดพิลังกาสา

จากการสกัดผลสุกพิลังกาสาพบว่า ร้อยละของสารสกัดที่ได้ของสารสกัดด้วย hexane, dichloromethaneและ methanol เท่ากับ 3.24 %, 2.74 % และ 24.6 % ตามลำดับ โดยคำนวณจากสูตรร้อยละของสารสกัด = (น้ำหนักของสารสกัด/น้ำหนักผงแห้งของผลสุกพิลังกาสา) x 100

2. ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัด hexane สารสกัด dichloromethane สารสกัด methanolสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (syringic acid)และสารมาตรฐาน ascorbic acid โดยการเปรียบเทียบค่า IC_{50}ทางสถิติ พบว่าผลที่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และจากการทดสอบสถิติรายคู่พบว่า syringic acid ที่แยกได้ และ ascorbic acid มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด (Table1)

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์

จากผลการทดสอบและเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัด hexane, สารสกัด diclhoromethane สารสกัด methanol สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (syringic acid) โดยใช้สารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานคือ 1-aminopyrene ทดสอบในเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium*2 สายพันธุ์ คือ TA98 และ TA100 ใช้สารสกัดที่ปริมาณ 12.5, 25, 50,100 และ 200 µg/plate หรือสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ที่ปริมาณ 12.5, 25, 50 และ 100µg/plate

พบว่า สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ syringic acid มีฤทธิ์ดีที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะสารสกัดพบว่า สารสกัด dichloromethane มีฤทธิ์ดีที่สุด (Table2)

4. ผลการแยกสารบริสุทธิ์และการพิสูจน์สูตรโครงสร้าง

จากการนำสารสกัด dichloromethaneซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ดี ไปแยกสารด้วยคอลัมน์แก้วได้สารที่มีผลึกรูปเข็มสีขาว เมื่อนำไปตรวจสอบโดยใช้เทคนิค TLC โดยใช้ Silica gel GF_{254} เคลือบบนแผ่นอลูมิเนียมเป็นวัฏภาคคงที่ และใช้ Chloroform: ethyl acetate : methanol : glacial acetic acid อัตราส่วน 9 : 1 : 2 : 0.2 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ผลการวิจัยพบว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ให้ค่า Rfเท่ากันกับ syringic acid คือ 0.53

จากข้อมูล^{13}C-NMR spectrum พบสัญญาณคาร์บอน 6 เส้น โดยเส้นที่เกิดบริเวณ downfield ที่ค่า chemical shift (d) 169.90 ppm เป็นสัญญาณของคาร์บอนของกรด carboxylic และสัญญาณที่ d148.80 ppm จะเป็นสัญญาณจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 3และตำแหน่งที่ 5 (C-3และ C-5) และสัญญาณที่ d 56.73 ppm เป็นของคาร์บอนที่มีหมู่เกาะเป็น methoxy group (-OCH_3) สัญญาณที่ d 148.80 ppmเป็นสัญญาณคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และตำแหน่งที่ 5 (C-3และ C-5)ดังแสดงรายละเอียดใน Table 3จากข้อมูลของ ^{1}H-NMR spectrum พบสัญญานเดี่ยว 2 เส้นที่ d3.82 and 7.33 ppm โดยสัญญาณแรกเป็นโปรตอนที่เทียบเท่ากันของโปรตอน 6โปรตอน ของ methoxy groups (–OCH_3) และโปรตอน 2 โปรตอนของวงแหวนอโรแมติกส์ (Table 4) จากข้อมูลเบื้องต้นสรุปได้ว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้คือ 4-hydroxy-3,5-dimethoxy benzoic acid หรือเรียกชื่อสามัญคือ syrigic acid ตาม Figure1

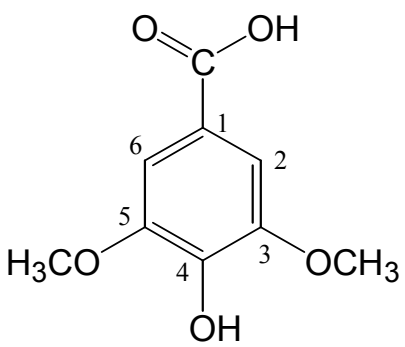

Figure 1 Chemical structure of the isolated compound (syringic acid)

วิจารณ์และสรุปผล

1. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging พบว่าเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะสารสกัด สารสกัด methanol จะให้ฤทธิ์ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัด dichloromethane แต่ถ้าเปรียบเทียบทั้งสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (syringic acid) และสารมาตรฐาน ascorbic acid พบว่า syringic acidที่แยกได้ให้ฤทธิ์ดีที่สุด (ค่า IC_{50} มีค่าน้อยที่สุด) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติแล้วพบว่าsyringic acidที่แยกได้ มีฤทธิ์เท่ากับสารมาตรฐาน ascorbic acid

จากการรวบรวมผลงานการวิจัยของ Robbins[12] พบว่า phenolic compounds มีสมบัติในการปกป้องการเกิดผลเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ และมีรายงานที่ว่า

สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีส่วนช่วยในการป้องกันโรคเรื้อรังบางชนิดเช่นโรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง โรคไต โรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น[3]ซึ่งsyringic acid เป็นสารจำพวก phenolic acid สารนี้และสารสกัดพิลังกาสาจึงน่าจะมีบทบาทในการป้องกันโรคเรื้อรังดังกล่าวได้ อนึ่งผลของการวิจัยสอดคล้องกับรายงานของ Dey SK[13] ที่พบว่าสารสกัดด้วย ethanol ของผลพิลังกาสามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 30.75 µg/ml เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH scavenging

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์

จากผลการศึกษาพบว่า syringic acid ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัด dichloromethane มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ได้ดีที่สุด แม้จะใส่สารปริมาณเพียง 12.5 -100 µg/plate ก็สามารถต้านการต่อกลายพันธุ์ในระดับดีมาก โดยพิจารณาจากค่า % modification ซึ่งมีค่ามากกว่าร้อยละ 90 ทั้งในสายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 ส่วนสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ได้ดีที่สุดคือสารสกัด dichloromethane ซึ่งพบสารประกอบหลักคือ syringicacid ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวก phenolic compoundsชนิดหนึ่งJayaprakasha GK[14] พบว่า สารจำพวก phenolic compoundsมีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ที่ดี Elvira และคณะ[15]ได้เสนอกลไกการต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารจำพวก phenolic compounds คือสารอาจทำปฏิกิริยาโดยตรงหรือไปจับกับสารก่อกลายพันธุ์จนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งมีผลต่อชีวประสิทธิผล (bioavailability) ของสารก่อกลายพันธุ์ หรือสารจำพวก phenolic compounds อาจไปทำให้ความสามารถในการซึมผ่านเมมเบรนของเซลล์แบคทีเรียของสารก่อกลายพันธุ์ลดลง ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดพิลังกาสา เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับรายงานของ Mongkolpech M[16] ที่พบว่าไวน์จากผลของ พิลังกาสาใหญ่ (*Ardisia colorata* Roxb.) มีฤทธิ์ต้านก่อกลายพันธุ์ที่ดี

3. การแยกสารบริสุทธิ์และการพิสูจน์สูตรโครงสร้าง

จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัด methanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด และสารสกัด dichloromethane มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ดีที่สุด ผู้วิจัยได้นำ

นำสารสกัด dichloromethaneไปศึกษาหาสารออกฤทธิ์ เนื่องจากฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ในการวิจัยครั้งนี้จะนำไปสู่การศึกษาการป้องกันมะเร็งจากพืชสมุนไพรในอนาคตวิธีการแยกสารบริสุทธิ์ทำโดยนำสารสกัดไปแยกสารด้วยคอลัมน์แก้วโดยอาศัยเทคนิคโครมาโตกราฟี และพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้ โดยใช้เทคนิคสเปคโตรสโกปี (^1H และ ^{13}C- NMR) พบว่าสารที่แยกได้คือ 4-hydroxy-3,5-dimethoxy benzoic acid หรือเรียกชื่อสามัญคือ syringic acid สารนี้เป็นสารจำพวก phenolic compounds กลุ่ม phenolicacid สารดังกล่าวผู้วิจัยเคยแยกได้จากสารสกัด chloroform จากพืชชนิดเดียวกัน แต่เน้นการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella*ที่พบในสัตว์เศรษฐกิจ[7]จากรายงานของ Wang X และคณะ[17] ได้แยกสารจากจากต้น *Ardisiacrenulata* พบสาร syringic acid และสารอื่น และพบว่า syringic acid มีฤทธิ์ต้านการแพร่กระจายของเนื้องอก (anti-tumor metastaticactivity)

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า สารสกัดด้วย methanol ของผลสุกพิลังกาสา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH scavenging สารสกัด dichloromethane มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี Ames testเมื่อนำสารสกัด dichloromethane ไปแยกหาสารออกฤทธิ์และพิสูจน์สูตรโครงสร้างพบว่า สารออกฤทธิ์ดังกล่าวคือ syringic acid และเมื่อนำสารดังกล่าวมาศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ได้ดีกว่าสารสกัดประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากผลพิลังกาสาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์และสามารถใช้ syringic acid เป็นสารออกฤทธิ์เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินทุนอุดหนุนการวิจัยร่วมทางเภสัชศาสตร์กับมหาวิทยาลัยต่างประเทศ (International Pharmacy Collaboration, MSU) งบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เอกสารอ้างอิง

1. Yumrutas O, Saygideger SD. Determination of anti-oxidant and antimutagenic activities of *Phlomisarmeniaca* and *Mentha pulegium*. J App PharmSci2012; 2: 36-40.
2. Poljsak B, Glavan U, Dahmane R. Skin cancer, free radicals and antioxidants. Int JCancPrev 2011; 4: 193-216.
3. Sarma AD, Mallic AR, Ghosh AK. Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. Int J Pharm Sci Rev Res 2010; 1: 185-192.
4. Shon MY, Choi SD, Kahng GG, Nam SH, Sung NJ. Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. Food ChemToxicol 2004; 42 :659.
5. Zaveri M, Patel P, Dhru B, Patel S. Screening of in- vitro anti-mutagenic activity of selected plants. Am J Pharmtech Res 2011; 1: 232-243.
6. Zahin M, Aqil F, Ahmad I. Broad spectrum antimutagenicactivity of antioxidant active fraction of *Punicagranatum*L. peel extracts. MutatRes, 2010; 703: 99-107.
7. Phadungkit M, Luanratana, O. Anti- *Salmonella* activity of constituents of *Ardisiaelliptica*Thunb. Nat Prod Res 2006; 20: 693-696.
8. มงคล โมกขะสมิต, กมล สวัสดีมงคล, ประยุทธ สาตราวาหะ. การศึกษาพิษของสมุนไพรไทย. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2514; 12: 36-65.
9. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. Nutr Cancer 2010; 62: 1-20.
10. Chu YH, Chang CL, Hsu HF., Flvonoids content of several vegetables and their antioxidant activity. Sci Food Agric2000; 80 :561-566.
11. Kangsadalampai K., Butryee C., Mnoonphol K., Direct mutagenicity of the polycyclic aromatic hydrocarbon containing fraction of smoked and charcoal-broiled foods treated with nitrite in acid solution. Food ChemToxicol 1996; 35: 213-218.
12. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. J Agric Food Chem 2003; 51: 2866-2887.
13. DeySk, Hira A, Howlader MS, Ahmed A, Hossain H, Jahan IA. Antioxidant and antidiarrheal activities of ethanol extract of*Ardisia elliptica* fruits. Phrm Biol 2014; 52 :213-220.
14. Jayaprakasha GK, Negi PS, Jena BS, Rao JM. Antioxidant and Antimutagenic Activities of *Cinnamomumzeylanicum Fruit Extracts*. J Food Compos Anal 2007; 20: 330-336.
15. Elvira GM, Eduardo CT, Guadalupe LP. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen 1999; 1 :1-9.
16. Mongkolpech P. Antimutagenicity of Pilangkasa (*Ardisiacolorata*Roxb.) Juice and Wine on Urethane Induced Somatic Mutation and Recombination in Drosophila Melanogaster. Bangkok: Mahidol University; 2002.
17. Wang X, Tang S, Zhai H, Duan H. Studies on anti-tumor metastatic constituents from *Ardisiacrenata* J Chin Med Mat 2011; 36 :881-885.

Table 1 DPPH scavenging activity of the herbal extracts and the isolated compound

Samples	50% DPPH scavenging activity (IC_{50} µg/ml)
Hexane extract	50.01 ±0.56 [d] *
Dichloromethane extract	14.24 ± 0.04 [c]
Methanol extract	8.87 ±0.24 [b]
Syringic acid	0.24 ± 0.04 [a]
Ascorbic acid	1.83 ± 0.01 [a]

Means with different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$)

Table 2 Antimutagenic activity of the herbal extracts and the isolated compound

Samples	Concentration (µg/plate)	% modification	
		TA 98	TA 100
Hexane extract	12.5	32.07±0.41	38.99±8.97
	25	9.75±2.29	15.65±29.97
	50	18.38±38.78	38.83±8.85
	100	21.82±34.92	38.97±4.86
	200	63.33±17.67	61.06±8.60
Dichloromethane extract	12.5	57.79±5.59	57.73±18.33
	25	56.01±17.16	48.76±6.62
	50	65.93±2.49	41.29±4.41
	100	68.04±6.86	64.54±8.14
	200	89.59±2.33	89.73±1.44
Methanol extract	12.5	52.39±16.50	76.93±11.01
	25	49.34±13.49	6.25±2.74
	50	54.36±14.75	17.59±4.84
	100	49.20±14.19	22.14±9.50
	200	63.19±13.86	20.39±7.95
Syringic acid	12.5	90.94±0.48	91.14±0.19
	25	99.11±0.91	97.11±0.84
	50	97.58±0.66	98.98±1.22
	100	96.44±4.04	99.50±0.49

Table 3 ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) data of the isolated compound

Carbon assignment	δ [PPM]
Carboxylic-	169.90
C-3, 5	148.80
C-4	141.68
C-1	121.88
C-2, 6	108.30
Methoxy-	56.73

Table 4 ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) data of the isolated compound

Proton assignment	δ [PPM]	Multiplicity (Proton number)
Methoxy-	3.82	*s* (6 H)
H-2, 6	7.33	*s* (2 H)