การสกัดและวิธีวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร
Extraction and determination of antioxidant activity in herbal plant

กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ[1*] และ ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ[2]
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์กายภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
สมุทรปราการ 10540
ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540
Kittipat Sopittummakhun[1*] and Panthip Rattanasinganchan[2]
[1] Division of Physical Science, Faculty of Science and Technology,
Huachiew Chalermprakiat University, Samutprakarn 10540
[2] Department of Clinical Chemistry, Faculty of Medical Technology,
Huachiew Chalermprakiat University, Samutprakarn 10540

บทคัดย่อ

คุณสมบัติทางเคมีของสารสกัดจากสมุนไพรในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในทางวิทยาศาสตร์ และเป็นองค์ความรู้สำคัญที่นำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยารักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพในมนุษย์ การสกัดสารจากสมุนไพรมีหลายวิธีที่นิยมใช้กัน เช่น การแช่ในตัวทำละลาย การให้ตัวทำละลายไหลผ่าน การย่อย การสกัดด้วยวิธีการชง และการสกัดด้วยการต้มในน้ำเดือด แต่ละวิธีก็จะมีข้อจำกัดสำหรับการใช้เพื่อสกัดสารจากสมุนไพร เช่น ส่วนของพืชที่นำมาสกัด และความเสถียรของสารที่สนใจในสมุนไพร ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งเป็นเครื่องมือพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเคมีทั่วไป ปฏิกิริยาเคมีที่ใช้ ได้แก่ การวัดความสามารถในกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS การวัดความสามารถในการรับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยโมเลกุลตัวรับที่มีการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้น เช่น FRAP, PFRAP และ cupric reducing antioxidant power และการหาปริมาณรวมของสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยกราฟมาตรฐาน สารมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ butylate hydroxytoluene (BHT), butylate hydroxyanisole (BHA) วิตามินซี (ascorbic acid) วิตามินอี (α-tocopherol) และอนุพันธ์วิตามินอี (trolox, vitamin E derivative) สำหรับกรดแกลลิก (gallic acid) ใช้สำหรับเป็นสารมาตรฐานในการหาปริมาณรวมของสารโพลีฟีนอล และ quercetin ก็เป็นสารมาตรฐานสำหรับหาปริมาณรวมของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

คำสำคัญ: วิธีการสกัดสาร การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การหาปริมาณรวมของสารโพลีฟีนอล การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

Corresponding author: ksopittha@gmail.com

Abstract

Chemical properties in herbal extracts are recognized as antioxidant. They have been widely interested in scientific fields. It is an important knowledge leading to the development of the effective medicine for human. The common procedures are applied for the herbal extraction i.e. maceration, percolation, digestion, infusion and decoction. In each extraction methods, it should be concerned about some limitations such as the part of plants using for preparation and chemical stability in herbal extract. Antioxidant assay is relied on absorption technique via spectrophotometer, general instrument in chemistry laboratory. Chemical reaction assays for determination of the antioxidant properties are DPPH and ABTS scavenging, the ability in electron acceptability from antioxidant molecules caused the alteration in absorption due to the chemical complex formation i.e. FRAP, PFRAP and cupric reducing; and analysis of total polyphenolics and flavonoids substances. Quantitative analysis of antioxidant contents relied on standard graph. The standard antioxidant agents for assay are butylate hydroxytoluene (BHT), butylate hydroxyanisole, vitamin C (ascorbic acid), vitamin E (α-tocopherol) and trolox (vitamin E derivative). Garlic acid is able to use as standard for quantitation of antioxidant and total polyphenolic contents. Quercetin is a standard agent for total flavonoid contents.

Keywords: Maceration, Spectrophotometer, Flavonoids, Vitamin E derivative (trolox)

บทนำ

สารสกัดจากสมุนไพรกับการพัฒนาไปสู่สารต้านอนุมูลอิสระ

การใช้ประโยชน์จากสมุนไพรของคนไทยนั้นมีมาอย่างยาวนาน อยู่คู่กับวิถีชีวิตมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ด้วยความได้เปรียบของลักษณะภูมิประเทศ และสภาพอากาศที่ร้อนชื้นทำให้มีความหลากหลายของชนิดพันธุ์ (biodiversity) ของสมุนไพรกระจายไปในหลายพื้นที่ของประเทศไทย สมุนไพรส่วนใหญ่ปลูกง่าย โตเร็ว นิยมปลูกไว้ใช้สอยตามบ้านเรือน ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร นำมาใช้เป็นยารักษาโรค และยังมีการพัฒนาเป็นตำรับยาแผนโบราณอันเป็นแหล่งความรู้ และภูมิปัญญาที่มีคุณค่าถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลาน ในปัจจุบันงานวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมาก เห็นได้จากการเพิ่มขึ้นของงานวิจัยเชิงลึกเกี่ยวกับสารสกัดจากสมุนไพร ได้แก่ การพัฒนาวิธีการสกัดให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น พัฒนาเทคนิคในการเตรียม และแยกสารที่สนใจให้บริสุทธิ์ การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารที่เป็นองค์ประกอบในสมุนไพร การดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารที่ได้จากสมุนไพรเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นสารยับยั้งที่ใช้ศึกษาความสามารถในการทำลายเชื้อจุลชีพก่อโรค [1, 2] และสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโต และทำลายกลุ่มเซลล์มะเร็ง [3] โดยทั้งหมดนี้จะเป็นข้อมูล และความรู้ที่นำไปสู่การพัฒนาตัวยาที่ใช้รักษาโรคในมนุษย์อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

คุณสมบัติทางเคมีของสารจากสมุนไพรที่อยู่ในความสนใจของนักวิทยาศาสตร์อย่างมากคือ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เนื่องจากอนุมูลอิสระ (free radical) เป็นอีกหนึ่งปัจจัยเสี่ยงที่นำไปสู่การเกิดโรคร้ายแรงในมนุษย์ เช่น โรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) ได้แก่ โรคหลอดเลือดหัวใจแข็งตัว โรงหลอดเลือดสมองแข็งตัว และโรคมะเร็ง (cancer) โดยโรคเหล่านี้เป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิต [4] อนุมูลอิสระมีความสามารถในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของดีเอ็นเอ (DNA) ที่อยู่ในเซลล์ นำไปสู่การผ่าเหล่าทางพันธุกรรม (mutation) ส่งผลให้ระบบการแบ่งเซลล์มี

ความผิดปกติ จนพัฒนาไปสู่การเกิดมะเร็งในที่สุด [5, 6] นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงตัวอย่างของโรคที่มีความผิดปกติของระบบประสาท (neurological disease) ที่เชื่อมโยงกับอนุมูลอิสระ ได้แก่ Alzheimer's [7], Parkinson [8], Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) และโรคซึมเศร้า (Depression) [8] เป็นต้น

การศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารในพืชสมุนไพร เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานที่จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยาในการรักษาโรคในมนุษย์อย่างมีประสิทธิภาพนั้น มีขั้นตอนในการศึกษา ทดลอง และวิธีการวิเคราะห์ที่สำคัญหลายขั้นตอน แต่เนื้อหาในบทความนี้จะเน้นเรื่องวิธีการที่ใช้สกัดสารจากสมุนไพร และวิธีการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในการประเมินปริมาณ และศักยภาพของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยผู้เขียนมีความคาดหวังว่าเนื้อหาส่วนนี้จะเป็นประโยชน์กับนักวิจัย นักศึกษา และผู้สนใจที่จะเริ่มศึกษาถึงคุณสมบัติทางเคมีที่ได้จากสมุนไพรต่อไป

วิธีที่นิยมใช้ในการสกัดสารจากสมุนไพร

1. การแช่ในตัวทำละลาย (maceration) เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดในการสกัดสารจากพืชสมุนไพร และยังเป็นวิธีที่ใช้ได้กับการสกัดสารจากทุกส่วนของพืช เช่น กิ่งก้าน เปลือก ใบ และราก ข้อได้เปรียบของวิธีนี้คือ เครื่องมือที่ใช้ และขั้นตอนในการสกัดไม่ซับซ้อน อีกทั้งสารเคมีที่ใช้มีในห้องปฏิบัติการเคมีทั่วไป แต่ข้อเสียที่ต้องคำนึงถึงด้วยคือระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดด้วยวิธีนี้ค่อนข้างนาน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น การสกัดสารจะเริ่มต้นด้วยการเตรียมส่วนต่าง ๆ ของพืชที่จะสกัดให้แห้งโดยใช้วิธีตากแดดหรืออบในตู้บ่ม (incubator) ใช้อุณหภูมิในช่วง 30-60 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับปริมาณความชื้นของชิ้นส่วนพืชที่เรานำมาสกัด จากนั้นนำส่วนที่แห้งไปปั่นหรือบดให้ละเอียดเพื่อเพิ่มพื้นผิวสัมผัสกับตัวทำละลาย ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดด้วยตัวทำละลายละลายอินทรีย์ ซึ่งที่นิยมใช้ในการสกัด ได้แก่ เฮกเซน (hexane) เอทิลอะซิเตท (ethylacetate) เมทานอล (methanol) และเอทานอล (ethanol) ซึ่งทำให้สารที่ถูกสกัดออกมาในชั้นของตัวทำละลายแต่ละชนิด มีความเป็นขั้วมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด เวลาที่ใช้ในการสกัดก็จะแตกต่างกันไป อาจใช้เวลาในการสกัดประมาณ 3-7 วัน ร่วมกับการสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิม หรืออาจใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกันในการสกัดเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ และให้ได้ปริมาณของสารสกัดที่จะนำมาศึกษามากขึ้น วิธีการแช่ในตัวทำละลายจะแช่สมุนไพรในตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง ในการสกัดด้วยวิธีการแช่ในตัวทำละลาย โดยทั่วไปแล้วจะใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของสมุนไพรต่อปริมาตรของตัวทำละลายตั้งแต่ 1:4 ไปจนถึง 1:20

2. การสกัดด้วยการให้ตัวทำละลายไหลผ่าน (percolation) หลักการเหมือนกับการสกัดด้วยการแช่ในตัวทำละลาย ต้องมีการเตรียมตัวอย่างที่จะสกัดให้แห้งนำไปปั่นหรือบดให้ละเอียด และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว (polarity) แตกต่างกันร่วมใน การสกัดสาร แต่ขั้นตอนที่มีความแตกต่างคือ จะใช้วิธีการสกัดโดยแช่สมุนไพรในตัวทำละลายทิ้งไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจะเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปเพิ่ม แล้วปล่อยให้มีการไหลของตัวทำละลายผ่านสมุนไพรช้า ๆ ด้วยอัตราเร็วเหมาะสมกับการเติมตัวทำละลายเข้าไปแทนที่ แต่ข้อด้อยของการสกัดด้วยวิธีนี้คือต้องใช้ปริมาณตัวทำละลายในการสกัดมากกว่าวิธีการสกัดด้วยการแช่ในตัวทำละลาย ดังนั้นในการสกัดสารจากสมุนไพรอาจประยุกต์ใช้ทั้งสองวิธีคือ การแช่ในตัวทำละลาย และการให้ตัวทำละลายไหลผ่านร่วมกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารก็ได้

3. วิธีการย่อย (digestion) (บางตำราเรียกวิธีการนี้ว่า การตุ๋น) คือวิธีเดียวกับการสกัดสารด้วยการแช่ในตัวทำละลาย แต่ระหว่างขั้นตอนการแช่สมุนไพรในตัวทำละลายนั้น จะใช้อุณหภูมิประมาณ 30-50 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยในการสกัดสารให้ละลายออกมาได้ดีขึ้น วิธีนี้จะใช้สกัดสารจากพืชส่วนที่มีความแข็ง และมีองค์ประกอบของพวกโพลิเมอร์ เช่น แทนนิน (tannins) ลิกนิน (lignin) ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (water-insoluble) ได้แก่ ส่วนเปลือก (bark) และราก (root) ของพืช ในการสกัดด้วยวิธีการย่อยจะใช้เวลาสั้นกว่าการแช่ในตัวทำละลาย โดยใช้ระยะเวลา

ตั้งแต่ 1 ชั่วโมงจนถึงหนึ่งวัน ขึ้นกับส่วนของพืชที่นำมาสกัด ข้อควรระวังของการสกัดสารด้วยวิธีนี้คือ อุณหภูมิอาจมีผลต่อการสลายของสารบางอย่างในสมุนไพรเมื่อได้รับความร้อน

4. การสกัดด้วยวิธีการชง (infusion) วิธีการนี้ใช้ได้ดีกับการสกัดสารที่มีคุณสมบัติในการละลายในน้ำได้ดี ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดคือน้ำ การสกัดจะใช้วิธีการแช่สมุนไพรในน้ำเดือด และแช่ทิ้งไว้ประมาณ 15-30 นาที จากนั้นกรองกาก ที่เหลืออยู่ด้วยกระดาษกรอง หรือผ้าขาวบาง แล้วนำสารละลายที่ได้จากการสกัดไปศึกษาต่อไป ตัวอย่างการสกัดด้วยวิธีนี้ที่เราเห็นได้ในชีวิตประจำวัน เช่น การชงชา ที่จะแช่ใบชาแห้งในน้ำเดือดทิ้งไว้จากนั้นก็ดื่มเฉพาะส่วนน้ำที่ได้ละลายสารที่อยู่ในใบชาออกมา เป็นต้น

5. การสกัดด้วยวิธีการต้มในน้ำเดือด (decoction) การสกัดสารด้วยวิธีนี้ คือการต้มสมุนไพรในน้ำเดือด ใช้ระยะเวลาในการสกัดประมาณ 15 นาที ถึง 1 ชั่วโมง ซึ่งจะใช้เวลาที่สั้นกว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ข้อควรระวังของการสกัดวิธีนี้คือ ความร้อนอาจทำลายสารที่เราสนใจในสารสกัดจากสมุนไพร การสกัดสารด้วยการต้มในน้ำเดือดใช้ได้ดีกับส่วนราก ใบ ดอก ก้าน แต่หลังจากการสกัดโดยต้มในน้ำเดือด จะต้องกรองกากเพื่อที่จะนำส่วนสารละลายไปใช้ศึกษาต่อ

การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นขั้นตอนสำคัญในการวิเคราะห์ และประเมินคุณภาพของสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดจากสมุนไพร ใช้วัดปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบ (crude extract) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน และการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดที่นำไปผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ (purification) ในแต่ละขั้นตอน เนื้อหาของบทความนี้จะอธิบายถึงการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยหลักการวัดการดูดกลืนคลื่นแสง ด้วยเครื่องมือที่เรียกว่า ยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible spectrophotometer) ซึ่งเป็นเครื่องมือพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางเคมีทั่วไป โดยมีรายละเอียดของแต่ละวิธีการดังนี้

1. ความสามารถในกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) DPPH คืออนุมูลอิสระที่มีความเสถียร (stable free radical) (ภาพที่ 1) เป็นสารที่นิยมนำไปใช้เป็นตัวชี้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สนใจ ใช้หลักการของ $DPPH^{\bullet}$ ในรูปของอนุมูลอิสระ ที่อยู่ในสารละลายจะมีสีม่วงเข้ม และดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร [9] การสูญเสียอิเล็กตรอนอิสระให้กับโมเลกุลอื่น โดยมีตัวรับอิเล็กตรอนคือสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารสกัดจากสมุนไพร จะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปออกซิไดซ์ (DPPH) ซึ่งการลดลงของอนุมูลอิสระดังกล่าวจะสังเกตได้จากการจางลงของสีม่วงในสารละลาย สามารถวัดการค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่นที่ 515 นาโนเมตร เป็นตัวชี้วัดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น หรือก็คือการลดลงของ DPPH ที่มีผลมาจากสารต้านอนุมูลอิสระ

2. ความสามารถในกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)] ใช้หลักการเหมือนกับการลดลงของอนุมูลอิสระ DPPH แต่ในกรณี $ABTS^{\bullet+}$ (ภาพที่ 1) เป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุเป็นบวก ในสารละลายจะมีสีเขียวเข้ม และมีค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นสูงสุด (l_{max}) หลายค่า ได้แก่ 415, 645, 734 และ 815 นาโนเมตร แต่ทั่วไปแล้วจะนิยมใช้ความยาวคลื่นที่ 415 [10] และ 743 นาโนเมตร [11] ในการติดตามปฏิกิริยา โดยในการลดลงของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าว จะใช้เป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (สีเขียวของสารละลายจางลง) ในการเตรียมอนุมูลอิสระของ ABTS เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะมีขั้นตอนที่ยุ่งยากกว่าในกรณีของ DPPH นั่นคือ ต้องนำเอา ABTS ไปบ่มกับ potassium persulfate ด้วยอัตราส่วน 1:0.5 (stoichiometry ratio) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง [10] เพื่อให้ได้อนุมูลอิสระที่เป็นประจุบวกของ $ABTS^{\bullet+}$ ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระต่อไป

3. การวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) หลักการของวิธีนี้จะวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระ (คุณสมบัติเป็น reductant) จะใช้หลักการที่แตกต่างจากวิธีการที่กล่าวไปแล้วข้างต้น โดยในสารละลาย FRAP ประกอบด้วย Fe^{3+} และ 2,4,6-tri (2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) ในสภาวะที่เป็นกรด โดย Fe^{3+} ใน FRAP reagent จะรับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน หรือในสารสกัดจากสมุนไพรแล้วเปลี่ยนเป็น Fe^{2+} จากนั้นเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ TPTZ เปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้ จะวัดจากการเพิ่มขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Fe^{2+} และ TPTZ โดยค่าการดูดกลืนคลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่นดังกล่าวนี้จะใช้เป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

4. การวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี potassium ferricyanide reducing power (PFRAP) หลักการของวิธีนี้เหมือนกับวิธี FRAP คือวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระ แต่วิธีนี้จะใช้ potassium ferricyanide (Fe^{3+}) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน โดยเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานหรือสารสกัดจากสมุนไพร จะได้ผลิตภัณฑ์คือ potassium ferrocyanide (Fe^{2+}) จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาต่อกับ ferric trichloride ($FeCl_3$) ได้สารประกอบเชิงซ้อน ferric ferocyanide ที่มีสีน้ำเงินที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่นดังกล่าวนี้จะใช้เป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

5. การวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี cupric reducing antioxidant power ใช้หลักการวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับ FRAP และ PFRAP assay แต่จะใช้ copper (II) sulfate ($CUSO_4$) และ neocuproine ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานหรือสารสกัดจากสมุนไพร โดยบ่มปฏิกิริยาไว้เป็นเวลา 30 นาที โดยจะเกิดปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอนของ Cu^{2+} ในสารละลายแล้วเปลี่ยนเป็น Cu^{+} ซึ่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ทำให้มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่นดังกล่าวนี้จะใช้เป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

การวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols)

สารในกลุ่มโพลีฟีนอลพบได้มากในผัก และผลไม้ ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ วิตามินซี (ascorbic acid) วิตามินอี (α-tocopherol) และสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นต้น ทั้งนี้ได้มีรายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติ และความน่าสนใจของสารกลุ่มนี้เกี่ยวกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ [12] จะเห็นได้ว่าในการศึกษา และวิจัยเรื่องสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดสมุนไพร ก็มักจะมีการรายงานปริมาณของสารในกลุ่มฟีนอล และฟลาโวนอยด์ร่วมด้วย โดยวิธีการที่นิยมใช้หาปริมาณสารทั้งสองกลุ่มที่จะได้กล่าวถึงในบทความนี้ ได้แก่

1. การหาปริมาณรวมของสารโพลีฟีนอล (total polyphenolic contents) การทดสอบหาปริมาณของสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดที่มีในตัวอย่างทดสอบ ด้วยการใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu (F-C reagent) มีส่วนประกอบสำคัญคือ phosphomolybdate และ phosphotungstate (สารละลาย F-C reagent สำเร็จรูปและพร้อมใช้ในการทดสอบ ผลิต และจำหน่ายโดยหลายบริษัท เช่น Sigma-Aldrich) ทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานของโพลีฟีนอล (นิยมใช้ garlic acid เป็นสารมาตรฐานของสารโพลีฟีนอล) หรือสารทดสอบที่ต้องการหาปริมาณรวมของโพลีฟีนอล จากนั้นจึงเติมโซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$) บ่มปฏิกิริยาต่อไปเป็นเวลา 90 นาทีในที่มืด สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจากผลของโพลีฟีนอลที่มีต่อ F-C reagent จะมีสีน้ำเงินเข้ม และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจะใช้เป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น การรายงานค่าของปริมาณทั้งหมดของสารโพลีฟีนอล จะแสดงในหน่วยน้ำหนักสมมูล มิลลิกรัมของ garlic acid (mg Garlic acid, GE equivalent) [13]

2. การหาปริมาณรวมของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (total flavonoids contents) ทำการทดสอบด้วยการเติม sodium nitrite ($NaNO_2$) เพื่อทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานของฟลาโวนอยด์ (นิยมใช้ catechin [14] หรือ quercetin [15] เป็นสารมาตรฐานของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์) หรือสารทดสอบที่ต้องการหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที จากนั้นจึงเติม aluminium chloride ($AlCl_3$) และ sodium hydroxide (NaOH) ลงไปในสารผสม บ่มทิ้งไว้อีกประมาณ 15-20 นาที จะได้สารประกอบเชิงซ้อนที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจะใช้เป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ในการรายงานค่าของปริมาณรวมของสารฟลาโวนอยด์ จะแสดงในหน่วยน้ำหนักสมมูล มิลลิกรัมของ catechin (mg catechin equivalent) หรือมิลลิกรัมของ quercetin (mg quercetin equivalent)

สารมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณ (quantitative analysis) ของสารสกัดสมุนไพรที่เราสนใจนั้นจะใช้การคำนวณเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่รู้ปริมาณของเนื้อสารหรือความเข้มข้นที่แน่นอน โดยการใช้วิธีการติดตามสารดังกล่าวด้วยปฏิกิริยาเคมีที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ใช้การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบ ทั้งนี้สารมาตรฐานที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่

1. Butylate hydroxytoluene (BHT) และ Butylate hydroxyanisole (BHA) (ภาพที่ 1) สารทั้งสองตัวนี้ถูกสังเคราะห์โดยวิธีทางเคมี และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (synthetic antioxidant) ถูกใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในอุตสาหกรรมอาหาร พวกเคมีโพลิเมอร์ น้ำมัน และปิโตรเคมี [16, 17]

2. วิตามินซี (vitamin C หรือ ascorbic acid) (ภาพที่ 1) สารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายน้ำได้ดี (water-soluble) พบมากในผลไม้ เช่น ส้ม ฝรั่ง และผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มวิตามินที่ละลายน้ำได้ดีเหมือนกับวิตามิบี จัดเป็นสารอาหารที่ร่างกายต้องได้รับในปริมาณที่เพียงพอต่อวัน วิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติที่มีกลไกการต่อต้านอนุมูลอิสระโดยให้อิเล็กตรอนอิสระบนโครงสร้างไปยังโมเลกุลของอนุมูลอิสระเพื่อทำลาย และลดความเป็นพิษของอนุมูลอิสระที่จะไปทำลายองค์ประกอบของเซลล์ วิตามินซีเป็นสารอีกตัวหนึ่งที่นิยมใช้เป็นสารมาตรฐานในการวัดปริมาณสารอนุมูลอิสระในสารสกัดสมุนไพร [17]

3. วิตามินอี (α-tocopherol) และ Trolox ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของวิตามินอี (vitamin E derivative) (ภาพที่ 1) สารต้านอนุมูลอิสระอีกตัวที่พบในธรรมชาติ จัดอยู่ในกลุ่มวิตามินที่ละลายในไขมัน (water-insoluble หรือ fat-soluble) ในอุตสาหกรรมอาหารจะเติมวิตามินอีลงไปเพื่อป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างหรือก็คือช่วยป้องกันการเหม็นหืนของน้ำมัน ด้วยโครงสร้างทางเคมีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ จึงได้มีการสังเคราะห์เป็นอนุพันธ์คือ 6-hydroxy-2,5,7,8-tertamethylchroman-2-carboxylic acid, ชื่อทั่วไปคือ Trolox ทำให้ละลายน้ำได้ดีขึ้น และใช้เป็นสารมาตรฐานในการวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยในรายงานวิจัยที่ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ นิยมใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณจะรายงานเป็นค่าน้ำหนักสมมูลกับ Trolox (trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) [18]

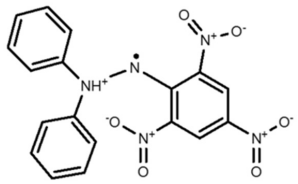
4. กรดแกลลิก (Gallic acid) คือสารที่จัดอยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอล ด้วยโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (ภาพที่ 1) ภายในโมเลกุลสามารถให้อิเล็กตรอนกับโมเลกุลอื่นได้ดี ด้วยกลไกที่เหมือนกับวิตามินซี สารตัวนี้พบมากในผลกระเทียม (garlic bulbils) ซึ่งมีกลิ่นเฉพาะตัว สารตัวนี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ด้วยโครงสร้างทางเคมีทำให้ละลายน้ำได้ง่าย นิยมใช้เตรียมเป็นสารมาตรฐานในการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับ Trolox และยังใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับการคำนวณหาปริมาณรวมของสารโพลีฟีนอลด้วย ในการวิเคราะห์

จะรายงานค่าเป็น น้ำหนักสมมูล มิลลิกรัมของ Garlic acid ต่อน้ำหนักแห้งของสารทดสอบ (mg garlic equivalent per g dry matter, มีหน่วยเป็น mg GAE g^{-1} DM)

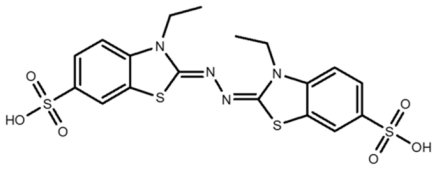
5. Quercetin เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบมากในผัก ผลไม้ และเมล็ดธัญพืช สารสกัดนี้ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเสริมสุขภาพ โครงสร้างทางเคมีมีลักษณะเป็นอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ (ภาพที่ 1) ที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี จึงเหมาะสำหรับในการเตรียม และนำไปใช้ในการเตรียมเป็นสารมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ในตัวอย่างทดสอบหรือสารสกัดจากสมุนไพร [14]

บทสรุป

ด้วยความหลากหลายของพืชสมุนไพรในประเทศไทย เป็นข้อได้เปรียบของวัตถุดิบของสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อการศึกษาและวิจัยสารออกฤทธิ์ (active compounds) นำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยาทางเลือกนอกเหนือจากการใช้ยาแผนปัจจุบัน ที่ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ และยังเกิดปัญหาเรื่องยาที่ใช้มีประสิทธิภาพทางการรักษาลดลง เช่น พบปัญหาการดื้อยา แนวทางการศึกษาเรื่องสารต้านอนุมูลอิสระจากสมุนไพรกำลังเป็นเรื่องที่อยู่ในความสนใจทางวิทยาศาสตร์ เพื่อที่จะพัฒนาเป็นยารักษาโรคในมนุษย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ข้อมูลพื้นฐาน และวิธีการที่ใช้ในการศึกษาเป็นสิ่งที่สำคัญ เริ่มต้นจาก 1) การพัฒนากระบวนการสกัดสารที่เป็นระบบ มีประสิทธิภาพ และสามารถทำซ้ำได้ พัฒนาเป็นความรู้ส่งต่อไปยังนักวิจัยที่จะเข้ามาต่อยอดงานวิจัยได้ 2) การวิเคราะห์ และติดตามการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นระบบ เช่น ปฏิกิริยาทางเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ และประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดสมุนไพร ระบบที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค และเซลล์มะเร็ง เป็นต้น 3) วิธีการแยก และเตรียมสารที่เราสนใจให้บริสุทธิ์ นำไปสู่การหาโครงสร้างทางเคมี 4) การปรับปรุง และดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสาร (การสังเคราะห์สารที่เป็นอนุพันธ์) ให้มีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพดีขึ้น จำเพาะต่อเป้าหมายที่จะใช้รักษามากขึ้น เช่น ทำลายกลุ่มเซลล์ที่เป็นพวกจุลชีพ กลุ่มเซลล์มะเร็ง อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นต้น 5) สุดท้ายความรู้ที่ได้จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยาที่ใช้รักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

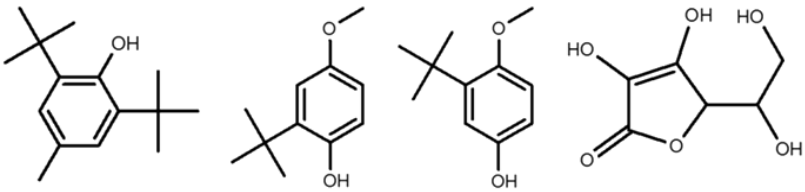


DPPH



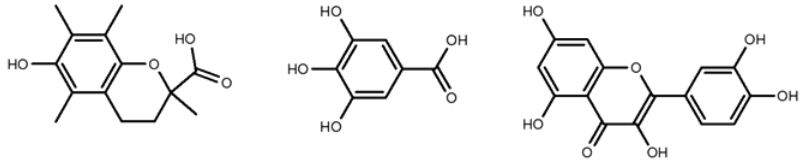
ABTS

สารอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)



(A) (B) (C) (D)

สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ (A) Butylate hydroxytoluene (BHT), (B) 2-*tert*-Butyl-4-methoxyphenol, (C) 3-*tert*-butyl-4-methoxyphenol โดย (B) และ (C) คือสารในกลุ่ม Butylate hydroxyanisole (BHA), (D) วิตามินซี (Ascorbic acid)



(E) (F) (G)

สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ (E) trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), (F) gallic acid, (E) quercetin (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one)

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

เอกสารอ้างอิง

1. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999;12(4):564-82.
2. Thongson C, Davidson PM, Mahakarnchanakul W, Vibulsresth P. Antimicrobial effect of Thai spices against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104. J Food Prot 2005;68(10):2054-8.
3. Pezzuto JM. Plant-derived anticancer agents. Biochem Pharmacol 1997;53(2):121-33.
4. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Phcog Rev 2010;4(8):118-26.
5. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. Eur J Cancer. 1996;32A(1):30-8.
6. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet 1994;344(8924):721-4.
7. Perry G, Cash AD, Smith MA. Alzheimer disease and oxidative stress. J Biomed Biotechnol 2002;2(3):120-3.
8. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. Drugs Aging 2001;18(9):685-716.
9. Lebeau J, Furman C, Bernier JL, Duriez P, Teissier E, Cotelle N. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. Free Radic Biol Med 2000;29(9):900-12.
10. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 1999;26(9-10):1231-7.
11. Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. J Food Compos Anal 2011;24(7):1043-8.
12. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci 1997;2(4):152-9.
13. Kalaycioglu Z, Erim FB. Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. Food Chem 2017;221:496-507.

14. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 1999;64(4):555-9.
15. Kamtekar S, Keer V, Patil V. Estimation of phenolic content, flavonoid content, antioxidant and alpha amylase inhibitory activity of marketed polyherbal formulation. J App Pharm Sci 2014;4(9):61-5.
16. Hilton J. Antioxidants: function, types and necessity of inclusion in pet foods. Can Vet J 1989;30:682-4.
17. Yehye WA, Rahman NA, Ariffin A, Abd HSB, Alhadi AA, Kadir FA, et al. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): a review. Eur J Med Chem 2015;101:295-312.
18. van den Berg R, Haenen GRMM, van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chem 1999;66(4):511-7.