การพัฒนาระบบอิมัลชันสำหรับทดสอบประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันโดยใช้สารสกัดดอกอัญชันและน้ำมันรำข้าวเป็นโมเดล

Development of Emulsion System for Antioxidation Capability Assay using Butterfly Pea Flower and Rice Bran Oil Extracts to Model

นพวัฒน์ เพ็งคำศรี*, สุธีรา ญานะโส, ปารภัทร โศภารักษ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
*Email : noppawat.pengkumsri@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบอิมัลชันที่สามารถเตรียมได้ง่าย ใช้ต้นทุนต่ำ และมีความคงตัว สำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในโมเดลที่มีขั้ว โดยใช้สารสกัดดอกอัญชันและน้ำมันรำข้าว ผลพบว่าอิมัลชันในรูปแบบ oil-in-water เตรียมได้จากทวีน 80 และโพรพิลลีนไกลคอลมีความคงตัว 7 วัน ผลการต้านออกซิเดชันของอิมัลชัน พบว่าสารสกัดดอกอัญชันแสดงฤทธิ์ไม่ต่างกันในตัวทำละลายเปรียบเทียบและระบบอิมัลชัน ส่วนน้ำมันรำข้าวจะแสดงฤทธิ์ในระบบอิมัลชันที่ดีกว่าในตัวทำละลายเปรียบเทียบ นอกจากนี้อิมัลชันของสารสกัดผสมแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดดอกอัญชัน ประโยชน์ของการศึกษานี้จะนำไปสู่การนำระบบอิมัลชันไปใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในโมเดลอื่น ๆ ต่อไป

คำสำคัญ : ดอกอัญชัน น้ำมันรำข้าว อิมัลชัน

Abstract

The aims of this study were to develop emulsion system which simply preparation, low cost and stable for polar *in vitro* antioxidant investigation, using butterfly pea flower and rice bran oil extracts. The results showed that developed emulsion were oil-in-water system, and stable for 7 days. The antioxidant activities of emulsion showed that activities of butterfly pea flower extracts in comparative solvent and emulsion were not different while activities of rice bran oil extracts in emulsion exhibited greater than comparative solvent. Besides, emulsion mixtures of extracts exhibited antioxidant activities upon dose dependent of butterfly pea flower extracts. These beneficial results may lead to developed-emulsion systems for biological investigation using other models.

Keywords : Butterfly pea flower, Rice bran oil, Emulsion

บทนำ

ความเครียดออกซิเดชันก่อให้เกิดอนุมูลอิสระมาทำลายความสมดุลของระบบสิ่งมีชีวิต โดยอนุมูลอิสระมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาเคมีและสามารถทำลายสารชีวภาพได้ทุกชนิด ส่งผลทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บหรือถูกทำลาย เป็นสาเหตุนำมาซึ่งโรคได้หลายอย่าง เช่น ความเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อต่าง ๆ การอักเสบเรื้อรังหรือโรคมะเร็ง (วรพล เองวานิช, 2555: 1-40) สารต้านอนุมูลอิสระมีคุณสมบัติต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยกลไกการให้ไฮโดรเจน การให้อิเล็กตรอน และการคอนจูเกต (Heim et al., 2002: 572-584; Nimse and Pal, 2015: 27986-28006) ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติในการควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์และสารชีวภาพได้

สารพฤกษเคมีเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระภายนอก ทำหน้าที่ช่วยสารต้านอนุมูลอิสระภายในที่มีอยู่อย่างจำกัด กลุ่มสารพฤกษเคมีต้านอนุมูลอิสระเฟสน้ำที่โดดเด่น คือ สารกลุ่มแคโร ทีนอยด์และฟีนอลิก และเฟสน้ำมัน คือ วิตามินอีและเนเชอรอลออยด์ (Shalaby and Shanab, 2013: 528-539) ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพโดยใช้สารพฤกษเคมีทั้งรูปแบบแยกและผสมระหว่างเฟสน้ำและน้ำมันเป็นองค์ประกอบหลักเพื่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ ดอกอัญชันเป็นสมุนไพรไทยที่อุดมไปด้วยรงควัตถุสีน้ำเงินถึงม่วง ประกอบไปด้วยสารกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแอนโธไซยานิน ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในเฟสน้ำที่ดี (Wongs-Aree et al., 2006: 437-442) น้ำมันรำข้าวเป็นอีกหนึ่งวัตถุดิบที่อุดมไปด้วยสารในกลุ่มโทโคไตรอีนอล โทโคเฟอรอล และแกมมา-ออไรซานอล ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในเฟสน้ำมันที่ดีมาก (Pengkumsri et al., 2015: 493-501)

แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันพื้นฐานในหลอดทดลอง (*in vitro*) เช่น DPPH assay, ABTS assay, FRAP assay, nitric oxide scavenging assay, superoxide radical scavenging assay และ ion chelation assay เป็นต้น (ชลธิดา เทพหินลัพ, 2555: 1-49) เหมาะสำหรับการทดสอบสารที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีเท่านั้น เนื่องจากส่วนผสมละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว จึงเป็นข้อจำกัดในการทดสอบสารที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ไม่ดี ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาใช้ระบบอิมัลชันมาแก้ไขปัญหานี้ โดย Laguerre et al. (2010, 2869-2876) ได้นำเสนอแนวทางการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารกลุ่มฟีนอลิกที่ละลายน้ำได้น้อยด้วยเทคนิคที่เรียกว่า phenolipid คือ การใช้ระบบอิมัลชันในรูปแบบ oil-in-water ผลพบว่าปฏิกิริยาไม่ถูกรบกวนและสามารถแสดงฤทธิ์ที่ดีในการทดสอบ แต่การศึกษานี้ยังมีข้อเสียคือ ใช้สารทำอิมัลชันหลายชนิดและมีราคาแพง

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเห็นแนวทางการพัฒนาระบบอิมัลชันเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารพฤกษเคมีในรูปแบบผสมระหว่างสารสกัดส่วนที่ละลายได้ดีในน้ำ และสารสกัดส่วนที่ละลายได้ดีในน้ำมัน โดยสามารถทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทั้งสองเฟสในเวลาเดียวกันด้วยระบบที่เตรียมได้ง่ายและใช้ต้นทุนต่ำ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้จะนำสารสกัดดอกอัญชันและน้ำมันรำข้าวมาใช้เป็นโมเดลทดสอบ นอกจากนี้ระบบอิมัลชันของสารพฤกษเคมีสองเฟสที่ต่างกันที่เตรียมได้ยังสามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นโภชนเภสัชภัณฑ์ในรูปแบบแคปซูลนิ่ม (soft capsule) หรือนำไปผสมกับอนุภาคตัวพา (carrier particle) เพื่อพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบผงสเปรย์แห้ง (spray dried powder) ได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมและการสกัดสารพฤกษเคมีจากดอกอัญชัน

ทำการอบดอกอัญชันที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดและทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 0.1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริกในเอทานอล (15:85) โดยใช้ผงดอกอัญชันบด 1 ส่วน และตัวทำละลายสกัด 10 ส่วน ทำการสกัดด้วยการปั่นที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปกรองและทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2. การเตรียมและการสกัดสารพฤกษเคมีจากรำข้าว

นำรำข้าวไปอบทำลายเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการคัดขนาดอนุภาคด้วยแร่งเบอร์ 60-mesh จากนั้นทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน โดยใช้ผงรำข้าว 1 ส่วน และตัวทำละลายสกัด 10 ส่วน ทำการสกัดด้วยการปั่นที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปกรองและทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3. การวิเคราะห์สารพฤกษเคมี

3.1 การวิเคราะห์สารสกัดดอกอัญชัน

เตรียมตัวอย่างสารสกัดในความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 0.1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริกและเอทานอล (15:85) เติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.2 นอร์มอล Folin-ciocalteu ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร คำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมเทียบเท่าสารมาตรฐานกรดกอลลิก (gallic acid)

3.2 การวิเคราะห์สารสกัดน้ำมันรำข้าว

เตรียมตัวอย่างสารสกัดในความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายเฟสเคลื่อนที่ กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง XL-9100 HPLC system ภายใต้สภาวะเฟสคงที่ คือ คอลัมน์ Luna® C-18 (4.6x250 มม.) เฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายผสมระหว่างเมทานอล อะซิโตไนไตรล์ ไดคลอโรมีเทน และกรด อะซิติก ในอัตราส่วน 55:44:3:3 ตามลำดับ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ คือ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร ทำการเปรียบเทียบชนิดและปริมาณสารกับสารมาตรฐานแกมมา-ออไรซานอล

4. การเตรียมและประเมินระบบอิมัลชัน

เตรียมระบบอิมัลชันโดยการเลือกชนิดอิมัลซิไฟเออร์และสัดส่วนที่เหมาะสม ได้แก่ ทวีน 80 (Tween 80) และ ทวีน 60 (Tween 60) จากนั้นผสมสัดส่วนระหว่างอิมัลซิไฟเออร์ที่เลือกได้กับโพรพิลลีนไกลคอลในการละลายสารสกัด โดยสารสกัดดอกอัญชันจะละลายในโพรพิลลีนไกลคอล และน้ำมันรำข้าวจะละลายในสารผสมระหว่างอิมัลซิไฟเออร์กับโพรพิลลีนไกลคอลในอัตราส่วนที่เหมาะสม อิมัลชันถูกเตรียมด้วยการปั่นที่ความเร็วรอบ 600 รอบต่อนาที จากนั้นทำการผสมส่วนที่ละลายน้ำได้และละลายน้ำไม่ได้เพื่อให้ได้อิมัลชันที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดดอกอัญชัน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อน้ำมันรำข้าว (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนี้ 1:0, 0:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1

และ 5:0 จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและทำการประเมินการแยกชั้นของระบบอิมัลชันที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยการขจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$

เตรียมตัวอย่างทดสอบในความเข้มข้นที่เหมาะสม เติมตัวอย่าง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate จากนั้นเติมสารละลายอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร คำนวณความสามารถในการขจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ เทียบเท่าสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (trolox)

6. การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและมีการเปรียบเทียบผลมากกว่า 2 กลุ่มขึ้นไป จึงใช้การทดสอบทางสถิติ one way analysis of variance (one way ANOVA) สำหรับการวิเคราะห์ความแตกต่างในครั้งนี้ด้วยโปรแกรม SPSS V.17.0 โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (α=0.05)

ผลการวิจัย

1. ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดดอกอัญชัน

สารสกัดดอกอัญชัน จำนวน 5 ขวด ที่ผ่านการสกัดในแต่ละครั้ง จำนวน 5 ครั้ง แสดงปริมาณฟีนอลิกรวมเทียบเท่ากรดกอลลิก เท่ากับ 130.59±6.76, 149.7±8.74, 146.51±7.58, 140.4±6.58 และ 144.15±5.46 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด ซึ่งแสดงเป็นค่าเฉลี่ย เท่ากับ 142.27±7.36 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด นอกจากนี้สามารถแสดงความเที่ยงในกระบวนการสกัดด้วยค่าร้อยละความแปรปรวนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 5.17

2. ปริมาณแกมมา-ออไรซานอลในน้ำมันรำข้าว

น้ำมันรำข้าวอุดมไปด้วยสารแกมมา-ออไรซานอล ซึ่งมีองค์ประกอบของสาร 4 ชนิด ได้แก่ cycloartenyl ferulate, 24-methylene cycloartanyl ferulate, campesteryl ferulate และ β-sitosteryl ferulate จากการสกัดแต่ละครั้ง จำนวน 5 ครั้ง แสดงปริมาณแกมมา-ออไรซานอล เท่ากับ 10.17±0.20, 12.62±0.18, 11.11±0.22, 10.45±0.23 และ 12.15±0.20 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด ซึ่งแสดงเป็นค่าเฉลี่ย เท่ากับ 11.30±1.06 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด สามารถแสดงความเที่ยงในกระบวนการสกัดด้วยค่าร้อยละความแปรปรวนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 9.39 นอกจากนี้ยังมีการทำการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ ในวันเดียวกัน (intra day) และต่างวัน (inter day) สามารถแสดงผลของความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ด้วยค่าร้อยละความแปรปรวนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 1.97 และ 2.20 ตามลำดับ

3. อิมัลชันสารสกัดดอกอัญชันและน้ำมันรำข้าว

การเตรียมอิมัลชันเฟสน้ำมัน พบว่า การใช้ทวีน 80 ทำให้ได้อิมัลชันที่ดีที่สุดโดยมีลักษณะสีเหลืองขุ่นเล็กน้อย ส่วนอิมัลชันที่ใช้ทวีน 60 ทำให้ได้อิมัลชันที่มีลักษณะสีเหลืองขุ่นมาก ซึ่งไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เตรียมอิมัลชันผสม ผลดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นทวีน 80 จึงถูกนำไปศึกษาผสมกับ โพรพิลลีนไกลคอลในอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อทำให้สามารถผสมกับเฟสน้ำได้ ผลพบว่า ทวีน 80: โพรพิลลีนไกลคอลในอัตราส่วน 9:1 ทำให้ได้อิมัลชันที่คงตัวมากที่สุด ผลดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อนำไปทดสอบผสมเฟสน้ำและเฟสน้ำมัน พบว่า อิมัลชันที่ได้จะมีความเข้มของสีแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดดอกอัญชัน ซึ่งระบบอิมัลชันมีความคงตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยไม่เกิดการแยกชั้น ผลดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 1 ผลของการใช้อิมัลซิไฟเออร์เพื่อการเตรียมอิมัลชันบรรจุน้ำมันรำข้าว

สารเคมี	ร้อยละ	ลักษณะอิมัลชัน	ความคงตัว
ทวีน 80	100	อิมัลชันสีเหลืองขุ่นเล็กน้อย	7 วัน
ทวีน 60	100	อิมัลชันสีเหลืองขุ่นมาก	7 วัน
ทวีน 80:ทวีน 60	50:50	อิมัลชันสีเหลืองขุ่นมาก	7 วัน

ตารางที่ 2 ผลการผสมอัตราส่วนอิมัลซิไฟเออร์ที่เลือกกับโพรพีลลีนไกลคอลบรรจุน้ำมันรำข้าว

สารเคมี	อัตราส่วน	ลักษณะอิมัลชัน	ความคงตัว
ทวีน 80:โพรพิลลีนไกลคอล	5:1	อิมัลชันสีเหลืองขุ่น	แยกชั้นในวันที่ 3
ทวีน 80:โพรพิลลีนไกลคอล	7:1	อิมัลชันสีเหลืองขุ่นเล็กน้อย	แยกชั้นในวันที่ 5
ทวีน 80:โพรพิลลีนไกลคอล	9:1	อิมัลชันสีเหลืองขุ่นเล็กน้อย	ไม่แยกชั้นในวันที่ 7

ตารางที่ 3 ผลการผสมอัตราส่วนเฟสน้ำและเฟสน้ำมันในระบบอิมัลชัน

ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดดอกอัญชัน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันรำข้าว (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ลักษณะอิมัลชัน	ความคงตัว
1	0	สีน้ำเงินจาง ๆ	ไม่แยกชั้นในวันที่ 7
0	1	สีเหลืองขุ่นเล็กน้อย	ไม่แยกชั้นในวันที่ 7
1	1	สีน้ำเงินจาง ๆ	ไม่แยกชั้นในวันที่ 7
2	1	สีน้ำเงินจาง	ไม่แยกชั้นในวันที่ 7
3	1	สีน้ำเงินเข้ม	ไม่แยกชั้นในวันที่ 7
4	1	สีน้ำเงินเข้ม ๆ	ไม่แยกชั้นในวันที่ 7
5	1	สีน้ำเงินเข้มมาก	ไม่แยกชั้นในวันที่ 7
5	0	สีน้ำเงินเข้มที่สุด	ไม่แยกชั้นในวันที่ 7

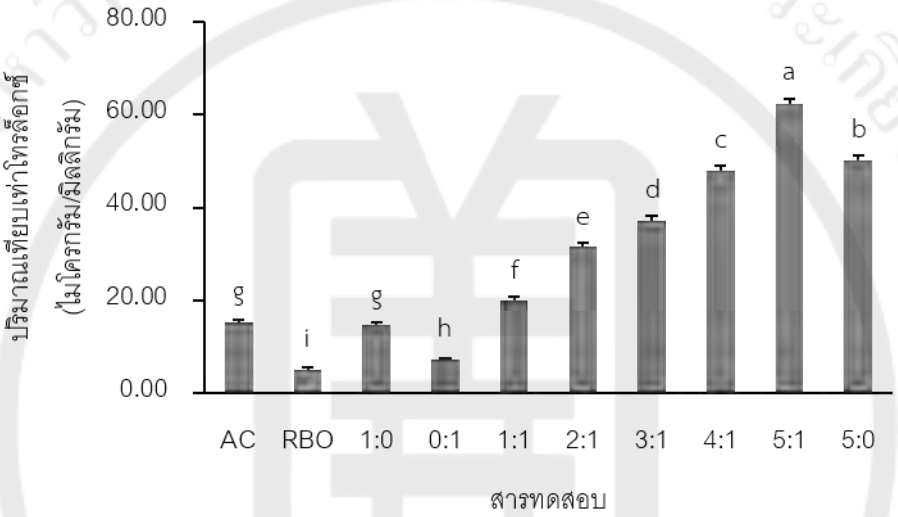
หมายเหตุ: สารสกัดดอกอัญชันละลายในโพรพิลลีนไกลคอล ส่วนน้ำมันรำข้าวละลายในทวีน 80 ต่อโพรพิลลีนไกลคอลในอัตราส่วน 9:1

4. ความสามารถในการขจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$

ความสามารถในการขจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดดอกอัญชันในตัวทำละลายปกติและระบบอิมัลชันแสดงค่าเทียบเท่าโทรล็อกซ์ที่ไม่แตกต่างกัน คือ 15.25±0.65 และ 14.62±0.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมสารทดสอบตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันรำข้าวในตัวทำละลายปกติแสดงค่าเทียบเท่าโทรล็อกซ์ที่น้อยกว่าน้ำมันรำข้าวในระบบอิมัลชันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) คือ 5.06±0.41 และ 7.16±0.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมสารทดสอบตามลำดับ นอกจากนี้สามารถเรียงลำดับความสามารถในการขจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ของอิมัลชันสารสกัดดอกอัญชันและน้ำมันรำข้าว ได้ดังนี้ อัตราส่วนสารสกัดดอกอัญชันต่อน้ำมันรำข้าว 5:1, 5:0, 4:1, 3:1, 2:1 และ 1:1 แสดงผล

เทียบเท่าโทรล็อกซ์ เท่ากับ 62.38±1.05, 50.21±1.02, 47.97±1.09, 37.01±1.08, 31.67±0.72 และ 19.94±0.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมอิมัลชัน ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าอิมัลชันของสารสกัดเดี่ยวแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) โดยอิมัลชันเดี่ยว ได้แก่ สารสกัดดอกอัญชันและน้ำมันรำข้าวแสดงผลเทียบเท่าโทรล็อกซ์ เท่ากับ 14.62±0.58 และ 7.16±0.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมอิมัลชัน ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1

รูปที่ 1 ความสามารถในการขจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ เทียบเท่าโทรล็อกซ์ของสารสกัดดอกอัญชัน น้ำมันรำข้าว และอิมัลชันผสมระหว่างสารสกัดดอกอัญชันและน้ำมันรำข้าว (AC คือ สารสกัดดอกอัญชัน RBO คือ น้ำมันรำข้าว) ค่า a, b, c, ... คือ ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ตามลำดับ



อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ผลจากการวิจัยพบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดดอกอัญชันเทียบเท่ากรดกอลลิก เท่ากับ 142.27±7.36 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด ซึ่งมีปริมาณมากกว่างานวิจัยของ Chayaratanasin et al. (2015: 27) ที่เป็นสารสกัดส่วนน้ำ 2.68 เท่า ผลดังกล่าวสัมพันธ์กับการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกที่เป็นรงควัตถุต้องมีคุณสมบัติที่มีขั้วและมีความเป็นกรด (Rodriguez-Saona and Wrolstad, 2001) ปริมาณแกมมา-ออไรซานอลที่ตรวจพบในน้ำมันรำข้าว เท่ากับ 11.30±1.06 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่างานวิจัยของข้าวไทยสามสายพันธุ์ที่แตกต่างกันโดย Pengkumsri et al. (2015: 493-501) ซึ่งมีปริมาณแกมมา-ออไรซานอลช่วง 17.54-18.49 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำมันรำข้าว

อิมัลซิไฟเออร์ที่ดีที่สุดในการเตรียมน้ำมันรำข้าว คือ ทวีน 80 ซึ่งมีลักษณะที่ดีและมีความ คงตัว นอกจากนี้อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายที่จะประสานสารสองเฟสเข้าด้วยกัน คือ 9:1 (ทวีน 80:โพรพิลลีนไกลคอล) อิมัลชันที่เตรียมได้มีขั้นตอนที่ง่าย ใช้ต้นทุนต่ำ และมีความคงตัว ซึ่งอยู่รูปแบบ oil-in-water โดยลักษณะอิมัลชันที่เตรียมได้มีลักษณะสีน้ำเงินซึ่งมาจากรงควัตถุของสารสกัดดอกอัญชัน นอกจากนี้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของอิมัลชันด้วยโมเดลที่มีขั้วโดยไม่เกิดการแยกชั้นและสามารถนำไปแปลผลได้ การศึกษาในครั้งนี้ใช้สารก่ออิมัลชันสองส่วน ส่วนที่ละลายน้ำได้ใช้โพรพิลลีนไกลคอลละลายสารสกัดดอกอัญชัน และส่วนที่ละลายน้ำมันได้ใช้โพรพิลลีน

ไกลคอลผสมทวีน 80 ละลายน้ำมันรำข้าว ซึ่งสอดคล้องกับระบบอิมัลชันที่ใช้อิมัลซิไฟเออร์ผสมทำให้เกิดอิมัลชันขนาดเล็กกว่าการใช้อิมัลซิไฟเออร์อย่างเดียวและสามารถบรรจุปริมาณน้ำมันรำข้าวได้สูงถึงร้อยละ 20 รวมทั้งยังมีความคงตัวและรักษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันรำข้าวได้ดีกว่าด้วย (Nguyen et al., 2013: 139-151)

สารสกัดดอกอัญชันในระบบอิมัลชันแสดงความสามารถในการต้านออกซิเดชันผ่านโมเดล ABTS assay ได้ไม่ต่างกันกับสารสกัดในตัวทำละลายปกติ โดยแตกต่างจากน้ำมันรำข้าวซึ่งแสดงความสามารถในการต้านออกซิเดชันในระบบอิมัลชันได้ดีกว่าสารสกัดในตัวทำละลายเปรียบเทียบ การเตรียมสารสกัดทดสอบด้วยระบบอิมัลชันในอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นของสารสกัดดอกอัญชันต่อน้ำมันรำข้าวในความเข้มข้นที่คงที่ โดยแสดงความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดดอกอัญชันเป็นความสัมพันธ์ในรูปแบบเส้นตรง ความสามารถในการต้านออกซิเดชันและยับยั้งอนุมูลอิสระเป็นผลจากสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งในสารสกัดดอกอัญชันแสดงถึงปริมาณฟีนอลิกรวมเทียบเท่ากรดกอลลิกที่สูง และน้ำมันรำข้าวแสดงถึงปริมาณแกมมา-ออไรซานอลที่สูงเช่นกัน จากผลการศึกษาในโมเดลทดสอบพบว่าสารสกัดดอกอัญชันและน้ำมันรำข้าวมีคุณสมบัติการให้อิเล็กตรอน ซึ่งเป็นกลไกพื้นฐานในการต้านออกซิเดชันและยับยั้งอนุมูลอิสระ (Heim et al., 2002: 572-584; Nimse and Pal, 2015: 27986-28006)

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารพฤกษเคมีที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายได้น้อยในโมเดลทดสอบที่มีขั้วสามารถทำการทดสอบได้อย่างไม่มีข้อกำจัดโดยการใช้ระบบอิมัลชันเข้ามาช่วย ซึ่งรูปแบบอิมัลชันที่เหมาะสมคือ oil-in-water ซึ่งเตรียมได้ง่ายและราคาถูกด้วยโพรพิลลีนไกลคอลและทวีน 80 โดยเฟสน้ำมันจะถูกห่อหุ้มเป็นวัฏภาคภายในและล้อมรอบด้วยวัฏภาคภายนอกที่เป็นน้ำ จึงทำให้ไม่เกิดการแยกชั้นและสามารถทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยสารที่เป็นเนื้อเดียวกัน (Asnaashari et al., 2014: 439-444) ผลการศึกษาในครั้งนี้จะนำไปสู่การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเพิ่มเติมในโมเดลอื่น ๆ เพื่อศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดดอกอัญชันและน้ำมันรำข้าว และนำไปพัฒนาเป็นโภชนเภสัชภัณฑ์ในรูปแบบแคปซูลนิ่ม (soft capsule) หรือนำไปผสมกับอนุภาคตัวพา (carrier particle) เพื่อพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบผงสเปรย์แห้ง (spray dried powder) ที่มีความคงตัวต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวพระเกียรติ ที่สนับสนุนทุนวิจัยพร้อมทั้งเอื้ออำนวยให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีและสนับสนุนการเผยแพร่ผลงานในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ชลธิดา เทพหินลัพ. (2555). *เทคนิคการตรวจวัดอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และดัชนีภาวะเครียดออกซิเดชัน*. พิมพ์ครั้งที่ 1 เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์.

วรพล เองวานิช. (2555). *อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ*. พิมพ์ครั้งที่ 1 เชียงใหม่: สมาร์ท โคทติ้งแอนด์ เซอร์วิส.

Asnaashari, M., Farhoosh, R., & Sharif, A. (2014). Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. *Food chemistry*, *159*, 439-444.

Chayaratanasin, P., Barbieri, M. A., Suanpairintr, N., & Adisakwattana, S. (2015). Inhibitory effect of *Clitoria ternatea* flower petal extract on fructose-induced protein glycation and oxidation-dependent damages to albumin *in vitro*. *BMC complementary and alternative medicine*, *15*(1), 27.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, *13*(10), 572-584.

Laguerre, M., López Giraldo, L. J., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M. C., Baréa, B., Weiss, J., et al. (2010). Relationship between hydrophobicity and antioxidant ability of "phenolipids" in emulsion: a parabolic effect of the chain length of rosmarinate esters. *Journal of agricultural and food chemistry*, *58*(5), 2869-2876.

Nguyen, H. H., Choi, K. O., Kim, D. E., KANG, W. S., & Ko, S. (2013). Improvement of oxidative stability of rice bran oil emulsion by controlling droplet size. *Journal of Food Processing and Preservation*, *37*(2), 139-151.

Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Advances*, *5*(35), 27986-28006.

Pengkumsri, N., Chaiyasut, C., Sivamaruthi, B. S., Saenjum, C., Sirilun, S., Peerajan, S., et al. (2015). The influence of extraction methods on composition and antioxidant properties of rice bran oil. *Food Science and Technology*, *35*(3), 493-501.

Rodriguez-Saona, L. E., & Wrolstad, R. E. (2001). Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. *Current protocols in food analytical chemistry*.

Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African journal of pharmacy and pharmacology*, *7*(10), 528-539.

Wongs-Aree, C., Giusti, M. M., & Schwartz, S. J. (2006). Anthocyanins derived only from delphinidin in the blue petals of *Clitoria ternatea*. *In IV International Conference on Managing Quality in Chains-The Integrated View on Fruits and Vegetables Quality*, *712*, 437-442.