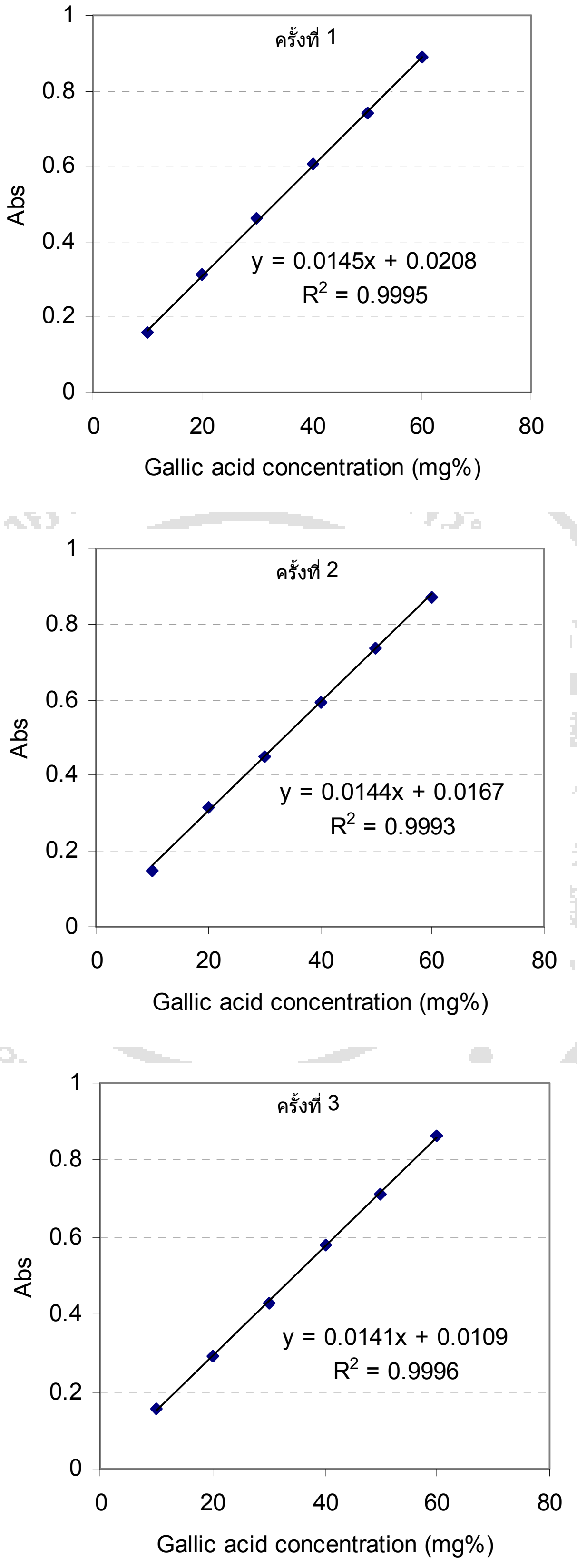
บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (total phenolic compounds) **ในยาหอม**

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในยาหอม ทำโดยการนำผงยาหอม 0.5 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ de-ionized water และ absolute ethanol 50 มล. แล้วทำปฏิกิริยากับสารละลาย 0.2 M Folin-Ciocalteau นำไปวัดปริมาณด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนมาคำนวณเป็นปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมโดยคิดเป็นปริมาณเทียบเท่ากับ gallic acid (โดยเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 10 – 60 mg%) เมื่อทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย phosphomolybdic-phosphotungstic acid สารนี้จะถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl groups ของ gallic acid และโดย total phenolic compounds ในตัวอย่างยาหอม ได้เป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินอมเขียวและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 760 nm

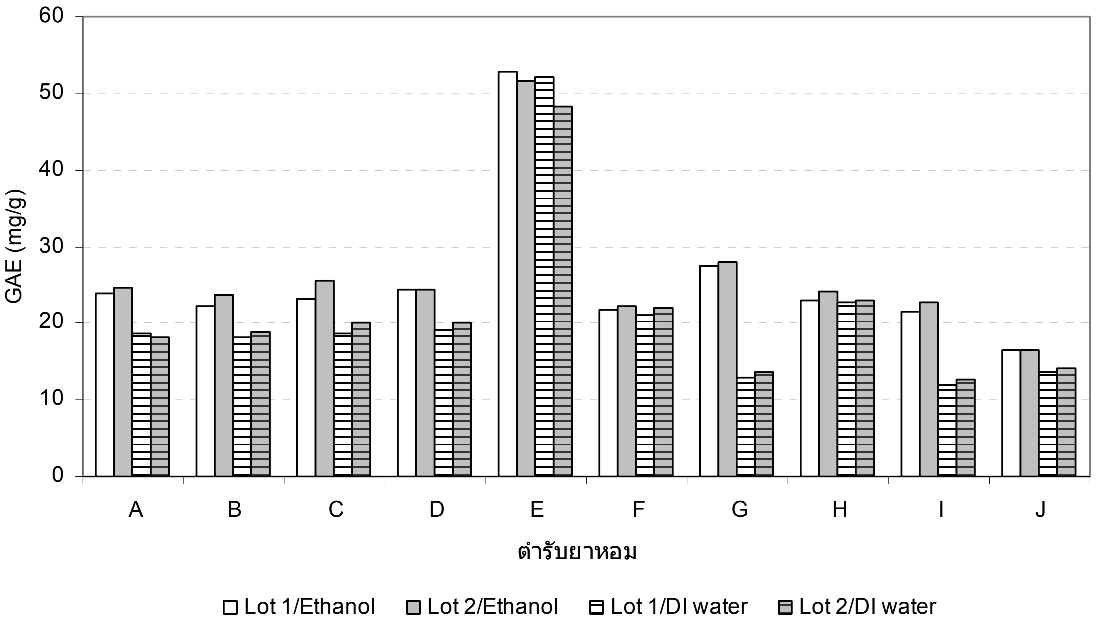
กราฟมาตรฐานของ gallic acid ในปฏิกิริยา Folin-Ciocalteu ทำการเตรียมทุกครั้งที่ศึกษาปริมาณ total phenolic compounds ในตัวอย่างเพื่อลดความแปรปรวนของการเจือจางสารก่อปฏิกิริยาและน้ำที่ใช้ในการทดลอง (ได้ค่า R^2 = 0.9995, 0.9993, 0.9996 แสดงผลดังภาพที่ 4.1) ผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลเฉลี่ยในตัวอย่างยาหอมทั้ง 10 ตำรับ ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอธานอล และน้ำ พบว่าตัวทำสกัดแต่ละชนิดให้ค่า GAE ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นตำรับยาหอม G และ I ซึ่งพบว่าใช้เอธานอลจะให้ค่า GAE สูงกว่าสกัดด้วยน้ำ และยาหอมแต่ละตำรับ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลไม่แตกต่างกัน ยกเว้นตำรับยาหอม E มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงกว่าตำรับอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) แสดงค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง ดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid

ตารางที่ 4.1 ค่า gallic acid equivalent เฉลี่ย (mean ± SD, n = 3)

ตัวอย่างยาหอม	GAE (mg/g dry weight)			
	สกัดด้วย ethanol		สกัดด้วย DI water	
	Lot 1	Lot 2	Lot 1	Lot 2
A	23.9 ± 2.3	24.7 ± 3.6	18.5 ± 4.2	18.2 ± 3.1
B	22.1 ± 3.4	23.6 ± 3.7	18.2 ± 3.9	19.0 ± 4.0
C	23.1 ± 3.6	25.5 ± 5.7	18.6 ± 2.4	20.0 ± 2.7
D	24.5 ± 6.2	24.3 ± 5.6	19.2 ± 3.2	20.1 ± 4.5
E	52.9 ± 6.7	51.6 ± 5.4	52.1 ± 12.5	48.4 ± 11.6
F	21.9 ± 2.2	22.3 ± 2.8	21.1 ± 1.7	22.0 ± 2.4
G	27.5 ± 3.7	28.0 ± 3.8	12.9 ± 1.7	13.7 ± 2.1
H	22.9 ± 2.5	24.0 ± 2.6	22.8 ± 2.6	23.0 ± 2.6
I	21.5 ± 2.6	22.7 ± 2.6	11.9 ± 3.6	12.7 ± 4.2
J	16.6 ± 0.9	16.5 ± 1.8	13.7 ± 2.5	14.0 ± 2.5

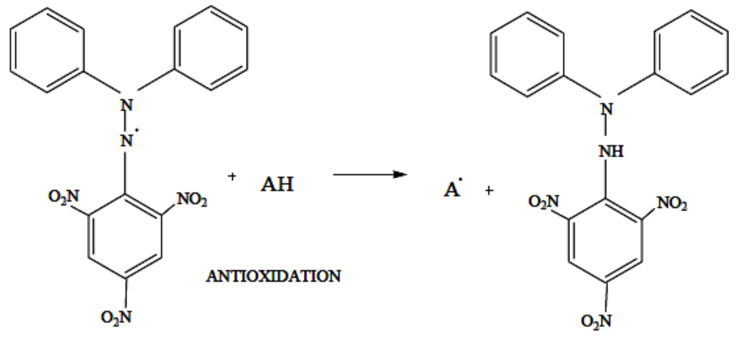


ภาพที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลเฉลี่ย (n = 3) คิดเป็นค่า gallic acid เทียบเท่า (GAE) หน่วยเป็น mg/g ของผงยาหอม

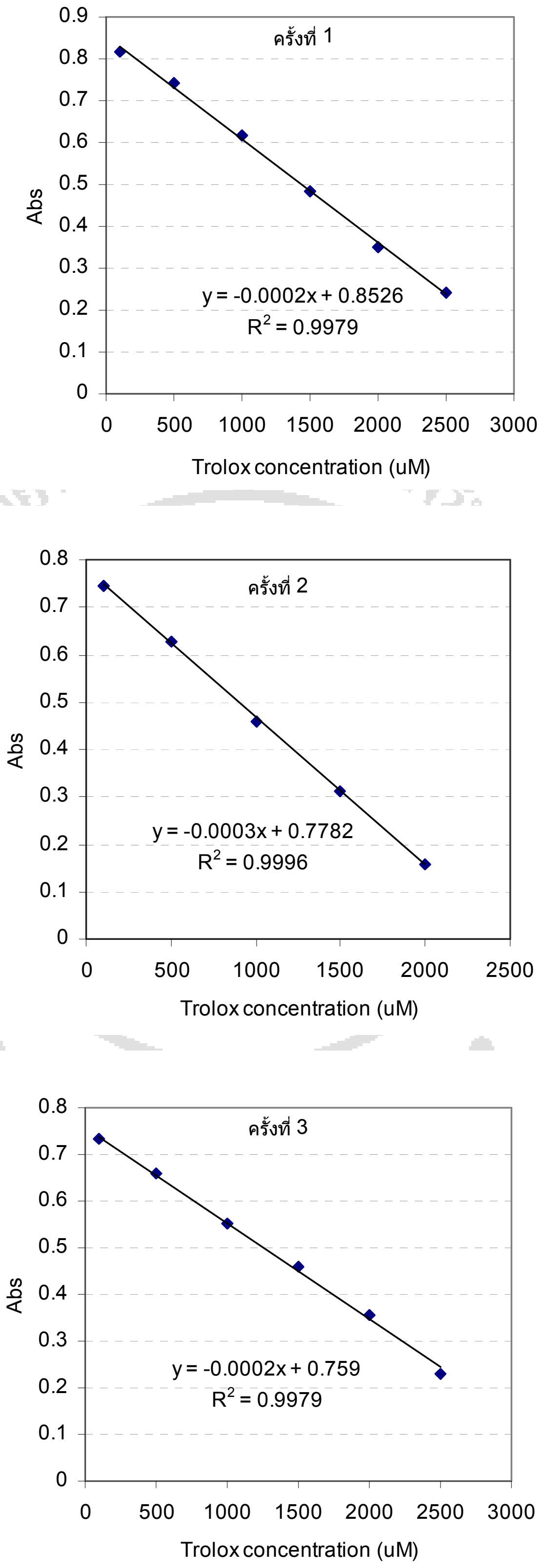
ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลเฉลี่ยของยาหอมทั้ง 10 ตำรับ พบว่ายาหอม 9 ตำรับสกัดด้วยเอธานอล มีค่า GAE เฉลี่ยอยู่ในช่วง 16.5 ± 1.8 ถึง 28.0 ± 3.8 mg/g และสกัดได้ด้วยน้ำมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 11.9 ± 3.6 ถึง 22.8 ± 2.6 mg/g ส่วนยาหอม E พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลเฉลี่ยสูงกว่าตำรับอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) โดยเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิดให้ผลไม่แตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 48.4 ± 11.6 ถึง 52.9 ± 6.7 mg/g

2. **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยาหอมศึกษาโดยวิธี** DPPH radical scavenging assay

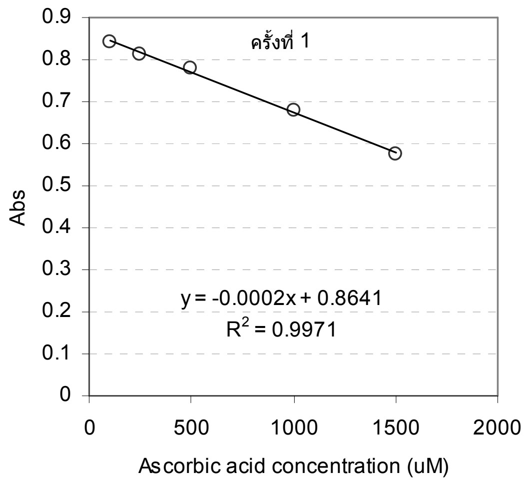
DPPH radical scavenging assay เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยให้สารสกัดยาหอมทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH•) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร มีสีม่วง ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm เมื่อ DPPH• ได้รับอิเล็คตรอน จะเปลี่ยนเป็น DPPH:H ซึ่งมีสีเหลืองนวล และไม่ใช่อนุมูลอิสระอีกต่อไป หากในตัวอย่างมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถให้อิเล็คตรอนหรือโปรตอนแก่ DPPH• ได้ ก็จะยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากตาม สีม่วงของอนุมูลอิสระจะจางลง ดังนั้นการลดลงของอนุมูลอิสระ DPPH• จึงเป็นดัชนีที่สามารถวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่ใช้ทดสอบได้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างติดตามโดยวัดการค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH• ที่ลดลงเทียบปริมาณกับกราฟมาตรฐานที่ทำปฏิกิริยาในลักษณะเดียวกันโดยใช้สารละลายมาตรฐาน 2 ชนิด คือ วิตะมินอี (ใช้อนุพันธ์สังเคราะห์ของวิตะมินอี ได้แก่ Trolox ซึ่งมีคุณสมบัติเหมือนวิตะมินอี แต่มีค่าการละลายน้ำมากกว่า) และสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานอีกชนิดหนึ่ง คือ วิตะมินซี (ascorbic acid)

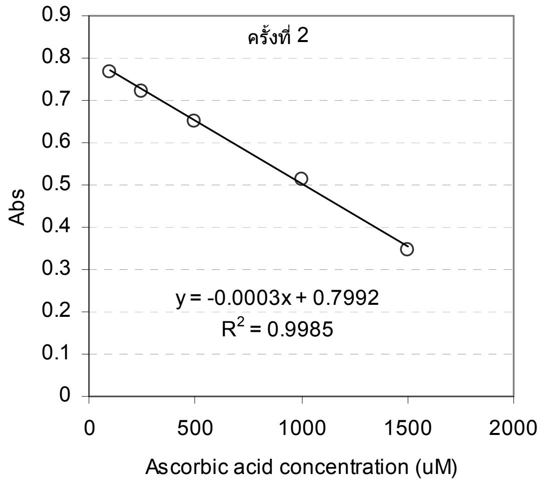


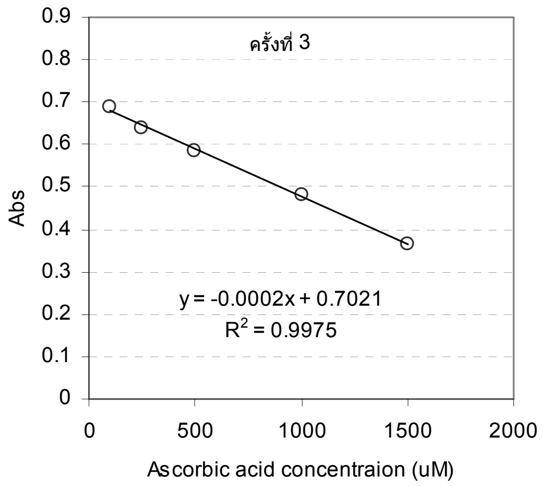
สมการข้างต้นแสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ DPPH• (สีม่วง) รับโปรตอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นไม่มีสี ส่งผลให้การดูดกลืนแสงลดลงตามปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 4.3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ทำปฏิกิริยากับ DPPH• radical





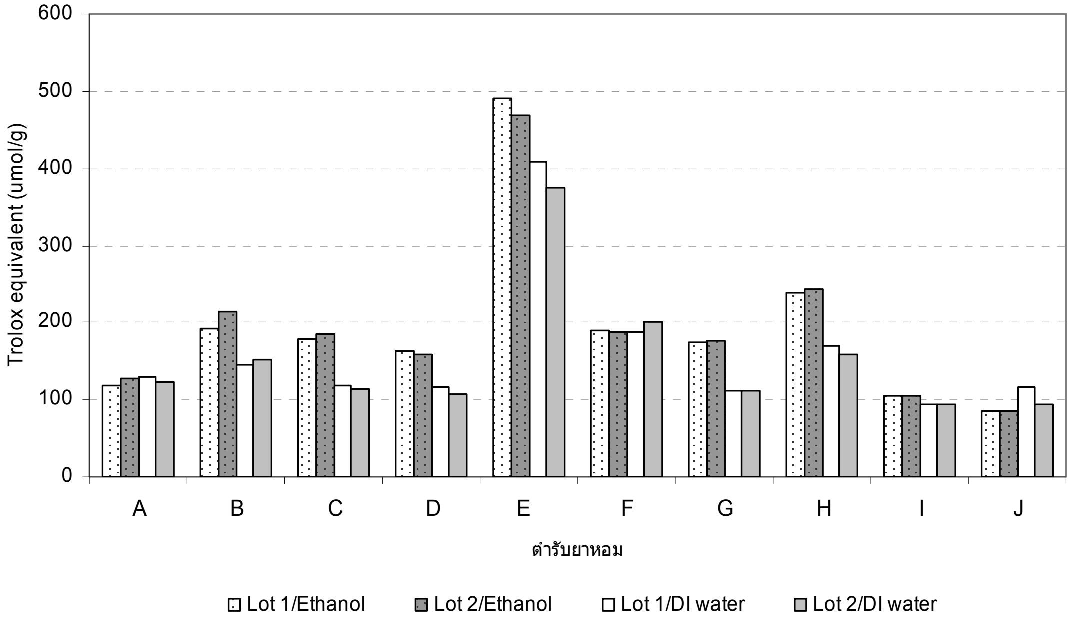


ภาพที่ 4.4 กราฟมาตรฐานของสารละลาย ascorbic acid ทำปฏิกิริยากับ DPPH• radical

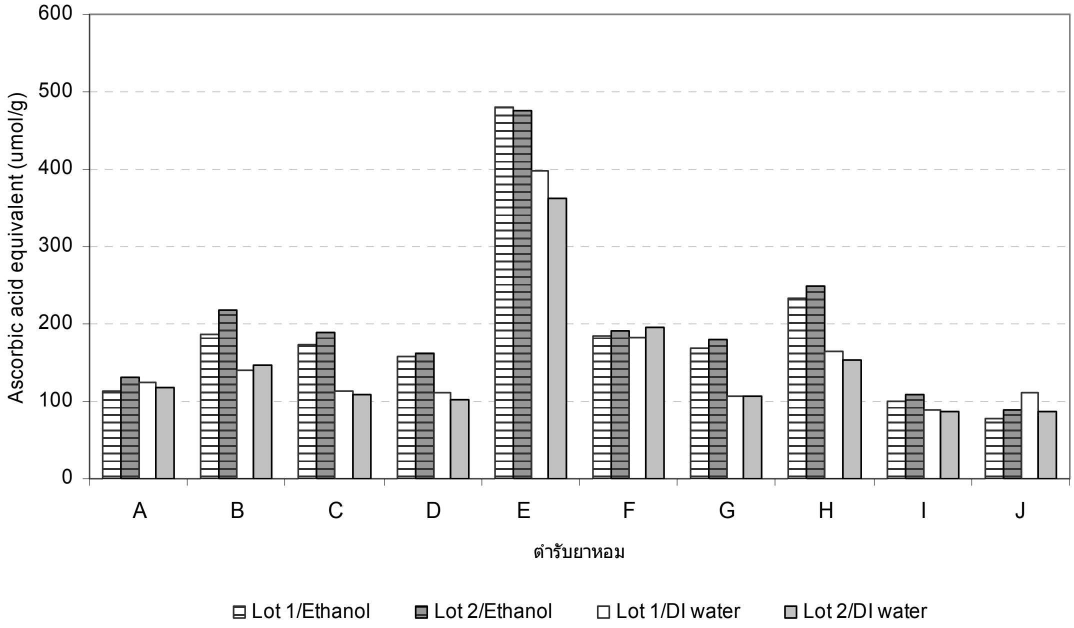
จากผลการวัดค่าการดูดกลืนของสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH• เมื่อเติมสารสกัดยาหอม และคำนวณเทียบเป็นฤทธิ์ของ Trolox และ ascorbic acid โดยใช้เส้นกราฟมาตรฐานที่เตรียมขึ้นในแต่ละครั้งที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.3 – 4.4 โดยกราฟมาตรฐานของ Trolox มี R^2 = 0.9979, 0.9996, 0.9979 และกราฟมาตรฐานของ ascorbic acid มี R^2 = 0.9971, 0.9985, 0.9975) ได้ผลดังภาพที่ 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อไม่นับรวมยาหอมตำรับ E ซึ่งมีค่า TE และ AE สูงกว่าทุกตำรับอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) สารสกัดด้วยเอธานอล มีค่า Trolox equivalent ตั้งแต่ 84 ± 20 micromol/g ถึง 244 ± 84 micromol/g และ ค่า ascorbic equivalent มีค่าตั้งแต่ 78 ± 27 ถึง 248 ± 85 micromol/g โดยแต่ละ lot ที่ทำการวิเคราะห์ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ จึงเป็นการกล่าวรวมผลทั้ง 2 lot ส่วนสารสกัดด้วยน้ำ จะให้ค่าต่ำกว่าเล็กน้อย และมีแนวโน้มไปในทางเดียวกับสารสกัดด้วยเอธานอลดังนี้ คือ ค่า Trolox equivalent มีค่าตั้งแต่ 93 ± 57 ถึง 200 ± 57 micromol/g และ ค่า ascorbic equivalent มีค่าตั้งแต่ 87 ± 43 ถึง 248 ± 85 micromol/g สำหรับยาหอม E ให้ค่าต่างๆ มากกว่าตำรับอื่นๆ โดยมีค่า TE เฉลี่ยสูงกว่าตำรับอื่นๆ ประมาณ 2.5 เท่า (374 ± 85 ถึง 492 ± 120 micromol/g) โดยสารสกัดด้วยเอธานอลให้ผลสูงกว่าเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากเอธานอลเป็นสารกึ่งมีขั้วที่สามารถละลายสารประกอบฟีนอลได้ดีกว่าน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในการทดลองแรก ที่ตัวสารสกัดด้วยเอธานอลให้ค่า GAE มากกว่า ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากขึ้นตาม

เมื่อเปรียบเทียบจากกราฟที่ได้จากการคำนวณเทียบให้เป็นค่า TE และ AE พบว่า ให้ผลใกล้เคียงกันเมื่อคิดในหน่วยโมล และมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน เนื่องจากเป็นการนำข้อมูลชุดเดียวกันมาแปลงค่า ซึ่งได้ค่าใกล้เคียงกันแสดงว่า สารมาตรฐานทั้งสองชนิดนี้ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• เหมือนๆ กัน คือ Trolox ทำหน้าที่เป็น hydrogen atom donation ให้แก่อนุมูลอิสระ DPPH• เช่นเดียวกับ ascorbic acid ซึ่งมีหมู่ hydroxyl ที่สามารถให้ hydrogen atom ในสภาวะที่ศึกษา ผลที่ได้นี้สามารถนำมาคำนวณเพื่อหาว่า เมื่อรับประทานยาหอมหนึ่งกรัมจะได้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับรับประทานวิตะมินแต่ละชนิดเป็นปริมาณกี่มิลลิกรัม อย่างไรก็ตาม ผลนี้เป็นเพียงผลการศึกษาในหลอดทดลองเท่านั้น เนื่องจากผลที่ได้ในร่างกายที่แท้จริงยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ มากมายเช่น ปริมาณสารที่ดูดซึมได้ในทางเดินอาหาร ความคงตัวของสารต่างๆ เมื่อเข้าสู่ร่างกาย เป็นต้น



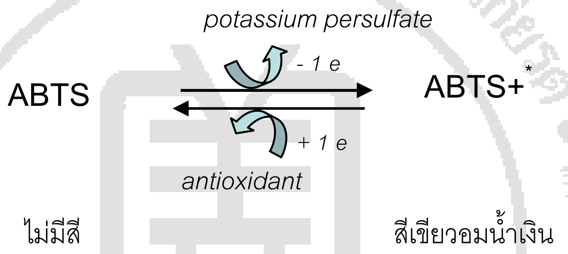
ภาพที่ 4.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ของยาหอมตำรับต่างๆ คำนวณเป็นค่าเฉลี่ย (n = 3) เทียบเท่าสาร Trolox (TE) ในหน่วย micromol/g



ภาพที่ 4.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH• ของยาหอมตำรับต่างๆ คำนวณเป็นค่าเฉลี่ย (n = 3) เทียบเท่าสาร ascorbic acid (AE) ในหน่วย micromol/g

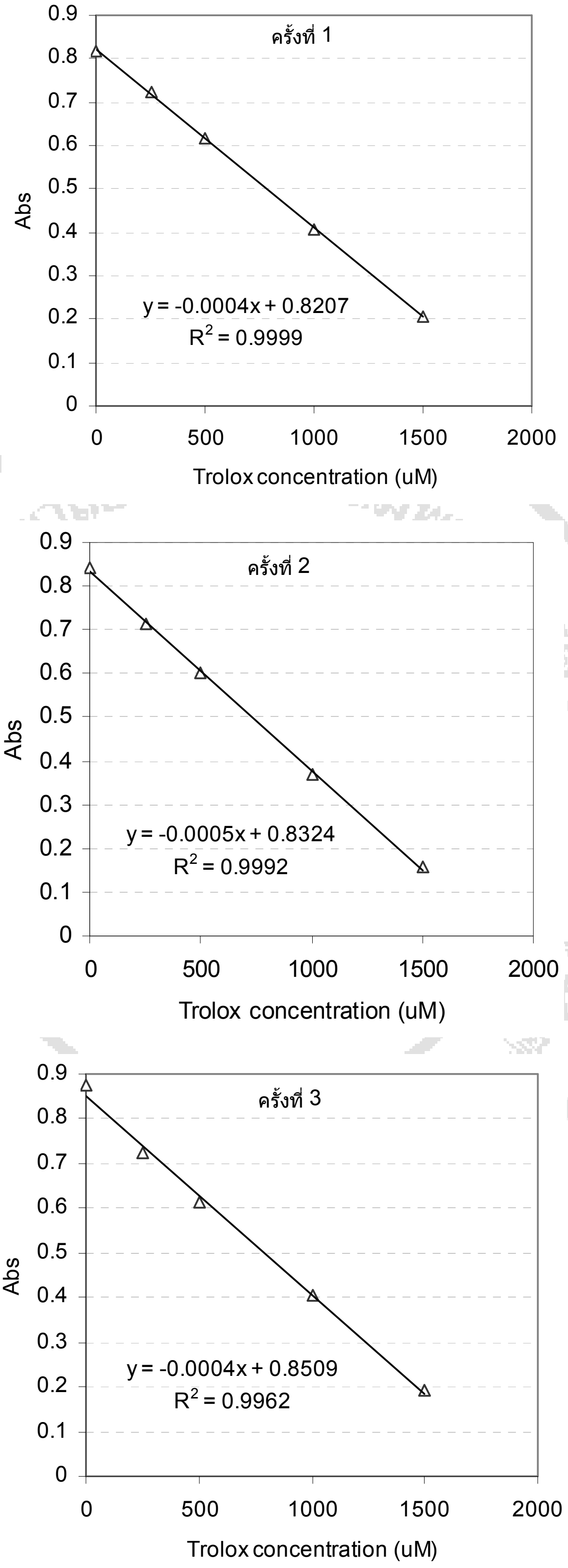
3. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยาหอมศึกษาโดยวิธี ABTS assay

ABTS assay เป็นวิธีใช้หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอีกวิธีหนึ่ง โดยต้องเตรียมอนุมูลอิสระของ ABTS radical ($ABTS^{+\bullet}$) เป็นอนุมูลอิสระชนิดประจุบวก จากสาร 2,2-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) โดยการนำมาออกซิไดซ์ด้วยสารละลาย potassium persulfate ข้ามคืน จนได้สารละลายเขียวอมน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 744 นาโนเมตร นำสารสกัดทำปฏิกิริยากับสารละลาย $ABTS^{+\bullet}$ ควบคู่กับสารละลายมาตรฐาน Trolox และ ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลที่ได้จะแสดงในรูปของ Trolox equivalent antioxidant capacity (TE) หรือ ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AE) โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะไปสลาย radical ที่เกิดขึ้นโดยการให้อิเล็คตรอน ทำให้สีของ $ABTS^{+\bullet}$ radical จางลงตามปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่

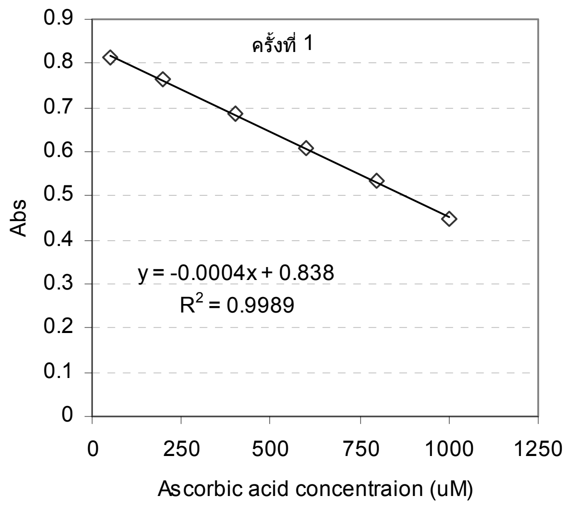


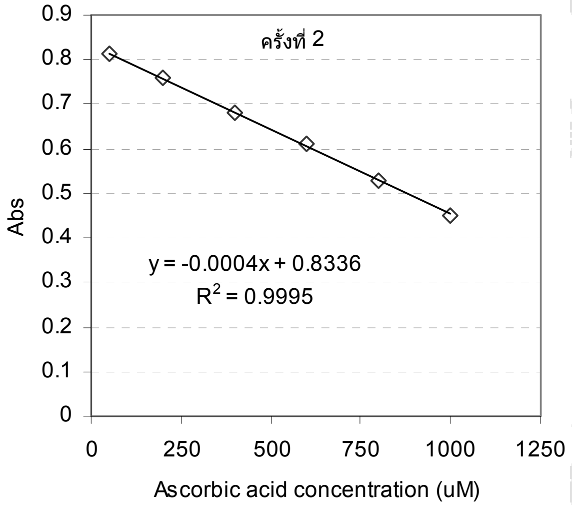
การทดลองนี้ ทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH assay โดยสร้างกราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระให้ทำปฏิกิริยากับสารละลาย $ABTS^{+\bullet}$ radical จะพบว่าสีของ $ABTS^{+\bullet}$ radical จางง่ายกว่าของสารละลาย DPPH• เมื่อใช้สารมาตรฐานความเข้มข้นเท่ากัน ดังนั้นค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานทั้งสองชนิดจึงมีค่าต่ำกว่า

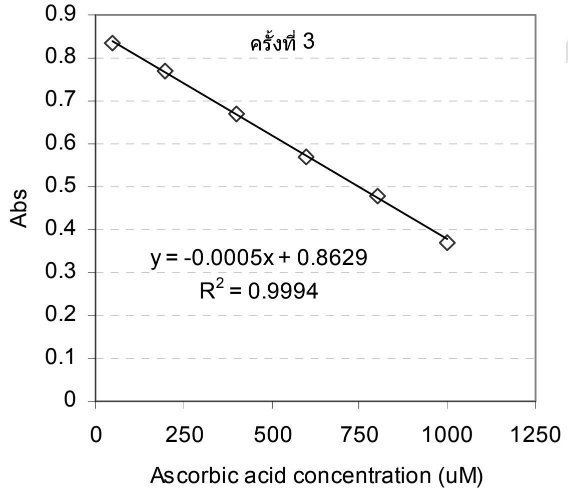
ภาพที่ 4.7 และ 4.8 เป็นกราฟมาตรฐานที่ทำในแต่ละครั้งของการทดลอง (เพื่อการควบคุมให้มีอนุมูลอิสระในหลอดต่างๆ เท่ากัน) ได้กราฟมาตรฐานของ Trolox มีค่า R^2 = 0.9999, 0.9992 และ 0.9962 และ ได้กราฟมาตรฐานของ ascorbic acid มีค่า R^2 = 0.9989, 0.9995 และ 0.9994 ของการทดลองครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.7 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ทำปฏิกิริยากับ ABTS$^{+\bullet}$ radical





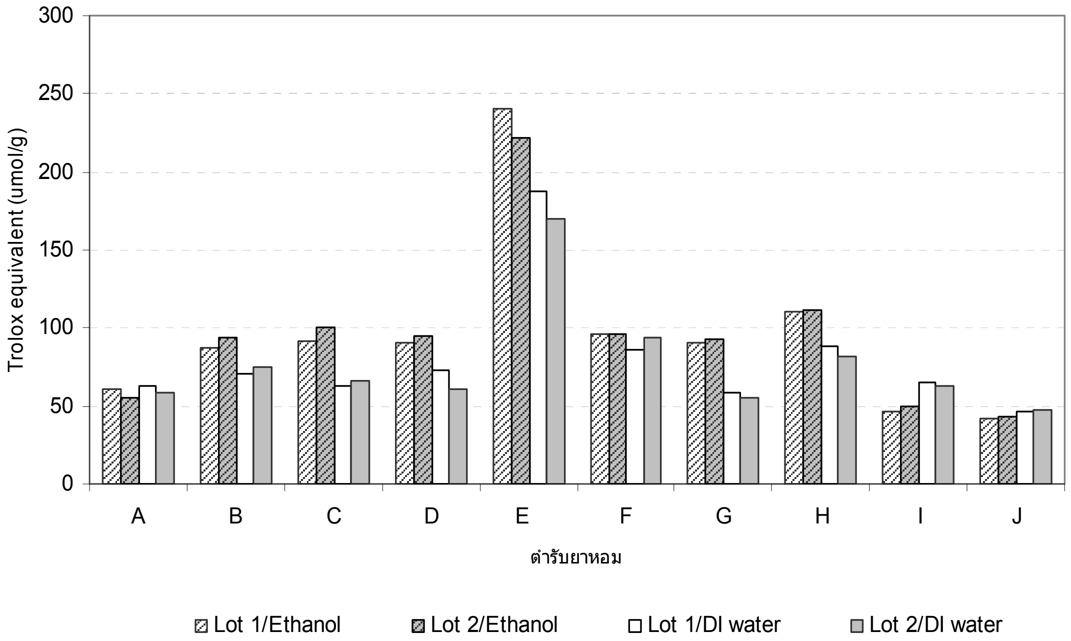


ภาพที่ 4.8 กราฟมาตรฐานของสารละลาย ascorbic acid ทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{+\bullet}$ radical

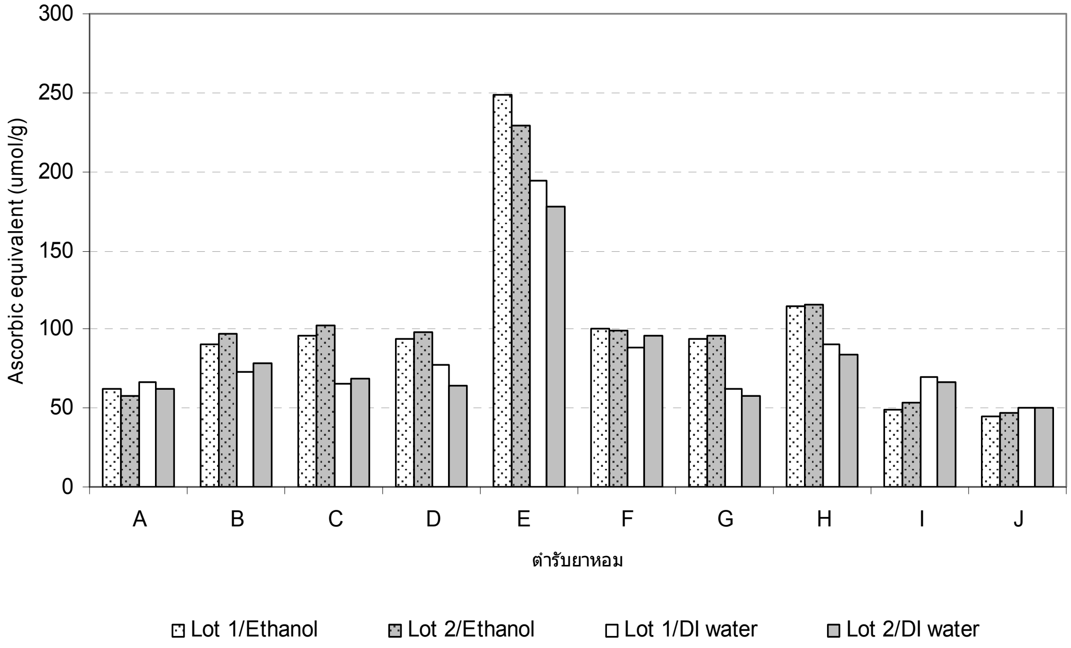
จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา ABTS ของสารสกัดยาหอม นำค่าดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาไปคำนวณเป็นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารต้านอนุมูลอิสระ Trolox และ ascorbic acid โดยใช้สมการเส้นตรงที่ได้กราฟมาตรฐานที่เตรียมขึ้นในแต่ละครั้งที่ทำการทดลอง นำมาคำนวณเป็นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า TE และ AE ในหน่วย micromol/g ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด ได้ผลแสดงดังภาพที่ 4.9 และ 4.10 พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดประจุบวก ($ABTS^{+}$•) นี้ ให้ค่า TE และ AE ต่ำกว่าค่า TE และ AE ที่ได้จากฤทธิ์ต้านอนุมูลที่คำนวณได้จากปฏิกิริยา DPPH assay ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระชนิดประจุลบ ประมาณครึ่งหนึ่ง เมื่อพิจารณาโดยภาพรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดประจุบวก ($ABTS^{+}$•) มีแนวโน้มเหมือนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดประจุลบ (DPPH•) โดยที่ยาหอมตำรับ E คงมีค่ามากที่สุด พบมีความแตกต่างระหว่างตัวทำละลายของตำรับ I โดยพบว่าเมื่อใช้น้ำสกัดยาหอมตำรับ I มีฤทธิ์มากกว่าสกัดด้วยเอธานอลเล็กน้อย (ซึ่งเหตุผลที่เกิดจากมีการทดลอง 1 ครั้งให้ค่าสูงมากผิดปกติ)

จากค่า TE และ AE ที่แตกต่างกัน แต่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันของฤทธิ์เทียบเท่าของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน 2 ชนิด ของการทดลองทั้งสองเทคนิคที่ใช้ในการศึกษานี้ ทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นว่า อนุมูลอิสระทั้งสองชนิดนี้ มีกลไกการเสียสภาพเหมือนกัน คือ รับโปรตอนหรืออิเล็คตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระแล้วเกิดเป็นสารที่เสถียร เพียงแต่สารอนุมูลอิสระทั้งสองชนิดใช้ความเข้มข้นต่างกันประมาณ 2 เท่า เป็นผลจากความสามารถในการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกันและความสามารถในการอ่านค่าของเครื่องวัดค่าการดูดกลืน จึงไม่ใช่ความแตกต่างจากกลไกการต้านอนุมูลอิสระแต่อย่างใด

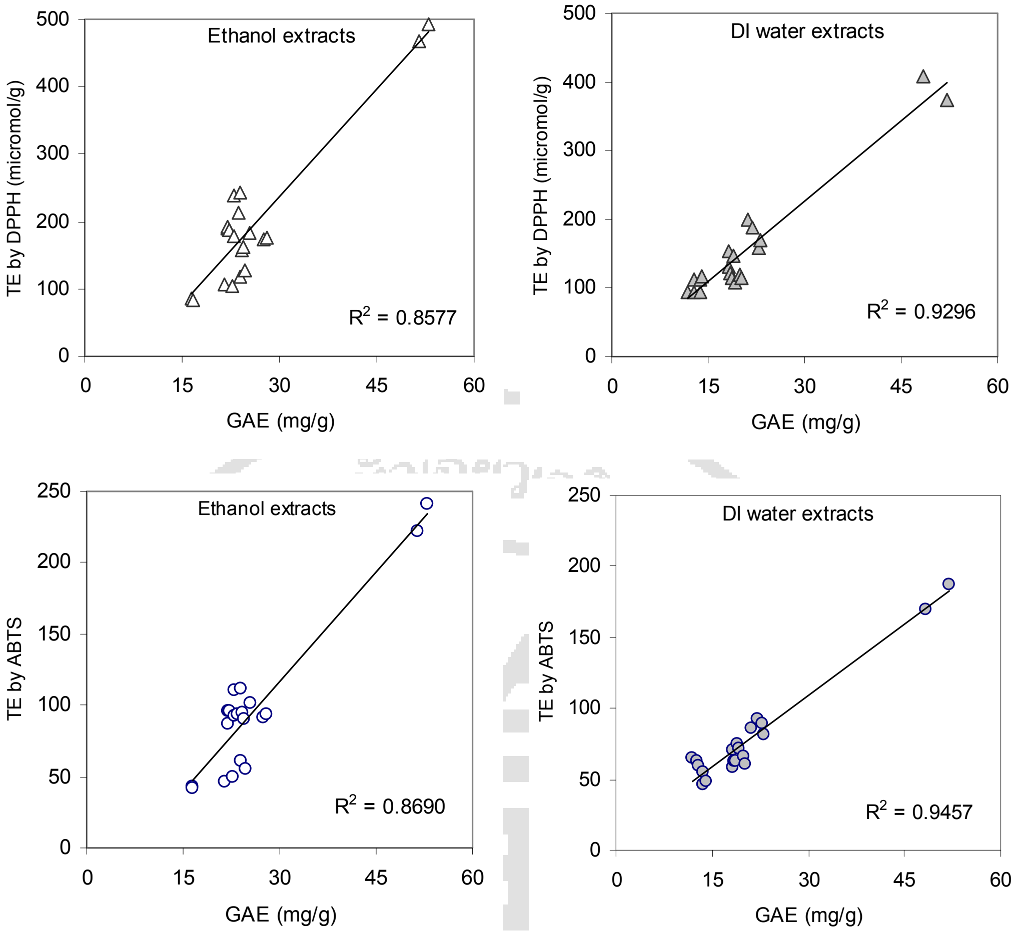
อย่างไรก็ตาม เพื่อทดสอบว่าทั้ง 2 เทคนิคนี้ให้ผลไปในทางเดียวกันและไม่แตกต่างกัน ผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยนำข้อมูลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ค่า TE และ AE) ที่ได้จากเทคนิค DPPH assay และ ABTS assay พล็อตกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับค่า GAE และหาความสัมพันธ์ระหว่าง 2 วิธี



ภาพที่ 4.9 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{+}• ของยาหอมตำรับต่างๆ คำนวณเป็นค่าเฉลี่ย (n = 3) เทียบเท่าสาร Trolox (TE) ในหน่วย micromol/g

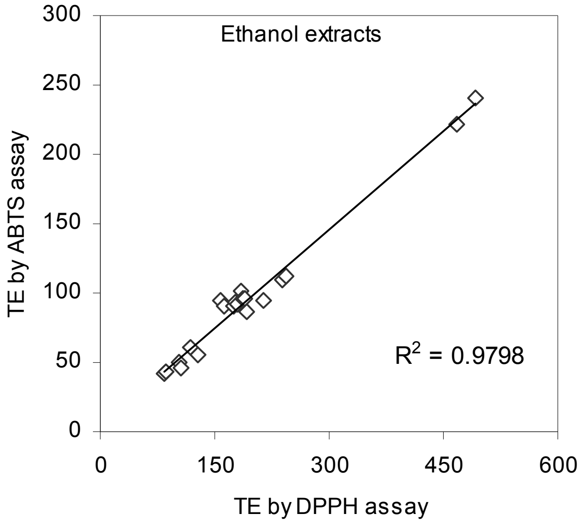


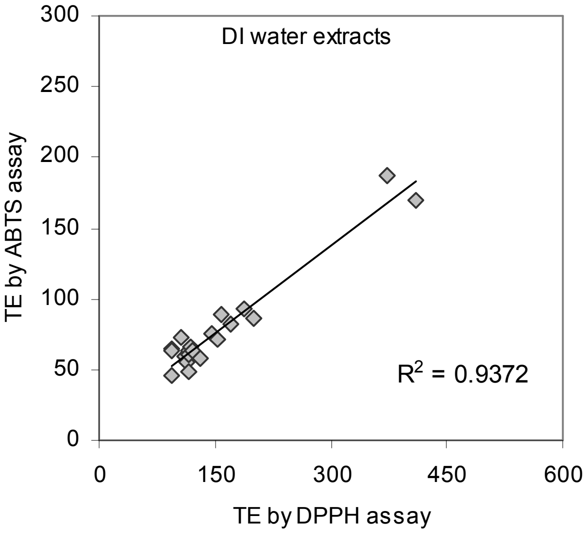
ภาพที่ 4.10 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{+}• ของยาหอมตำรับต่างๆ คำนวณเป็นค่าเฉลี่ย (n = 3) เทียบเท่าสาร ascorbic acid (AE) ในหน่วย micromol/g



ภาพที่ 4.11 ความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีนอลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า Trolox เปรียบเทียบการวัดด้วยวิธี DPPH assay (บน) กับวิธี ABTS assay (ล่าง)

ภาพที่ 4.11 เป็นกราฟที่พล็อตระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่าเทียบเท่าวิตะมินอี (Trolox) ของแต่ละเทคนิคที่วัด พบว่าทั้งสองวิธีให้ค่าความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันและมีค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นถดถอยสูง (R^2 = 0.8577-0.9457) แสดงว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของทั้งสองเทคนิคที่ศึกษา มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในผงยาหอม เมื่อเปรียบเทียบตัวทำละลายแต่ละชนิด พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจะให้ค่าความสัมพันธ์ดีกว่า โดยมีค่า R^2 สูงกว่าสารสกัดด้วยเอธานอลทั้งสองเทคนิค แสดงว่าสารประกอบฟีนอลรวม โดยเฉพาะในส่วนที่ละลายน้ำได้ดี จะทำหน้าที่รับผิดชอบในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าสารประกอบฟีนอลที่ละลายได้ดีในเอธานอล ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกันทั้งเทคนิคการวัดด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay ด้วยค่า R^2 ที่สูงกว่า คือ เท่ากับ 0.9296 และ 0.9457 ตามลำดับ





ภาพที่ 4.12 ความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดด้วยวิธี DPPH assay กับวิธี ABTS assay เปรียบเทียบชนิดตัวทำสกัดยาหอมด้วยเอธานอลและน้ำ

ภาพที่ 4.12 เป็นกราฟที่พล็อตระหว่างค่า TE ที่วัดด้วยวิธี DPPH assay กับวิธี ABTS assay เปรียบเทียบชนิดตัวทำสกัดยาหอมด้วยเอธานอลและน้ำ พบว่าทั้งสองวิธีให้ค่าความสัมพันธ์ต่อกันสูง สารสกัดด้วยเอธานอลให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9798 และสารสกัดด้วยน้ำให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9372 แสดงว่าการออกฤทธิ์ของสารประกอบฟีนอลในสารสกัด ระหว่าง 2 วิธีนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกัน เนื่องจาก กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลต่ออนุมูลอิสระทั้งสองชนิดที่ศึกษาเป็นแบบเดียวกัน อย่างไรก็ตาม จากภาพจะพบว่าสารสกัดด้วยเอธานอลให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระสูง

กว่าสารสกัดด้วยน้ำ อาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลบางกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงๆ มักเป็นกลุ่มที่ละลายในเอธานอลได้ดี เช่น สารกลุ่ม flavonoids ซึ่งในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณของ flavonoids จึงไม่สามารถยืนยันให้ชัดเจนได้

ค่าอื่นๆ ที่ศึกษาได้แก่ ค่า ascorbic acid equivalent ไม่ได้นำมาพล็อตแสดงความสัมพันธ์ เนื่องจากแนวโน้มการออกฤทธิ์เป็นไปในทิศทางเดียวกัน เพราะมีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกัน

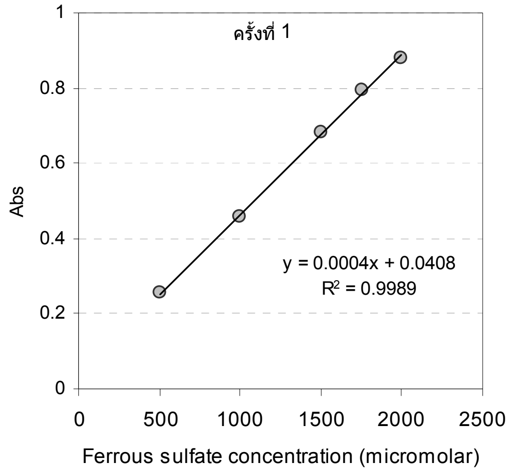
4. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยาหอมโดยวิธี FRAP assay

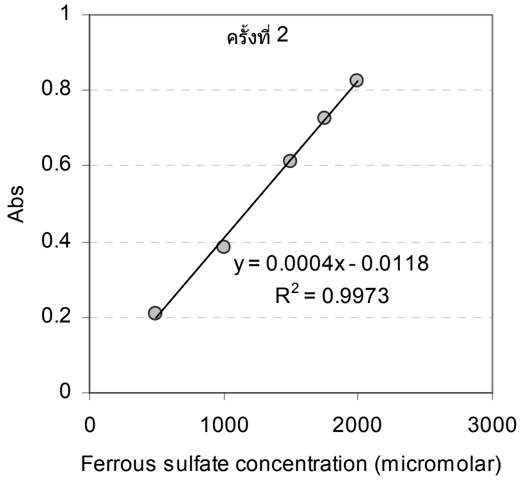
การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยาหอมโดยวิธี FRAP assay เป็นการวัดสมบัติการต้านอนุมูลอิสระชนิดต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยอาศัยหลักการที่สารต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่ให้อิเล็คตรอนซึ่งสารที่ให้อิเล็กตรอนจัดเป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) การทดลองนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์การเป็นสารรีดิวซ์รวม (total reducing capacity) แบบทางอ้อม โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริค Fe^{3+}-TPTZ (ferric tripyridyltriazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมของเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์โดยสารรีดิวซ์ ได้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe^{2+}-TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงิน ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ดังสมการ

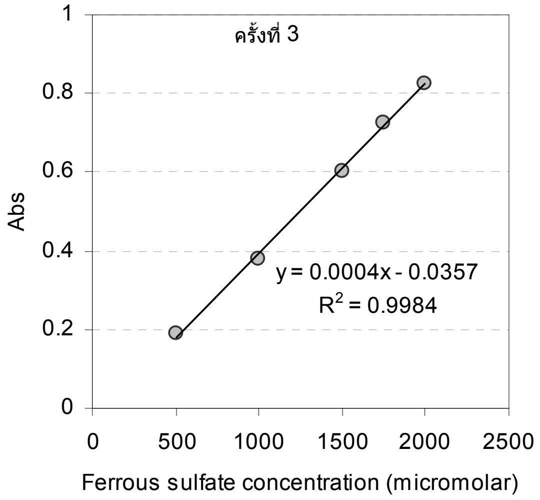
$$\text{Fe (III)-TPTZ} + \text{A} \longrightarrow \text{Fe (II)-TPTZ} + \text{A}^{\bullet}$$

ฤทธิ์การเป็นสารรีดิวซ์ในตัวอย่างสารสกัดเป็นค่าที่มีความสำคัญ เนื่องจากความสามารถในการรีดิวซ์ เป็นกลไกหนึ่งของการต้านอนุมูลอิสระ เพราะร่างกายที่มีสุขภาพดี จะต้องอยู่ในสภาวะรีดิวซ์ เพื่อให้การทำงานของเซลล์ต่างๆ เป็นปกติสุข ไม่มีภาวะ oxidative stress (ตามแผนภูมิที่แสดงในภาพที่ 2.2) โดยที่สารรีดิวซ์ที่สำคัญและมีมากที่สุดในร่างกาย ก็คือ ascorbic acid ซึ่งร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นเอง ต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น reducing power ในร่างกายมีความสำคัญโดยจะไปยับยั้งการเกิด Fenton reaction ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิด lipid peroxidation ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ มากมาย

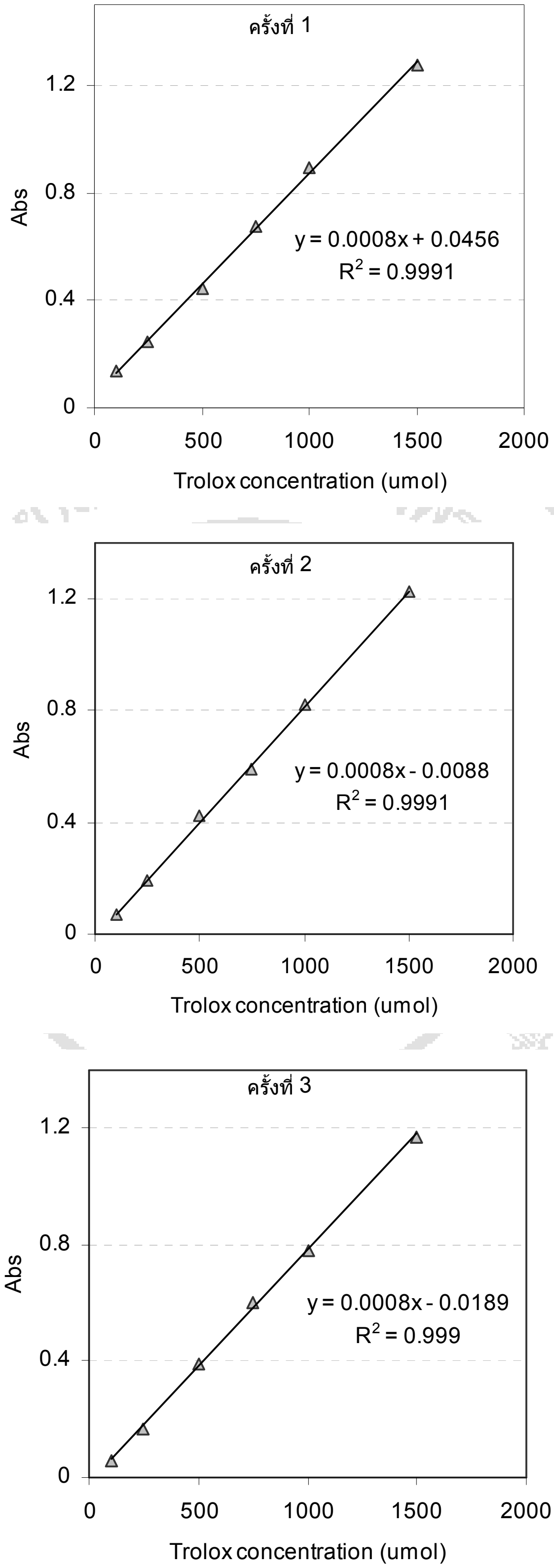
ในการศึกษาในหัวข้อนี้ ทำการศึกษาเพียงตัวอย่างยาหอมที่หาซื้อได้ในร้านขายยา จำนวน 5 ยี่ห้อเท่านั้น ได้แก่ 5 เจดีย์ ฤาษีทรงม้าทูลถวาย ซามิ้น และเด็กในพานทอง (รหัส A – E ตามลำดับ) เนื่องจากการทำการทดลองครั้งละ 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 รุ่นผลิต จำนวนตัวอย่างมีมากเกินความสามารถในการควบคุมสภาวะให้ใกล้เคียงกัน ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลได้ถูกต้อง ทั้งนี้เพราะปฏิกิริยา FRAP assay ต้องวัดตัวอย่างในระยะเวลาที่ทำปฏิกิริยาเท่ากันหรืออย่างน้อยใกล้เคียงกัน เนื่องจากสารสกัดแต่ละตัวอย่างมีอัตราเร็วในการทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน ในการศึกษานี้จึงทำการวัดที่เวลาเดียวที่สารส่วนใหญ่ทำปฏิกิริยาถึงจุดยุติแล้ว เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบได้ใกล้เคียงมากที่สุด



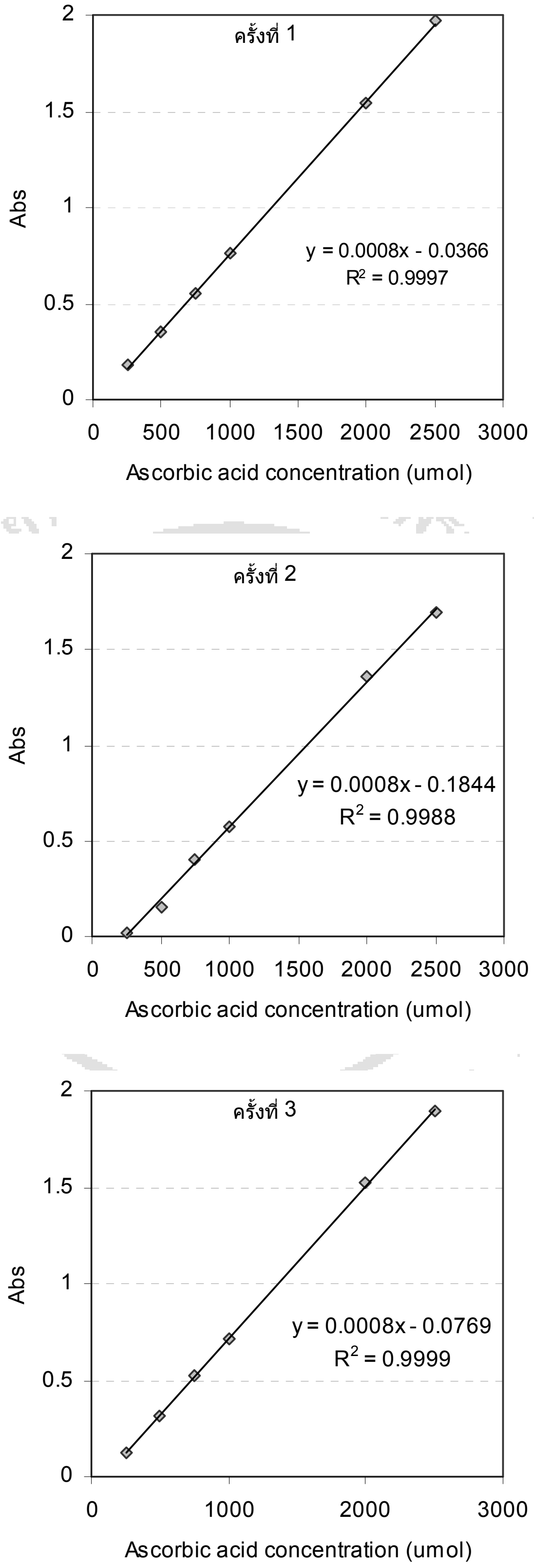




ภาพที่ 4.13 กราฟมาตรฐานของสารละลาย ferrous sulfate ในปฏิกิริยา FRAP assay

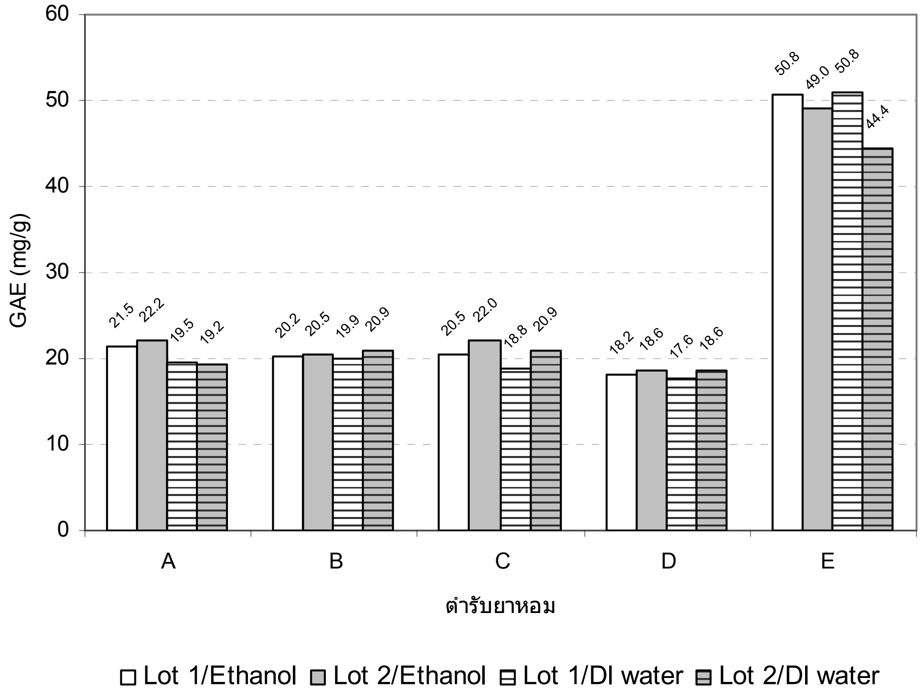


ภาพที่ 4.14 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ในปฏิกิริยา FRAP assay



ภาพที่ 4.15 กราฟมาตรฐานของสารละลาย ascorbic acid ในปฏิกิริยา FRAP assay

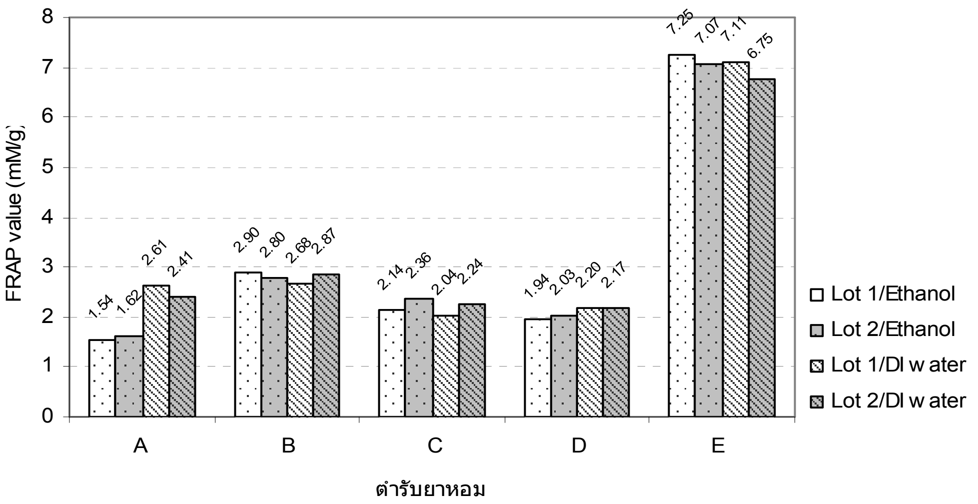
ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัดยาหอม โดยทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteau reagent และคำนวณเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid พบว่าได้ค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในยาหอมตำรับ A-D สกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ 17.6 ± 4.3 ถึง 22.2 ± 5.9 mg/g ยกเว้นตำรับ E มีค่าสูงกว่าประมาณ 2.5 เท่า (44.4 ± 5.1 ถึง 50.8 ± 10.9 mg/g)



ภาพที่ 4.16 ปริมาณสารประกอบฟีนอลเฉลี่ย (สกัด 3 ครั้ง) ของตำรับยาหอม คิดเป็นค่า gallic acid เทียบเท่า (GAE) หน่วยเป็น mg/g ของผงยาหอมน้ำหนักแห้ง

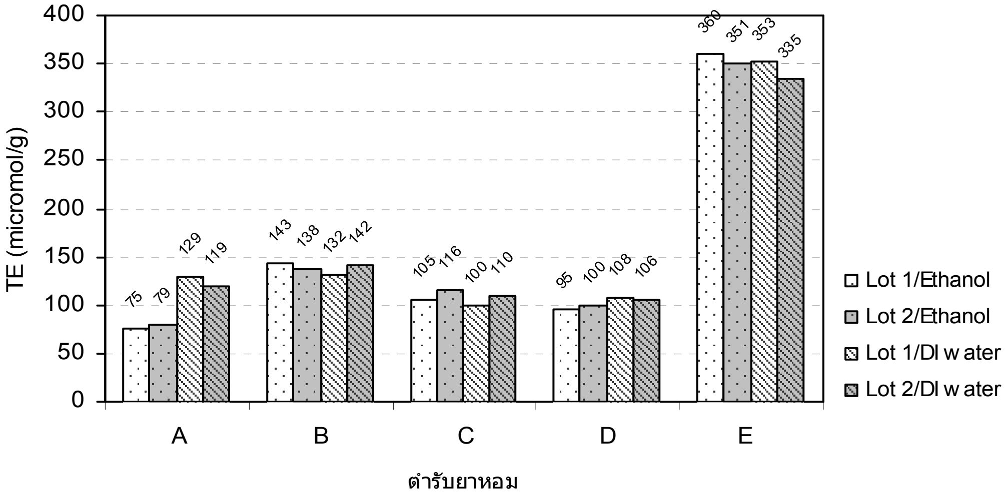
ภาพที่ 4.13 ถึง 4.15 เป็นกราฟมาตรฐานที่ได้จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน 3 ชนิด ที่ทำปฏิกิริยากับ FRAP reagent เพื่อใช้คำนวณค่า total reducing capacity ของสารสกัดยาหอมเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ Ferrous sulfate, Trolox และ ascorbic acid (กราฟมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นถดถอย (R^2) = 0.9980 – 0.9995) โดยทั้งสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างสารสกัดในตัวทำละลายเอธานอลและน้ำทั้ง 2 รุ่นการผลิต ทำปฏิกิริยาใน FRAP reagent ที่เตรียมในคราวเดียวกัน อ่านผลที่เวลา 10 นาที หลังจากผสมกับ FRAP reagent วัดค่าการดูดกลืนที่ 593 nm

ค่า FRAP value เป็นค่าที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบความแรงของฤทธิ์ reducing ของสารประกอบฟีนอลรวมในยาหอมแต่ละตำรับ โดยเทียบค่าการดูดกลืนกับสารละลายมาตรฐานที่ทำขึ้นพร้อมกัน ได้ดังแสดงในภาพที่ 4.16 พบว่าส่วนใหญ่ ตัวทำสกัดชนิดเอธานอลและน้ำให้ผลใกล้เคียงกัน โดยเรียงลำดับค่า FRAP value จากมากไปน้อย คือ ตำรับ E > B > C ≈ D ยกเว้นตำรับที่ A สารสกัดด้วยน้ำให้ค่าสูงกว่า ซึ่งอาจเกิดจากชนิดของสารที่ละลายออกมามีความแตกต่างกันมาก เนื่องจากสารประกอบฟีนอลไม่ทุกชนิดที่สามารถรีดิวว์ Fe^{2+} ได้ สารที่สามารถเปลี่ยนสีของ Fe(III)-TPTZ ให้เป็นสีน้ำเงินของสารเชิงซ้อน Fe(II)-TPTZ ได้ ต้องมีค่า redox potential สูงกว่า Fe^{2+}/Fe^{3+} ซึ่งคุณสมบัตินี้ทั้ง Trolox และ ascorbic acid สามารถทำได้

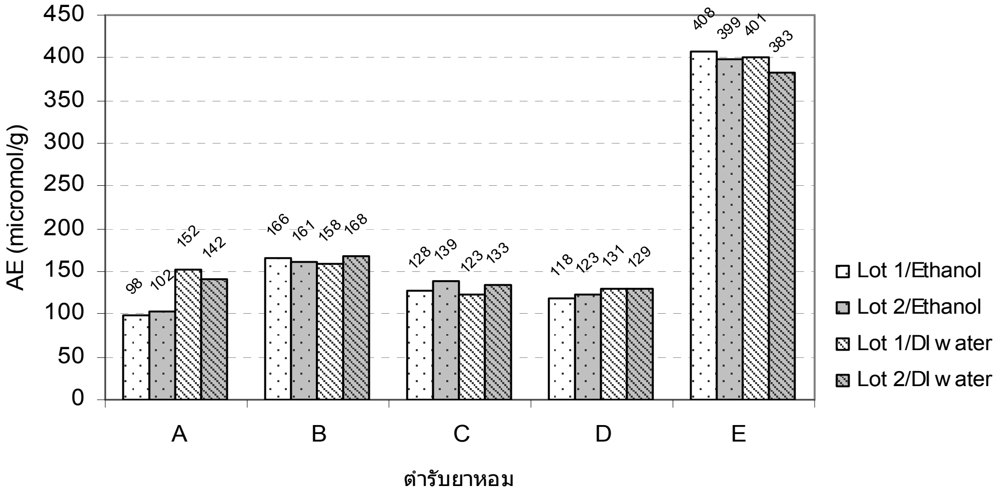


ภาพที่ 4.17 เปรียบเทียบค่า FRAP value ของสารสกัด 1 กรัมในตัวทำสกัด 100 มิลลิลิตร

ภาพที่ 4.18 และ 4.19 เป็นค่า TE และ AE ที่คำนวณได้จากค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างยาหอมเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox และ ascorbic acid จากการศึกษาพบว่า ค่า TE มีค่าตั้งแต่ 75 ± 8 ถึง 360 ± 65 micromol/g และ ค่า AE มีค่าตั้งแต่ 98 ± 27 ถึง 408 ± 100 micromol/g โดย ascorbic ให้ค่าสูงกว่าเล็กน้อย เช่นผลการทดลองด้วยวิธีอื่นๆ ที่ผ่านมา



ภาพที่ 4.18 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า Trolox (TE) ในยาหอมตำรับต่างๆ



ภาพที่ 4.19 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า ascorbic acid (AE) ในยาหอมตำรับต่างๆ

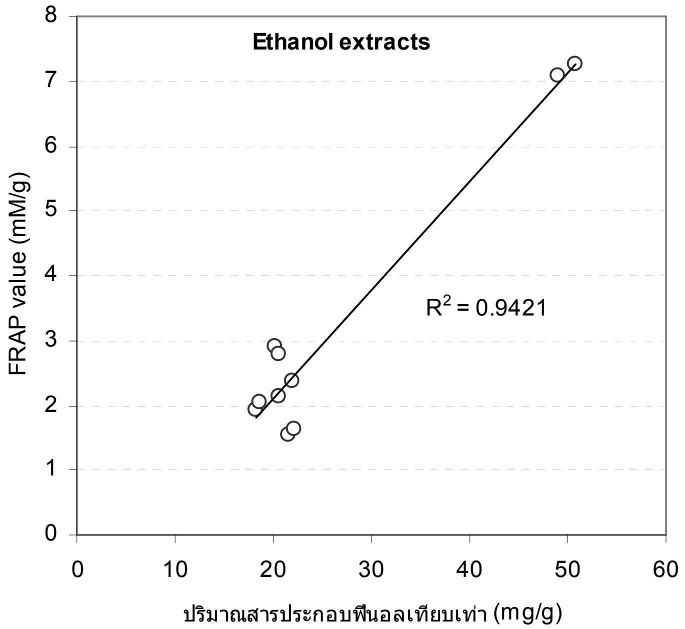
การคำนวณค่า total reducing capacity เป็นค่า FRAP value เป็นเพียงค่าเปรียบเทียบในปฏิกิริยาในแต่ละหลอดลองซึ่งมีผงยาหอมเข้มข้น 0.5 g/50 ml ว่ามีความสามารถรีดิวว์ Fe(III)-TPTZ ที่มีมากเกินพอให้เป็น Fe(II)-TPTZ ได้กี่ millimolar (เทียบจากสารละลายมาตรฐาน) เป็นการคำนวณเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกันเอง ไม่สามารถเปรียบเทียบกับผลของผู้อื่นได้ หากไม่ทราบวิธีการคำนวณ ซึ่งจากค่าที่ได้พบว่ามีค่าตั้งแต่ 1.54 ± 0.16 ถึง 7.25 ± 1.28 millimolar

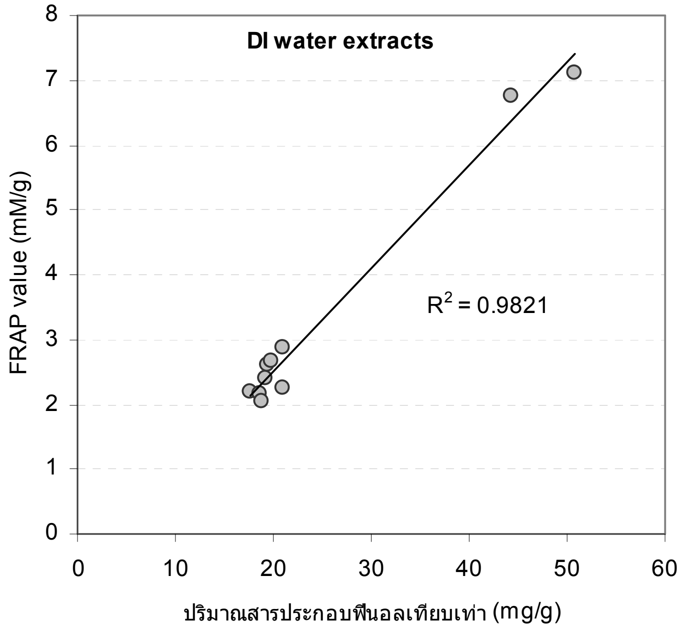
การหาค่าความสามารถในการเป็นสารรีดิวซ์ของตัวอย่าง เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย ราคาถูก และยังสามารถใช้ได้กับตัวอย่างที่เป็น biological products ซึ่งวิธีการนี้มีการศึกษากันมากและ

เป็นพารามิเตอร์หนึ่งในการนำเสนอฤทธิ์ต้านอนุมูลสระแบบทางอ้อม ไม่ใช่ค่าจริง และเป็นค่าเปรียบเทียบความสามารถของแต่ละตัวอย่างเพื่อบอกแนวโน้มเท่านั้น เนื่องจากในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ สาร Fe^{2+} ในรูปอิสระ จะเป็นอันตรายต่อร่างกาย เพราะกระตุ้นให้เกิด Fenton reaction ซึ่งปกติอิออนเหล่านี้จะเกิดจากการทำงานของ superoxide anion ที่ทำปฏิกิริยากับ Fe-containing molecules ทั้งหลาย (รวมทั้งสารประกอบทองแดงด้วย) (Volka et al. 2007) สารที่จะช่วยป้องกันอันตรายจาก iron อิสระเหล่านี้ คือ chelating agent ซึ่งสารประกอบฟีนอลหลายชนิดมีความสามารถในการเป็นสารคีเลตได้ ซึ่งในการทดลองนี้ไม่ได้ทำการศึกษา

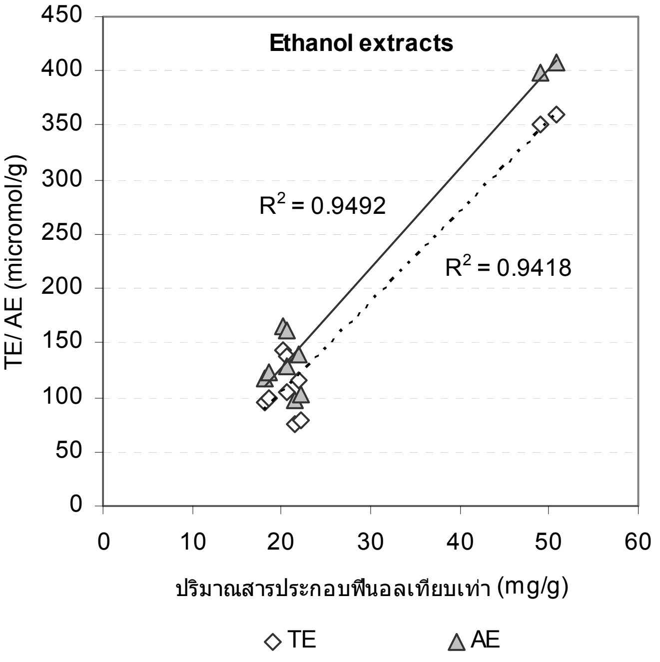
ภาพที่ 4.20 และ 4.21 เป็นการนำข้อมูลปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมวาดกราฟเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับค่า FRAP value TE และ AE พบว่ามีความสัมพันธ์กันค่อนข้างสูง โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9424 - 0.9821 สำหรับ ค่า FRAP value ของยาหอมที่สกัดด้วยเอธานอลและน้ำตามลำดับ สำหรับความสัมพันธ์ของปริมารสารประกอบฟีนอลกับค่า TE มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9418 - 0.9817 สำหรับยาหอมที่สกัดด้วยเอธานอลและน้ำตามลำดับ และความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีนอลกับค่า AE มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9492 - 0.9817 สำหรับยาหอมที่สกัดด้วยเอธานอลและน้ำตามลำดับ

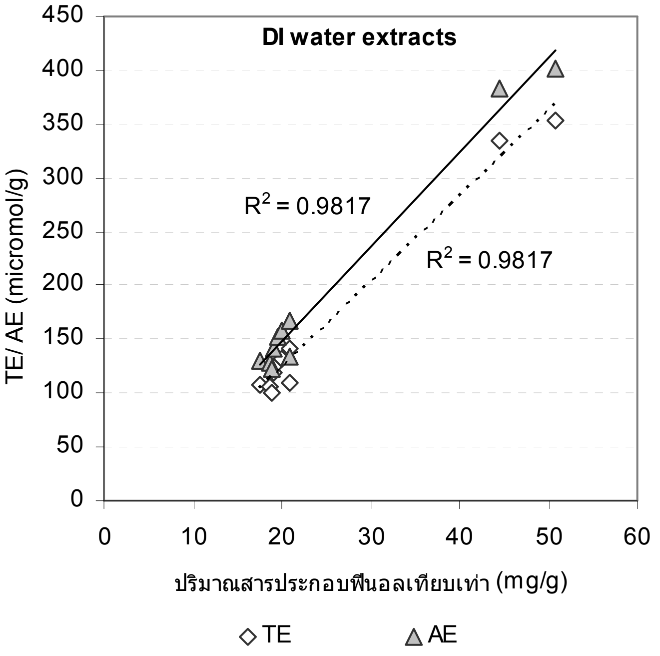
จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธีต่างๆ มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมทั้งสิ้น ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของผู้วิจัยอื่นๆ ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพร ผัก ผลไม้ (Cai et al. 2004; Ardestani and Yazdanparat. 2007) ในอาหารและเครื่องดื่มที่ผลิตจากพืช (Fernandez-Panchon et al. 2008; Zhao and Hall III. 2008) ล้วนมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลที่มีอยู่ในปริมาณสูง ซึ่งจากการประมวลจากงานวิจัยต่างๆ ข้างต้นนี้ พบว่าสมุนไพรส่วนใหญ่มีค่า GAE < 20 mg/g dry weight แต่สำหรับผงยาหอมที่ทำการศึกษานี้มีค่า GAE อยู่ในระดับค่อนข้างสูง (20 – 50 mg/g dry weight) ซึ่งพืชเดี่ยวที่มีค่า GAE อยู่ในระดับที่สูงมาก (> 50 mg/g dry weight) ได้แก่ green tea, black tea, grape seed (Fernandez-Panchon et al. 2008)





ภาพที่ 4.20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีนอลกับ reducing power ของยาหอมสกัดด้วยอัลกอฮอล์และน้ำ





ภาพที่ 4.21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีนอลกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า Trolox และ ascorbic acid ของยาหอมสกัดด้วยอัลกอฮอล์ (บน) และน้ำ (ล่าง)