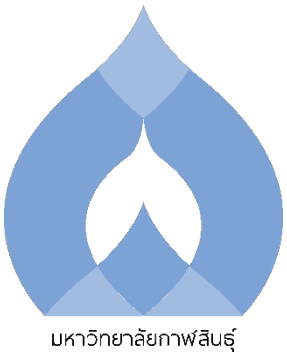
# การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบมะหาด ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์
งบประมาณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564




# การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบมะหาด ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

**พิชชาภรณ์ วันโย, ณัฏฐพงศ์ เจนวิพากษ์, พนิดา วงษ์ปรีดี และ บุญยศ คำจิแจ่ม**

**สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์**

**งบประมาณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ**
**สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564**

## อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) เป็นอะตอมหรือกลุ่มของอะตอมที่มีหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ (unpaired electron) มีความไม่เสถียร (unstable) ว่องไวมาก (reactive) ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ของมนุษย์ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร [1]

อนุมูลอิสระทำให้เกิดกระบวนการทางเคมีซึ่งเรียกว่าออกซิเดชัน (oxidation) เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ เมื่อโมเลกุลของออกซิเจนทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต เช่น พืช สัตว์และมนุษย์ รวมถึงสิ่งไม่มีชีวิต เช่น การเกิดสนิมของเหล็ก ในด้านสิ่งแวดล้อม อนุมูลอิสระและออกซิเดชันมีบทบาทสำคัญมาก ทำให้วัสดุโลหะและอโลหะหลายชนิดไม่สามารถคงสภาพถาวร มีความเสื่อม ผุกร่อน และหักร้าวอย่างช้าๆ ทำให้เครื่องอุปโภคและสิ่งก่อสร้างต่างๆ เปลี่ยนแปลงและเสื่อมสลายไปในที่สุด นอกจากนี้อนุมูลอิสระอาจมีผลกระทบทำให้เกิดมลภาวะทางอากาศและทางน้ำได้ดีอีกด้วย [1]

ด้านโภชนาการ อนุมูลอิสระและออกซิเดชันทำให้น้ำมันเหม็นหืน ไขมันประเภทไม่อิ่มตัว เช่น น้ำมันพืชจะมีความไวต่ออนุมูลอิสระ ออกซิเดชันทำให้เสียโครงสร้างของน้ำมันพืชเปลี่ยนเป็นแอลดีไฮด์และกรดไขมันขนาดสั้น ซึ่งมีกลิ่นเหม็นและรสเปรี้ยว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อน้ำมันที่ไม่อิ่มตัวถูกความร้อนสูง อาหารทอด อาหารประเภทปิ้งหรือย่างจนเกรียมจัด จะเกิดอนุมูลอิสระในปริมาณเพิ่มมากขึ้น หากบริโภคอาหารที่มีน้ำมันใช้ซ้ำจะมีผลเสียต่อสุขภาพ [1, 2]

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) คือสารที่ทำลายอนุมูลอิสระ แบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ เอนไซม์และไม่ใช่เอนไซม์ โดยลักษณะสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ คือ สามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระหรือสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจน ตัวสารต้านอนุมูลอิสระจะมีอิเล็กตรอนอิสระอยู่ จำเป็นต้องมีสารอื่นมาช่วยให้เกิดการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ ตัวแรกที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง พบในร่างกายสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายชนิดทั้งที่เป็นโมเลกุลขนาดเล็กหรือเอนไซม์ นอกจากนี้ยังมีสารในธรรมชาติที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดไฟติค และโพลีฟีนอล เป็นต้น [1-3]

## มะหาด

มะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) เป็นไม้ต้นขนาดใหญ่ไม่ผลัดใบ แก่นไม้รสร้อน มีสรรพคุณขับพยาธิตัวตืด แก้ลม แก้ท้องอืดเฟ้อ แก้กษัย แก้เส้นเอ็นพิการ และเมื่อนำไปต้มเคี่ยวกับน้ำจนเกิดฟอง ช้อนฟองที่ได้รวมกันทำให้แห้ง จะได้ผงสีขาวนวลจับกันเป็นก้อน เมื่อนำไปย่างไฟให้เหลือง เรียกว่า “ผงปวกหาด” มีรสร้อนเมา นำมาชงกับน้ำเย็นรับประทาน เป็นยาขับพยาธิตัวตืดและพยาธิไส้เดือน หรือใช้ละลายน้ำทาแก้ผื่นคัน ในบัญชียาสามัญประจำบ้านแผนโบราณ พ.ศ. 2556 ได้จัดมะหาด เข้ากลุ่มยาถ่ายพยาธิตัวกลม (ตัวยาตรง ใช้ส่วนเนื้อไม้) พบปรากฏการใช้ประโยชน์ยาถ่ายพยาธิและยาแก้ซางตานขโมย นอกจากนี้ ยังปรากฏการใช้ประโยชน์ในพระคัมภีร์ชวดาร พระคัมภีร์ปฐมจินดา พระคัมภีร์มหาโชตรัต และพระคัมภีร์มุจฉาปักขันทิกา

มะหาด จัดอยู่ในสกุล *Artocarpus* วงศ์ Moraceae ในประเทศไทยพบ 14 ชนิด หลายชนิดเป็นไม้ผลที่นิยมรับประทาน ได้แก่ ขนุน (*A. heterophyllus* Lam.) จำปาดะ (*A. integer*

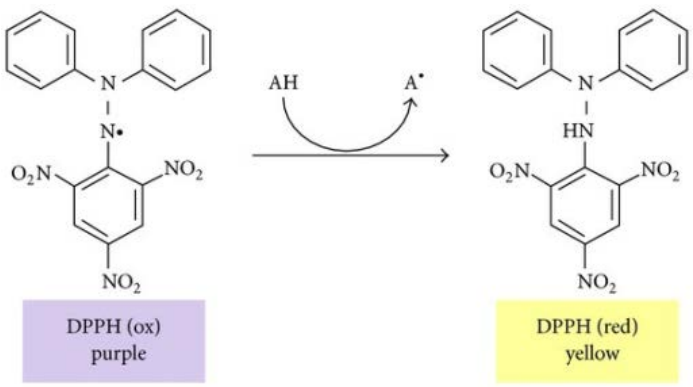
(Thunb.) Merr.) และสาเก (*A. altilis* (Parkinson) Fosberg) และจัดเป็นสมุนไพร ได้แก่ มะหาด (*A. lakoocha* Roxb.) สารสำคัญที่พบในเปลือกของมะหาด คือ สารกลุ่ม triterpenoids ได้แก่ cycloartenol และ cycloartenone และพบสารกลุ่ม stilbenes และ flavonoids จากส่วนรากของมะหาด นอกจากนี้ พบว่าสารสกัดจากแก่นมะหาดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (anit-tyrosinase) ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดกระบวนการไกลเคชั่น (anti-glycation) และฤทธิ์ต้านความเสื่อมของเซลล์ (anti-aging activities) [4]

## การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH radical scavenging assay

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งวิธีการวิเคราะห์ออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพและการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ในแต่ละประเภทจะมีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน โดยปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบและสรุปผล โดยในที่นี้จะแสดงวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระที่เสถียร 2,2 diphemyl -1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยใช้วิธี DPPH radical scavenging assay เป็นวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น โดยดูถึงความสามารถในการจับอนุมูล DPPH$^{\bullet}$ ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร ถ้าสารสกัดสามารถจับกับอนุมูล DPPH$^{\bullet}$ ได้สีของสารละลาย DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 157 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสงของสาร (Spectrophotometer) [5-7]

ข้อดีของการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ คือ มีขั้นตอนและวีการวิเคราะห์ง่ายไม่ซับซ้อน ใช้เครื่องมือพื้นฐาน นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกัน

ข้อด้อยของวิธีนี้คืออนุมูล DPPH$^{\bullet}$ มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของ DPPH$^{\bullet}$ ที่แสดงจะเห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตร ทำให้สารต้านอุมูลที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง ทั้งที่สารต้านอนุมูลนั้นมีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้สี DPPH$^{\bullet}$ จางลงได้อีกด้วย [5-7]

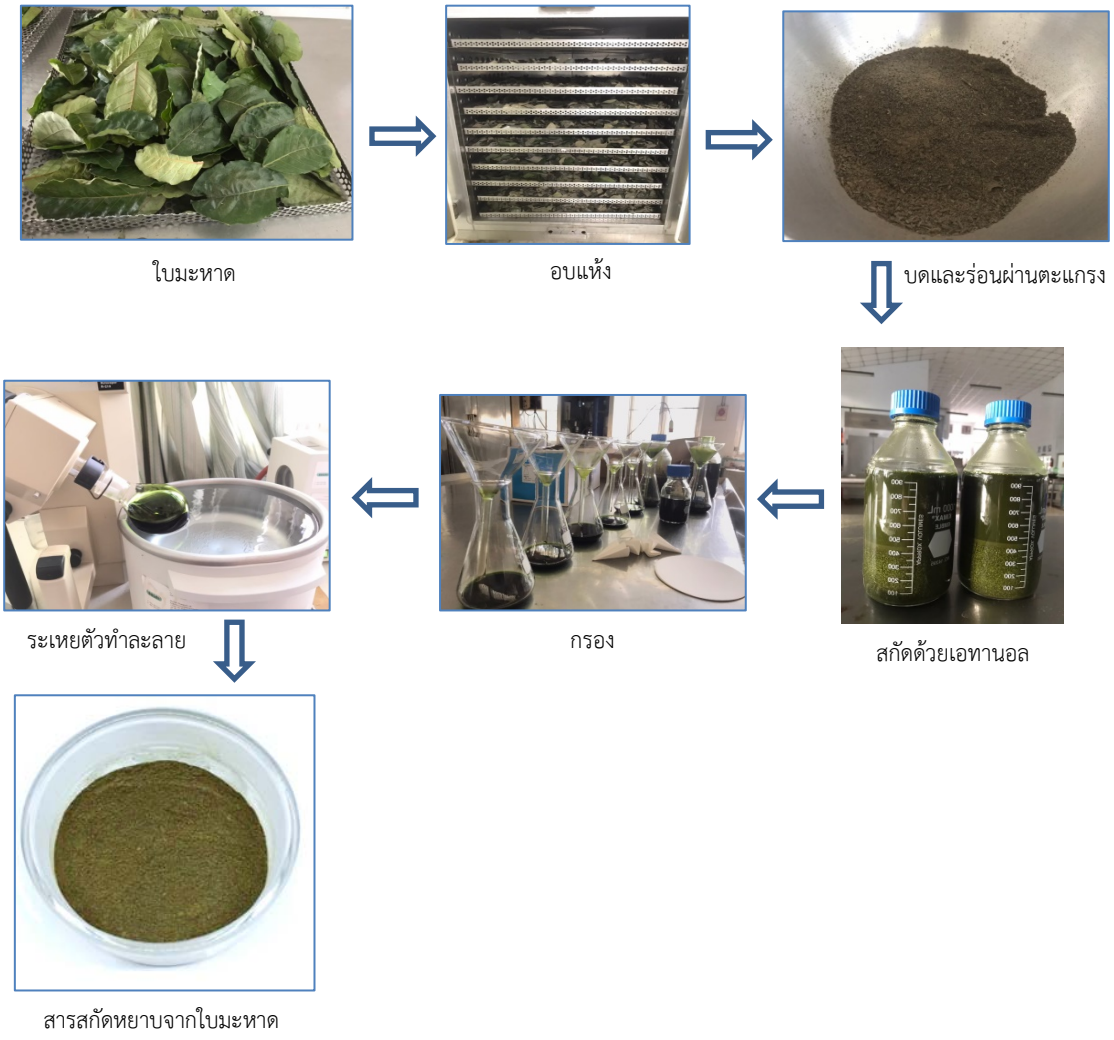



**ภาพที่ 1** หลักการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH [7]

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบมะหาด ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ในครั้งนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Dasgupta and De (2004) [8] มีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

**1. การเตรียมสารสกัดจากใบมะหาด**

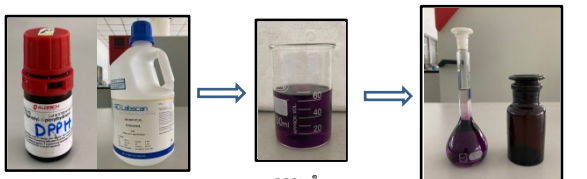
การเตรียมสารสกัดจากใบมะหาด เริ่มต้นจากการนำใบมะหาดมาล้างน้ำสะอาด หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิทโดยใช้เวลาประมาณ 18 ชั่วโมง จากนั้นนำใบมะหาดแห้งไปบดให้ละเอียด แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 50 mesh (297 µm) จากนั้นทำการสกัดด้วยเอทานอล ร้อยละ 95 โดยชั่งใบผงมะหาดแห้ง 250 กรัม สกัดด้วยเอทานอล ร้อยละ 95 ปริมาตร 1 ลิตร เวลา 24 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง และนำของเหลวที่กรองได้ (Filtrate) ไประเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท แล้วบดสารสกัดและนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 80 mesh (177 µm) ได้สารสกัดหยาบดังแสดงในภาพที่ 2 แล้วนำมาเก็บในภาชนะปิดสนิทป้องกันแสง ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส




**ภาพที่ 2** การเตรียมสารสกัดจากใบมะหาด

## 2. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบมะหาด

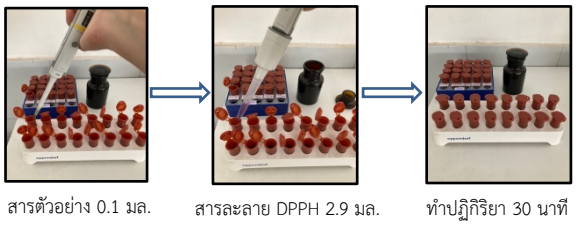
1) เตรียมสารละลาย 2,2 diphemyl-1-picrylhydrazyl radical ( DPPH) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมล โดยการชั่ง DPPH 0.04 g /ml Ethanol ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมด้วยเครื่อง Vortex ปิดด้วยฟอยล์หรือเก็บในขวดทึบแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส




**ภาพที่ 3** การเตรียมสารละลาย DPPH

2) เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยละลายสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลด้วยอัตราส่วน 1:25 (w/v) โดยชั่งสารสกัดหยาบจากใบมะหาด 1.00 กรัม.ละลายด้วยเอทานอล 25 มิลลิลิตร เก็บในขวดทึบแสง

3) ทดสอบตัวอย่างสารสกัดโดยดูดสารสกัดอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองอย่างละ 3 หลอด จากนั้นปิเปตสารละลาย DPPH ที่เตรียมไว้ใส่หลอดที่ใส่สารสกัดตัวอย่างไปแล้วหลอดละ 2.9 มิลลิลิตร เพื่อให้ทำปฏิกิริยากัน แล้วทำการเขย่าทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที




**ภาพที่ 4** การทดสอบสารสกัด

**ภาพที่ 5** เปรียบเทียบสารละลาย DPPH และสารละลาย DPPH ที่เติมสารสกัดจากใบมะหาด

4) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

**ภาพที่ 6** เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

5) คำนวณหาประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ จากสูตรดังนี้

$$\mathbf{AA(\%)} = \frac{\mathbf{A_{DPPH} - A_{Sample}}}{\mathbf{A_{DPPH}}} \times \mathbf{100}$$

เมื่อ AA คือ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

$A_{DPPH}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่าง

$A_{Sample}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

**เอกสารอ้างอิง**

[1] ไมตรี สุทธจิตต์ และคณะ. (2555). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสะ. เชียงใหม่ : สมาร์ท โคตรติ้ง แอนด์ เซอร์วิส.

[2] ศิริธร ศิริอมรพรรณ. (2557). สารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

[3] Olinescu, R. and Smith, T. (2002). Free Radicals in Medicine. New York : Nova Science Publishers.

[4] วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. (2542). พจนานุกรมสมุนไพรไทย, ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 5. “มะหาด”. หน้า 643-645. ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. “มะหาด”. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.phargarden.com.

[5] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 28: 25-30.

[6] Dejian, H. and Boxin, O. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 : 1841-1856.

[7] Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, M., Garrido, J. and Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Research International*, (http://dx.doi.org/10.1155/2013/251754).

[8] Dasgupta, N. and De, B. (2004). Antioxidant Activity of *Piper betle* L. Leaf Extract *in Vitro*. *Food Chemistry*, 88: 219-224.