การศึกษาชนิดและสัดส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกะหล่ำปลีม่วง

Study of Type and Appropriate Proportion of Organic Solvent Extraction on Antioxidant Activity of Red Cabbage Extract

นิตยา จันกา[1] ศิริชัย กัลยาณรัตน์[2] และ เฉลิมชัย วงษ์อารี[2]

Nittaya Junka[1], Sirichai Kanlayanarat[2] and Chalerrmchai Wongs-Aree[2]

Abstract

Red cabbage contains anthocyanins, derivative of polyphenol compound, in their leaves. In the present, there are many organic solvent extractions which they have different efficiencies for extracting antioxidant. Therefore, the objective of this study was to investigate the types and appropriate proportion of organic solvent extractions on antioxidant activity of red cabbage extract. Three organic solvents were used for red cabbage extraction; ethanol 95%, hexane 99.8%, and dichloromethane-ethanol mixture solvent 50% (v/v). Experimental results revealed that the ethanol 95% gave the significantly highest total phenolic content, total anthocyanins content, antioxidant activity by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical assay (DPPH), and ferric reducing/antioxidant power assay (FRAP). In order to find appropriate proportion of ethanol-water mixture solvent, the ratios of ethanol-water at 50, 70, and 95% (v/v) were studied. The results showed the ethanol-water mixture solvent at 70% (v/v) had no significantly different effect on antioxidant activity with ethanol-water mixture solvent at 95%. Therefore, ethanol-water mixture solvent at 70% (v/v) was the appropriate proportion of organic solvent for anthocyanin extraction from red cabbage that could reduce cost for organic solvent.

Keywords: red cabbage, antioxidant, organic solvent extraction, DPPH assay, FRAP assay

บทคัดย่อ

กะหล่ำปลีม่วงมีแอนโทไซยานินซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ polyphenols ที่สำคัญอยู่ในใบ ซึ่งในปัจจุบันตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดสารประกอบ polyphenols ของพืชนั้นมีหลายชนิดและแต่ละชนิดให้ประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและสัดส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายอินทรีย์โดยเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดสารที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ polyphenols จากกะหล่ำปลีม่วงที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ดำเนินการทดลองโดยสกัดกะหล่ำปลีม่วงด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิดคือ เอทานอล 95% เฮกเซน 99.8% และตัวทำละลายอินทรีย์ผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนร่วมกับเอทานอลอัตรา 50:50% (v/v) ภายหลังการทดสอบพบว่าการสกัดตัวอย่างด้วยเอทานอล 95% มีปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานิน ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทดสอบโดยเทคนิค 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ซึ่งรายงานโดยค่า % inhibition activity และเทคนิค ferric reducing /antioxidant power (FRAP) มีค่าสูงที่สุด สำหรับการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายอินทรีย์ผสมระหว่างเอทานอลร่วมกับน้ำ 50 70 และ 95% (v/v) ต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า การใช้เอทานอลสัดส่วน 70% (v/v) ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใช้เอทานอล 95% ดังนั้น การใช้เอทานอลสัดส่วน 70% (v/v) จึงเหมาะสมในการสกัดตัวอย่างและยังช่วยลดต้นทุนของการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ได้

คำสำคัญ: กะหล่ำปลีม่วง การต้านอนุมูลอิสระ FRAP assay ตัวทำละลายอินทรีย์ DPPH assay

[1] โปรแกรมวิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม 85 ถนนมาลัยแมน อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

[1] Department of Agriculture, Faculty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat University, 85 Malaiman Road. Muang, Nakhon Pathom 73000

[2] หลักสูตรเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10500

[2] Department of Postharvest, School of Bioresource and Technology, King Mongkut's University Technology Thonburi, Bangkhuntiean Campus, Bangkok 10150

คำนำ

การบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์นั้นถึงแม้มีประสิทธิภาพสูง แต่มีข้อจำกัดของการใช้และอาจมีความเสี่ยงในด้านความปลอดภัยของการบริโภค ดังนั้นในปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติจึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ หนึ่งในนั้นคือสารประกอบ polyphenols เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในเกือบทุกส่วนของพืช เช่น ผัก ผลไม้ สมุนไพร เป็นต้น สารประกอบ polyphenols ประกอบไปด้วยอนุพันธ์หลายชนิดและบางชนิดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้

กะหล่ำปลีม่วงเป็นพืชที่นิยมนำมารับประทานสด สีสันสวยงาม มีแอนโทไซยานินเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอยู่ที่ใบและจัดเป็นสารฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่ง ซึ่งอยู่ในกลุ่มอนุพันธ์ของสารประกอบ polyphenols เช่นกัน สำหรับตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างพืชในปัจจุบันนั้นมีหลายชนิด โดยแต่ละชนิดให้ประสิทธิภาพและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีแตกต่างกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและการหาสัดส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายอินทรีย์ ในการสกัดสารที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ polyphenols จากกะหล่ำปลีม่วงที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

อุปกรณ์และวิธีการ

1.การศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดสารที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ polyphenols จากกะหล่ำปลีม่วงที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ทำการสกัดกะหล่ำปลีม่วงด้วยตัวทำละลายอินทรีย์3 ชนิดคือ เอทานอล 95% (E) เฮกเซน 99.8% (H) และตัวทำละลายอินทรีย์ผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนต่อเอทานอล 50:50% (v/v) (DE) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (Turkmen *et al.,* 2007) กรองแยกกากกะหล่ำปลีม่วงออกจากตัวทำละลายและลดปริมาตรน้ำกะหล่ำปลีม่วงที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Rotary evaporator (BÜCHI Rotovapor R-205) ภายใต้สภาวะสุญญากาศด้วย vacuum pump (BÜCHI Vac V-500) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเพื่อระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ ปรับปริมาตรสารสกัดให้ครบ 4 มิลลิลิตร จากนั้นทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของสารสกัดและทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ตรวจวัดค่าความสว่าง (L) และค่า Hue angle ของสารสกัด โดยการนำตัวอย่างสารสกัดจากกะหล่ำปลีม่วง วัดค่าความสว่าง (L) และค่า Hue angles โดยใช้เครื่อง colorimeter (Minolta CR-300, Osaka, Japan) จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินด้วย pH differential technique ตามวิธีการของ Giusti and Wrolstad (2005) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิคทั้งหมดในกะหล่ำปลีม่วงด้วยวิธีการของ Swain and Hillis (1959) ทำการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ด้วยวิธีการของ Brand-Williams *et al*. (1995) และวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP โดยวิธีการของ Benzie and Strain (1996)

2.การศึกษาสัดส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดสารที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ polyphenols จากกะหล่ำปลีม่วงที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

เลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่ดีที่สุดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการทดลองที่ 1 คือเอทานอล เพื่อศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้เอทานอล 50 70 และ 95% (v/v) ในการสกัดสารที่เป็นอนุพันธุ์ของสารประกอบ polyphenols จากกะหล่ำปลีม่วง โดยใช้วิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติของสารสกัดและทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระตามการทดลองที่ 1

ผลและวิจารณ์ผล

1.การศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดสารที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ polyphenols จากกะหล่ำปลีม่วงที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

จากผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อใช้ในการสกัดสารที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ polyphenols จากกะหล่ำปลีม่วงดัง Table 1 พบว่า เมื่อสกัดสารที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ polyphenols ด้วยเอทานอล 95% (E) ให้ค่าความสว่าง (L) น้อยที่สุดและค่า Hue angle มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับผลของปริมาณฟีนอลิคทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานิน โดยการสกัดตัวอย่างด้วยเอทานอล 95% (E) ให้ปริมาณฟีนอลิคทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ 182.1 mg/mL และ 6.5 mg/100g FW ตามลำดับ เนื่องจากแอนโทไซยานินซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในใบของกะหล่ำปลีม่วงนั้นมีโครงสร้างโมเลกุลที่มีขั้วและมีการเชื่อมต่อกันกับหมู่ hydroxyl หมู่ methoxyl และหมู่ glycosyl บน aromatic rings โดย Harbone and Grayer (1988) ได้อธิบายว่าจากลักษณะของความมีขั้วดังกล่าวได้ส่งผลต่อการสกัดและการแยกแอนโทไซยานินในตัวอย่าง โดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสามารถสกัดแอนโทไซยานินได้ดีกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว

สำหรับแอนโทไซยานินในกะหล่ำปลีม่วงเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์และเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ polyphenols จัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่ละลายน้ำได้ (hydrophilic antioxidant) และด้วยคุณสมบัติความมีขั้ว (polar) ของเอทานอล ซึ่งมีค่า Polarity Index มากกว่าเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนจึงสามารถสกัดแอนโทไซยานินได้ดีที่สุด ด้วยเหตุผลดังกล่าวการสกัดตัวอย่างด้วย Hexane 99.8 % จึงไม่พบปริมาณแอนโทไซยานินในตัวอย่างที่ได้ทำการสกัด เนื่องจากคุณสมบัติความไม่มีขั้ว (nonpolar) ของ Hexane ส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างด้วยเอทานอล 95% (E) ที่ทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH และวิธี ferric reducing/antioxidant power (FRAP) มีค่าสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเช่นกัน

Table 1 Experimental analysis results of red cabbage at various organic solvent extractions

Sample	L	Hue angle	Total Phenolics content (mg gallic acid equivalents/100 g FW)	Anthocyanins content (mg/100 g FW)	Antioxidant activity	
					DPPH (% inhibition activity)	FRAP (μM TE/ g FW)
E 95%	23.8 ± 0.4^{c}	357.6 ± 0.4^{a}	182.1 ± 1.9^{a}	6.5 ± 0.3^{a}	88.7 ± 0.6^{a}	323.7 ± 3.1^{a}
H 99.8%	75.3 ± 0.2^{a}	225.0 ± 3.9^{c}	2.8 ± 0.4^{c}	0.0 ± 0.0^{c}	14.4 ± 0.5^{c}	0.0 ± 0.0^{c}
D:E (50:50%) v/v	24.5 ± 0.1^{b}	349.0 ± 1.0^{b}	166.1 ± 0.4^{b}	3.8 ± 0.1^{b}	79.6 ± 1.4^{b}	188.1 ± 2.3^{b}
	**	**	**	**	**	**
% CV	0.64	0.75	0.96	4.70	1.54	1.46

Different superscripts in the same column mean that the mean values are significantly different at $p \leq 0.01$ by DMRT

2.การศึกษาสัดส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดสารที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ polyphenols จากกะหล่ำปลีม่วงที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

หลังจากที่เลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่ดีที่สุดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากการทดลองที่ 1 คือเอทานอล เพื่อศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้เอทานอล 50 70 และ 95% (v/v) ในการสกัดสารที่เป็นอนุพันธุ์ของสารประกอบ polyphenols จากกะหล่ำปลีม่วง พบว่า ค่าความสว่างและค่า Hue angle ของสารสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 50 70 และ 95% (v/v) ให้ค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ อย่างไรก็ตามการสกัดตัวอย่างด้วยเอทานอล 95 และ 70% (v/v) ให้ผลปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานิน ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH และวิธี ferric reducing/antioxidant power (FRAP) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในระหว่างชุดทดลอง ดังที่แสดงใน Table 2

Table 2 Experimental analysis results of red cabbage at various proportions of ethanol solvent extraction

Sample	L	Hue angle	Total Phenolics Content (mg gallic acid equivalents/100 g FW)	Anthocyanins content (mg/100 g FW)	Antioxidant activity	
					DPPH (% inhibition activity)	FRAP (μM TE/ g FW)
E 50%	25.5 ± 0.2^{a}	345.5 ± 1.5^{c}	174.5 ± 2.5^{b}	4.4 ± 0.3^{b}	83.4 ± 0.9^{b}	204.4 ± 2.9^{b}
E 70%	25.7 ± 0.4^{a}	350.1 ± 1.4^{b}	181.0 ± 3.0^{a}	6.6 ± 0.2^{a}	87.4 ± 1.0^{a}	316.4 ± 6.6^{a}
E 95%	23.8 ± 0.4^{b}	357.6 ± 0.4^{a}	182.1 ± 1.9^{a}	6.5 ± 0.3^{a}	88.7 ± 0.6^{a}	323.7 ± 3.1^{a}
	**	**	**	**	**	**
% CV	1.41	0.34	1.07	4.25	0.98	1.04

Different superscripts in the same column mean that the mean values are significantly different at $p \leq 0.01$ by DMRT

สรุปผล

การสกัดกะหล่ำปลีม่วงด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ชนิดคือ เอทานอล 95% เฮกเซน 99.8% และตัวทำละลายอินทรีย์ผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนต่อเอทานอล 50:50% (v/v) พบว่า ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดเอทานอล 95% ให้ปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานิน และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่น สำหรับการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของตัวทำละลายอินทรีย์ผสมระหว่างเอทานอลต่อน้ำ 50 70 และ 95% (v/v) ต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระพบว่า การใช้เอทานอลสัดส่วน 70% (v/v) ให้ปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้เอทานอลสัดส่วน 95% (v/v) ดังนั้นการใช้เอทานอลสัดส่วน 70% (v/v) จึงเหมาะสมในการสกัดกะหล่ำปลีม่วงและยังช่วยในการประหยัดค่าใช้จ่ายในการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อการสกัดตัวอย่าง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่สนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ในการทำงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

Benzie, I.F.F. and J.J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP Assay. Analytical biochemistry 239: 70-76.

Brand-Williams, W.M., E. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology 28: 25-30.

Giusti, M.M. and R.E. Wrolstad. 2005. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: R. E. Wrolstad, T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, C. F. Shoemaker, D. Smith and P. Sporns (Eds.). Handbook of Food Analyical Chemistry (Vol. 2): Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components. John Wiley & Sons Inc. New Jersey. p. 19-31.

Harbone, J.B. and R.J. Grayer. 1988. The anthocyanins. In: J.B. Harborne (Ed.). The flavonoids. Chapman and Hall Ltd.London. p. 1-20.

Swain, T. and W.E. Hillis. 1959. The phenolic constituents of Prunus domestica the quantitative analysis of phenolic constituents. Journal of Science of Food and Agriculture 10: 63-68.

Turkmen, N., Y.S. Velioglu, F. Sari and G. Polat. 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. Molecules 12: 484-496.