ความคงตัวของตัวอย่างสารต้านออกซิเดชันจากพืชในภาวะต่าง ๆ
Stability of an Antioxidant from Plants in Various Conditions

อรุณศรี ปรีเปรม และ แสงระวี สุทธิปริญญานนท์

Aroonsri Priprem and Saengrawee Sutthiparinyanont

Abstract

Quercetin, an effective antioxidation agent, could be found in vegetables, fruits, and flowers, and tea. Several healthcare products containing quercetin had been developed for use as disease prevention and/or food supplements. Owing to its signigicance, quercetin is chosen for this study as a representative to an antioxidation of flavonoids grop. The data provide information factors causing degradation and stabilization of quercetin which will be important in the development of its derived healthcare products. These influent factors included types and pH of solvent, temperature, an interference of metal, and vitamin C, which is popularly used in various healthcare products. The stability of quercetin was analyzed by measuring quercetin content using UV spectrophotometer at 373 nm within 5 days of storage time. The results showed that quercetin in organic solvent were higher stable than in aqueous system which it found about 50% after 2 days of storage time. Refrigerator accelerated the degradation of quercetin in aqueous system. Temperature under refrigeration could prolong its stability, while basic condition and the metal contamination. Therefore, all above conditions has to be controlled throughout the steps of preparation and processing to storage in order to keep the quality and antioxidant activity of quercetin in healthcare products.

Keywords: Antioxidation, flavonoids , quercetin, stability

บทคัดย่อ

เคอซิตินเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญตัวหนึ่งซึ่งพบได้มากในผัก ผลไม้ ดอกไม้ และ ชา มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเคอซิติน เพื่อประโยชน์ต่อการรักษาโรคและ/หรือเสริมสุขภาพมากมายหลายรูปแบบ จึงนำเคอซิตินมาเป็นสารตัวอย่างของสารต้านออกซิเดชันกลุ่มฟลาโวนอยด์ เพื่อศึกษาเพื่อเข้าใจปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวหรือการป้องกันเพื่อให้เกิดความคงตัว อันจะเป็นข้อมูลสำคัญในการเตรียมผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆ ภาวะที่ศึกษาได้แก่ ชนิดและค่าความเป็นกรดด่างของตัวทำละลาย อุณหภูมิ โลหะปนเปื้อน และการเติมสารต้านออกซิเดชันอื่นในกรณีนี้ใช้วิตามินซีซึ่งนิยมใช้ในผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆ ทดสอบความคงตัวของเคอซิตินหลังเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน วัดปริมาณเคอซิตินคงเหลือตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาด้วยเครื่องยูวีสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 373 นาโนเมตร ผลการศึกษาพบว่าเคอซิตินในตัวทำละลายอินทรีย์มีความคงตัวมากกว่าตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบซึ่งคงเหลือประมาณ 50% หลังจากเก็บไว้ 2 วัน การเก็บในตู้เย็น (ประมาณ 4 องศาเซลเซียส) ช่วยเพิ่มความคงตัว ด่างและโลหะที่ปนเปื้อนเป็นตัวเร่งการสลายตัวของเคอซิตินที่ละลายในน้ำ ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเคอซิตินเพื่อประโยชน์ในการเป็นสาร

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand

Telephone and Fax: +66 043 362092; e-mail address: aroonsri@kku.ac.th

ต้านออกซิเดชันต้องควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ กระบวนการผลิตไปจนกระทั่งการเก็บรักษา จะทำให้ผลิตผลิตภัณฑ์ได้คุณภาพและมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันคงเหลือให้ออกฤทธิ์ได้มากที่สุด

คำสำคัญ: ความคงตัว, เคอซิติน, ฟลาโวนอยด์, สารต้านออกซิเดชัน

บทนำ

ความใส่ใจต่อสุขภาพตนเองทำให้มนุษย์สนใจใฝ่หาความรู้เกี่ยวกับการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมเป็นสารจากแหล่งธรรมชาติและลดการรับสารเคมีสังเคราะห์เข้าสู่ร่างกาย ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่มีการเติมสารสกัดจากพืชผักและผลไม้ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารธรรมชาติยังเป็นการเพิ่มมูลค่าสินค้าพื้นบ้านส่งเสริมคุณภาพชีวิตและสร้างรายได้ให้แก่ท้องถิ่น พืชผักตระกูลหัว (allium family vegetable) เช่น หัวหอม (onion; *Allium cepa* Linn.) ผักตระกูลผักกาด (Brassica family vegetable) ชา (tea; *Camellia Sinensis* Linn.) ผลไม้ เช่น องุ่น (grape; *Vitis* spp.) และรวมไปถึงผลิตภัณฑ์จากองุ่นได้แก่ไวน์ (wine) เป็นกลุ่มของพืชซึ่งพบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่ชื่อว่าเคอซิติน (quercetin; 3,3',4'5,7-pentahydroxy flavone) สารชนิดนี้มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันและมีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและเครื่องสำอางหลากหลายรูปแบบมากที่สุดในปัจจุบัน

สารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างพอลิฟินอลิก (polyphenolic compounds) ได้แก่ ฟลาโวนอยด์และกรดฟีนอลิก (phenolic acid) พบทั่วไปในใบ ลำต้นและเปลือกของพืช ฟลาโวนอยด์ ยังจำแนกตามโครงสร้างออกเป็นกลุ่มย่อย เช่น แอนโธไซยานิดิน (anthocyanidins) ไอโซฟลาวานอยด์ (isoflavanoids) ฟลาแวน(flavanes) ฟลาวาโนน(flavanones) ฟลาวานอล (flavanols) ฟลาโวน (flavones) และฟลาโวนอล(flavonols) แสดงโครงสร้างเป็นตัวอย่างดัง Fig. 1 (Formica and Regelson, 1995; Ratnam *et al*., 2006) เคอซิตินจัดเป็นสารที่สำคัญที่สุดตัวหนึ่งในกลุ่มย่อยฟลาโวนอล มีประโยชน์ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคอันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระได้ป้องกันโรคหัวใจ (Cook and Samman, 1996; Ajay et al., 2006a) ป้องกันผิวหนังถูกทำลายด้วยแสงแดด (Bonina *et al*., 1996; Casagrande *et al*., 2006) ป้องกันโรคเบาหวาน (Coskun *et al*., 2005; Ajay et al., 2006b) และป้องกันเซลล์ประสาทจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) (Heo and Lee, 2004; Cho *et al*., 2006) จึงมีโอกาสในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับใช้ป้องกันโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือด โรคระบบประสาท โรคระบบภูมิคุ้มกัน โรคหัวใจ โรคเบาหวานและป้องกันการเสื่อมวัย เป็นสารที่มีความว่องไวและมีประสิทธิภาพในปฏิกิริยาต้านออกซิเดชัน ดังนั้นจึงเสื่อมสภาพได้รวดเร็วภายใต้ภาวะหนึ่งๆ ด้วยการศึกษาเพื่อเข้าใจภาวะเร่ง/ชะลอการเสื่อมสภาพหรือการสลายตัวของสารนี้เป็นสิ่งสำคัญสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์และยังมีส่วนช่วยให้เกษตรกรเข้าใจกระบวนการในขณะเก็บเกี่ยวผลผลิตพืชผัก ทำให้ถนอมรักษาสารสำคัญไว้ให้มากที่สุด ทำให้พัฒนาผลิตภัณฑ์ได้คุณภาพดีที่สุดอีกทางหนึ่งด้วย

ความคงตัวเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการผลิตผลิตภัณฑ์ โดยทั่วไปสารต้านออกซิเดชันขณะอยู่ในพืชมีความคงตัวระดับหนึ่ง แต่หากสกัดและแยกสารสกัดในรูปสารละลายมักจะเริ่มปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เสื่อมสภาพไม่สามารถออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ต่อไป ปัจจัยหลายปัจจัยพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับความคงตัวของสารต้านออกซิเดชันได้แก่ออกซิเจนซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวแบบออกซิเดชัน นอกจากนี้ โลหะหนักและอุณหภูมิยังถูกพบว่าเป็นปัจจัยที่มีส่วนเร่งให้เกิดการสลายตัวมากขึ้น (Makris *et al.*, 2000) ปี 2004 Pinelo et al. ได้ศึกษาและรายงาน ผลของชนิดของตัวทำละลายโดยเฉพาะตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ ว่ามีผลกระทบต่อการสลายตัวของ

เคอซิตินอย่างชัดเจน ขณะเดียวกันการใช้สารต้านออกซิเดชันอื่น เช่น วิตามินซี ที่นำมาร่วมผสมในผลิตภัณฑ์ พบว่ามีส่วนช่วยเพิ่มความคงตัวได้ (van der Woude *et al.*, 2003) และค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลายเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการแตกตัวของสาร ทำให้สามารถแสดงผลกระทบต่อความคงตัวตลอดจนการออกฤทธิ์ของสารได้

ดังนั้น การวิจัยนี้จึงทำการศึกษาความคงตัวของสารต้านออกซิเดชันตัวอย่างคือ เคอซิติน ภายใต้ภาวะต่างๆ ได้แก่ ชนิดตัวทำละลาย ค่าความเป็นกรด-ด่างของ อุณหภูมิ โลหะหนักปนเปื้อน ปริมาณออกซิเจนและสารต้านออกซิเดชันที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆ มากที่สุดตัวหนึ่ง คือ วิตามินซี โดยคาดหมายว่าข้อมูลในเรื่องความคงตัวที่ได้รับจะเป็นข้อมูลพื้นฐานของการเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมในการลดโอกาสการสลายตัวของสารและคงคุณภาพการออกฤทธิ์ที่สำคัญของสารในกระบวนการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีสารต้านออกซิเดชันต่อไป อีกทั้งผลจากการศึกษาโดยเลือกใช้เคอซิตินเป็นสารต้านออกซิเดชันต้นแบบของการศึกษาความคงตัวในระบบต่างๆ ที่เลือก สามารถนำไปใช้ประเมินเรื่องความคงตัวและปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความคงตัวของสารต้านออกซิเดชันอื่นๆ ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันได้ต่อไป

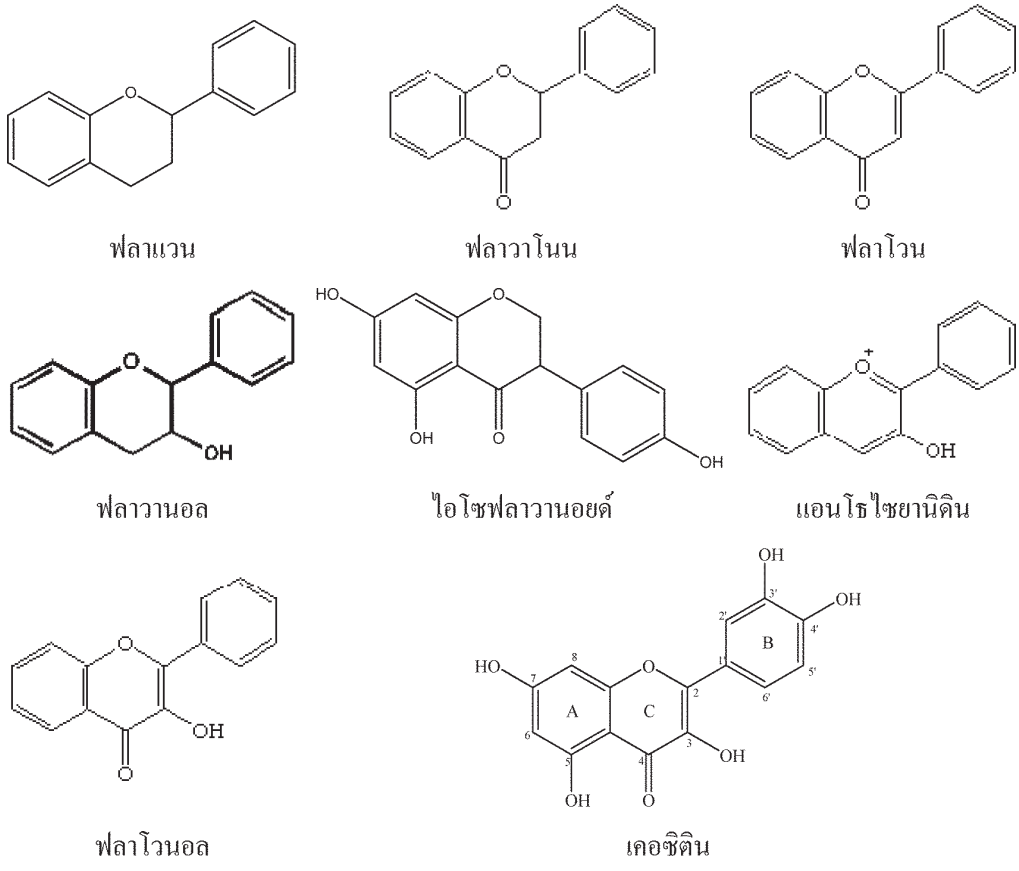

Fig. 1 The structure of some flavonoids compouds

วิธีการทดลอง

1. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย เคอซิติน พอลิเอทิลลีนไกลคอล 400 (polyethylene glycol 400 ย่อว่า PEG 400) โพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol ย่อว่า PG) จากบริษัท Sigma (Barcelona, Spain) เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol, BDH, Poole, UK) พอลิซอร์เบต 80 (polysorbate 80 ย่อว่า PS 80) โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodiumdihydrogenphaphate) และแมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride) จาก Ajax Finechem (Seven Hills, Australia) และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate) จาก Fluka (Buchs, Germany)

2. ชนิดและความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย

ละลายเคอซิตินในตัวทำละลาย 6 ชนิด ได้แก่ น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4) เอทิล-แอลกอฮอล์ พอลิเอทิลลีนไกลคอล 400 โพรพิลีนไกลคอลและพอลิซอร์เบต 80 โดยให้สารละลายเคอซิตินในน้ำมีความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเป็น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับระบบฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ส่วนสารละลายอื่นๆ มีความเข้มข้นเคอซิตินเป็น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ เป็นผลเนื่องจากค่าความสามารถในการละลายได้ของเคอซิตินในตัวทำละลายแต่ละชนิดไม่เท่ากันซึ่งจะมีค่าต่ำมากในน้ำและระบบที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบสูง

สำหรับการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายต่อความคงตัวของเคอซิติน ทำการเตรียมสารละลายเคอซิตินในน้ำที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเป็น 3 7 และ 9 ตามลำดับ

สารละลายเคอซิตินจากการทดลองเพื่อศึกษาผลของชนิดของสารละลายและผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง นี้ ถูกเก็บภายใต้การควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยจะทำการวัดปริมาณสารเคอซิติน ณ เวลาเริ่มต้นการทดลองและปริมาณสารที่เปลี่ยนไปตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษา

3. อุณหภูมิ

เตรียมสารละลายเคอซิตินในน้ำที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งสารละลายเป็น 3 ชุด เก็บสารแต่ละชุดที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน วัดปริมาณสารเคอซิติน ณ เวลาเริ่มต้นการทดลอง และปริมาณสารที่เปลี่ยนไปตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษา

4. สารปนเปื้อนจำพวกโลหะ

โลหะที่เลือกศึกษาได้แก่ แมกนีเซียมคลอไรด์ โดยเตรียมละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ในน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 1 โมลาร์เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้น เตรียมสารละลายเคอซิตินในน้ำที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น เติมสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ลงไปในสารละลายเคอซิตินให้ได้ความเข้มข้นสุทธิของแมกนีเซียมคลอไรด์ในสารละลายดังกล่าวเป็น 0.01 0.05 และ 0.1 โมลาร์ เก็บสารละลายแต่ละชุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน วัดปริมาณสารเคอซิติน ณ เวลาเริ่มต้นการทดลอง และปริมาณสารที่เปลี่ยนไปตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษา

5. ออกซิเจน

เตรียมสารละลายเคอซิตินในน้ำที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งสารละลายเป็น 2 ชุด เก็บสารชุดที่มีการควบคุมให้มีปริมาณออกซิเจนในระบบน้อยที่สุด โดยการแทนที่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนก่อนจะปิดหลอดทดลองด้วยอลูมิเนียมฟอล์ยและเก็บในสภาวะสูญญากาศ โดยใช้เครื่องปั๊มอากาศออกจากภาชนะที่เก็บ ขณะที่สารอีกชุดเก็บในภาชนะที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจน เก็บสารทั้งสองชุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน วัดปริมาณสารเคอซิติน ณ เวลาเริ่มต้นการทดลองและปริมาณสารที่เปลี่ยนไปตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษา

6. วิตามินซี

เตรียมละลายวิตามินซีในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นเป็น 1 โมลาร์เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้น เตรียมสารละลายเคอซิตินในน้ำที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมวิตามินซีลงไปในสารละลายเคอซิตินให้ได้ความเข้มข้นสุทธิของวิตามินซี

ในสารละลายดังกล่าวเป็น 0.01 0.05 และ 0.1 โมลาร์ เก็บสารละลายแต่ละชุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน วัดปริมาณสารเคอซิติน ณ เวลาเริ่มต้นการทดลอง และปริมาณสารที่เปลี่ยนไปตลอดช่วงเวลาของการเก็บรักษา

7. การวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณเคอซิตินในการทดลองนี้เป็นการตรวจวัดด้วยเครื่องยูวีสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเคอซิตินที่ค่าความยาวคลื่น 373 นาโนเมตร

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. ชนิดและความเป็นกรดด่างของตัวทำละลาย

ตัวทำละลายมีความสำคัญในขั้นตอนเตรียมผลิตภัณฑ์ การทดสอบผลิตภัณฑ์ได้และช่วยให้เกิดการละลายของสารต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์เมื่อเข้าสู่ร่างกายก่อนที่สารจะออกฤทธิ์ ในการวิจัยนี้เลือกตัวทำละลายมาศึกษา 6 ชนิด ตามสมบัติและการใช้งานที่แตกต่างกันได้แก่ น้ำ ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีการใช้มากที่สุด พบได้ตั้งแต่กระบวนการเตรียม การผลิตและเข้ารูปแบบผลิตภัณฑ์ เช่น น้ำผลไม้ และยังเป็นส่วนประกอบหลักของของเหลวในร่างกาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4 เนื่องจากใกล้เคียงกับค่ากรด-ด่าง ในระบบหมุนเวียนเลือด เอทิลแอลกอฮอล์เป็นตัวแทนสารละลายที่มีการใช้มากรองจากน้ำสำหรับการเตรียมตลอดจนเข้ารูปแบบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพืช เช่น การสกัดสารสำคัญจากพืชหรือผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ผสม พอลิเอทิลลีนไกลคอลและโพรพิลีนไกลคอล เป็นสารพอลิเมอร์ทำหน้าที่ในการเป็นตัวทำละลายร่วมในสูตรตำรับทางเภสัชภัณฑ์และพอลิซอร์เบต (polysorbate; PS) เป็นสารลดแรงตึงผิวมักใช้ในสูตรตำรับทางเภสัชภัณฑ์เพื่อช่วยเพิ่มการละลายของสาร ผลการทดลองพบว่า เคอซิตินที่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นน้ำและฟอสเฟตบัฟเฟอร์แสดงปริมาณลดต่ำลงอย่างรวดเร็วจากปริมาณเริ่มต้นจนกระทั่งเข้าสู่ชั่วโมงที่ 48 ของการเก็บรักษา โดยมีปริมาณคงเหลือประมาณร้อยละ 50 (Fig. 2) ขณะที่เคอซิตินในตัวทำละลายอื่น แสดงการสลายตัวอย่างช้าๆ ด้วยอัตราที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ อาจเป็นผลเนื่องจากคุณสมบัติการเป็นตัวให้หรือรับโปรตอนและความมีขั้วของตัวทำละลายที่ใช้ในระบบ ซึ่งมีผลอย่างมากต่อความคงตัวของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เคอซิตินที่จะแสดงคุณสมบัติของการเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำกว่าน้ำ เช่น แอลกอฮอล์ (Pedrielli et al., 2001; Pinelo et al., 2004) ด้วยเหตุนี้การเลือกใช้เคอซิตินสำหรับผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทต่างๆ ควรเลือกใช้ตัวทำละลายให้เหมาะสม เพื่อคงประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ให้ได้นานตลอดอายุการใช้งานของผลิตภัณฑ์

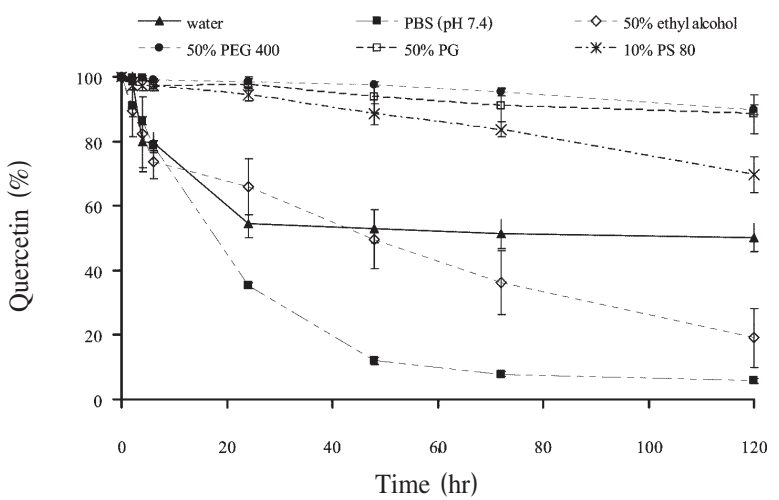

Fig. 2 stabity of quercetin in various solvents under under storage temperature at 25 °c for 5 days (n=3).

สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายถือว่าเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการแตกตัวของสาร ซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อความคงตัวและประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันของเคอซิติน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษา เพื่อทราบถึงพฤติกรรมของเคอซิตินในสารละลายที่ค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน อันจะ Fig. 3 แสดงผลการศึกษาผลกระทบของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อความคงตัวของเคอซิตินที่ละลายในน้ำ เส้นกราฟบอกได้ถึงพฤติกรรมการสลายตัวของสารละลายเคอซิตินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง คือ 3, 7 และ 9 ด้วยอัตราที่แตกต่างกัน เคอซิตินในสารละลายที่เป็นกลางและกรดมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณหรือการสลายตัวช้ากว่ากรณีสารละลายที่เป็นด่าง ดังนั้น การเตรียมสารละลายหรือผลิตผลิตภัณฑ์จึงควรทำในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรดหรือกลางโดยหลีกเลี่ยงสภาวะที่เป็นด่าง เพื่อช่วยในเรื่องความคงตัวของเคอซิติน เพื่อให้คงประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

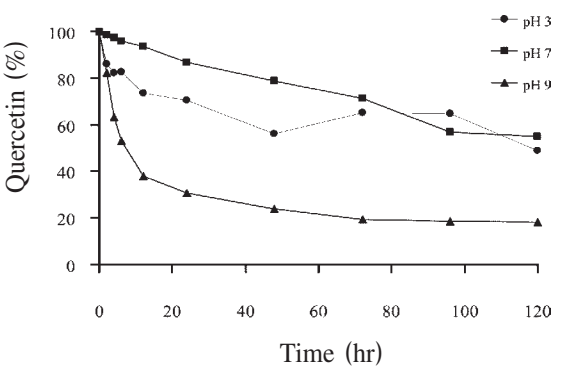

Fig. 3 Stability of quercetin in water at pH 3,7 and 9 under storage temperature at 25˚c for 5 days (n=3).

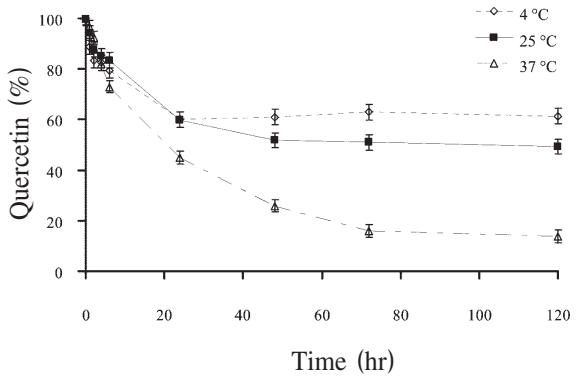

Fig. 4 Stability of quercetin in water under storage temperature at 4, 25 and 37˚c for 5 days (n=3).

2. อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องตั้งแต่ขั้นตอนของการเตรียม การผลิตตลอดจนกระทั่งการเก็บรักษาอุณหภูมิที่เลือกทำการศึกษาในที่นี้ คือ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิต่ำที่อาจมีการเลือกใช้ให้เหมาะสมกับสารที่ทนความร้อนได้น้อยหรือใช้สำหรับเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นค่าของอุณหภูมิห้องและที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิของร่างกายมนุษย์ ซึ่งอาจใช้เป็นข้อมูลประกอบการอธิบายถึงพฤติกรรมของสารภายหลังการรับเข้าสู่ร่างกายในรูปแบบต่างๆ ทั้งนี้ยังเป็นค่าอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิของอากาศในช่วงหน้าร้อนของไทย ผลการทดลองแสดงดัง Fig. 4 พบว่า การเปลี่ยนแปลงปริมาณเคอซิตินในทุกช่วงอุณหภูมิมีความชันหรืออัตราการสลายตัวที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิต่ำที่ 4 องศาเซลเซียส แสดงปริมาณการสลายตัวของเคอซิตินน้อยกว่าเมื่อเวลาของการเก็บรักษามากขึ้น อัตราการสลายตัวมีค่าสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ทั้งนี้ อาจเป็นผลเนื่องจากความร้อนจะไปช่วยเร่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับสาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้สารเกิดการสลายตัวได้มากขึ้นที่อุณหภูมิสูงขึ้น ดังจะเห็นได้จากการศึกษาของ Pinelo *et al.* (2004) ซึ่งแสดงให้ถึงผลกระทบของอุณหภูมิที่สูงขึ้น 60 องศาเซลเซียส มีอัตราการสลายตัวของเคอซิตินสูงมาก โดยเฉพาะเมื่อมีการเก็บรักษามากกว่า 10 วัน ขณะที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส สามารถคงสภาพเคอซิตินให้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากตลอดระยะเวลา 3 เดือน

3. สารปนเปื้อนจำพวกโลหะ

โลหะเป็นสารปนเปื้อนที่พบได้ทั่วไป เช่น เหล็ก อลูมิเนียม แมกนีเซียม สังกะสี ทองแดง ตะกั่ว แคลเซียม เป็นต้น ซึ่งสามารถส่งผลกระทบคุณสมบัติและความคงตัวของสารสำคัญได้ การทดลองเลือกใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งมักพบได้ในน้ำกระด้าง ทำศึกษาในช่วงความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 โมลาร์ ผลที่ได้รับแสดงดัง Fig 5 พบว่า การเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ลงในสารละลายเคอซิตินช่วยเพิ่มความคงตัวของเคอซิติน ดังจะเห็นได้จากปริมาณเคอซิตินในสารละลายเคอซิตินที่มีการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์มีประมาณคงเหลือของสารสูงกว่าสารละลายเคอซิตินที่ไม่ได้มีการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ อีกทั้งเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์พบว่า ความเข้มข้นมีผลน้อยมากต่อการสลายตัวของเคอซิตินดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการปนเปื้อนของแมกนีเซียมคลอไรด์ก็ยังเป็นประโยชน์ต่อความคงตัวของเคอซิติน นอกจากนี้แมกนีเซียมคลอไรด์ยังพบว่าเป็นสารประกอบในผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช ขนมหวาน ขนมอบ โดยช่วยในเรื่องการคงรูปและการคงตัวของสี ของผลิตภัณฑ์ รวมทั้งทำหน้าที่เป็นสารกันเสียของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทล้างออกได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามการมีแมกนีเซียมคลอไรด์อยู่ในผลิตภัณฑ์ต้องมีความระมัดระวังถึงปริมาณที่ประกอบในผลิตภัณฑ์ ซึ่งต้องเป็นไปตามมาตรฐานกำหนด เพื่อให้เกิดความปลอดภัยในการอุปโภคและบริโภค

อย่างไรก็ตามแม้ว่าแมกนีเซียมคลอไรด์จะแสดงผลในด้านการช่วยชะลอการสลายตัวของเคอซิตินได้ แต่ผลจะแตกต่างจากกรณีการศึกษาโลหะในกลุ่มทรานซิชัน (transition elements) ซึ่งมีการรายงานถึงผลของเฟอร์ริก ($Fe2^{+}$) และคอปเปอร์อิออน ($Cu2^{+}$) ที่เร่งการสลายตัวของเคอร์ซิตินให้เร็วยิ่งขึ้น (Makris et al., 2000) ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากโลหะให้กลุ่มทรานซิชันมีเลขออกซิเดชันได้หลายค่า จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่าย อันเป็นตัวการในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในระบบที่ศึกษาได้ขณะที่แมกนีเซียมไอออนซึ่งเป็นโลหะในกลุ่มที่ 2 (alkaline earth metals) เป็นโลหะที่มีเลขออกซิเดชันค่าเดียวคือ 2^{+} ทำให้โอกาสที่ตัวโลหะเองจะเกิดถูกออกซิไดส์ไปเป็นโลหะที่มีเลขออกซิเดชันอื่นจึงไม่สามารถเกิดได้ ทำให้ผลของโลหะจากทั้งสองกลุ่มต่อความคงตัวของเคอซิตินจึงแสดงผลต่างกัน

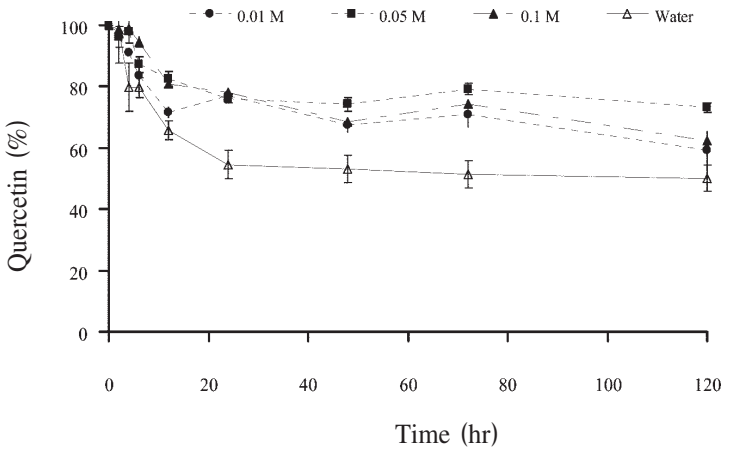

Fig. 5 Stability of querectin in water with and without added 0.01, 0.05 and 0.1 M megnesium ehloride under storage temperature at 25°c for 5 days (n=3).

4. ออกซิเจน

ออกซิเจนถือได้ว่าเป็นตัวการสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอันจะเป็นผลโดยตรงต่อความคงตัวของสาร โดยเฉพาะสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ได้จากพืชซึ่งมีโครงสร้างว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา จากการทดลองจะเห็นว่า สารที่มีและไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารที่วัดได้หรือการสลายตัวของสารในลักษณะที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 6) โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายหลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าออกซิเจนมีผลน้อยมากต่อการสลายตัวของเคอซิติน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าในการศึกษาสารละลายเคอซิตินสัมผัสอากาศหรือออกซิเจนของค่อนข้างน้อย จากการเตรียมชุดทดลองในหลอดทดลองที่มีความกว้างของปากหลอดไม่กว้างนัก อีกทั้งจากปริมาณ สารที่เตรียมทำให้ช่องว่างในการสัมผัสอากาศของสารจนถึงปากหลอดค่อนข้างน้อย จึงทำให้ผลที่ได้รับจากสาร ทั้งสองชุดไม่แตกต่าง ในขณะที่จากการศึกษาก่อนหน้า โดย Makris and Rossiter (2000) ที่แสดงถึงผลของออกซิเจนว่าเป็นปัจจัยหลักในการสลายตัวของเคอซิติน

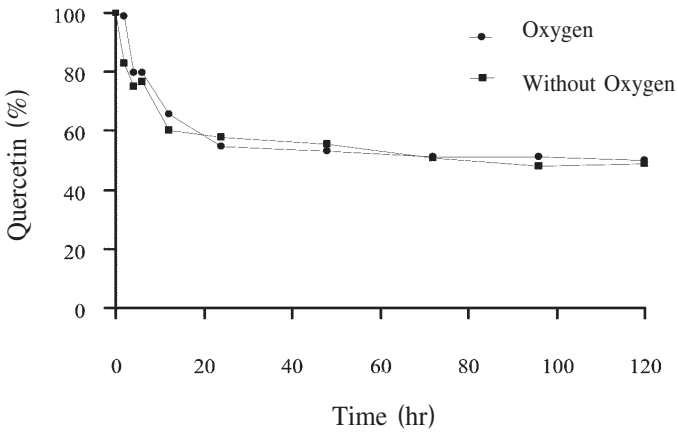

Fig. 6 Stability of querectin in water with and without oxygen contrd under storage temperature at 25°c for 5 days (n=3).

5. วิตามินซี

การเติมสารต้านออกซิเดชันอีกชนิดหนึ่งลงในสารละลายของสารต้านออกซิเดชันชนิดเป้าหมายหลักเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการลดความเป็นไปได้ในการสลายตัวของสารหลัก ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้วิตามินซี ซึ่งถือได้ว่าเป็นสารต้านออกซิเดชันที่รู้จักกันดีและบริโภคกันอย่างกว้างขวาง เมื่อเติมวิตามินซีลงในสารละลายเคอซิตินในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4 ซึ่งจากการศึกษาข้างต้นพบว่าเคอซิตินในระบบของบัฟเฟอร์มีความคงตัวต่ำสุดในการศึกษานี้จึงคาดหมายว่าวิตามินซีจะแสดงความเป็นไปได้ในการช่วยเพิ่มความคงตัวในระบบตัวทำละลายดังกล่าว เพื่อแก้ปัญหาความคงตัวของเคอซิติน เมื่อเข้าสู่ระบบของร่างกายที่มีระบบบัฟเฟอร์เดียวกัน แต่จากผลการศึกษาแสดงดัง Fig7 พบว่าเคอซิตินที่เติมวิตามินซีมีการสลายตัวสูงกว่าสารละลายเคอซิตินที่ไม่มีการเติมสารใดๆ อีกทั้งยังพบการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำตาล เช่นเดียวกับที่พบในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีในสารละลายระบบอื่น แต่ในสารละลายวิตามินซีพบว่า มีความเข้มสูงกว่าและจะมีความเข้มสูงขึ้นตามระยะเวลาของการเก็บรักษา ด้วยเหตุนี้อาจสันนิษฐานได้ว่าเป็นสีที่เกิดจากผลของการสลายตัวของเคอซิตินอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันนั่นเอง และจากการที่พบสีของสารละลายเป็นสีน้ำตาลที่มีความเข้มสูงมากกว่าที่พบในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ อาจเป็นเพราะสีน้ำตาลของสารละลายส่วนหนึ่งมาจาก

กระบวนการ browning reaction ของวิตามินซี โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันอันเนื่องจากปัจจัยหลายประการ เช่น ในสภาวะกรด อุณหภูมิสูง เป็นต้น โดยไม่มีโปรตีนมาเกี่ยวข้อง (non-enzymatic browning)

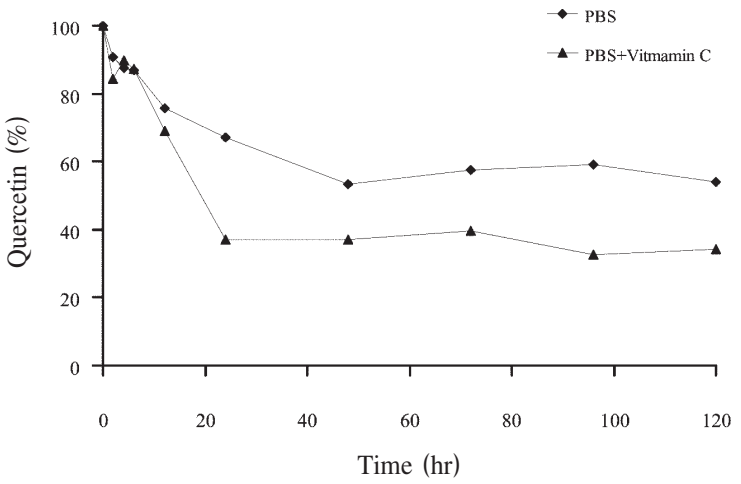

Fig. 7 Stability of quercetin in phasphate buffer system (pH 7.4) with and without added vitamine C under storage temperature at 25°c for 5 days (n=3).

ผลการสลายตัวของเคอซิตินภายใต้สภาวะจำเพาะ สามารถแสดงกลไกของการสลายตัวที่เป็นไปได้ว่าประกอบด้วย 2 กลไกหลัก คือ การแตกตัวของโครงสร้างด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative cleavage) และการเกิดเป็นสายพอลิเมอร์ของเคอซิตินจากกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน โดยกระบวนการออกซิเดชัน (oxidative polymerization) ดัง Fig 8 (Makris and Rossiter, 2000; Pinelo et al., 2004) ซึ่งเหตุที่ทำให้เกิดกลไกการแตกโครงสร้างสารเกิดได้ในตัวทำละลายที่แสดงพฤติกรรมการเป็นตัวรับโปรตอน (hydrogen-acceptor media) ซึ่งถูกเร่งปฏิกิริยาโดยอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และสารที่ทำให้เกิดกระบวนการออกซิเดชัน เช่น ออกซิเจน เอนไซม์ เมื่อพิจารณาจากสารที่เกิดจากการสลายตัวผ่านกลไกนี้พบว่า เป็นสารที่ให้สีน้ำตาลได้ ดังจะพบเห็นได้ทั่วไปในพืชผักที่ เมื่อมีการปล่อยทิ้งไว้จะเกิดเป็นสีน้ำตาลเข้ม จึงอาจกล่าวได้ว่า สารฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชผักและผลไม้นั้น มักจะเกิดการสลายตัวโดยกระบวนหรือสภาวะที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและสำหรับกลไกการเกิดเคอซิตินพอลิเมอไรเซชัน มักพบในกรณีของตัวทำละลายที่แสดงพฤติกรรมการให้โปรตอน (hydrogen-donor media)

สรุปผลการศึกษา

เคอซิตินเป็นสารต้านออกซิเดชันตัวอย่างที่นำมาศึกษาเกี่ยวกับความคงตัวที่เวลาต่างๆ มีการสลายตัวได้รวดเร็วเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ ภาวะด่างในสารละลาย ตัวทำละลายที่เป็นน้ำ ขณะที่ภาวะที่มีออกซิเจนและโลหะปนเปื้อนมีผลกระทบน้อยมากต่อความคงตัวของเคอซิติน การนำสารต้านออกซิเดชันไปใช้ในผลิตภัณฑ์สุขภาพหรือเครื่องสำอางประเภทต่างๆ ต้องป้องกันผลิตภัณฑ์ทั้งในขณะเตรียม เก็บรักษาไปจนถึงขณะใช้ผลิตภัณฑ์ให้ปลอดจากปัจจัยที่มีผลเร่งการสลายตัวดังกล่าว

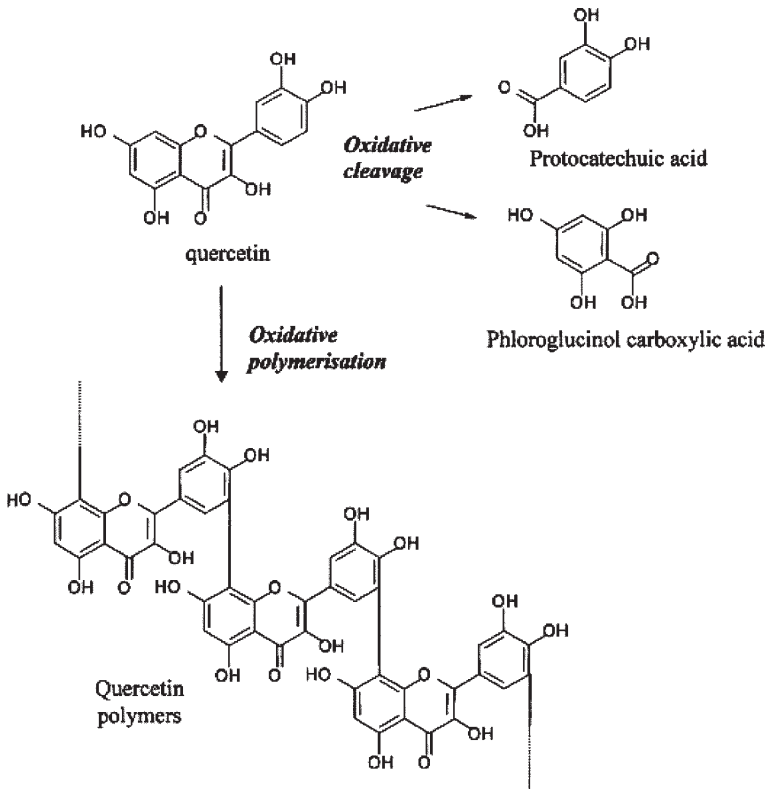

Fig. 8 Degradation mechanisms of quercetin.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติซึ่งให้การสนับสนุนด้านเงินทุนวิจัยและจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยโดยโครงการสหวิทยาการเชิงพลวัตรทางวิชาการซึ่งช่วยอำนวยการชุดโครงการสำหรับการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Ajay M., F.I. Achike, A.M. Mustafa, and M.R.Mustafa. 2006a. Direct effects of quercetin on impaired reactivity of spontaneously hypertensive rat Aortae: comparative study with ascorbic acid. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 33: 345-350.

Ajay M., F.I. Achike, A.M. Mustafa, and A.R. Mustafa. 2006b. Effect of quercetin on altered vascular reactivity in Aortae isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes Res. Clin. Pract. 73: 1-7.

Bonina F., M. Lanza, L. Montenegro, C. Puglisi, A. Tomaino, D. Trombetta, F.Castelli, and A. Saija. 1996. Flavonoids as potential agents against photo-oxidative skin damage. Int. J. Pharm. 145: 87-94.

Casagrande R., S.R. Georgetti, W.A. Verri Jr., D.J. Dorta, A.C. dos Santos, and M.J.V. Fonseca. 2006. Protective effect of topical formulations containing quercetin against

UVB-induced oxidative stress in hairless mice. J. Photochem. Photobiol. B: Biology 84: 21-27.

Cho J.Y., I.S. Kim, Y.H. Jang, A.R. Kim, and S.R. Lee. 2006. Protective effect of quercetin, a natural flavonoid against neuronal damage after transient global cerebral ischemia. Neurosci. Lett. 404: 330-335.

Cook N.C. and S. Samman. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. Nutr. Biochem. 7: 66-76.

Coskun O., M. Kanter, A. Korkmaz, and S. Oter. 2005. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β-cell damage in rat pancreas. Pharmacol. Res. 51: 117-123.

Formica J.V. and W. Regelson, 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food Chem. Toxicol. 33(12): 1061-1080.

Giovanucci E., A. Asherio, and W.C. Willett. 1995. Intake of carotenoids and retinol in relation to the risk of prostate cancer. J. Natl.Cancer Inst. 87: 1767-1776.

Heo H.J. and C.Y. Lee, 2004. Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. J. Agric. Food Chem. 52: 7514-7517.

Kuo S.M. 1996. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. Cancer Lett. 110: 41-48.

Makris D.P. and J.T..Rossiter. 2000. Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-*O*-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. J. Agric. Food Chem. 48: 3830-3838.

Pedrielli P., G.F. Pedulli, and L.H. Skibsted. 2001. Antioxidant mechanism of flavonoids. solvent effect on rate constant for chain-breaking reaction of quercetin and epicatechin in autoxidation of methyl linoleate. J. Agric. Food Chem. 49: 3034-3040.

Pinelo M., L. Manzocco, M.J. Nuñez, and M.C. Nicoli. 2004. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. Food Chem. 88: 201-207.

Ratnam V.D., D.D. Ankola, V.Bhardwaj, D.K. Sahana, and M.N.V. Ravi Kumar. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. J. Control. Rel. 113: 189-207.

van der Woude H., A. Gliszczyńska-Świgło, K. Struijs, A. Smeets, G.M. Alink, I.M.C.M. Rietjens. 2003. Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. Cancer Lett. 200: 41-47.