

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและเหตุผล

ปัจจุบันปัญหาสุขภาพของมนุษย์เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องทั้งโรคชนิดเรื้อรังและโรคแบบเฉียบพลัน อย่างไรก็ตามผู้บริโภคได้หันมาให้ความสนใจอาหารเพื่อสุขภาพหรือผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เพื่อการดูแลสุขภาพแทนการใช้ยารักษาโรค เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ แครอทินอยด์ วิตามินอี และวิตามินซี แอนโทไซยานิน หรืออื่นๆ (Dasgupta, N., & De, B., 2007) สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจเป็นอย่างมาก (Wabel and Blunden et al., 2005) ทั้งในด้านอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการแพทย์ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Bera and Lahiri D et al., 2006) เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหลายชนิด ทั้งในด้านการรักษาสุขภาพและป้องกันโรคอย่างโรคมะเร็งและโรคหลอดเลือดหัวใจ นอกจากนี้ยังมีการใช้สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติในเภสัชภัณฑ์ และส่วนประกอบอื่น ๆ (Matill et al., 1947) สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นโมเลกุลของสารที่สามารถจับกับตัวรับอิเล็กตรอนและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของโมเลกุลสารอื่น ๆ ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังตัวออกซิไดซ์ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระซึ่งสารอนุมูลอิสระเหล่านี้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่และทำลายเซลล์ของร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้ายุติปฏิกิริยาลูกโซ่เหล่านี้ด้วยการเข้าจับกับสารอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยถูกออกซิไดซ์ (Maxwell et al., 2009) ถึงแม้ว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นสิ่งสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต หากแต่ยังเกิดโทษเช่นกัน ดังนั้นพืชและสัตว์จึงรักษาสมดุลด้วยระบบอันซับซ้อน ของปฏิกิริยาโดยสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น กลูต้าไธโอน วิตามินซี และวิตามินอี (Gluud et al., 2007) เช่นเดียวกับเอนไซม์อย่างตัวเร่งปฏิกิริยาและเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์รวมถึง เพอรอกซิเดสต่าง ๆ ระดับสารต้านอนุมูลอิสระที่ต่างหรือเอนไซม์ที่ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มากเกินไปจะยังผลให้เกิดภาวะออกซิเดชันที่มากเกินไป นำมาซึ่งการทำลายหรือสร้างความเสียหายแก่เซลล์ ภาวะที่ออกซิเดชันมากเกินไปจะทำให้เกิดโรคในมนุษย์หลายโรค การใช้สารต้านอนุมูลอิสระในทางเภสัชวิทยา ได้รับการศึกษาอย่างละเอียดในการรักษาภาวะหลอดเลือดในสมองและโรค neurodegenerative disease (Simonetti and Gluud et al., 2007) และลดความเสี่ยงต่อโรคหลายโรคโดยเฉพาะโรคเรื้อรังที่สัมพันธ์กับอาหาร เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคสมอง (เช่น อัลไซเมอร์) เป็นต้น

ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ความให้ความสนใจพืชผักพื้นบ้านที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ผักคะน้า (Jia et al., 2011) ผักโขม (Amin et al., 2006) มะม่วง (Miguel and Giuseppe et al., 2015) ข้าวโพด (Cunshan Zhou and Jiali Hua et al., 2015) หรือชะมวง ซึ่งมีรายงาน พบว่าชะมวงมีสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Bloggang, 2013)(Manager, 2013) โดยได้มีการทดสอบการออกฤทธิ์กับเซลล์มะเร็งปอด 2 ชนิดคือ A459 และ SCB3 และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวอีก 2 ชนิดคือ K562 และ K562/ADM นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร (A. Sakunpak, 2012) และจากคุณสมบัติของชะมวงที่มี

ฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญอยู่นี้ ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาและทดสอบหาสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัด ส่วนต่าง ๆ ของชะมวง

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากส่วนต่าง ๆ ของชะมวง

1.3 แผนการดำเนินงาน

แผนการดำเนินการ วิจัย	พ.ศ. 2558							พ.ศ. 2559				
	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.
1. ศึกษาและสืบค้น ข้อมูล กำหนด เป้าหมายและวาง แผนการดำเนินงาน	←→											
2. ลงพื้นที่เก็บ ตัวอย่างและเตรียม สารเคมีเพื่อใช้ในการ วิจัย	←→											
3. ทำการทดลองและ บันทึกข้อมูลการสกัด หาปริมาณแคโรที นอยด์รวม ฟีนอลิ กรวม ฟลาโวนอยด์ รวมและ ความสามารถในการ ต้านอนุมูลอิสระ จาก ใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดของ ชะมวง	←→											
4. สรุปและวิเคราะห์ ผลการทดลอง					←→							
5. จัดทำรูปเล่มและ นำเสนอผลการวิจัย								←→				

1.4.ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.4.1 ตัวอย่างชะมวง เก็บมาจากบ้านหนองโพธิ์ ต.หนองโพธิ์ อ.นาเชือก จ.มหาสารคาม เมื่อวันที่ 7 มิถุนายน พ.ศ. 2558

1.4.2 วิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมจากใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดของชะมวง ด้วยเครื่อง spectrophotometer

1.4.3 วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมจากใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดของชะมวง โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu's phenol reagent

1.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดของชะมวงโดยใช้วิธี Aluminium chloride colorimetric assay

1.4.5 วิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดของชะมวง ด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ 2-Deoxyribose assay

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณฟีนอลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดของชะมวง

1.5.2 สามารถตีพิมพ์ในงานวิชาการระดับชาติได้

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชะมวง

2.1.1 ข้อมูลทั่วไปของชะมวง

ชื่อ : ชะมวง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Garcinia cowa* Roxb.

ชื่อวงศ์ : GUTTTIFERACEAE

ชื่อสามัญ : -

ชื่ออื่น : หมากโมง (อุดรธานี) กะมวง (ใต้) ส้มมวง (นครศรีธรรมราช) ส้มโง

ถิ่นกำเนิด : พบได้ในป่าร้อนชื้นทั่วไป

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (ภาพที่ 2.1 2.2 และ 2.3) ชะมวงเป็นไม้ยืนต้น ขนาดเล็ก ถึงกลาง สูง 15 - 30 เมตร ไม้ผลัดใบ ทรงพุ่ม เป็นรูปกรวยคว่ำทรงสูง เปลือกสีน้ำตาลปนเทา แตกเป็นสะเก็ด มีน้ำยางสีเหลือง ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามสลับตั้งฉาก รูปวงรีแกมใบหอกหรือรูปขอบขนาน กว้าง 2 - 3.5 เซนติเมตร ยาว 7 - 15 เซนติเมตร ปลายใบป้านหรือแหลมเล็กน้อย ฐานใบสอบแหลม ขอบใบเรียบ เนื้อใบหนาและแข็งเปราะ ก้านใบสีแดงยาว 0.5 - 1 เซนติเมตร ผิวใบเป็นมัน ใบอ่อนสีเขียวอ่อนหรือเขียวอมม่วงแดง ใบแก่สีเขียวเข้ม บริเวณปลายกิ่งมักแตกเป็น 1 - 3 ยอด เส้นใบไม่ชัด แต่ด้านหลังของใบเห็นเส้นกลาง ดอกแยกเพศ อยู่คนละต้น ดอกตัวผู้ออกตามกิ่งเป็นกระจุก ดอกย่อย 3 - 8 ดอก เกสรตัวผู้จำนวนมากเรียงกันเป็นรูปสี่เหลี่ยม กลีบดอกสีเหลือง 4 กลีบ รูปรีแกมหัวใจ มีกลิ่นหอม กลีบเลี้ยง 4 กลีบ รูปรีแกมรูปขอบขนาน ปลายกลีบกลม เส้นผ่าศูนย์กลางดอก 2 - 2.5 เซนติเมตร ดอกตัวเมียเป็นดอกเดี่ยว ดอกมีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย มีปลายเกสรเป็น 4 - 8 เหลี่ยม เกสรเพศเมียออกปลายกิ่ง เกสรเพศผู้เรียงอยู่รอบ ๆ รังไข่ ก้านเกสรติดกันเป็นกลุ่ม ๆ ปลายก้านมีต่อม 1 ต่อม ผลสดมีรูปกลมแป้น ผิวเรียบ ขนาด 2.5 - 6 เซนติเมตร เมื่อสุกสีเหลืองแกมส้มหม่น มีร่องตื้น ๆ 5 - 8 ร่อง ด้านบนปลายบวม และมีชั้นกลีบเลี้ยง 4 - 8 แฉกติดอยู่ เนื้อหนาสีเหลือง มีรสฝาด มีเมล็ดขนาดใหญ่ 4 - 6 เมล็ด รูปรี หนา เรียงตัวกันเป็นวงรอบผล พบทั่วไปในป่าขึ้นระดับต่ำ มีความทนต่อความแห้งแล้งได้ดีกว่าพืชชนิดอื่น ๆ ในสายพันธุ์เดียวกัน พบตามป่าที่ระดับความสูง 600 เมตร จากระดับน้ำทะเล ออกดอกราวเดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายน ติดผลราวเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน ใบมีรสเปรี้ยว นำมาใส่แกง ประุงอาหาร หรือกินเป็นผักสด ผลเมื่อสุกรับประทานได้ มีรสเปรี้ยว แต่มียางมากทำให้ติดฟัน

2.1.3 สรรพคุณ: ยาพื้นบ้านอีสานใช้

- ราก ผสมรากปอดอ่อน รากตุ้มกาขาว และรากกำแพงเจ็ดชั้น ต้มน้ำดื่ม เป็นยาระบาย
- แก่น ฝนหรือแช่น้ำดื่ม แก้อาการเหน็บชา
- เปลือกต้น และยาง มีสีเหลือง ใช้ย้อมผ้า

- ใบอ่อนและผลอ่อน มีรสเปรี้ยวรับประทานได้ ตำรายาไทยใช้ เป็นยาระบาย แก้ไข้ กระจายน้ำ กัดฟอกเสมหะ แก้ธาตุพิการ ราก มีรสเปรี้ยว แก้ไข้ตัวร้อน แก้บิด แก้เสมหะ ใบ มีรสเปรี้ยว ประุงเป็นยากัดฟอกเสมหะ และโลหิต แก้ไอ ผสมกับยาชนิดอื่น ๆ ประุงเป็นยาขับเลือดเสีย
- ใบและดอก เป็นยาระบายท้อง แก้ไข้ กัดฟอกเสมหะ รักษาธาตุพิการ ผล หั่นเป็นแว่นตากแห้ง ใช้กินเป็นยาแก้บิด (รวิทานุทริก, 2559)



ภาพที่ 2.1 ต้นชะมวง

ภาพโดย กัญญาณัฐ แสงจารุ ถ่ายที่ บ้านหนองโพธิ์ ต.หนองโพธิ์ อ.นาเชือก จ.มหาสารคาม 44170
เมื่อ 10 พฤษภาคม 2559



ภาพที่ 2.2 ใบชะมวง
ภาพโดย กัญญาณัฐ แสงจารุ ถ่ายที่ บ้านหนองโพธิ์ ต.หนองโพธิ์ อ.นาเชือก จ.มหาสารคาม 44170
เมื่อ 10 พฤษภาคม 2559



ภาพที่ 2.3 ผลชะมวง
ภาพโดย กัญญาณัฐ แสงจารุ ถ่ายที่ บ้านหนองโพธิ์ ต.หนองโพธิ์ อ.นาเชือก จ.มหาสารคาม 44170
เมื่อ 10 พฤษภาคม 2559

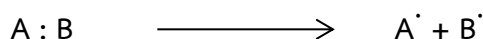
จากรายงานการวิจัยพบว่า ในชะมวงนั้นมีสารชีวภาพอยู่ เช่น สารต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร และยั้งค้นพบสารชนิดใหม่ชื่อชะมวงโอน พบว่ามีฤทธิ์มีในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (A. Sakunpak, 2012) อีกทั้งยังมีสารต้านการอักเสบและสารต้านความเป็นพิษต่อเซลล์อีกด้วย (Husni et al., 2015)

2.2 อนุมูลอิสระ (Free radical)

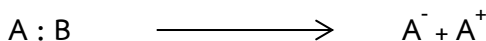
อนุมูลอิสระ หรือ อนุมูล คืออะตอมหรือโมเลกุลใด ๆ ก็ตามที่ไม่มียอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่อยู่ 1 ตัวหรือมากกว่า 1 ขึ้นไป ซึ่งอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ (unpaired electron) คือ อิเล็กตรอนที่ครอบครอง atomic orbital โดยตัวมันเองตัวเดียวการที่โมเลกุลนั้น ๆ สูญเสียอิเล็กตรอนหรือรับอิเล็กตรอนมาเพียง 1 ตัว จะทำให้โมเลกุลนั้นเสถียร อนุมูลอิสระมีทั้งสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้าและอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ ซึ่งสัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระที่จะแสดงด้วยจุดตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น A^{\cdot} , A^+ อิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นเพื่อให้ตัวเองเสถียร นั่นคืออนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะตัว คือมีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ (โอภา วัชระคุปต์, (2006)

2.2.1 การเกิดอนุมูลอิสระ

2.2.1.1 โฮโมไลติกฟิสชัน (Homolytic fission) จะให้อนุมูลอิสระโดยตรง ซึ่งเกิดจากการให้ความร้อนที่ระดับ 450-600 °C ซึ่งสามารถทำลายพันธะระหว่าง C-C C-H หรือ C-O หรืออาจเกิดจากการได้รับรังสี (electromagnetic radiation) หรือเกิดจากสาเหตุอื่นใดก็ตามที่สามารถทำลายพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) แล้วแยกจากกันเป็น 2 ส่วน โดยที่อิเล็กตรอนไปส่วนละ 1 ตัว ซึ่งเกิดเป็นอนุมูลอิสระ 2 ตัว เช่น



2.2.1.2 เฮเทอโรไลติกฟิสชัน (Heterolytic fission) จะให้อนุมูลอิสระในรูปไอออน โดยการแตกตัวแบบนี้จะเกิดขึ้นเมื่อพันธะโควาเลนต์ถูกทำลายแล้วอะตอมใดอะตอมหนึ่งรับเอาอิเล็กตรอนไว้ทั้งสองตัว เช่น

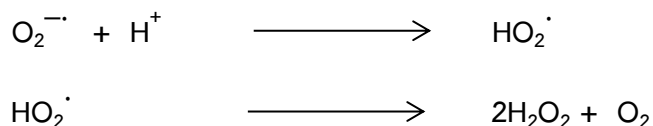


2.2.2 ชนิดของอนุมูลอิสระ

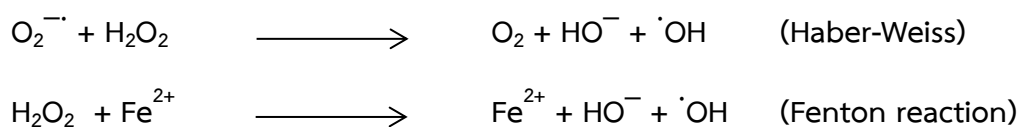
2.2.2.1 อนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive oxygen species, ROS)

(1) Singlet oxygen สำหรับออกซิเจนที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยามากกว่าออกซิเจนทั่วไปในธรรมชาติ คือ Singlet oxygen ซึ่งเกิดจากการได้เพิ่มพลังงานให้แก่โมเลกุลของออกซิเจนที่อยู่ในสภาวะพื้น (ground state) โดยจะมีสองแบบที่มีพลังงานต่างกัน คือ Singlet oxygen ที่มีพลังงานต่ำ และ Singlet oxygen ที่มีพลังงานสูง ซึ่ง Singlet oxygen ทั้งสองแบบนี้มีความไวในการเกิดปฏิกิริยามากกว่า ground state และ Singlet oxygen แบบที่มีพลังงานสูง จะมีความไวสูงสุดโดยมีพลังงานสูงกว่าออกซิเจนใน ground state ถึง 22.4 kcal

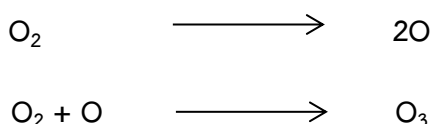
(2) Superoxide radical : $O_2^{\cdot -}$ ถ้าเติมอิเล็กตรอน 1 ตัวให้กับโมเลกุลของออกซิเจนที่ ground state อิเล็กตรอนนั้นจะเข้าไปอยู่ในออร์บิทัลของพันธะที่มีระดับพลังงานสูง ทำให้เกิดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ หรืออนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot -}$) ในระบบของสิ่งมีชีวิตออกซิเจนจะถูกรีดิวซ์โดยการเติมอิเล็กตรอน 2 ตัว ได้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังสมการ



ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สลายตัวได้ง่ายโดยพันธะระหว่างอะตอมออกซิเจนจะแตกออกแบบ Homolytic fission ได้อนุมูลของไฮดรอกซี 2 อนุมูล นอกจากนี้อนุมูลไฮดรอกซียังเกิดได้จาก อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยปฏิกิริยา Haber-Weiss และ Fenton reaction ดังสมการ



(3) โอโซน (Ozone) คือโมเลกุลของแก๊สที่ประกอบไปด้วยอะตอมของออกซิเจน 3 อะตอม มีสีฟ้าอ่อน โอโซนทำหน้าที่เสมือนเกราะป้องกันรังสีจากดวงอาทิตย์ในชั้นบรรยากาศของโลก ซึ่งโอโซนไม่ใช่อนุมูลอิสระเหมือนออกซิเจนแต่เป็นไดอะแมกเนติก (Diamagnetic) โอโซนเกิดขึ้นจากกระบวนการ Photodissociation ของโมเลกุลของ O_2 ได้เป็นอะตอมของออกซิเจน 2 อะตอม ซึ่งเกิดปฏิกิริยาดังสมการ



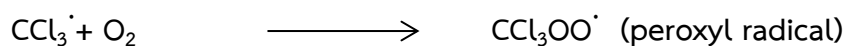
โอโซนเป็นสารที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์รุนแรงกว่าออกซิเจนที่ Ground state พิษของโอโซนเกิดจากการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยตรง โดยจะช่วยป้องกันรังสียูวีจากดวงอาทิตย์ไม่ให้เข้ามาในโลกมากเกินไป โอโซนมีกลิ่นที่ทำให้เกิดการระคายเคืองและสามารถสร้างความเสียหายให้กับปอดได้อย่างรุนแรง

2.2.2.2 อนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive nitrogen species, RNS)

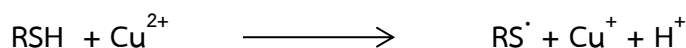
ไนตริกออกไซด์ ($\cdot NO$ หรือ NO) เป็นแก๊สที่ไม่มีสี จะเป็นฝ่ายให้อิเล็กตรอนกับโมเลกุลอื่น ซึ่งทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้เป็นไนโตรเจนไดออกไซด์ (NO_2) เป็นแก๊สพิษสีน้ำตาลและเป็นสารออกซิไดซ์ที่แรง ในสิ่งมีชีวิตไนตริกออกไซด์จะผลิตได้จาก L-arginine โดยเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (Nitric oxide synthase, NOS) ซึ่งมีอยู่สองไอโซฟอร์ม คือเอนไซม์ที่อยู่เฉพาะในเนื้อเยื่อและเซลล์บางชนิด (Constitution synthase) และไอโซฟอร์มที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดย Macrophage

เรียกว่า Inducible NOS (iNOS) ไนตริกออกไซด์ที่สร้างโดย iNOS จะมีความเข้มข้นสูงในระยะเวลานานจะถูกออกซิไดซ์อย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน เกิดเป็นอนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจน เป็นองค์ประกอบ RNS จะทำปฏิกิริยาแล้วให้หมู่ไนโตรเจนแก่หมู่ไทออล (-SH) ของกลูตาไทโอนหรือทำปฏิกิริยาให้หมู่ไนโตรเจนแก่หมู่ไทออลในโปรตีน ซึ่งการเกิดปฏิกิริยานี้มีผลให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนไป และจะทำให้เซลล์ทำงานบกพร่อง

2.2.2.3 ไตรคลอโรเมทิล (Trichloromethyl, $\text{CCl}_3\cdot$) เป็นอนุมูลอิสระที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่อยู่ที่คาร์บอน (Carboncentred radical) เกิดจากการทำลายคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (Carbon tetrachloride, CCl_4) อนุมูลอิสระที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่อยู่ที่คาร์บอนนี้เป็นสารตัวกลาง (Intermediate) ที่สำคัญในการเกิดออกซิเดชันของลิพิด (Lipid peroxidation) เกิดได้ดังสมการ



2.2.2.4 ไทอิล/เปอร์ไทอิล (Thiyl/perthiyl, $\text{RS}\cdot/\text{RSS}\cdot$) เป็นอนุมูลอิสระที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่อยู่ที่ซัลเฟอร์ เกิดจากสารประกอบที่มี Thiol ถูกออกซิไดซ์โดยโลหะทรานซิชัน ดังสมการ

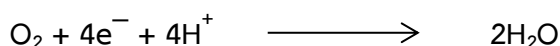


2.2.2.5 โลหะทรานซิชัน (Transition-metal ions) โลหะทรานซิชันทั้งหมดมีอิเล็กตรอนเดี่ยวจึงจัดเป็นอนุมูลอิสระยกเว้น สังกะสี เช่น เหล็ก และทองแดง เพราะมีความสามารถในการเปลี่ยนออกซิเดชันนัมเบอร์ที่ละหนึ่ง ทำให้มันสามารถรับหรือให้อิเล็กตรอนที่ละหนึ่งได้ โลหะทรานซิชันจึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพสูง (โอภา วัชรคุปต์ และคณะ, 2006 ; ประสาร สวัสดิ์ชิตัง)

2.3 อนุมูลอิสระในระบบของสิ่งมีชีวิต

อนุมูลอิสระในระบบสิ่งมีชีวิตเกิดได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมในภาวะปกติของ Aerobic cells ซึ่งอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้หลายสาเหตุดังต่อไปนี้

2.3.1 ความผิดปกติของระบบการทำงานของไมโทคอนเดรีย Reactive species (RS) หรือสารที่มีความไวในการทำปฏิกิริยา เกิดได้จากกระบวนการเผาผลาญในไมโทคอนเดรียโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ขบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่เมมเบรนของแบคทีเรีย ที่อยู่ภายในไมโทคอนเดรีย และที่เอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม (Endoplasmic reticulum) ของ Eukaryotic cells ซึ่งอาจเป็นแหล่งผลิตอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ที่สำคัญที่สุดในสิ่งมีชีวิต การรั่วของอิเล็กตรอนออกจากขบวนการนี้ทำให้เกิด $\text{O}_2^{\cdot-}$ ส่วนการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่สมบูรณ์ให้กับออกซิเจนจะทำให้ได้น้ำ ดังสมการ



โดนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะไปทำลายเสียหายแก่มิโทคอนเดรีย (Mitochondria) DNA โดยเฉพาะ mRNA ซึ่งอนุมูลอิสระจะทำให้ mRNA เสียหายไปเกิดความผิดปกติ แล้วจะทำให้ได้โปรตีนที่ผิดปกติ

2.3.2 เอนไซม์ (Enzyme) เอนไซม์หลายชนิดมีความสามารถในการรีดิวซ์ออกซิเจนไปเป็น $O_2^{\cdot-}$

2.3.2.1 เปอร์ออกซิเดสชนิดที่ไม่จำเพาะ (Peroxidase, non-specific) ในพืช แบคทีเรีย และเนื้อเยื่อสัตว์บางชนิด เช่น Phagocyte myeloperoxidase และ Thyroid peroxidase ซึ่งสร้าง $O_2^{\cdot-}$ ระหว่างการเกิดปฏิกิริยา

2.3.2.2 Cellobiose oxidase ในเชื้อรา ประกอบไปด้วย Flavin adenine dinucleotide, FAD ซึ่งเป็น Oxidized form และ b-type cytochrome จะไปออกซิไดซ์น้ำตาล โมเลกุลคู่หลายชนิด และเกิด $O_2^{\cdot-}$ ด้วย

2.3.2.3 Nitric oxide synthase (NOS) พบในเซลล์ส่วนใหญ่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ผลิตออกไซด์จาก L-arginine และเกิดจาก $O_2^{\cdot-}$ เมื่อมี Arginine ต่ำ

2.3.2.4 Indoleamine 2,3-dioxygenase พบในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ของสัตว์ โดยเฉพาะ ลำไส้เล็ก แต่ไม่พบในตับ เอนไซม์นี้จะไปแยก Indole ring ของ Tryptophan และสารอื่นที่สัมพันธ์กัน เกิด $O_2^{\cdot-}$

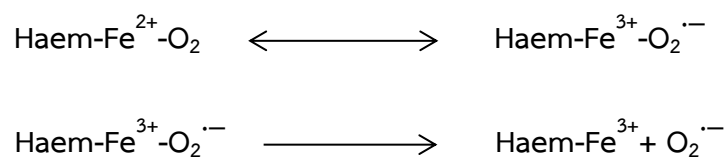
2.3.2.5 Tryptophan dioxygenase พบในเซลล์ตับ ทำหน้าที่เหมือนกับ Indoleamine 2,3-dioxygenase แต่มีความจำเพาะกับ Tryptophan

2.3.2.6 Galactose oxidase พบในเชื้อรา ทำหน้าที่ออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ไปเป็นอัลดีไฮด์ ($-CH_2-OH$ เป็น $-CHO$)

2.3.2.7 Aldehyde oxidase พบในตับ ทำหน้าที่ออกซิไดซ์อัลดีไฮด์ และสารอื่น ๆ

2.3.2.8 Xanthine oxidase พบที่ลำไส้และเนื้อเยื่อที่ขาดเลือด ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา ออกซิเดชันของ Hypoxanthine และ xanthine เพื่อเป็นกรดยูริก (Uric acid)

2.3.3 ฮีมโปรตีน (Haem protein) เหล็กที่อยู่ใน Haem ring ของโปรตีนและไมโอโกลบิน นั้นอยู่ในรูป Ferrous ion (Fe^{2+}) เมื่อรวมกับออกซิเจนก็ยังคงอยู่ในฟอร์มเดิม แต่เมื่อเกิดการย้าย อิเล็กตรอนและจะเกิดโครงสร้างตัวกลางขึ้นมา ดังสมการ



Ferric ion (Fe^{3+}) ที่อยู่ใน Haem ring (Haem-Fe^{3+}) จะไม่สามารถจับกับออกซิเจนได้ จึงไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งก็คือ Methaemoglobin หรือ Metmyoglobin นั่นเอง ฮีมโกลบินในเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ประมาณ 3% จะเกิดออกซิเดชันทุกวัน นั่นคือเม็ดเลือดแดงจะสัมพันธ์กับ $O_2^{\cdot-}$ ในปริมาณหนึ่งทุกวัน

2.3.4 การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ของแบคทีเรีย (Bacterial superoxide production) ใน *E. coli* มีเอนไซม์บางอย่างในไซโทพลาซึมสามารถให้ $O_2^{\cdot-}$ จากปฏิกิริยาของมัน แต่ส่วนใหญ่จะมาจาก electron transport chain นอกจากนี้ $O_2^{\cdot-}$ ยังเกิดปฏิกิริยาของ fumarate reductase และ nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenase

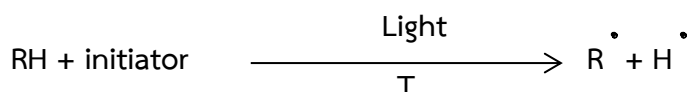
2.3.5 เอนโดพลาสมิครีติคูลัม (Endoplasmic reticulum) มีการทดลองพบว่า endoplasmic reticulum ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อชนิดต่างๆมีการผลิต $O_2^{\cdot -}$ และ H_2O_2 อย่างรวดเร็ว เมื่อพบกับ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) โดย ROS ที่เกิดขึ้นมาจากระบบของ Cytochrom P450

2.3.6 นิวเคลียส (Nucleus) การรั่วของอิเล็กตรอนจากขบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในนิวเคลียสไปสู่ O_2 แล้วเกิดเป็น $O_2^{\cdot -}$ ในสถานะที่มี NADH หรือ NADPH และอาจมีความสำคัญมาก เพราะอนุมูลที่เกิดจะอยู่ใกล้กับ DNA ในนิวเคลียส

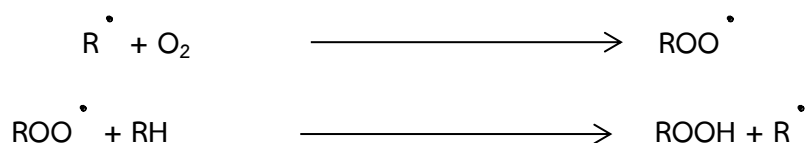
2.3.7 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันตัวเอง (Auto-oxidation reaction) เนื่องจากออกซิเจนไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาจึงเป็นสิ่งที่ยากที่ออกซิเจนจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขึ้นด้วยตัวมันเอง การเกิดปฏิกิริยาจึงมีการคาดคะเนว่าน่าจะเกิดจากการมีไอออนของโลหะทรานซิชัน เช่น เหล็ก และทองแดง ที่ปนอยู่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โมเลกุลหลายชนิดในสิ่งมีชีวิตสามารถรีดิวซ์ออกซิเจนอย่างช้าๆ แล้วเกิดเป็น $O_2^{\cdot -}$ ซึ่งอนุมูลอิสระนี้ก็จะไปออกซิไดซ์สารประกอบนั้นเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ซับซ้อน (Complex chain reaction) (โอบา วัชระคุปต์, 2249 ; ประสาร สวัสดิ์ชิตัง)

2.3.7.1 Auto-oxidation แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

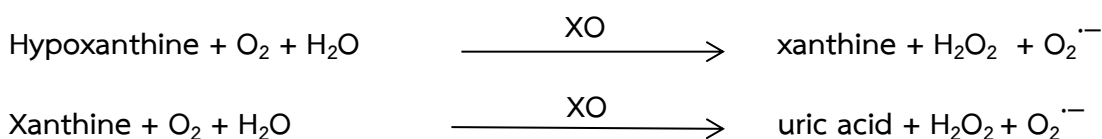
(1) ระยะเหนี่ยวนำเริ่มต้น (initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ โดยมีแสงหรืออุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ



(2) ระยะเพิ่มจำนวน (propagation) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxy radical) แล้วปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydro peroxide) และอนุมูลอิสระซึ่งถ้ามีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่งก็จะเกิดปฏิกิริยาต่อทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นก็สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนใหม่ได้ต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ ดังสมการ



(3) ระยะสิ้นสุด (Termination) เป็นระยะ ที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร ดังสมการ (Nawar, 1996)



2.3.8 อนุมูลอิสระที่เกิดจากสภาวะแวดล้อม

2.3.8.1 การเกิดความเครียด เนื่องจากความเครียดกระตุ้นให้ร่างกายทำงานหนัก ใช้ออกซิเจนมาก กระตุ้นให้ต่อมหมวกไตหลั่งฮอร์โมนอะดรีนาลินแล้วมีผลให้ความดันเลือดสูง การเผาผลาญอาหารมากขึ้น มีการเกิดอนุมูลอิสระขึ้นในระหว่างที่ร่างกายกำลังสร้างฮอร์โมนชนิดหนึ่งที่ต่อต้านความเครียด และระหว่างที่เอนไซม์กำลังแยกสลายฮอร์โมนนี้ด้วย

2.3.8.2 การได้รับสารพิษ สารพิษที่ได้รับนี้เป็นแบบตั้งใจและไม่ตั้งใจรับเข้ามา เช่น สารเสพติดต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็น แอลกอฮอล์ กาแฟ ภัยุชา เฮอร์อีน สารพิษในอาหาร เช่น ยาฆ่าแมลง วัตถุปรุงแต่งอาหาร สารพิษจากผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในชีวิตประจำวัน สารพิษจากยาชนิดต่าง ๆ

2.3.8.3 การได้รับคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า เช่นรับจากเครื่องใช้ไฟฟ้าต่าง ๆ ที่ใช้ในชีวิตประจำวัน ได้แก่ วิทยุ โทรทัศน์ คอมพิวเตอร์ โทรศัพท์มือถือ เต้าไมโครเวฟ เป็นต้น ซึ่งสร้างความเสียหายต่อร่างกายทั้งภายในและภายนอกในการทะลุทะลวงเข้าไปทำลายเซลล์ต่าง ๆ ได้ง่าย

2.3.8.4 การได้รับแสงแดด การได้รับแสงแดดแรง ๆ เป็นประจำ ร่างกายย่อมสะสมอนุมูลอิสระมากขึ้น โดยเฉพาะผู้ที่ทำงานกลางแจ้งเป็นเวลานาน ๆ

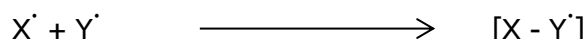
2.3.8.5 การได้รับรังสี รังสีเอ็กซ์เรย์ที่ได้รับจากฉายรังสีเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรค หากได้รับบ่อย ๆ ดีเอ็นเอจะถูกทำลายและมีความเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็ง

2.3.8.6 การกินมากเกินไป เนื่องจากถ้ากินอาหารมากร่างกายก็ต้องเผาผลาญ ต้องใช้พลังงานสูง และเกิดอนุมูลอิสระขึ้นมาในกระบวนการเผาผลาญนี้ (โรสวันย์ พิริยะสมบุรุษ, 2553)

2.4 การเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ

ความไวในการทำปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับ ชนิดของอนุมูลอิสระ และโมเลกุลหรือสารที่อนุมูลนั้นรวมอยู่ด้วยกัน ลักษณะการทำปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระดังนี้

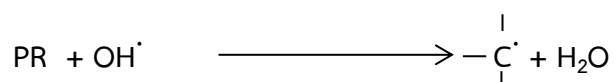
2.4.1 อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยารวมตัวกับอนุมูลอื่น เกิดเป็นแอดดักท์ (adduct) ที่มีอิเล็กตรอนที่ยังไม่คู่ เช่น OH^\cdot เข้ารวมกับกวานีน (guanine) ใน DNA ได้เป็น 8-hydroxyhuanine สมการทั่วไปแสดงดังนี้



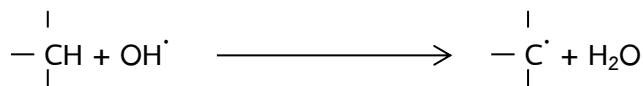
2.4.2 อนุมูลอิสระอาจจะเป็นสารรีดิวซ์ ที่ให้อิเล็กตรอน 1 ตัว กับสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ ทำให้สารที่ได้รับอิเล็กตรอนมามีอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นละไม่มีคู่ เช่น $\text{CO}_2^{\cdot-}$ ไปรีดิวซ์ Cu^+ กลายเป็น Cu สมการทั่วไปแสดงดังนี้



2.4.3 อนุมูลอิสระอาจเป็นสารออกซิไดซ์ ที่รับอิเล็กตรอน 1 ตัว มาจากสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ ทำให้สารนั้นกลายเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ สมการทั่วไปแสดงดังนี้



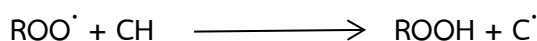
2.4.4 อนุมูลอิสระอาจดึงเอาอะตอมของไฮโดรเจนจาก C-H (จาก Carbon center) ทำให้ อิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่อุ่อยู่บนคาร์บอนอะตอม สมการทั่วไปแสดงดังนี้



ชีวโมเลกุลส่วนใหญ่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ การเกิด OH^\cdot ในสิ่งมีชีวิตจึงเป็นการเริ่มต้นของ ปฏิกิริยาลูกโซ่ในการทำลายชีวโมเลกุล เช่น การเกิดออกซิเดชันของลิพิด (lipid peroxidation)

2.4.4.1. ขั้นเริ่มเกิดปฏิกิริยา (Initiation) สารที่มีคุณสมบัติในการดึงอะตอมของไฮโดรเจน จาก methyl group ($-\text{CH}_2-$ ของกรดไขมัน ได้แก่ OH^\cdot , HO_2^\cdot , RO^\cdot , ROO^\cdot และสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กและออกซิเจน (iron-oxygen complexes) อะตอมของไฮโดรเจนที่ง่ายต่อการถูกดึงคืออะตอมที่เกาะกับคาร์บอนอะตอมที่อยู่ถัดจาก $-\text{C}=\text{C}-$ ซึ่งเรียกว่า allylic hydrogen และถ้าอยู่ระหว่างพันธะคู่สองพันธะ จะยิ่งง่ายต่อการหลุดออก กรดไขมันไม่อิ่มตัวจะถูกดึงอะตอมไฮโดรเจนได้ง่ายกว่ากรดไขมันอิ่มตัว

2.4.4.2. ขั้นการเพิ่มอนุมูลอิสระ (Propagation) เมื่ออะตอมไฮโดรเจนหลุดออกจากคาร์บอนอะตอม จะทำให้ตำแหน่งที่อะตอมไฮโดรเจนหลุดออกนั้นมีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่อุ่ได้เป็นอนุมูลของคาร์บอน ($-\text{C}^\cdot\text{H}-$) และอนุมูลนี้จะมีการจัดเรียงตัวใหม่เพื่อให้ตัวมันเองมันเสถียร ซึ่งเรียกว่า conjugated diene แต่ถ้า $-\text{C}^\cdot\text{H}-$ สองตัวมาชนกันอาจจะเกิด Cross link ของสายของกรดไขมันได้ แต่อันที่น่าจะเป็นไปได้มากกว่าการเกิด Cross link คือ $-\text{C}^\cdot\text{H}-$ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ คือการรวมตัวกับออกซิเจน เกิดเป็น peroxy radical (ROO^\cdot) โดย ROO^\cdot ที่เกิดขึ้นนี้สามารถไปดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนจากไขมันโมเลกุลอื่นอยู่ใกล้เคียงได้อีก ทำให้เกิด lipid hydroperoxide (ROOH) และเกิดอนุมูลของคาร์บอน ที่สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนแล้วได้เป็น peroxy radical ได้ จึงกลายเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อเนื่องกัน ดังสมการ



2.5 อนุมูลอิสระกับการเกิดโรค

เป็นตัวการสำคัญของการเกิดโรคต่าง ๆ หลายโรค อีกทั้งยังทำให้เกิดความเสื่อมตามส่วน ๆ ของร่างกายด้วย โดยอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยาทันทีกับ Lipids, Nucleic acids, Proteins, Sugars และ Sterols (Lee, Koo, & Min, 2004) ความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระทำให้มีอนุมูลอิสระมากเกินไป และเกิดภาวะที่เซลล์และร่างกายถูกออกซิไดซ์ (oxidative stress) ซึ่งภาวะดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องในการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น ภาวะผนังเส้นเลือดแดงหนาตัวและยืดหยุ่นน้อยลงเพราะมีการสะสมไขมันที่ภายในผนังเส้นเลือด ทำให้เส้นเลือดตีบตันเกิดภาวะขาดเลือดชั่วคราวที่สมอง และหัวใจ นอกจากนี้ oxidative stress ยังเกี่ยวกับลักษณะโรคหรืออาการผิดปกติต่าง ๆ เช่น อัลไซเมอร์ พาร์กินสัน เป็นต้น (โอภา วัชรคุปต์ และคณะ, 2549)

2.5.1 โรคหัวใจและสมองขาดเลือด อนุมูลอิสระทำให้เกิดภาวะหัวใจและสมองขาดเลือดจากการเกิด lipidperoxidation แล้วทำให้หลอดเลือดผิดปกติอีกเสบและอุดตัน เกิดภาวะขาดเลือด

ช่วงหนึ่งในระยะแรก และเมื่อเลือดกลับไปเลี้ยงใหม่ทำให้สภาพทางชีวเคมีของเซลล์เปลี่ยนไปทำให้ออนมูลอิสระเกิดมากขึ้น

2.5.1.1 ภาวะขาดเลือดช่วงหนึ่งในระยะแรก การที่เซลล์ขาดออกซิเจนและพลังงานอันเนื่องมาจากภาวะหลอดเลือดตีบตันมีผลให้มีการหลั่ง glutamate เพิ่มขึ้น แล้วจับกับ NMDA/ AMPA receptor จะทำให้มีแคลเซียมเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้เกิด Nitric oxide เพิ่มขึ้นมาก ไมโทคอนเดรียถูกทำลาย นอกจากนี้ยังกระตุ้นเอนไซม์ Protease และ Phospholipase ซึ่งทำให้เกิดอนุมูลอิสระ

2.5.2 โรคมะเร็ง คือโรคที่เกิดจากความไม่สมดุลของร่างกายระหว่างการแบ่งตัวและเปลี่ยนสภาพของเซลล์กับการตายและการมีอายุของเซลล์ กลไกสำคัญ 2 กลไกที่น่าจะทำให้เกิดมะเร็งคือ

2.5.2.1 สารก่อมะเร็งทำให้มีการสร้าง DNA และการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นเป็นสาเหตุให้เกิดการก่อการกลายพันธุ์ในการแบ่งตัวของเซลล์ เนื่องจากการซ่อมแซมที่บกพร่อง

2.5.2.2 ความไม่สมดุลระหว่างการเจริญเติบโตและการตายของเซลล์ เมื่อเซลล์มีการเสียหายของ DNA จะมีกระบวนการกำจัดเซลล์นั้นๆ ที่เรียกว่า apoptosis โดยมีโปรตีน p53 ที่ทำหน้าที่สำคัญในการตรวจสอบความถูกต้องของ DNA ที่สร้างขึ้นในระหว่างการแบ่งเซลล์ หากพบว่าเซลล์มีความผิดปกติโปรตีน p53 จะส่งสัญญาณให้เกิด apoptosis เพื่อทำลายเซลล์ที่ผิดปกติ นั้น ๆ ซึ่งถ้าหาก apoptosis ผิดปกติ เช่น ในกรณีที่กระบวนการตายไม่ทำงานก็จะเกิดการแบ่งตัวของเซลล์จำนวนมากซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมะเร็ง

2.5.3 ภาวะแทรกซ้อนเนื่องจากโรคเบาหวาน โรคเบาหวานมักจะมีอาการ peripheral neuropathy ซึ่งเกิดจากภาวะ Oxidative stress ทำให้เกิดสารพิษคือ advanced lipoxidation end products ซึ่งเรียกว่า glycotoxin สารนี้สามารถเข้าไปจับกับโปรตีนฮีโมโกลบินที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงทำให้ไม่สามารถทำงานได้ เม็ดเลือดก็จะไม่สามารถนำก๊าซออกซิเจนไปให้เซลล์ต่าง ๆ ของร่างกายได้ทำให้เกิดการทำลาย sensitive tissues นอกจากนี้ยังเข้าไปสะสมในหลอดเลือดที่ดวงตาทำให้จอประสาทตาเสื่อม ถ้าไปสะสมในเส้นประสาทจะทำให้เส้นประสาทเสื่อม และถ้าเข้าไปสะสมในเนื้อเยื่อของไตทำให้หน่วยไตทำงานไม่ได้ เป็นต้น

2.5.4 ภาวะการติดเชื้อที่ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ องค์ประกอบในเม็ดเลือดขาวจะจับกับเอนไซม์ NADPH oxidase ทำให้เกิดอนุมูลอิสระภายนอกเซลล์เพิ่มมากขึ้น ส่วนการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์นั้นเป็นผลมาจากการสร้าง cytokines ในกระบวนการอักเสบ การรื้อออก และการเกิดพิษจาก แอลฟา-TNF, IL-1 ซึ่งเกิดอนุมูลในปริมาณมากส่งผลให้เนื้อเยื่อเสียหายอย่างมาก

2.5.5 กระบวนการชราภาพ อนุมูลอิสระมีบทบาทใน cell transduction หรือ cell transduction ซึ่งเป็นกลไกทางชีววิทยาในการติดต่อกันของเซลล์เพื่อประสานกันในการทำงานหรือส่งสัญญาณให้รู้ถึงสภาวะภายนอกซึ่งจะทำให้เกิดการตอบสนองต่อสิ่งเร้า เช่น สารพิษ สารสื่อประสาท และเชื้อโรค พบว่าเซลล์หลายชนิดเมื่อถูกกระตุ้นโดย cytokines, growth factor และ hormone จะเกิดการสร้างอนุมูลอิสระในปริมาณต่ำ ๆ ใช้ในการเหนี่ยวนำและสื่อสัญญาณเกี่ยวกับการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่ต่าง ๆ

(เอมอร์ ตริภิญโญยศ, 2551)

2.6. สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ หมายถึง สารใดก็ตามที่ปรากฏอยู่ในปริมาณที่ต่ำกว่าสารที่ถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย แล้วช่วยชะลอหรือป้องกันการเกิดออกซิเดชันของสารที่ถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายนั้น โดยสารที่ถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายคือสารชีวโมเลกุลทุกชนิด สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยาถูกโซ่ สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น กรดยูริก บิลิรูบิน จะกำจัดอนุมูลอิสระส่วนวิตามินซี วิตามินอี กลูตาไธโอน เบตาแคโรทีน และยูบิควิโนน จะหยุดปฏิกิริยาถูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระมีโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์หรือความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระในอนุมูลอิสระในอุดมคติควรมีคุณสมบัติที่สำคัญดังนี้ มีความเฉพาะเจาะจงสูงในการเข้าจับหรือทำปฏิกิริยาโดยตรงและกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไป สามารถทำปฏิกิริยาคีเลทกับโลหะได้ เป็นสารต้านออกซิเดชัน ไม่มีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน

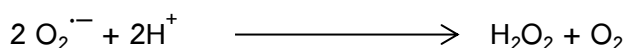
สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งได้ 2 ประเภทใหญ่ ๆ ตามแหล่งที่มา ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง และสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากภายนอก

2.6.1. สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง

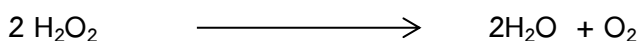
สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสามารถสร้างขึ้นเองได้ เช่น เอนไซม์คะตาเลส จะสามารถการทำงานได้ต้องอาศัยแร่ธาตุ เช่น สังกะสี ทองแดง แมงกานีสเหล็ก ซีลีเนียม

2.6.1.1 สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์

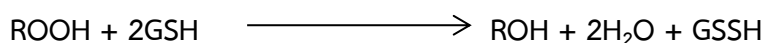
(1) ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase, SOD) จะอยู่ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ สำหรับใน Eukaryote ประกอบไปด้วย 2 หน่วยย่อย ซึ่งมีไอออนของทองแดงและไอออนของสังกะสีอยู่ด้วย โดยจะไปเร่งปฏิกิริยา dismutation ของ $O_2^{\cdot-}$ ไปเป็น hydrogenperoxide ดังสมการ



(2) ตะตาเลส (Catalase, CAT) catalase ประกอบด้วยโปรตีน 4 หน่วยย่อย (subunit) แต่ละ subunit ประกอบด้วย ferric heme group อยู่บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ โดย catalase จะทำหน้าที่ทำลาย H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของ SOD ดังสมการ



(3) กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase, GPX) พบทั่วไปในเนื้อเยื่อสัตว์ มีซีลีเนียมอยู่ที่ active site และมีความจำเพาะต่อรีดิวซ์กลูตาไธโอน (reduced glutathione, GSH) ในฐานะที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน GPX ประกอบด้วย 4 subunit ซึ่งเอนไซม์นี้ทำหน้าที่กำจัด peroxide โดยทั่วไปออกซิไดซ์ GSH กลายเป็น oxidized glutathione (GSSG) เกิดดังสมการ

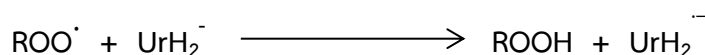


2.6.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่เป็นไขมัน

(1) กลูตาไทโอน (Glutathione) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจึงช่วยชะลอความเสื่อมของร่างกาย ช่วยให้ตับขับสารพิษออกจากร่างกาย และยังสามารถรักษาโรคมะเร็ง โรคหัวใจข้ออักเสบ โรคพาร์กินสัน โรคตับ โรคไต โรคเอดส์ ภาวะเป็นหมันในเพศชาย และภาวะหูตึงจากเสียงดัง ผลข้างเคียงทำให้ผิวขาว หากขาดไป วิตามินซีและวิตามินอีอาจจะทำงานได้ไม่เต็มที่

(2) กรดไลโปอิก (Lipoic acid) เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ที่สำคัญในสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์หลายชนิด (multi-enzyme complexes) lipoic acid สามารถจับกับไอออนของเหล็กและทองแดงได้ ทำให้โลหะเหล่านี้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันได้

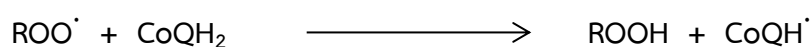
(3) กรดยูริก (Uric acid) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ hypoxanthine และ xanthine โดยการทำงานของ xanthine oxidase และ dehydrogenase ในคน ที่ไม่มี urate oxidase จึงทำให้มี urate สะสมอยู่ในเลือดระดับหนึ่ง และถูกขับออกทางปัสสาวะ การผลิต urate มากเกินไปจะทำให้ไปสู่การตกผลึกและทำให้เกิดโรคเก๊าท์ urate สามารถทำปฏิกิริยาในการกำจัด ROO^{\cdot} , OH^{\cdot} และ singlet oxygen ในการทดลอง และยังพบว่า urate ยังสามารถทำปฏิกิริยากับไอโซนและ NO_2^{\cdot} ดังสมการ



(4) บิลิรูบิน (Bilirubin) ได้จากการสลาย haem ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมผลิตจาก catabolism ของฮีโมโกลบิน โดย reticuloendothelial cells ในม้าม ตับ และไขกระดูก ในร่างกายมนุษย์ bilirubin จะจับกับอัลบูมิน แล้วถูกส่งไปที่ตับเพื่อกำจัดออกทางน้ำดี bilirubin เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการจับกับอนุมูลเปอร์ออกไซด์ และ singlet oxygen ได้เป็นอย่างดี bilirubin ที่จับอยู่กับ albumin จึงช่วยป้องกันทั้ง albumin และกรดไขมันที่จับอยู่กับ albumin จากการทำลายของอนุมูลอิสระ

(5) ฮอโมนเพศ (Sex hormones) ฮอโมนในเพศหญิงจำพวก estradiol, estrone, และ poeestriol สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันในระดับหลอดทดลองที่ความเข้มข้นเป็น micromolar ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันชนิดที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain-breaking antioxidant)

(6) โคเอนไซม์คิว (Coenzyme Q) มีบทบาทในการขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย มันจะเกิดออกซิเดชันและรีดักชันไปพร้อม ๆ กันผ่านสารตัวกลางที่เป็นอนุมูลอิสระคือ ยูเซมิควิโนน (ubisemiquinone, $CoQH^{\cdot}$) ในหลอดทดลอง ubiquinol ($CoQH_2$) สามารถจับกับ ROO^{\cdot} ดังนั้นจึงยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันได้ ดังสมการ



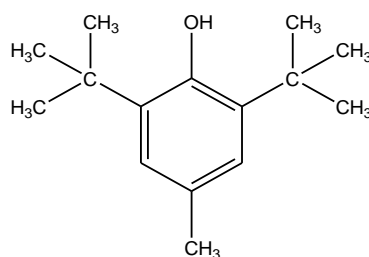
(7) เมลานิน (Melanins) เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) ของ tyrosine พอลิเมอร์ของเมลานินประกอบด้วยอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่หลายตัว

การเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ในระหว่างระดับพลังงานที่ต่างกัน ทำให้ช่วยดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตได้ (โสภา วัชรคุปต์ และคณะ, 2549 ; ศวรรรี เหลืองสุนทรชัย, 2549)

2.6.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากภายนอก

2.6.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้มีการพัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่แล้วจะออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็ก และใช้โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในธรรมชาติและสมุนไพรมาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมี และมีฤทธิ์ที่ดีขึ้น

(1) BHT (butylated hydroxytoluene) เป็นสารประกอบฟีนอล ที่ใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร เป็นวัตถุกันหืนที่ใช้เป็นสารต้านออกซิเดชัน ป้องกันการเหม็นหืน ของไขมัน และน้ำมัน จากปฏิกิริยาการออกซิเดชันของลิพิด มักผสมกับวัตถุกันหืนชนิดอื่นเพื่อเสริมให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น ซึ่งจะนิยมใช้กับพวก น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ผลิตภัณฑ์เนื้อ ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ น้ำมันหอมระเหย เป็นต้น BHT ยังใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay โดยใช้เป็นสารมาตรฐานที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ภาพที่ 2.4)

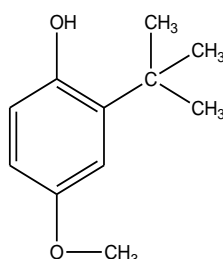


ภาพที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ BHT

ที่มา : สูตรโครงสร้างของ BHT. (2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558.

จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1576/butylated-hydroxytoluene-bht>.

(2) BHA (butylated hydroxyanisole) เป็นวัตถุเจือปนอาหาร ที่เป็น สารประกอบฟีนอลิก ใช้เป็นสารต้านออกซิเดชัน ป้องกันการเหม็นหืน ของไขมัน และน้ำมัน จากปฏิกิริยาการออกซิเดชันของลิพิด (ภาพที่ 2.5)

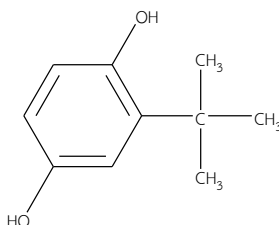


ภาพที่ 2.5 สูตรโครงสร้างของ BHA

ที่มา : สูตรโครงสร้างของ BHA. (2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558.จาก

<http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1577/butylated-hydroxyanisole-bha>.

2.6.2.1.3 TBHQ (tert-butylhydroxyquinone) เป็นวัตถุเจือปนอาหาร มี E-number คือ E319 เป็น phenolic compound ใช้เพื่อเป็นสารกันหืน (antioxidant) ป้องกันการเหม็นหืน ที่เกิดจากปฏิกิริยาการออกซิเดชันของลิพิด ละลายน้ำได้เล็กน้อย ละลายได้ปานกลางในไขมัน ใช้กับอาหารทอดและไขมัน น้ำมันพืช น้ำมันสำหรับทอดอาหาร (ภาพที่ 2.6)

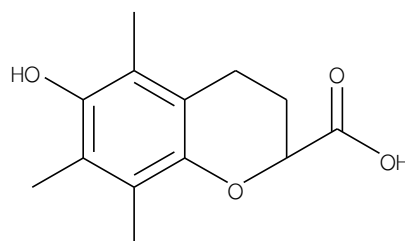


ภาพที่ 2.6 สูตรโครงสร้างของ TBHQ

ที่มา : สูตรโครงสร้างของ TBHQ. (2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558.

จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2123/tertiary-butyl-hydro-quinone-tbhq>.

2.6.2.1.4 Trolox เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสายอัลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก ทำให้สามารถละลายได้ดีในน้ำ และเนื่องจากละลายน้ำได้ดีจึงออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี ซึ่งวิตามินอีจะใช้เวลาเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน (ภาพที่ 2.7)



ภาพที่ 2.7 สูตรโครงสร้างของ Trolox

ที่มา : สูตรโครงสร้างของ Trolox. (2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558.

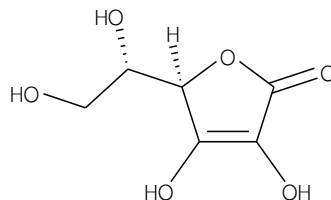
จาก <https://en.wikipedia.org/wiki/Trolox>.

2.6.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เช่น BHT (butylated hydroxytoluene), BHA (butylated hydroxyanisole), TBHQ (tert-butylhydroxyquinone) เป็นสารที่ยับยั้งการเกิด lipid oxidation ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามความวิตกกังวลจากการเอาใจใส่ของลูกค้าย เช่น สารเติมแต่งอาหาร ได้กระตุ้นให้มีการสำรวจเกี่ยวกับคุณประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ ซึ่งเป็นตัวแทนของสารสังเคราะห์ (Formanek et al., 2001)

(1) วิตามินซี (vitamin C or ascorbic acid) คือ สารชีวภาพที่มีประโยชน์อย่างสูง และนอกจากนั้นยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญมากในเซลล์และสามารถละลายน้ำได้ และเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ROS มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ (ภาพที่ 2.8) ที่เป็นสามารถแตกตัวได้ที่ pH ของร่างกาย วิตามินซี จะอยู่ในรูปที่มีประจุลบหนึ่ง จึง

เรียกว่า เอสคอร์เบท (ascorbate) ซึ่งคุณสมบัติที่บ่งบอกว่าวิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระคือ วิตามินซีมีความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing agent) (Padayatty et al., 2003)

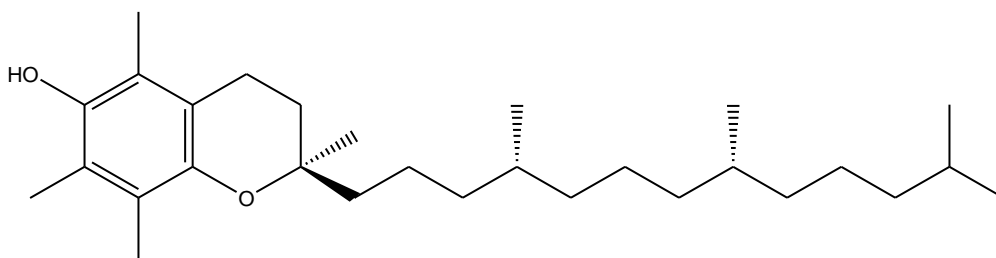


ภาพที่ 2.8 สูตรโครงสร้างของ Ascorbic acid

ที่มา : สูตรโครงสร้างของ Ascorbic acid. (2558). ค้นเมื่อ 24 ธันวาคม 2558.

จาก https://th.wikipedia.org/wiki/vitamin_C.

(2) วิตามินอี (vitamin E) เป็นโมเลกุลที่ละลายได้ดีในน้ำมันหรือลิพิด จึงสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ช่วยปกป้องผนังเซลล์จากอนุมูลอิสระ การสะสมที่ผิวหนังจะช่วยป้องกันผิวจากแสงแดด และป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนัง การต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี คือ การให้อะตอมไฮโดรเจนซึ่งจะไปจับกับ lipid peroxy radical และ alkoxyl radical ซึ่งเป็นการหยุดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน (โอภา วัชรคุปต์ และคณะ, 2549)



ภาพที่ 2.9 สูตรโครงสร้างของ Vitamin E

ที่มา : สูตรโครงสร้างของ Vitamin E. (2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558.

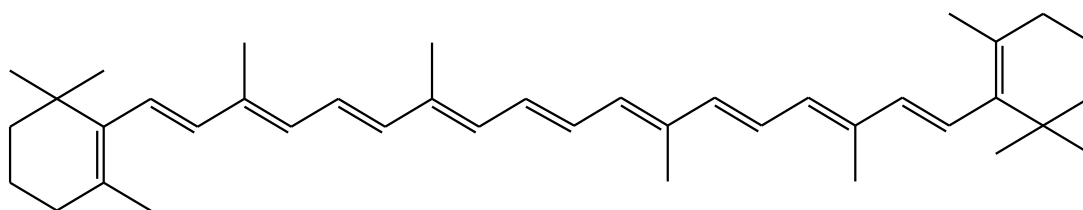
จาก https://th.wikipedia.org/wiki/Vitamin_E.

2.7 แคโรทีนอยด์ (Carotenoids)

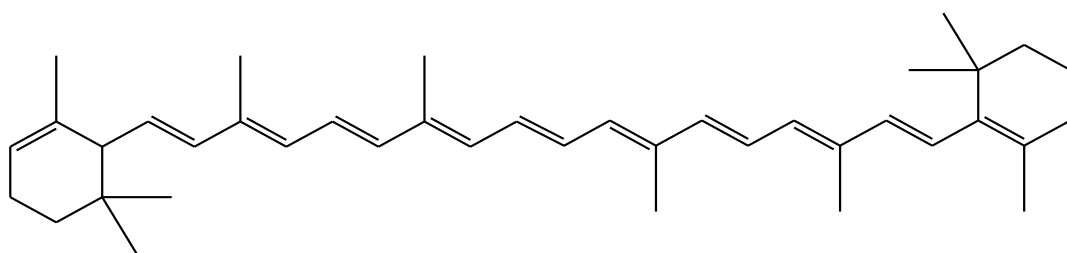
แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุชนิดหนึ่งที่พบได้ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) และครอโมพลาสต์ (chromoplast) ของผลไม้ ดอกไม้ และใบของพืช และยังพบได้ในสัตว์ จุลชีพที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และสาหร่ายมีแคโรทีนอยด์กว่า 700 โมเลกุลที่ตรวจสอบโครงสร้างได้ และพบทั่วไปในธรรมชาติ แคโรทีนอยด์ในพืชจะดูดกลืนพลังงานแสง เพื่อส่งต่อให้คลอโรฟิลล์ในกระบวนการสังเคราะห์แสงและเป็นตัวจับรังสีอัลตราไวโอเล็ตจึงปกป้องพืชจากปฏิกิริยาออกซิเดชันอันเนื่องมาจากแสง (photooxidation) และยังป้องกันการทำลายเซลล์จากอนุมูลอิสระ (free radical) นอกจากนี้แคโรทีนอยด์ยังป้องกันพืชจากในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เกิดบาดแผลหรือกระทบกับแสงแดดอย่างรุนแรง เพื่อป้องกันการติดเชื้อและการทำลายจากแสงแดด โครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์ (ภาพที่ 2.10) ประกอบด้วยหน่วยไอโซพรีน (isoprene unit) จำนวน

8 หน่วย ที่เกิดพันธะโควาเลนต์กัน และทำให้เกิดคอนจูเกชันของพันธะคู่สายยาว (extensive conjugated double bond) ซึ่งการเกิด conjugated double bond ทำให้แคโรทีนอยด์สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต และแสงสีขาวย และทำให้แคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีสีและมีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โมเลกุลของแคโรทีนอยด์อาจเป็นเส้นตรงดังที่พบในไลโคพีน (lycopene) หรืออาจเป็นวงแหวน (ring) ที่ปลายโซ่ของโมเลกุลดังที่พบในเบต้าแคโรทีน (beta-carotene) ซึ่งสามารถจำแนกแคโรทีนอยด์เป็น 2 กลุ่ม คือ hydrogenated และ oxygenated carotenoid derivatives (วีระศักดิ์ สามิ, 2548)

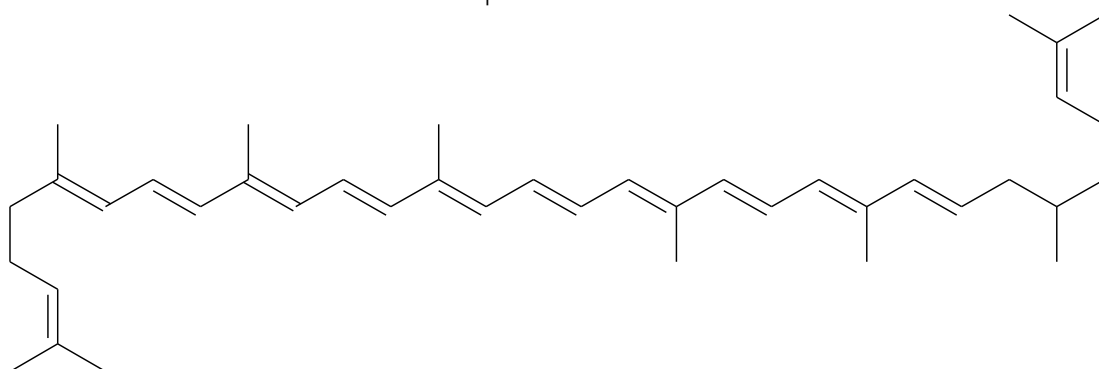
2.7.1 Hydrogenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแคโรทีน (carotene) เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ทำให้เป็นสารที่ไม่มีขั้วและละลายได้ในไขมัน ตัวอย่างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ได้แก่ บีตาแคโรทีนและไลโคพีน เป็นต้น



Beta-carotene



Alpha-carotene



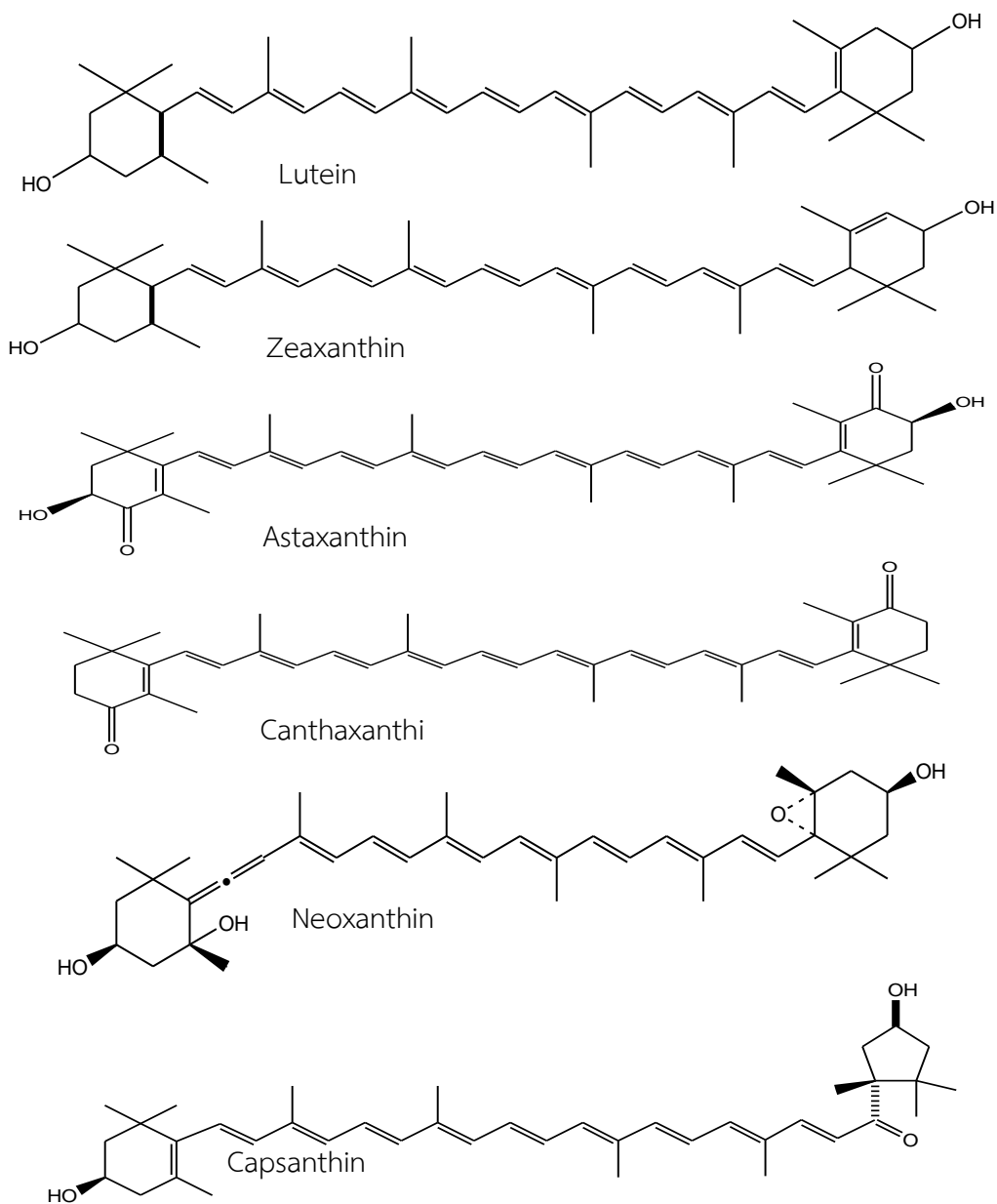
Lycopene

ภาพที่ 2.10 สูตรโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ กลุ่มแคโรทีน

ที่มา: สูตรโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ กลุ่มแคโรทีน. (2558). ค้นเมื่อ 25 ธันวาคม 2558.

จาก <http://supplement-to-health.blogspot.com/2013/10/su-per-antioxidant.html>.

2.7.2 Oxygenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) มีอะตอมของออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล จึงมีขั้วมากกว่าและละลายในไขมันได้น้อยกว่ากลุ่มแคโรทีน ซึ่งตัวอย่างสารกลุ่มนี้ ได้แก่ Lutein Zeaxanthin Astaxanthin Canthaxanthin Neoxanthin และ Capsanthin ดังแสดงโครงสร้างในภาพที่ 2.11

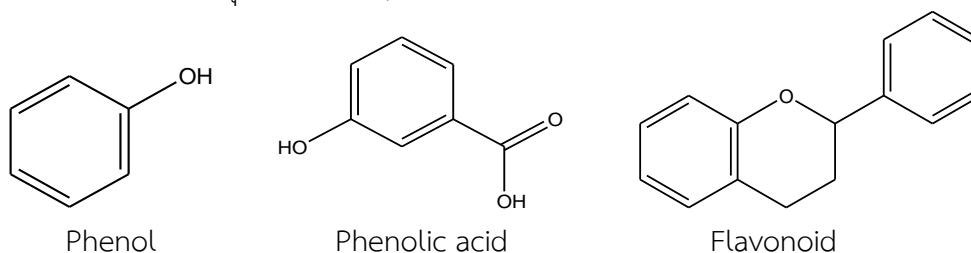


ภาพที่ 2.11 สูตรโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ กลุ่มแซนโทฟิลล์
ที่มา : Von Elbc and Schwartz (1996) ; วีระศักดิ์ สามี่, 2548

2.8.สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

โพลีฟีนอลิกเป็นส่วนประกอบหลักของเมทาบอลิท์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ในพืช และยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Bouayed; Bouayed & Bohn) สารประกอบฟีนอลิกจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในธรรมชาติ ได้แก่ พืชผัก ผลไม้ ชาเขียว และไวท์แดง เป็นต้น

ปัจจุบันนี้พบสารประกอบฟีนอลิกในธรรมชาติมากกว่า 8,000 ชนิด ตั้งแต่สารที่มีโมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น และสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อน เช่น เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น สารโพลีฟีนอลิกเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญเพราะมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ มีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือดและเป็นสารต้านการเกิดมะเร็ง อีกทั้งสามารถลดความดันโลหิตโดยมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวสัมพันธ์กับลักษณะของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างทั่วไปที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติก และมีหมู่แทนที่ที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ ดังภาพที่ 2.12 และสามารถละลายน้ำได้ (โอภา วัชรคุปต์ และคณะ, 2549)



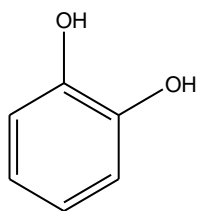
ภาพที่ 2.12 สูตรโครงสร้างของ Phenolic compounds

ที่มา : สูตรโครงสร้างสารฟีนอลิก. (2558). ค้นเมื่อ 21 พฤศจิกายน 2558.

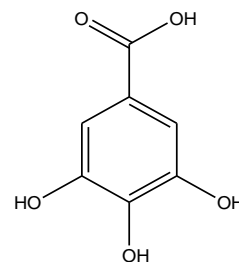
จาก <http://www.intechopen.com/books/antioxidant-antidiabetic-agents-and-human-health/antioxidant-rich-natural-grain-products-and-human-health>.

สารประกอบฟีนอลิกภายในเซลล์ที่อยู่ในรูปอิสระนั้นพบน้อยมาก ส่วนใหญ่มักพบรวมอยู่กับโมเลกุลอื่นหลายชนิดพบในรูป Glycosides โดยเชื่อมต่อกับมอโนแซคคาไรด์หรือไดแซคคาไรด์ โดยเฉพาะกลุ่มของ flavonoids ซึ่งมักรวมกับน้ำตาล นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกยังอาจรวมกับสารประกอบอื่นอีกหลายชนิด เช่น hydroxycinnamic acid อาจพบรวมกับ organic acids, amino groups, lipids, terpenoids, phenolics และกลุ่มอื่น ๆ นอกจากนี้น้ำตาล การรวมตัวในลักษณะนี้ภายในเซลล์เป็น monophenols และ diphenols ทำให้เกิดความเป็นพิษกับพืช (phytotoxic) น้อยกว่าในรูปอิสระ ซึ่งอาจแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามจำนวน phenol ring หรือ aromatic ring ที่มีอยู่ดังนี้

2.8.1 Monocyclic phenols พบทั่วไปในพืช โดยมี 1 aromatic ring ดังภาพที่ 2.13 เช่น สาร phenol, catechol, hydro-quinone, p-hydroxycinnamic acid, gallic acid, ellagic acid, tannic acid, vanillin, salicylic acid และ resorcinol เป็นต้น



Catechol



Gallic acid

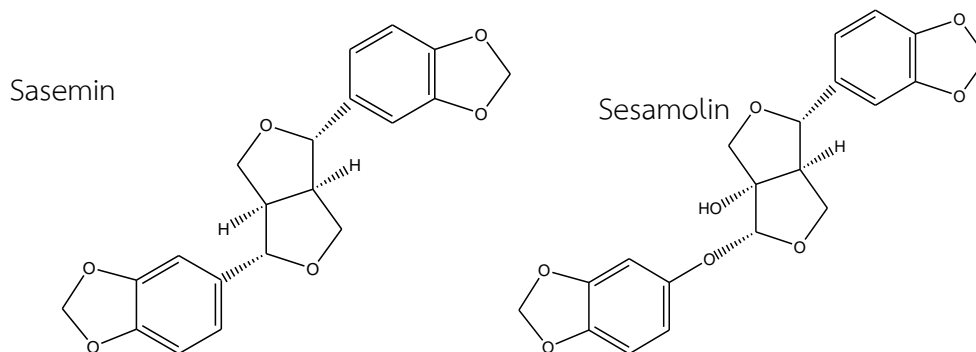
ภาพที่ 2.13 สูตรโครงสร้างของ Monocyclic phenols

ที่มา : โครงสร้าง catechol. (2558). ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558.

จาก <https://en.wikipedia.org/wiki/Catechol>.: โครงสร้าง gallic acid. . (2558).

ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558. จาก https://en.wikipedia.org/wiki/Gallic_acid.

2.8.2 Dicyclic phenols มี 2 aromatic ได้แก่ flavonoids และ lignans (sesamin, sesamol) (ภาพที่ 2.14)



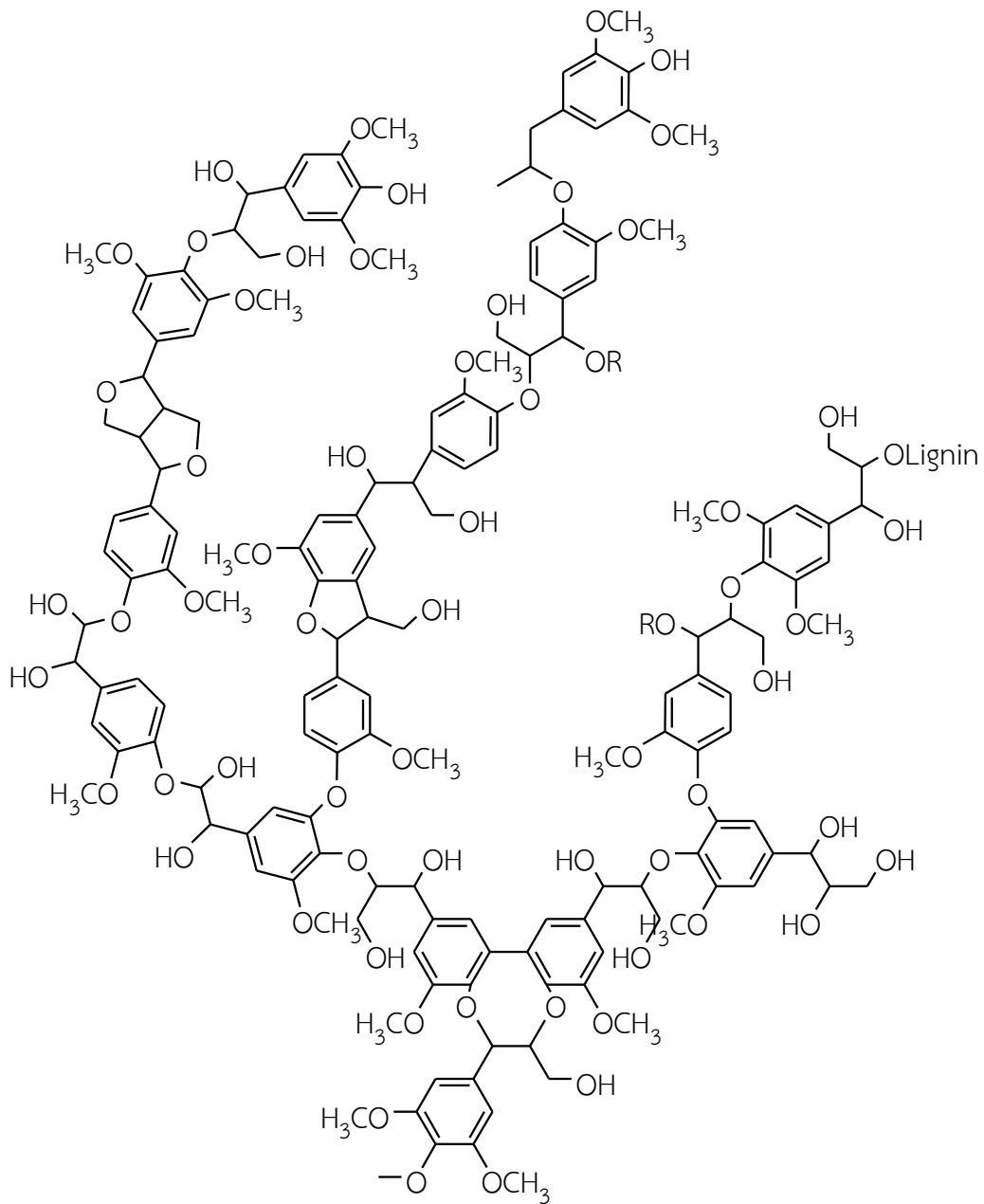
ภาพที่ 2.14 สูตรโครงสร้างของ Dicyclic phenols

ที่มา : โครงสร้าง Sesamin. . (2558). ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558.

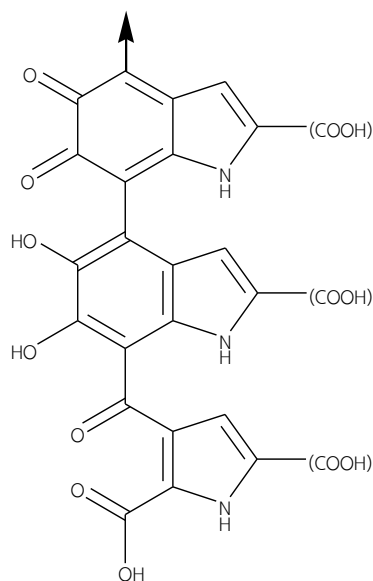
จาก <https://en.wikipedia.org/wiki/Sesamin>.: โครงสร้าง Sesamol. . (2558).

ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558. จาก <https://en.wikipedia.org/wiki/Sesamol>.

2.8.3 Polycyclic phenols หรือ Polyphenols มีวงอะโรมาติกมากกว่า 2 วงขึ้นไป ได้แก่ lignins (ภาพที่ 2.15) eumelanins (ภาพที่ 2.16)



ภาพที่ 2.15 สูตรโครงสร้างของ Lignin
ที่มา : โครงสร้าง Lignin. (2558). ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558. จาก
<https://en.wikipedia.org/wiki/Lignin>.



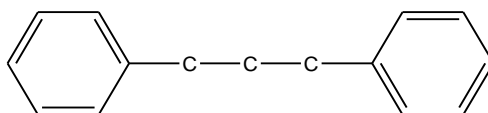
ภาพที่ 2.16 สูตรโครงสร้างของ Eumelanin

ที่มา : โครงสร้าง Eumelanin. .(2558). ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558. จาก

<https://en.wikipedia.org/wiki/Eumelanin>.

2.9. ฟลาโวนอยด์ (Fravonoids)

เป็นสารที่พบทั่วไปในพืชที่มีใบสีเขียว และพบในทุกส่วนของพืช ฟลาโวนอยด์จัดว่าเป็นสารสำคัญของกลุ่ม polyphenols มีสูตรโครงสร้างเป็น flavan หรือ 2-phenylbenzopyran โดยประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอมเรียงกันเป็นระบบ $C_6C_3C_6$ ซึ่งวงอะโรมาติกทั้งสองวงจะถูกเชื่อมด้วยคาร์บอน 3 อะตอม (ภาพที่ 2.17) (โอภา วัชรคุปต์, 2006) ฟลาโวนอยด์เป็นส่วนหนึ่งของสารฟีนอลที่มีอยู่ในธรรมชาติ และเป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ โดยมีประมาณ 2% ของคาร์บอนที่เกิดจากการสังเคราะห์ของพืชทั้งหมดที่เปลี่ยนเป็นฟลาโวนอยด์ การบริโภคฟลาโวนอยด์น่าจะเป็นประโยชน์ เพราะสามารถทำปฏิกิริยากับระบบต่าง ๆ ทางชีววิทยาและยังแสดงการเป็น anti-inflammatory, hypolipidemic, hypoglycemic และ antioxidant activities อีกด้วย (Vijayakumar, Presannakumar & Vijayalakshmi, 2008)

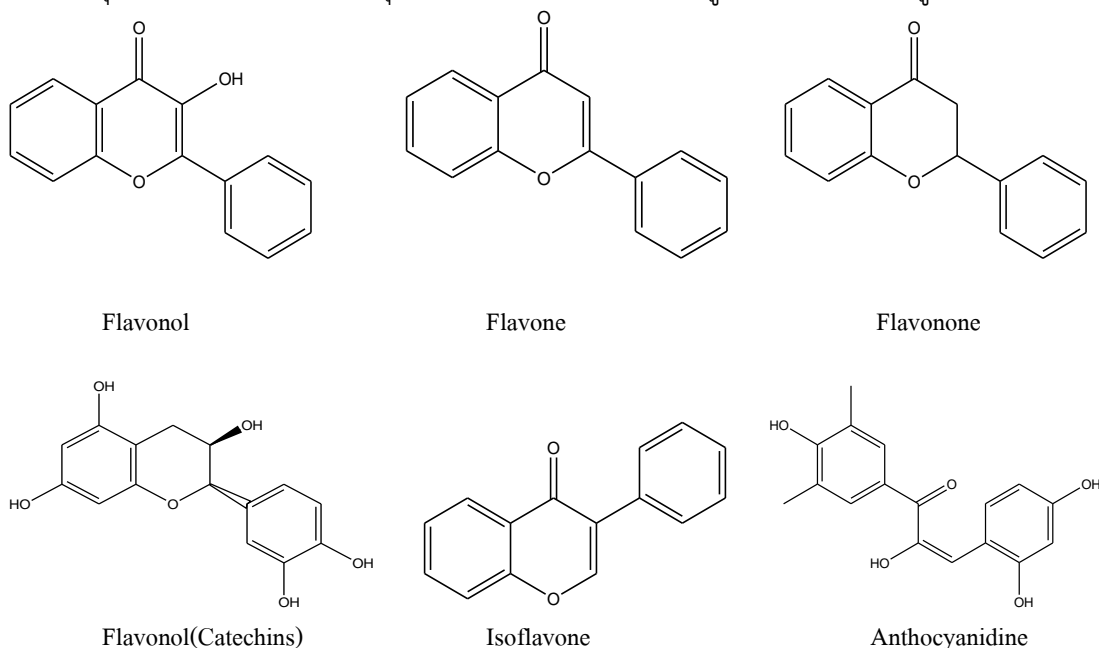


ภาพที่ 2.17 สูตรโครงสร้างพื้นฐานของ Flavonoids

ที่มา : โครงสร้าง Flavonoids. .(2558). ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558.

จาก <https://en.wikipedia.org/wiki/Flavonoids>.

ซึ่งสารกลุ่มฟลาโวนอยด์แบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามความแตกต่างของสูตรโครงสร้างได้ดังรูปที่ 2.18

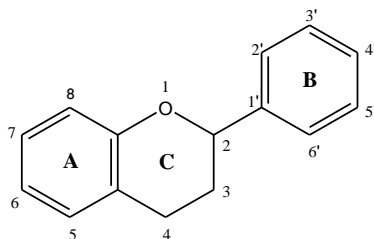


ภาพที่ 2.18 สูตรโครงสร้างของ Flavonoids
ที่มา : โอภา วัชรคุปต์, (2006)

2.10 ปฏิกริยาการทดสอบที่ใช้ในการวิจัย

2.10.1 Folin-Ciocalteu method เป็นปฏิกริยาทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวม ในการทดสอบจะใช้ Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Molybdate (VI)) ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีเหลืองเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นสีของ Molybdate (V) ติดตามการเกิดปฏิกริยาที่มีความยาวคลื่น 765 nm

2.10.2 Aluminium chlorimetric assay เป็นปฏิกริยาทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ในการเกิดปฏิกริยา $AlCl_3$ ที่เติมในปฏิกริยา จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารฟลาโวนอยด์ที่เรียกว่า acid stable complexes ในตำแหน่ง C3 C5 และ C2 หรือ C5 ในการสกัดเมื่อเติม NaOH ลงไป สารผสมนั้นจะกลายเป็นสีชมพู ซึ่งติดตามการเกิดปฏิกริยาโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm

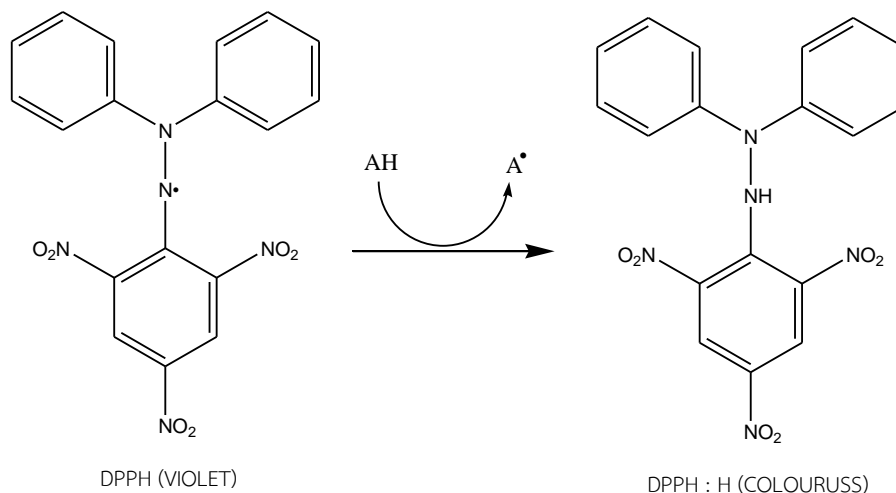


รูปที่ 2.19 Flavonoid structure

ที่มา : โครงสร้าง Flavonoids structure. . (2558). ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558.

จาก https://en.wikipedia.org/wiki/Flavonoids_structure.

2.10.3 DPPH assay เป็นวิธีการทดสอบหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่ง DPPH มีสีม่วง เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปทำให้สีม่วงนั้นเจือจางลง เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระไปให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งจะติดตามการเกิดปฏิกิริยาที่ค่าความยาวคลื่น 517 nm (ภาพที่ 2.20)

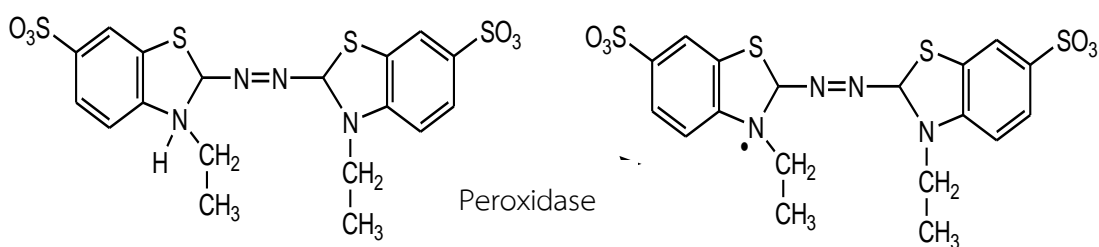


ภาพที่ 2.20 การเกิดปฏิกิริยาของ DPPH assay

ที่มา : โครงสร้าง DPPH assay. .(2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558.

จาก <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/251754/sch1/>.

2.10.4 ABTS assay เป็นวิธีการทดสอบหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่ง ABTS radical มีสีเขียว เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปทำให้สีเขียวที่เจือจางลง เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระไปให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล ABTS ซึ่งจะติดตามการเกิดปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 734 nm (ภาพที่ 2.21)

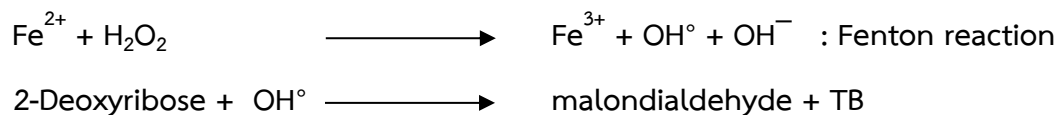


ภาพที่ 2.21 การเกิดปฏิกิริยาของ ABTS assay

ที่มา : โครงสร้าง ABTS assay. .(2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558. จาก

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/peroxidase-enzymes.html>.

2.10.5 2-Deoxyribose เป็นวิธีการทดสอบหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่ง 2-Deoxyribose ถูกออกซิไดซ์โดย OH radical ที่เกิดจาก Fenton reaction แล้วกลายเป็น malondialdehy เมื่อเติม TBA และ TCA ลงไปแล้วสารละลายจะเกิดเป็นสีชมพู (Kubola & Siriamornpun, 2008) แต่ถ้าเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป จะไม่เกิด Aldehyde ซึ่งจะติดตามการเกิดปฏิกิริยาโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 nm ดังสมการ



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.2 อุปกรณ์

- Aluminum foil
- Balance
- Beaker
- Brown bottle
- Dropper and rubber
- Erlenmeyer flask
- Filter paper
- Funnel
- Glass cuvette
- knife and block
- mortar and pestle
- pipet
- Separation funnel
- Spatula
- Spectrophotometer
- Stand and clamp
- Round bottom flask
- Test tube and rack
- Vial tube
- Volumetric flask
- Water bath

3.1.2 Chemical and reagent (All of AR grade)

- Aluminium chloride
- (+)-ascorbic acid
- 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
- Butylated hydroxytoluene : BHT
- (+)-catechin
- 2-Deoxy-D-ribose
- 2,2-Diphenyl-1-picryldrazyl
- Distilled water : DW
- Double-distilled water : DDW
- Ethanol : EtOH
- Ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA
- Ferrous sulfate heptahydrate : $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Folin-Ciocalteu's phenol reagent
- Gallic acid
- Hydrogen peroxide : H_2O_2
- Methanol : MeOH
- Petroleum ether : PE
- Potassium hydroxide : KOH
- Potassium persulfate : $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$
- Sodium carbonate : Na_2CO_3
- Sodium nitrite : Na_2CO_3
- Sodium hydroxide : NaOH
- Tetrahydrofuran : THF
- Trichloroacetic acid : TCA
- Thiobarbituric acid : TBA

3.2 วิธีกรวิจัย

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างชะมวง นำตัวอย่างใบและเปลือกของผลล้างให้สะอาดแล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดเราจะใช้ช้อนชูดเอาเฉพาะเนื้อเยื่อ แล้วนำไปเก็บในภาชนะปราศจากอากาศแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4°C

3.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม

3.2.2.1 การสกัดตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างชะมวงสดมาประมาณ 0.5 g นำมาใส่โกร่งบดสาร (mortar and pestle) จากนั้นเติมตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ Ethanol ปริมาตร 4 ml และเติม BHT ลงไปเล็กน้อย (ประมาณ 2-3 เกล็ด) แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียด แล้วนำสารสกัดหยาบ (Crude extract) จากโกร่งมาใส่หลอดทดลอง ขนาด 10 ml และเติม Tetrahydrofuran 4 ml ผสมสารละลายโดยการเขย่า แล้วเติม Petroleum ether 5 ml แล้วเขย่า (แคโรทีนอยด์จะละลายอยู่ในส่วนของ Petroleum ether) จากนั้นก็เติมน้ำกลั่น 2 ml เขย่าและตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น แล้วเก็บส่วนที่ใสของชั้น Petroleum ether ไปปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย Petroleum ether แล้วเก็บใส่ขวดสีชาเพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป

3.2.2.2 การวิเคราะห์ นำสารสกัดที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer และใช้ petrolume ether เป็น Blank จากนั้นก็คำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์ตามสมการ

$$A_{450} = ECL$$

3.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม

3.2.3.1 การสกัดตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างชะมวงสดมาประมาณ 5 g และเติม 7 ml ของ 50% ethanol แล้วบดให้ละเอียดในโกร่งบด จากนั้นนำมาใส่หลอดทดลอง แล้วแช่ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วกรองด้วยสำลี แล้วนำสารสกัดที่ได้มาปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย 50% ethanol และเก็บใส่ขวดสีชาเพื่อรอนำไปวิเคราะห์

3.2.3.2 การวิเคราะห์

ผสมสารสกัดตัวอย่าง 0.1 ml กับ Folin-Ciocalteu's phenol reagent (ที่เจือจางจาก stock solution แล้ว 10 เท่าด้วย Double-distilled water (DDW)) ปริมาตร 0.75 ml เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วเติม 35% Na_2CO_3 ปริมาตร 0.75 ml เขย่าให้สารผสมกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นตั้งไว้ที่มืดนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm (โดยมี Blank : 0.1 ml 50% ethanol 0.75 ml Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.75 ml 35% Na_2CO_3 และ DDW)

3.2.3.3 สร้างกราฟมาตรฐานของ Gallic acid ทำได้โดย ปิเปต gallic acid จาก 1000 $\mu\text{g/ml}$ stock solution มา 0.05 0.25 0.5 1.0 1.5 และ 2.5 ml ตามลำดับและปรับปริมาตรเป็น

5 ml ด้วยน้ำกลั่นแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา ซึ่งจะได้ความเข้มข้นเป็น 10 50 100 200 300 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับสารสกัดชะมวง คือ ใช้สารละลาย Gallic acid แทนสารสกัดตัวอย่าง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของ Gallic acid โดยใช้แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของ Gallic acid และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสง

3.2.4 การวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์รวม

3.2.4.1 การสกัดตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างชะมวงสดมาประมาณ 5 g และเติม 7 ml ของ 50% ethanol โดยบดให้ละเอียดใน โกร่งบด จากนั้นนำมาใส่หลอดทดลอง แล้วแช่ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วกรองด้วยสำลี และนำสารสกัดที่ได้มาปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย 50% ethanol และเก็บใส่ขวดสีชาเพื่อรอนำไปวิเคราะห์

3.2.4.2 การวิเคราะห์

ปิเปตน้ำกลั่น 4 ml ใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 10 ml และเติมสารสกัดชะมวง 1 ml 0.3 ml ของ 5% NaNO_2 เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 0.3 ml ของ 10% AlCl_3 และตั้งทิ้งไว้ อีก 1 นาที จึงเติม 2 ml ของ 1 M NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง จากนั้นเขย่าให้สารละลายผสมกัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องวัดภายใน 30 นาทีหลังทำปฏิกิริยาเสร็จ (Blank: 50% ethanol 1 ml 5% NaNO_2 0.3 ml 1 M NaOH 2 ml และ DDW)

3.2.4.3 สร้างกราฟมาตรฐาน (+)-catechin

ปิเปต 500 μM stock solution มา 1.25 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วยน้ำกลั่น จะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 125 μM ปิเปต 125 μM มา 2.5 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วยน้ำกลั่นจะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 62.5 μM ปิเปต 62.5 μM มา 2.5 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วยน้ำกลั่นสองครั้งจะได้ความเข้มข้น 31.25 μM และที่ความเข้มข้น 0 μM จะใช้น้ำกลั่นสองครั้ง 5 ml แล้วทำการวิเคราะห์เหมือนกับสารสกัดชะมวง คือ ใช้สารละลาย (+)-catechin แทนสารสกัดตัวอย่าง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของ (+)-catechin โดยใช้แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของ (+)-catechin และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสง

3.2.5 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย DPPH assay

3.2.5.1 การสกัดตัวอย่าง

ตัวอย่างชะมวงมาประมาณ 3 g บดให้ละเอียดใน โกร่งบด โดยเติม 10 ml methanol แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที แล้วกรองสารสกัดด้วยสำลี นำสารสกัดที่กรองได้มาปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วย Methanol และเก็บในขวดสีชาเพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป

3.2.5.2 การวิเคราะห์

ผสม 0.0001 M DPPH ใน Methanol ปริมาตร 3 ml กับสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 0.2 ml เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm (Blank : Methanol) แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดชะมวงหลังทำปฏิกิริยาแล้วมาคำนวณตามสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ DPPH radical-scavenging activity} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

3.2.5.3 สร้างกราฟมาตรฐาน Trolox

โดยปิเปต Trolox จาก 1000 µg/ml stock solution มา 0.25 0.5 1.0 และ 1.5 ml และปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วย Methanol ซึ่งได้ความเข้มข้นเป็น 50 100 200 และ 300 µg/ml ตามลำดับแล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับสารสกัดตัวอย่างชะมวง คือ ใช้สารละลาย Trolox แทนสารสกัดตัวอย่าง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของ Trolox โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของ Trolox และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งค่าที่ได้แสดงเป็น µg Trolox equivalent(TE)/g sample

3.2.6 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย ABTS assay

3.2.6.1 การสกัดตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่างชะมวงมาประมาณ 3 g แล้วเติม 10ml methanol บดให้ละเอียดในโถรงบ แล้วนำมาใส่หลอดทดลองแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที แล้วสารสกัดด้วยสำลี นำสารสกัดที่กรองได้มาปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วย Methanol และเก็บในขวดสีชาเพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป

3.2.6.2 การวิเคราะห์

ผสมสารละลาย 7 mM ABTS กับ 140 mM K₂S₂O₈ แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 12-16 ชม. จะได้ stock solution แล้ว ปิเปต stock solution มาเจือจางด้วย Ethanol จนได้ค่า A₇₃₅ ประมาณ 0.70-0.90 มาผสมกับสารสกัดตัวอย่าง 0.1 ml กับสารละลาย ABTS radical ที่เจือจางแล้ว 1 ml แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm (Blank : Ethanol) และนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างชะมวงหลังทำปฏิกิริยาแล้วมาคำนวณตามสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ ABTS radical-scavenging activity} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

3.2.6.3 สร้างกราฟมาตรฐาน Trolox

โดยการปิเปต Trolox จาก 100 µg/ml stock solution มา 0.05 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 ml และปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วย ethanol ซึ่งจะได้ความเข้มข้นเป็น 1 10 20 30 40 50 µg/ml ตามลำดับ แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับสารสกัดตัวอย่างชะมวง คือ ใช้สารละลาย Trolox แทนสารสกัดตัวอย่าง จากนั้นนำวัดค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟมาตรฐานของ Trolox โดยให้แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของ Trolox และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งค่าที่ได้แสดงเป็น µg Trolox equivalent(TE)/g fresh sample

3.2.7 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2-Deoxyribose

3.2.7.1 การสกัดตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างหยาบประมาณ 3 g บดให้ละเอียดใส่ในขวดรูปชมพู่และเติมน้ำกลั่นสองครั้ง 20 ml แล้วตั้งทิ้งไว้ 12-18 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง แล้วกรองผ่านกรวยกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 หรือสำลี แล้วนำสารสกัดที่ได้มาปรับปริมาตรเป็น 25 ml ด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง และเก็บในขวดสีชาที่ 4 °C เพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป

3.2.7.2 การวิเคราะห์

ผสม 10 mM FeSO₄·7H₂O 0.1 ml 10 mM EDTA 0.1 ml และ 10 mM 2-Deoxyribose 0.2 ml ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารสกัดตัวอย่างลงไป 0.2 ml จากนั้นเติม 0.1 mM phosphate buffer 1.4 ml และเติม 10 mM H₂O₂ 0.2 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชม. หลังจากครบ 1 ชม. เติม 2.8% Trichloroacetic acid และ 1% Thiobarbituric acid อย่างละ 1 ml เขย่าแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา โดยการนำไปแช่น้ำแข็ง และเมื่อสารผสมเย็นลงแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm (blank : DDW)

ซึ่งในการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่างจะประกอบไปด้วย control tube คือ ใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดตัวอย่าง (เมื่อสิ้นสุดการทำปฏิกิริยาจะได้สีชมพูเข้ม), no treat tube คือไม่มีการเติม 10 mM H₂O₂ (จะไม่เกิดสีชมพู) และ test tube จะใช้สารสกัดตัวอย่างในการทดสอบ จากนั้นนำมาคำนวณตามสมการ ดังต่อไปนี้

$$\% \text{ Hydroxyl radical-scavenging activity} = \left[1 - \left(\frac{A_s - A_0}{A_c - A_0} \right) \right] \times 100$$

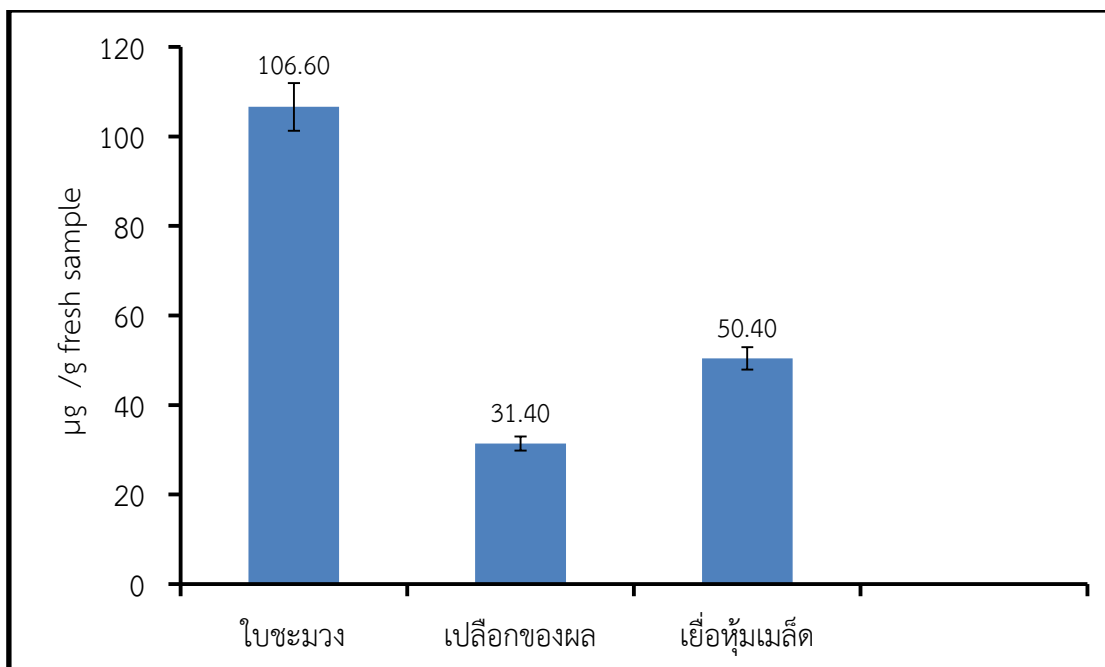
3.2.7.3 สร้างกราฟมาตรฐาน (+)-ascorbic acid

โดย ปิเปต (+)-ascorbic acid จาก 100mg/ml stock solution มา 0.25 0.5 1.0 และ 2.5 ml และปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วยน้ำกลั่น จะได้ความเข้มข้นเป็น 5 10 20 และ 50 mg/ml ตามลำดับ แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับสารสกัดตัวอย่างหยาบ คือ ใช้สารละลาย (+)-ascorbic acid แทนสารสกัดตัวอย่าง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน (+)-ascorbic acid โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของ (+)-ascorbic acid และให้แกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งค่าที่ได้แสดงเป็น mg (+)-ascorbic acid equivalent (AAE)/g fresh sample

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ผลการวิเคราะห์หาสารแคโรทีนอยด์รวม (Total carotenoid)

ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมที่วิเคราะห์โดยใช้ Spectrophotometer ทำโดยชั่งตัวอย่างชมวง มา 0.5 กรัม เติมethanol 4 ml และ BHT 2-3 เกร็ด จากนั้นก็บดให้ละเอียด จากนั้นก็เติม Tetrahydrofuran 4 ml เขย่าแล้วเติม Petrolium ether 5 ml จากนั้นเติม น้ำกลั่นสองครั้ง 2 ml ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น จากนั้นเก็บส่วนที่เป็นชั้นของ Petrolium ether ไปปรับปริมาตรเพื่อให้ได้ ปริมาตรที่แน่นอน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm โดยสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้นี้ใช้ Optimize method ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นไปได้สูงในการสกัด ซึ่งช่วยลดปริมาณสาร ตัวอย่าง ลดปริมาณสารเคมี และยังช่วยลดเวลาในการสกัด อีกทั้งยังได้สารสกัดแคโรทีนอยด์ใน ปริมาณที่สูงและบริสุทธิ์กว่าวิธีการสกัดอื่น ๆ โดยมีการพัฒนามาจากวิธี Ben-Amotz and fishler method และวิธี Julic and Sherry method ซึ่งจากการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม พบว่า ใบชมวงมีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมสูงที่สุดซึ่งเท่ากับ $106.60 \pm 1.11 \mu\text{g/g}$ fresh sample รองลงมาคือ เยื่อหุ้มเมล็ด เท่ากับ $50.40 \pm 1.11 \mu\text{g/g}$ fresh sample และเปลือกของผลเป็นส่วนที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมน้อยที่สุดคือ $31.40 \pm 1.11 \mu\text{g/g}$ fresh sample แสดงดังภาพที่ 4.1.1

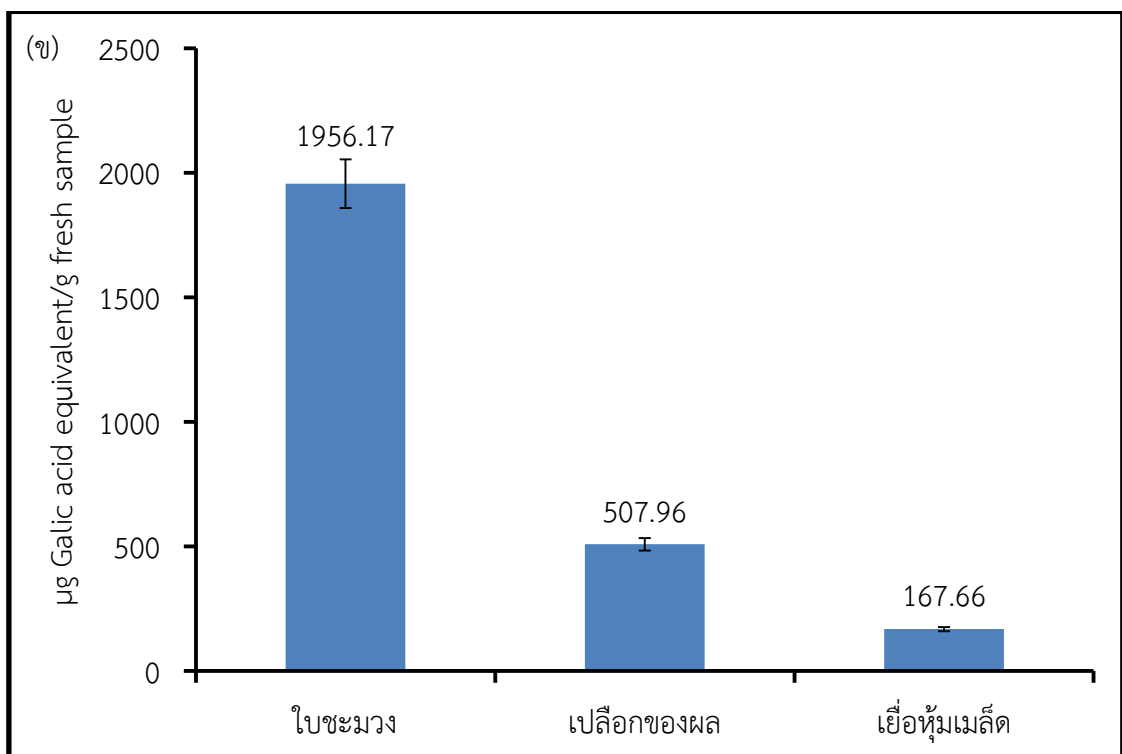
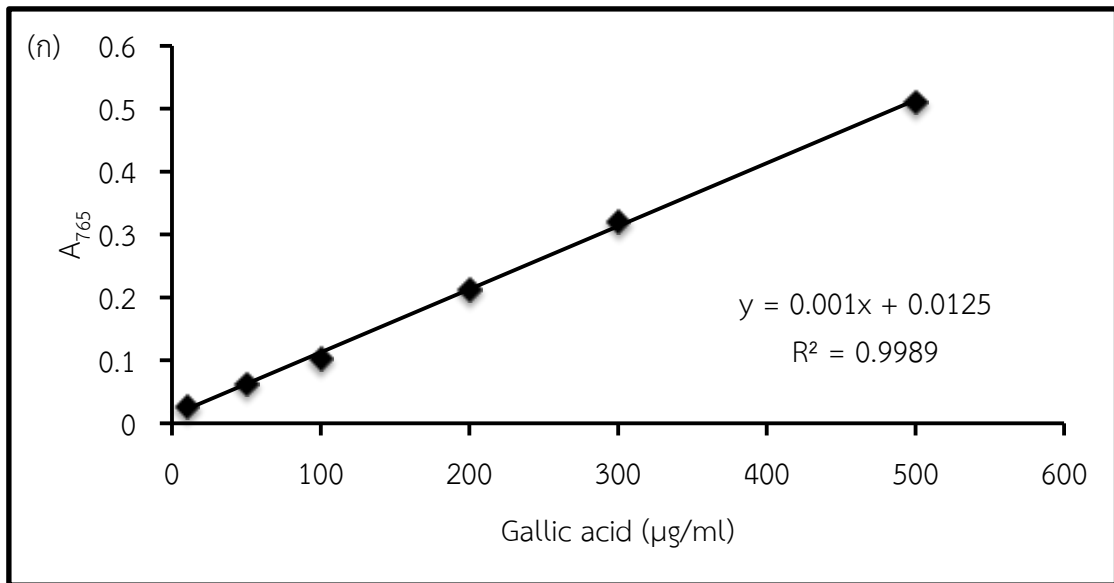


ภาพที่ 4.1.1 ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมของสารสกัดจากใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดของ ชมวง (means \pm SD μg /g fresh sample, n=3)

4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic contents)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic contents) ที่ได้จากการสกัดส่วนต่าง ๆ ของชะมวง ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี Folin-Ciocalteu assay โดยนำสารสกัดตัวอย่างชะมวง 0.1 ml ผสมกับ Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.75 ml เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นก็เติม 35% Na_2CO_3 0.75 ml เขย่าแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 ml แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm และเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid ($y = 0.001x + 0.012$ $R^2 = 0.998$) โดยสารฟีนอลิกที่ได้แสดงเป็น $\mu\text{g Gallic acid equivalent/g fresh sample}$ ซึ่งพบว่าใบของชะมวงเป็นส่วนที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุดคือ เท่ากับ $1956.17 \pm 15.80 \mu\text{g GAE/g fresh sample}$ รองลงมาคือ เปลือกของผล มีค่าเท่ากับ $507.96 \pm 15.80 \mu\text{g GAE/g fresh sample}$ และเยื่อหุ้มเมล็ดของชะมวงเป็นส่วนที่มีปริมาณฟีนอลิกน้อยที่สุดคือ $167.66 \pm 15.80 \mu\text{g GAE/g fresh sample}$ แสดงดังภาพที่ 4.2.1 (ข)

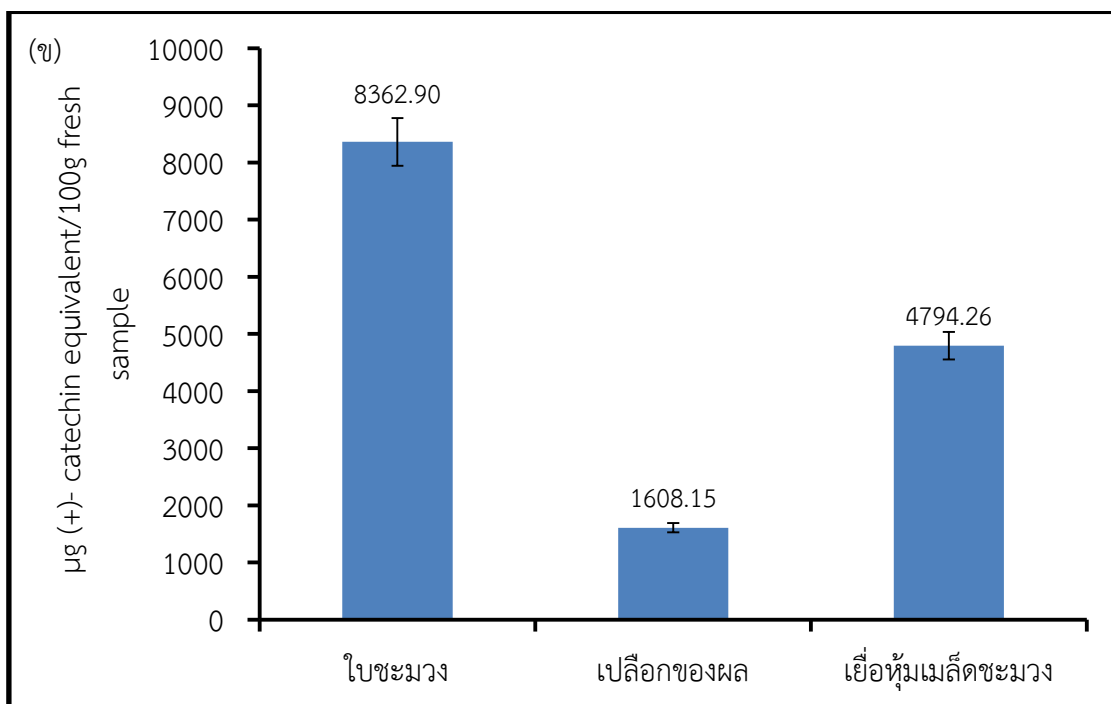
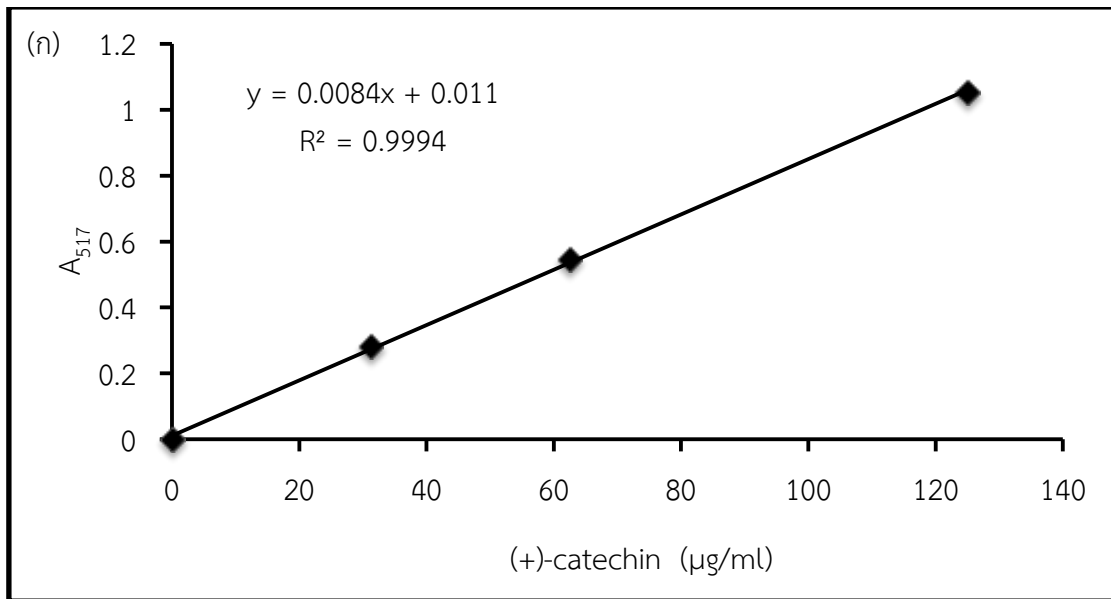
ในการสกัดใช้ 50% ethanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขี้ เพราะสารประกอบฟีนอลิกสามารถละลายในสารละลายที่มีขี้ได้โดยตัวทำละลาย ที่ใช้ในการสกัดมีนัยสำคัญต่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวม ที่ได้จากส่วนต่างๆของชะมวง ในขณะที่คุณสมบัติความเป็นขี้ของสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากวัตถุดิบที่สด จะได้ในช่วงที่กว้าง



ภาพที่ 4.2.1 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดของชะมวง
 (ก) กราฟสารมาตรฐาน Gallic acid (ข) ปริมาณสารฟีนอลิกรวม เทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid
 (means \pm SD $\mu\text{g Gallic acid equivalent/g fresh sample}$, $n=3$)

4.3 2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid)

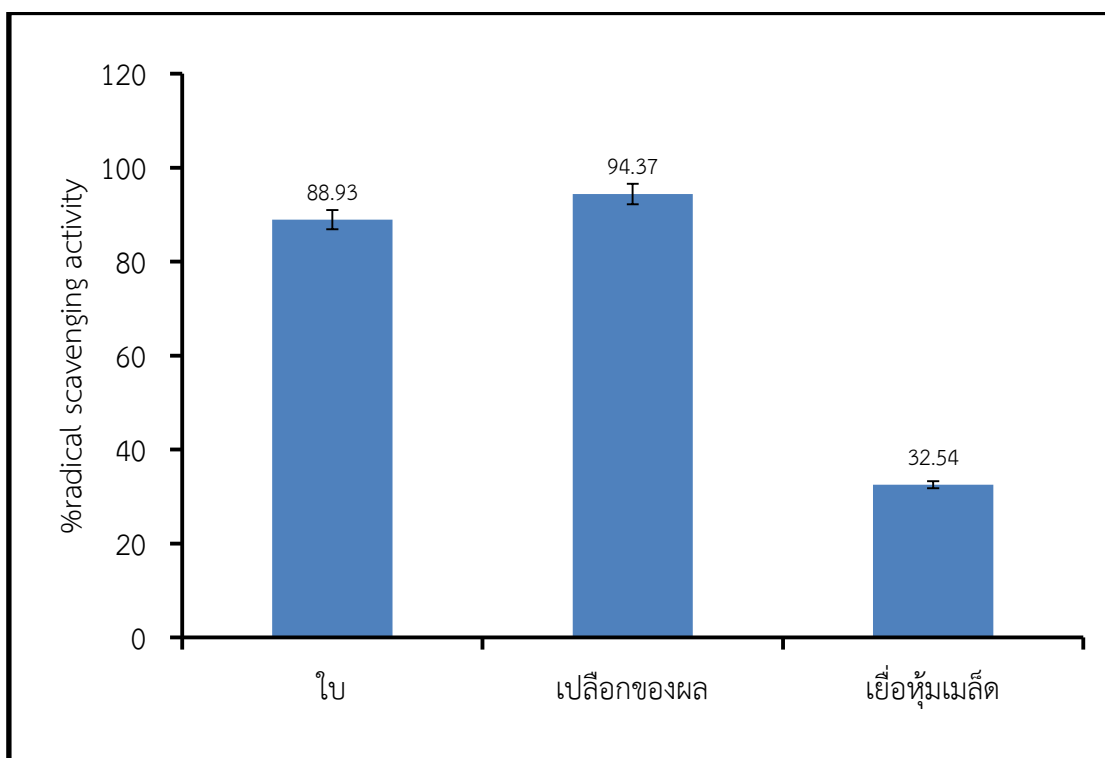
ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่ได้จากการสกัดส่วนต่าง ๆ ของชะมวง ซึ่งทดสอบตามวิธีของ Marinova (2005) คือ Aluminium chloride colorimetric assay โดยนำสารสกัดตัวอย่างชะมวง 1 ml ผสมกับน้ำกลั่น 4 ml และ 5% NaNO_2 0.3 ml เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 10% AlCl_3 0.3 ml แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 3 นาที แล้วเติม 1M NaOH 1 ml เขย่า แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm แล้วเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (+)- catechin ($y = 0.0084x + 0.011$ $R^2 = 0.9994$) โดยค่าที่ได้แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในหน่วย μg (+)- catechin equivalent (CE)/100 g fresh sample ซึ่งพบว่า ใบของชะมวงเป็นส่วนที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดคือ 6711.00 ± 13.94 μg (CE)/100 g fresh sample รองลงมาคือ เยื่อหุ้มเมล็ด มีค่าเท่ากับ 4794.26 ± 13.94 μg (CE)/100 g fresh sample และเปลือกของผลเป็นส่วนที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์น้อยที่สุดคือ 1608.15 ± 13.94 μg (CE)/100 g fresh sample แสดงดังภาพที่ 4.3.1 (ข)



ภาพที่ 4.3.1 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดของชะมวง
 (ก) กราฟสารมาตรฐาน (+)-catechin (ข) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม เทียบกับสารมาตรฐาน
 (+)-catechin (means \pm SD $\mu\text{g (+)-catechin equivalent (CE)/100 g fresh sample}$, n=3)

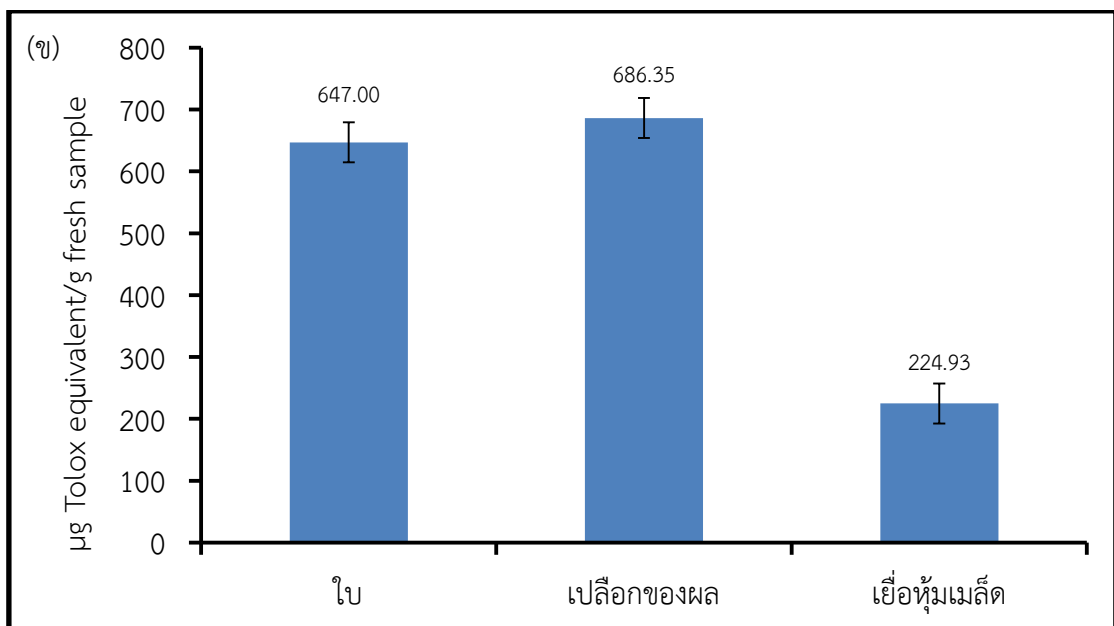
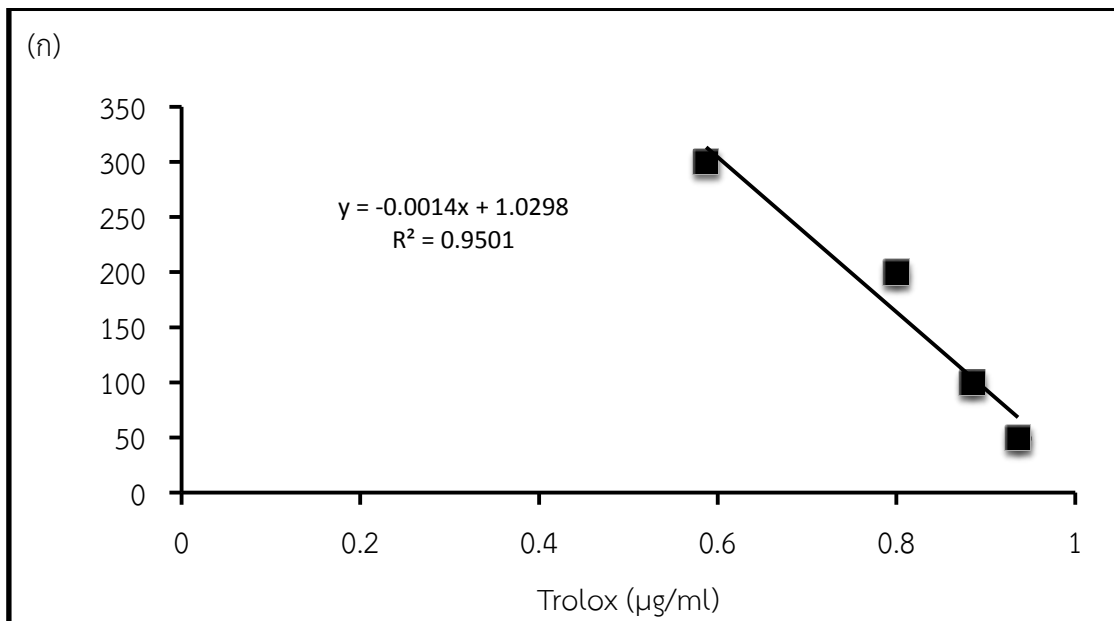
4.4 ผลการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay (DPPH radical-scavenging activity)

DPPH assay เป็นวิธีที่นิยมกันอย่างมากในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย และมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาสูง ในการวิเคราะห์จะวิเคราะห์จากสีของสารละลาย DPPH radical ที่จางลงเนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดชะมวงได้ให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล DPPH ทำให้อนุมูลลดลง ซึ่งจะวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีม่วงที่มีความยาวคลื่น 517 nm จากการวิเคราะห์พบว่า % radical-scavenging activities ของสารสกัดใบเปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดของชะมวงนั้น ซึ่งพบว่าเปลือกของผลชะมวงจะมีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH สูงที่สุดคือ 94.37 ± 0.45 % รองลงมาคือใบชะมวง มีค่าเท่ากับ 88.93 ± 0.45 % และเยื่อหุ้มเมล็ดชะมวงเป็นส่วนที่มีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH น้อยที่สุดคือ 32.54 ± 0.45 % แสดงดังภาพที่ 4.4.1



ภาพที่ 4.4.1 เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดจากชะมวง (means ± SD., n=3)

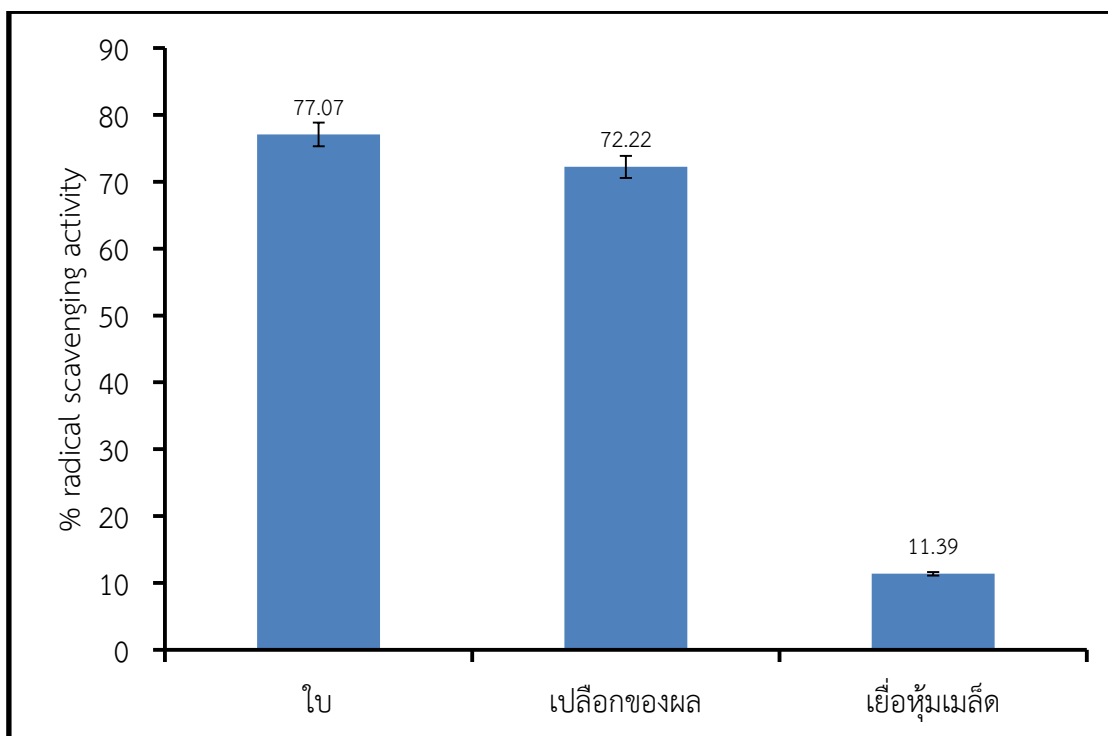
เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ของสารสกัดชะมวงเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ($y = -0.0014x + 1.0219$ $R^2 = 0.9501$) ซึ่งพบว่าเปลือกชะมวงมีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox สูงที่สุดคือ 686.35 ± 4.23 $\mu\text{g TE/g fresh sample}$ รองลงมาคือ ใบชะมวง มีค่าเท่ากับ 647.00 ± 4.23 $\mu\text{g TE/g fresh sample}$ และ เยื่อหุ้มเมล็ดชะมวงเป็นส่วนที่มีน้อยที่สุด เท่ากับ 224.93 ± 4.23 $\mu\text{g TE/g fresh sample}$ แสดงดังภาพที่ 4.4.2 (ข)



ภาพที่ 4.4.2 ความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ของสารสกัดใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดของชะมวง (ก) กราฟสารมาตรฐาน Trolox (ข) ความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (means \pm SD. $\mu\text{g TE/g fresh sample}$, $n=3$)

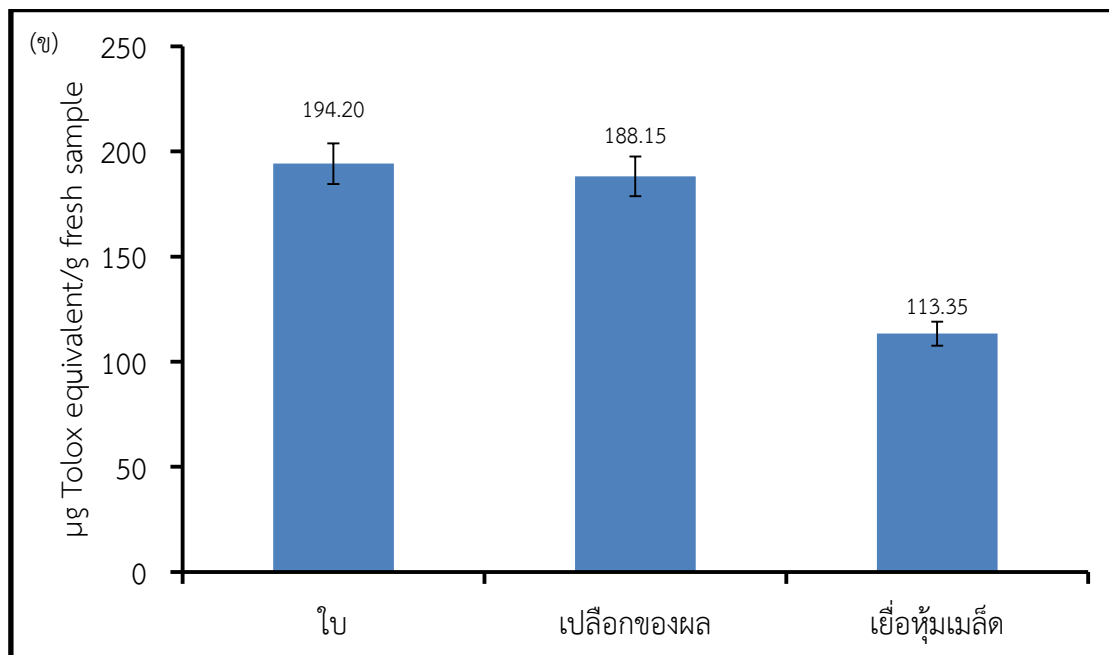
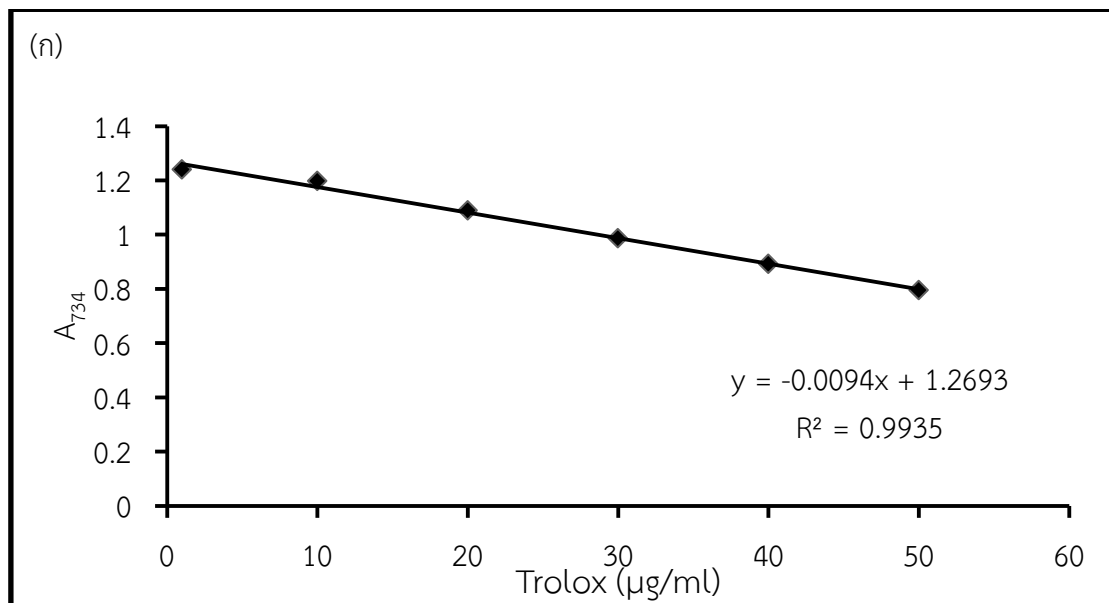
4.5 ผลการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay (ABTS radical-scavenging activity)

ABTS radical เป็นอนุมูลสีเขียว ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดที่มีวิธีการในการทดสอบที่ง่ายอีกวิธีหนึ่ง โดย ปิเปต stock solution มาเจือจางด้วย Ethanol จนได้ค่า A_{735} ประมาณ 0.70-0.90 มาผสมกับสารสกัดตัวอย่าง 0.1 ml กับสารละลาย ABTS radical ที่เจือจางแล้ว 1 ml แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm จากการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดใบชะมวงนั้นมี % radical-scavenging activities ในการต้านอนุมูล ABTS สูงที่สุดคือ 77.07 ± 0.11 % รองลงมาคือ เปลือกของผล ซึ่งมีค่าเท่ากับ 72.22 ± 0.11 % และเยื่อหุ้มเมล็ดชะมวงนั้นมีความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS น้อยที่สุดคือ 11.39 ± 0.11 % แสดงภาพที่ 4.5.1



ภาพที่ 4.5.1 เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS ของสารสกัดใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดจากชะมวง (means \pm SD., n = 3)

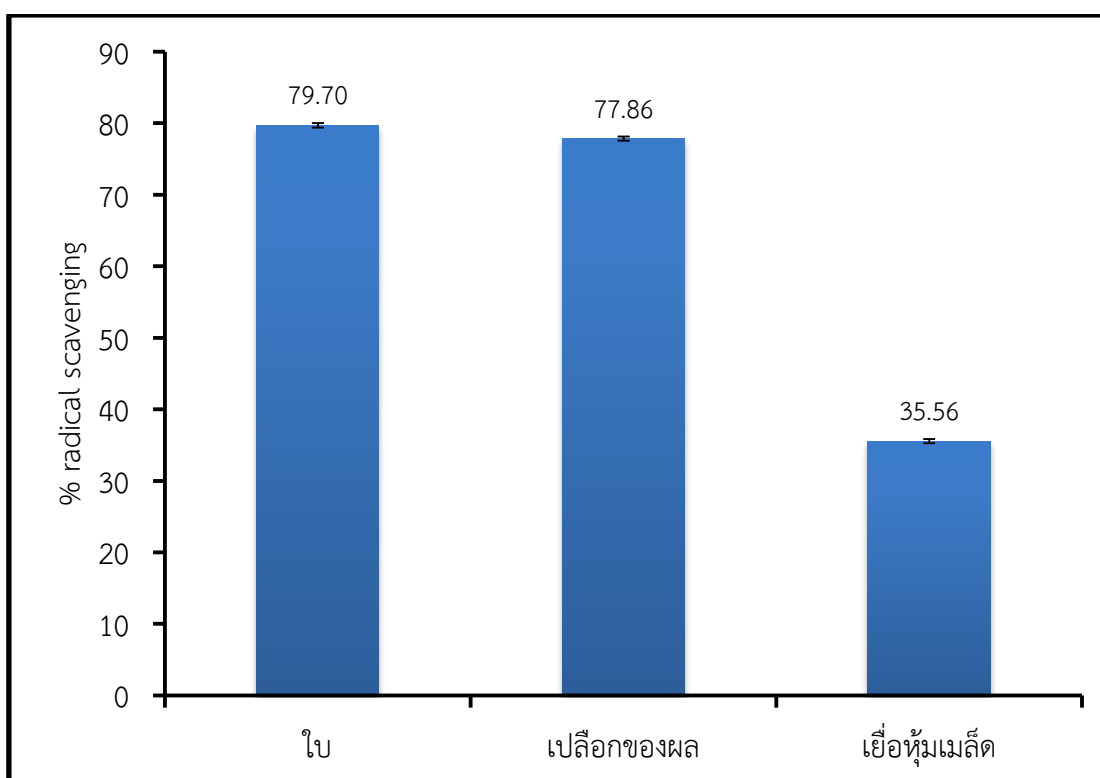
เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS ของสารสกัดชะมวงเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ($y = -0.0094x + 1.2693$) ซึ่งพบว่าใบชะมวงนั้นมีความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS ได้มากที่สุด คือ $194.20 \pm 5.00 \mu\text{g TE /g fresh sample}$ รองลงมาคือ เปลือกของผล ซึ่งมีค่าเท่ากับ $188.15 \pm 5.00 \mu\text{g TE /g fresh sample}$ และเยื่อหุ้มเมล็ดชะมวงนั้นเป็นส่วนที่มีความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS น้อยที่สุดคือ $113.35 \pm 5.00 \mu\text{g TE /g fresh sample}$ แสดงดังภาพที่ 4.5.2 (ข)



รูปที่ 4.5.2 ความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS ของสารสกัดจากใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดของชะมวง (ก) กราฟสารมาตรฐาน Trolox (ข) ความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (means \pm SD. $\mu\text{g TE/g fresh sample}$, $n=3$)

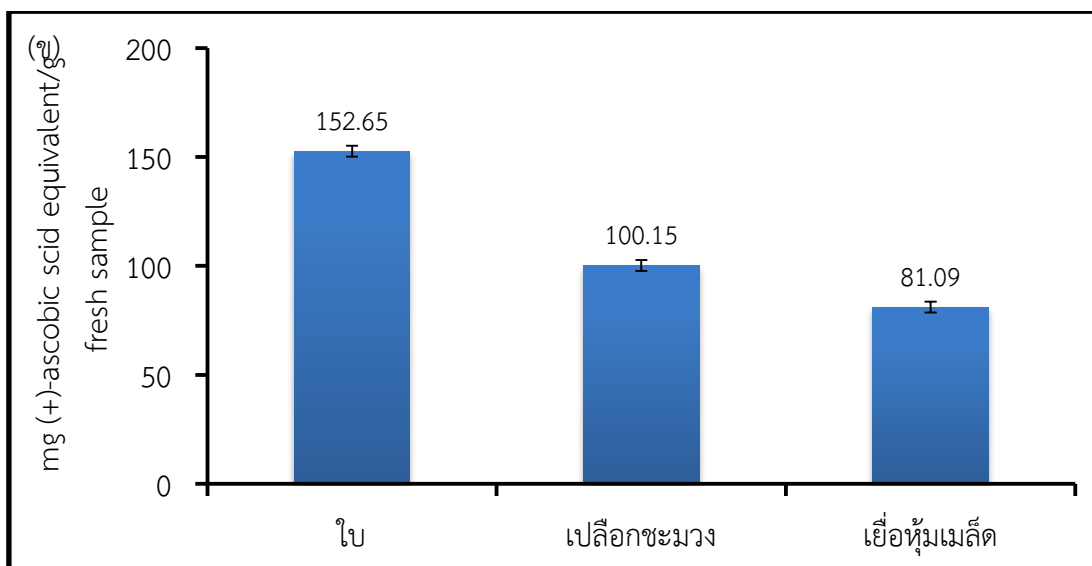
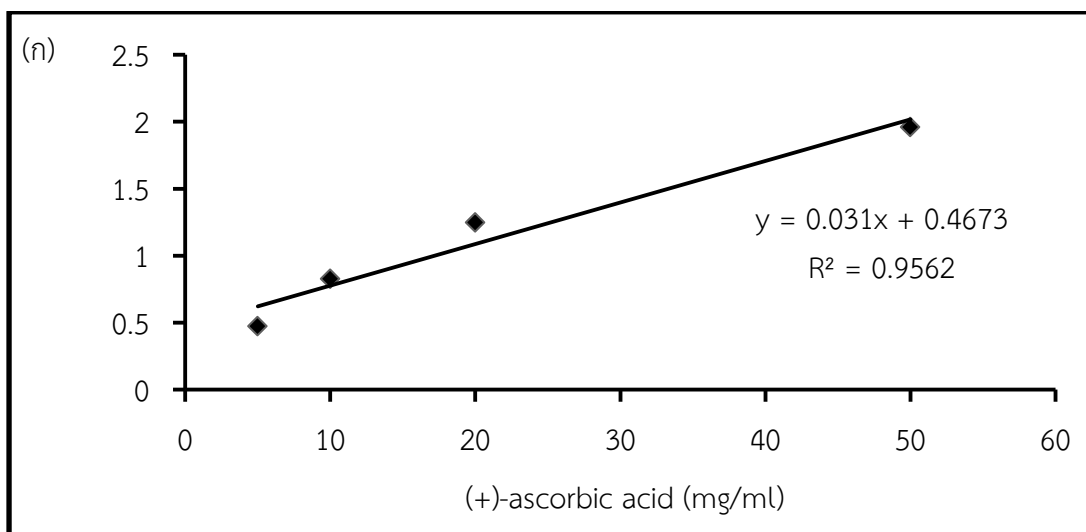
4.6 ผลวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2-Deoxyribose assay (Hydroxyl radical-scavenging activity)

วิธีนี้เป็นการยับยั้งการเกิด OH radical แอนติออกซิแดนท์ที่มีในสารสกัด และคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูล OH ตาม Kubora and Siriamornpun (2008) โดยผสม 10 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 ml 10 mM EDTA 0.1 ml และ 10 mM 2-Deoxyribose 0.2 ml ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารสกัดตัวอย่างลงไป 0.2 ml จากนั้นเติม 0.1 mM phosphate buffer 1.4 ml และเติม 10 mM H_2O_2 0.2 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชม. หลังจากครบ 1 ชม. เติม 2.8% Trichloroacetic acid และ 1% Thiobarbituric acid อย่างละ 1 ml เขย่าแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปแช่น้ำแข็ง และเมื่อสารผสมเย็นลงแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูล OH แสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยใบมี %radical-scavenging activities สูงที่สุดคือ $79.70 \pm 1.29\%$ รองลงมาคือ เปลือกของผล มีค่าเท่ากับ $77.86 \pm 1.29\%$ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน และเยื่อหุ้มเมล็ดนั้นเป็นส่วนที่มีค่าต่ำสุดคือ $35.56 \pm 1.29\%$ แสดงดังภาพที่ 4.6.1



ภาพที่ 4.6.1 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูล Hydroxyl ของสารสกัดจากใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดชะมวง (means \pm SD., n=3)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูล OH ของสารสกัด นอกจากจะวิเคราะห์ด้วยการคำนวณตามสูตรแล้ว ยังสามารถเทียบกับสารมาตรฐานได้คือ (+)- ascorbic acid หรือ vitamin C ($y=0.031x+0.4673$ $R^2=0.9562$) เพราะในการวิเคราะห์ด้วยวิธี 2-Deoxyribose assay นี้ จะสกัดสารได้ด้วยโดยใช้น้ำ ซึ่งวิตามินซีก็สามารถละลายในน้ำได้ จึงสามารถเป็นสารมาตรฐานได้ ซึ่งพบว่าสารสกัดใบชะมวงมีความสามารถในการต้านอนุมูล Hydroxyl สูงที่สุด คือ 152.65 ± 0.12 mg (+)-ascorbic acid equivalent (AAE)/g fresh sample รองลงมาคือ เปลือกของผลชะมวง มีค่าเท่ากับ 100.15 ± 0.12 mg (AAE)/g fresh sample และเยื่อหุ้มเมล็ดชะมวงเป็นส่วนที่มีน้อยที่สุด คือ 81.09 ± 0.12 mg (AAE)/g fresh sample แสดงดังภาพที่ 4.6.2 (ข)



ภาพที่ 4.6.2 ความสามารถในการต้านอนุมูล Hydroxyl ของสารสกัดใบ ดอก เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ดของชะมวง (ก) กราฟสารมาตรฐาน (+)-ascorbic acid (ข) ความสามารถในการต้านอนุมูล Hydroxyl กับสารมาตรฐาน (+)-ascorbic acid (means \pm SD., mg (+)-ascorbic acid equivalent/g fresh sample)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับการหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม สารประกอบฟีนอลิกรวม สารฟลาโวนอยด์รวม นอกจากนั้นยังศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของชะมวง ได้แก่ ใบ เปลือกของผล และเยื่อหุ้มเมล็ด การวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม สารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้นี้ใช้วิธี Optimize method ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นไปได้สูงในการสกัด ซึ่งช่วยลดปริมาณสารตัวอย่าง ลดปริมาณสารเคมี และยังช่วยลดเวลาในการสกัด อีกทั้งยังได้สารสกัดแคโรทีนอยด์ในปริมาณที่สูงและบริสุทธิ์กว่าวิธีการสกัดอื่น ๆ พบว่าใบชะมวงมีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมสูงที่สุดซึ่งเท่ากับ $106.60 \pm 1.11 \mu\text{g/g}$ fresh sample รองลงมาคือ เยื่อหุ้มเมล็ด เท่ากับ $50.40 \pm 1.11 \mu\text{g/g}$ fresh sample และเปลือกของผลเป็นส่วนที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมน้อยที่สุดคือ $31.40 \pm 1.11 \mu\text{g/g}$ fresh sample การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu assay และเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid ($y = 0.001x + 0.012$ $R^2 = 0.998$) พบว่าใบของชะมวงเป็นส่วนที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุดคือ เท่ากับ $1956.175 \pm 15.80 \mu\text{g GAE/g}$ fresh sample รองลงมาคือ เปลือกของผลมีค่าเท่ากับ $507.96 \pm 15.80 \mu\text{g GAE/g}$ fresh sample) และ เยื่อหุ้มเมล็ดของชะมวงเป็นส่วนที่มีปริมาณฟีนอลิกน้อยที่สุดคือ $167.66 \pm 15.80 \mu\text{g GAE/g}$ fresh sample การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่ได้จากการสกัดส่วนต่าง ๆ ของชะมวง ซึ่งทดสอบตามวิธี Aluminium chloride colorimetric ซึ่งเทียบกับสารมาตรฐาน (+)-catechin ($y = 0.0084x + 0.011$ $R^2 = 0.9994$) พบว่า ใบของชะมวงเป็นส่วนที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดคือ $6711 \pm 13.94 \mu\text{g (CE)/100 g}$ fresh sample รองลงมาคือ เยื่อหุ้มเมล็ด มีค่าเท่ากับ $4794.26 \pm 13.94 \mu\text{g (CE)/100 g}$ fresh sample และเปลือกของผลเป็นส่วนที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์น้อยที่สุดคือ $1608.15 \pm 13.94 \mu\text{g (CE)/100 g}$ fresh sample

สำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระใช้ Methanol ในการสกัด โดยทำทั้งหมด 3 วิธี คือ DPPH assay ABTS assay และ 2-Deoxyribose วิธีแรกคือ DPPH assay เป็นวิธีที่นิยมกันอย่างมากในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย และมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาสูง จากการวิเคราะห์พบว่า % radical-scavenging activities ของสารสกัดเปลือกของผลชะมวงจะมีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH สูงที่สุดคือ $94.37 \pm 0.459\%$ รองลงมาคือ ใบชะมวง มีค่าเท่ากับ $88.93 \pm 0.459\%$ และเยื่อหุ้มเมล็ดชะมวงเป็นส่วนที่มีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH น้อยที่สุดคือ $32.54 \pm 0.459\%$ เมื่อวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ($y = -0.0014x + 1.0219$ $R^2 = 0.9501$ ซึ่งพบว่า เปลือกชะมวงมีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox สูงที่สุดคือ $686.35 \pm 4.23 \mu\text{g TE/g}$ fresh sample รองลงมาคือ ใบชะมวง มีค่าเท่ากับ $647.00 \pm 4.23 \mu\text{g TE/g}$ fresh sample และเยื่อหุ้มเมล็ดชะมวงเป็นส่วนที่มีน้อยที่สุด เท่ากับ $224.93 \pm 4.23 \mu\text{g TE/g}$ fresh sample วิธีต่อมาคือ ABTS assay พบว่าสารสกัดใบชะมวงนั้นมี % radical-scavenging activities ในการต้านอนุมูล ABTS สูงที่สุดคือ $77.07 \pm 0.11\%$ รองลงมาคือ เปลือกของผลชะมวง ซึ่งมีค่าเท่ากับ $72.22 \pm 0.11\%$ และเยื่อหุ้มเมล็ดชะมวงนั้นมีความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS น้อย

ที่สุดคือ $11.39 \pm 0.11\%$ เมื่อวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ($y = -0.0094x + 1.2693$) ซึ่งพบว่า ใบชะมวงนั้นมีความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS ได้มากที่สุด คือ $194.20 \pm 5.00 \mu\text{g TE /g fresh sample}$ รองลงมาคือ เปลือกของผล ซึ่งมีค่าเท่ากับ $188.15 \pm 5.00 \mu\text{g TE /g fresh sample}$ และเยื่อหุ้มเมล็ดชะมวงนั้นเป็นส่วนที่มีความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS น้อยที่สุดคือ $113.35 \pm 5.00 \mu\text{g TE /g fresh sample}$ วิธีสุดท้าย 2-Deoxyribose assay จากการวิเคราะห์พบว่าใบมี % radical-scavenging activities สูงที่สุดคือ $79.70 \pm 1.29\%$ รองลงมาคือ เปลือกของผล มีค่าเท่ากับ $77.86 \pm 1.29\%$ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน และเยื่อหุ้มเมล็ดนั้นเป็นส่วนที่มีค่าต่ำสุดคือ $35.56 \pm 1.29\%$ นอกจากจะวิเคราะห์ด้วยการคำนวณตามสูตรแล้ว ยังสามารถเทียบกับสารมาตรฐานได้คือ (+)- ascorbic acid หรือ vitamin C ($y=0.031x+0.4673$ $R^2=0.9562$) เพราะในการวิเคราะห์ด้วยวิธี 2-Deoxyribose assay นี้ จะสกัดสารได้ด้วยโดยใช้น้ำ ซึ่งวิตามินซีก็สามารถละลายในน้ำได้ จึงสามารถเป็นสารมาตรฐานได้ ซึ่งพบว่าสารสกัดใบชะมวง มีค่า (+)- ascorbic acid equivalent (AAE) สูงที่สุด คือ $152.65 \pm 0.12 \text{ mg (+)-ascorbic acid equivalent (AAE)/g fresh sample}$ รองลงมาคือ เปลือกของผลชะมวง มีค่าเท่ากับ $100.15 \pm 0.12 \text{ mg (AAE)/g fresh sample}$ และเยื่อหุ้มเมล็ดชะมวงเป็นส่วนที่มีน้อยที่สุด คือ $81.09 \pm 0.12 \text{ mg (AAE)/g fresh sample}$

บรรณานุกรม

- กัญญาณัฐ แสงจาร์. บ้านหนองโพธิ์ ต.หนองโพธิ์ อ.นาเชือก จ.มหาสารคาม 44170
เมื่อ 10 พฤษภาคม 2559
- ท้องถิ่นอีสาน. (2554). วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีวเคมี. มหาวิทยาลัยขอนแก่น
เจนจิรา จิรัมย์ และ ประสงค์ สีหนาม” (พฤษภาคม-สิงหาคม 2554) “อนุมูลอิสระและสารต้าน
อนุมูลอิสระ” วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์. 1(1)
- ณัฐพล ใจไว. (2553). การศึกษาแคโรทีนอยด์ในผลไม้ท้องถิ่นและกล้วยหลากหลายสายพันธุ์. วิทยา
ศาสตร์บัณฑิต สาขาชีวเคมี. มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- นฤมล เบญจปักษ์, ประสาร สวัสดิ์ชิตัง, ธนเศรษฐ์ เสนาวงศ์ และ สายันต์ ต้นพานิชย์. (2551).
“ความสามารถต้านออกซิเดชันของผักหวานบ้านในเซลล์ human embryonic kidney 293 (HEK-
293 cells)” ว. วิทย. กษ. 39(3) (พิเศษ) : 197-200
- ประสาร สวัสดิ์ชิตัง. (2551). “สารต้านอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิต” (เอกสารประกอบการสอนชีวเคมี
แบบเข้มข้น2 ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)
- ชมวง. จาก [http://livitanutric.com/ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม/ชมวงสรรพคุณมากกว่าที่ท่าน
คิด/17](http://livitanutric.com/ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม/ชมวงสรรพคุณมากกว่าที่ท่านคิด/17). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2559
- โรสวินัย พิริยะสมบูรณ์. (2553). “อาหารต้านอนุมูลอิสระ” Antioxidant ตัวการโรคร้าย ปัจจัย
ความเสี่ยง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : Feel good
- วรรณพิชญ์ จุลกัลป์. (2553). การศึกษาการสกัดพีโบอิติกส์และสารประกอบฟีนอลิกจากเมล็ดขนุน.
วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี.
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- วีระศักดิ์ สามิ. (พฤษภาคม 2548). “แคโรทีนอยด์ : โครงสร้างทางเคมีและกลไกที่มีผลต่อการทำ
หน้าที่” SWU J Pharm Sci. 10(1) : 58-66
- ศวรรณี เหลืองสุนทรชัย. (2549). มหัศจรรย์สารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ :
ใกล้หมอ
- สูตรโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ กลุ่มแคโรทีน. (2558). ค้นเมื่อ 25 ธันวาคม 2558.
จาก [http://supplement-to-health.blogspot.com/2013/10/su-per-
antioxidant.html](http://supplement-to-health.blogspot.com/2013/10/su-per-antioxidant.html).
- สูตรโครงสร้างสารฟีนอลิก. (2558). ค้นเมื่อ 21 พฤศจิกายน 2558.
จาก [http://www.intechopen.com/books/antioxidant-antidiabetic-agents-and-
human-health/antioxidant-rich-natural-grain-products-and-human-health](http://www.intechopen.com/books/antioxidant-antidiabetic-agents-and-human-health/antioxidant-rich-natural-grain-products-and-human-health).
- สูตรโครงสร้างของ Ascorbic acid. (2558). ค้นเมื่อ 24 ธันวาคม 2558.
จาก https://th.wikipedia.org/wiki/vitamin_C.
- สูตรโครงสร้าง ABTS assay. (2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558.
จาก [http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-
explorer/analytical-enzymes/peroxidase-enzymes.html](http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/peroxidase-enzymes.html).

- สูตรโครงสร้างของ BHA. ((2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558.
จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1577/butylated-hydroxyanisole-bha> .
- สูตรโครงสร้างของ BHT. (2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558.
จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1576/butylated-hydroxytoluene-bht>.
- สูตรโครงสร้าง catechol. (2558). ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558. จาก
<https://en.wikipedia.org/wiki/Catechol>.
- สูตรโครงสร้าง DPPH assay. (2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558.
จาก <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/251754/sch1/>
- สูตรโครงสร้าง Eumelanin. (2558). ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558.
จาก <https://en.wikipedia.org/wiki/Eumelanin>.
- สูตรโครงสร้าง Flavonoids. (2558). ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558. จาก
<https://en.wikipedia.org/wiki/Flavonoids>.
- สูตรโครงสร้าง Flavonoids structure. (2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558.
[https://en.wikipedia.org/wiki/Flavonoids structure](https://en.wikipedia.org/wiki/Flavonoids_structure).
- สูตรโครงสร้าง gallic acid. (2558). ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558. จาก
[https://en.wikipedia.org/wiki/Gallic acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Gallic_acid).
- สูตรโครงสร้าง Lignin. (2558). ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558. จาก
<https://en.wikipedia.org/wiki/Lignin>.
- สูตรโครงสร้าง Sesamin. (2558). ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558.
จาก <https://en.wikipedia.org/wiki/Sesamin>.
- สูตรโครงสร้าง Sesamolin. (2558). ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2558.
จาก <https://en.wikipedia.org/wiki/Sesamolin>.
- สูตรโครงสร้างของ TBHQ. (2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558.
จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2123/tertiary-butyl-hydro-quinone-tbhq>.
- สูตรโครงสร้างของ Trolox. (2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558.
จาก <https://en.wikipedia.org/wiki/Trolox>.
- สูตรโครงสร้างของ Vitamin E. (2558). ค้นเมื่อ 24 พฤศจิกายน 2558.
จาก <https://th.wikipedia.org/wiki/Vitamin>.
- โอภา วัชระคุปต์ และคณะ. (2549). สารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : พี.เอส.พรีนซ์
เอมอร์ ตรีปัญญาโยยศ. (2551). รู้จักอนุมูลอิสระ (Antioxidant). พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ :
แอ๊ปเปิ้ล พรีนติ้ง กรุป

- Apilax, S., Paakpoom, P. (2012). Antibacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone. *Food chemistry*, 130, 826-831.
- Alzoreky, N. S., & Nakahara, K. B. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 223–230.
- Amin, I., Norazaidah, Y., Emmy Hainida, K. I. (2006). Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. *Food Chemistry*. 94, 47–52
- Bouayed, J. Polyphenols. (2011). A potential new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. *Current Nutrition and Food Science*, 6(1), 13-18.
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2011). Exogenous antioxidants – Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228-237.
- Braca, A., De Tommasi, N., Di Bari, L., Pizza, C., Politi, M., & Morelli, I. (2001). Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *Journal of Natural Products*, 64(7), 892-895.
- Cunshan, Z., Jiali, H., Haile, M., Abu, E., Yagoub, A., Xiaojie, Y., John, O., Haiyan, M., Xiaopei, Q., (2015). Antioxidant peptides from corn gluten meal: Orthogonal design evaluation. *Food Chemistry*, 187, 270–278
- Dasgupta, N., & De, B. (2007). Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chemistry*, 101(2), 471-474.
- El, S. S., Abdel, H. (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chemistry*. 114(4), 1271-1277.
- Englberger, L., Wills, R. B. H., Blades, B., Dufficy, L., Daniells, J. W., & Coyne, T. (2006). Carotenoid content and flesh color of selected banana cultivars growing in Australia. *Food and Nutrition Bulletin*, 27(4), 281-291.
- Formanek, Z., Kerry, J. P., Higgins, F. M., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., & Farkas, J (2001). Addition of synthetic and natural antioxidants to VR-tocopheryl acetate supplemented beef patties: effects of Antioxidants and packaging on lipid oxidation. *Meat science*, 58(4), 337-341

- Formanek, A. C., Kruger, J. A., Irene, D. R., Pieh, S., Skorpik, C. (2001). Gonioscopic changes after implantation of a posterior chamber lens in phakic myopic eyes. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 27 (12), 1919–1925
- Giasson, B. I., Ischiropoulos, H., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2002). The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(12), 1264-1275.
- Gonzalez-Montelongo, R., Gloria Lobo, M., & Gonzalez, M. (2010). Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*. 119(3), 1030-1039
- Glud, L. L. (2007): Bias in clinical intervention research. *Am. J. Epidemiol.*163, 493–501.
- Jia Wei, Huiying Miao, Qiaomei Wang. (2011) Effect of glucose on glucosinolates, antioxidants and metabolic enzymes in *Brassica* sprouts. *Scientia Horticulturae*. 129, 535–540
- Kanazawa, K., & Sakakibara, H. (2000). High content of dopamine, a strong antioxidant, in cavendish banana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 844-848.
- Kawasaki, B. T., Hurt, E. M., Mistree, T., & Farrar, W. L. (2008). Targeting cancer stem cells with phytochemicals. *Molecular Interventions*, 8(4), 174-184.
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chemistry*, 110(4), 881-890.
- Lee, J., Koo, N., & Min, D.B. (2004). Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 21-33.
- Lim, Y. Y., Lim, T. T., & Tee, J. J., (2007). Antioxidative properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*, 103(3), 1003-1008.
- Maxwell, D., H. Young, S. Jaspars, J. Frize, J. Burns. (2009). Targeting and Distribution in Complex Emergencies: Participatory Management of Humanitarian Food Assistance. Feinstein International Center, Tufts University, Medford. MA. Under submission to *Food Policy*.
- Matill H. (1947). Antioxidants *Annu Rev Biochem* National Center for biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine; 16, 177–92.

- Meechaona, R., Sengpracha, W., Banditpuritat, J., Kawaree, R., Phutdhawong, W. (2007). Fatty acid content and antioxidative activity of Thai bananas Maejo International. science and Technology 1(2), 222-228
- Miguel, A., Meneses, G. C., Mariarosa, S., Ernesto, R., Renata, A. (2015). Antioxidant phenolic compounds recovery from *Mangifera indica* L.by-products by supercritical antisolvent extraction. Food Engineering. 163, 45–53
- Mokbel, M. S., Hashinaga, F. (2005). Antibacterial and antioxidative activities of banana fruits peel. Biochemistry and Biotechnology, 1(3), 126-131.
- Moon, J. K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. Agricultural and Food Chemistry, 57(5), 1655-1666.
- Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M (February 2003). "Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention". J Am Coll Nutr 22 (1): 18–35.
- Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentao, P., Andrade, P. B., Ferreira, I. C., et al. (2007). Walnut (*Juglansregia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food Chem Toxicol, 45(11), 287-2295.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. Agricultural and Food Chemistry, 48(8), 3396-3402.
- Senevirathne, M., Kim, S. H., Siriwardhana, N., Ha, J. H., Lee, K. W., & Jeon, Y. J. (2006). Antioxidant potential of *ecklinia cavaon* reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. Food Science and Technology International, 12(1), 27-38
- Silva, B. M., Andrade. P B., Valention, P., Ferreres, F., Seabra, R. M., & Ferreira, M. A. (2004). Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: Antioxidant activity. Agricultural and Food Chemistry, 52(15), 4705-4712.
- Someya, S., Yoshiki, Y., & Okubo, K. (2002). Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). Food Chemistry, 79(3), 351-354.
- Sulaiman, S. F., Yusoff, N. A. M., Eldeen, I M., Seow, E. M., Sajak, A. A. B., Supriatno, et al. (2011). Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa* sp.) Food Composition and Analysis, 24(1), 1-10.
- Vijayakumar, S., Presannakumar, G., & Vijayalakshmi, N. R. (2008) . Antioxidant activity of banana flavonoids. Fitoterapia, 79(4), 279-282.

- Wall, M. M. (2006). Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (Musa sp.) and papaya (Carica papaya) cultivars grown in Hawaii. *Food Composition and Analysis*, 19(5), 434-445.
- Wijekoon, M. M. J. O., Bhat, R., & Karim, A. A. (2011) Effect of extraction solvents on the phenolic Compounds and Antioxidant activities of bunga kantan (Etlingera elatior Jack.) inflorescence. *Food composition and Analysis*, 24(4-5), 615-619
- Zin, Z. M., Abdul Hamid, A., & saari N. (2006). Antioxidant ive activities of chromatographic Fractions obtained from root, fruit and leaf of mengkudu (Morinda citrifolia L.). *Food Chemidtry*, 94(2), 169-178.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการเตรียมสาร

1. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม
 - 1.1 การเตรียม 40% KOH
ชั่ง KOH มา 20 g ละลายใน beaker ด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง (double – distilled water) และปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร
2. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลรวม
 - 2.1 การเตรียม 50% ethanol
ผสม Ethanol กับ น้ำกลั่นสองครั้ง ในอัตราส่วน 1:1
 - 2.2 การเตรียมสารละลาย Folin – Ciocalteu’s phenol reagent
เตรียมจาก 2 N stock solution โดยปิเปต 2 N stock solution มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง ในอัตราส่วน 1:10 (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)
 - 2.3 การเตรียมสารละลาย 35% Na_2CO_3
ชั่ง Na_2CO_3 มา 17.5 g ละลายในน้ำกลั่นสองครั้ง และปรับ 50 ml ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร
 - 2.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$
ชั่ง Gallic acid มา 0.01 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสอง เป็น 10 ml ในขวดปรับปริมาตร ซึ่งจะเป็น stock solution เก็บที่ 4°C
3. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์รวม
 - 3.1 การเตรียมสารละลาย 5% NaNO_2
ชั่ง NaNO_2 มา 2.5 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง เป็น 50 ml ในขวดปรับปริมาตร
 - 3.2 การเตรียมสารละลาย 10% AlCl_3
ชั่ง AlCl_3 มา 5 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง เป็น 50 ml ในขวดปรับปริมาตร
 - 3.3 การเตรียมสารละลาย 1 M NaOH
ชั่ง NaOH มา 4 g ละลายด้วยน้ำกลั่นในบีกเกอร์ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง เป็น 100 ml ในขวดปรับปริมาตร
 - 3.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (\pm)-catechin ความเข้มข้น 500 μM
ชั่ง (\pm)-catechin มา 0.0015 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง เป็น 10 ml ในขวดรูปปรับปริมาตร ซึ่งจะได้เป็น stock solution เก็บที่ 4°C
4. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay
 - 4.1 การเตรียม 0.0005 M DPPH stock solution
ชั่ง DPPH (MW.=394.3 g/mol) มา 0.049 g ละลายใน Methanol และปรับปริมาตรเป็น 250 ml ด้วย Methanol ในขวดรูปปรับปริมาตร ซึ่งจะได้เป็น stock solution เก็บในขวดสีชา

ที่ 4°C เมื่อจะนำไปใช้จะต้องเจือจางเป็น 0.0001 M ด้วย Methanol โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง 0.0005 M DPPH กับ Methanol เป็น 1:4

5. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay

5.1 การเตรียม ABTS stock solution

ชั่ง ABTS มา 0.0180 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง (double-distilled water) เป็น 5 ml ซึ่งจะได้เป็น 7 mM ABTS solution

ชั่ง $K_2S_2O_8$ มา 0.0033 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย Double-distilled water เป็น 5 ml ซึ่งจะได้เป็น 2.45 mM $K_2S_2O_8$ solution นำสารละลายทั้งสองที่เตรียมไว้มาผสมกัน จะได้เป็น ABTS stock solution เก็บในขวดสีชาที่ 4°C

6. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 1000 $\mu\text{g/ml}$ Trolox

ชั่ง Trolox มา 0.01 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย Methanol เป็น 10 ml เก็บในขวดสีชาที่ 4°C ซึ่งจะได้เป็น stock solution

7. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี

2-Deoxyribose

7.1 การเตรียมสารละลาย 10 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

ชั่ง $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MW.=278.05) มา 0.0278 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง เป็น 10 ml เก็บที่ 4°C

7.2 การเตรียมสารละลาย 10 mM EDTA

ชั่ง EDTA (MW.=298.25) มา 0.0746 g ละลาย (ในการละลายจะเติมเบส เช่น NaOH ลงไปทะเลน้อยจนกว่า EDTA ละลายหมด) และปรับปริมาตรด้วย น้ำกลั่นสองครั้งเป็น 10 ml

7.3 การเตรียมสารละลาย 10 mM 2-Deoxy-D-ribose

ชั่ง 2-Deoxy-D-ribose (MW.=134.13 g/mol) มา 0.0134 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสองครั้งเป็น 10 ml แล้วเก็บที่ 4°C

7.4 การเตรียมสารละลาย 0.1 mM phosphate buffer (pH 7.4)

ชั่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ มา 0.78 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 ml

ชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ มา 0.445 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 ml

ผสม $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 81 ml กับ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 19 ml ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บในขวดเก็บสารเพื่อใช้ทำการวิเคราะห์ต่อไป

7.5 การเตรียมสารละลาย 10 mM H_2O_2

เตรียมจาก 6% H_2O_2 (มีจำหน่ายตามร้านขายยาทั่วไป) โดยปิเปต 6% H_2O_2 มา 0.570 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่นสองครั้งในขวดปรับปริมาตร

7.6 การเตรียมสารละลาย 2.8% Trichloroacetic acid

ชั่ง TCA มา 1.4 g ละลาย (ในการละลายจะค่อยๆเติมเบสลงไปจนกว่า TCA จะละลายหมด) และปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง แล้วเก็บในขวดเก็บสารเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

7.7 การเตรียมสารละลาย 1% Thiobarturic acid

ชั่ง TBA มา 0.5 g ละลาย (ในการละลายจะค่อย ๆ เติมเบสลงไปจนกว่า TBA จะละลายหมด) และปรับปริมาตรเป็น 50 ml ด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง แล้วเก็บในขวดเก็บสารเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

7.8 การเตรียมสารละลายสารมาตรฐาน 100 mg/ml (+)-ascorbic acid

ชั่ง (+)-ascorbic acid มา 1 g ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วยน้ำกลั่น แล้วเก็บในขวดสีชาที่ 4°C ซึ่งได้เป็น (+)-ascorbic acid stock solution

ภาคผนวก ข
วิธีการคำนวณ

1. การหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ที่ได้จากการนำสารสกัดไปวัดมาคำนวณดังตัวอย่างต่อไปนี้

$$A_{450} = ECL$$

A_{450} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างที่ 450 nm

E คือ Absorbance coefficient ใน Petroleum ether = $A^{1\%}$ (ค่าการดูดกลืนแสงสำหรับ 1 μ g ใน 1 ml) ซึ่งเท่ากับ 0.25

C คือ ความเข้มข้นของสารละลาย

L คือ ระยะทางที่แสงผ่านสารละลาย = 1 cm

ตัวอย่าง ใบชะมวงสด 0.5 กรัม เมื่อสกัดแล้วได้ total volume เป็น 10 ml และมีค่า A_{450} เท่ากับ 1.3325

จาก	A_{450}	= ECL
แทนค่า	C	= $1.3325/0.25$ = 5.33 μ g/ml

ในสารสกัด 1 ml มีแคโรทีนอยด์อยู่ 5.33 μ g

ถ้าสารสกัด 10 ml มีแคโรทีนอยด์อยู่ $(5.33 \times 10)/1 = 53.3 \mu$ g

ในการทดลองซึ่งสารมา 0.5 กรัม

ในตัวอย่างใบชะมวงสด 0.5 g มีแคโรทีนอยด์ 53.3 μ g

ถ้าตัวอย่างใบชะมวงสด 1 g มีแคโรทีนอยด์ $(53.3 \times 0.5)/1 = 106.6 \mu$ g

ดังนั้น ในใบชะมวงสดมีปริมาณแคโรทีนอยด์อยู่ 106.6 μ g/g

2. การหาปริมาณฟีนอลิกรวม

จากกราฟมาตรฐานของ Gallic acid ได้สมการเส้นตรงคือ $y = 0.001x + 0.0125$
 $R^2 = 0.9989$ ในการคำนวณจะนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ของสารสกัดตัวอย่างมาเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid สามารถคำนวณได้ดังตัวอย่าง

ตัวอย่าง ใบชะมวงสด 5.02 กรัม เมื่อสกัดแล้วได้ total volume เป็น 10 ml และเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ได้เท่ากับ 0.994

จาก	$y = 0.001 X + 0.0125$
	$X = (y-0.0012) / 0.001$
จะได้	$X = (0.994 - 0.0012) / 0.001$ = 982 μ g/ml

ในสารสกัด 1 ml มี phenolic content 982 μ g

ถ้าสารสกัด 10 ml มี phenolic content 9820 μ g

ในการทดลองซึ่งสารมา 5.02 กรัม

ในตัวอย่างใบชะมวงสด 5.02 g มี phenolic content 9820 μ g

ถ้าตัวอย่างใบชะมวงสด 1 g มี phenolic content 1956.17 μg
 ดังนั้น ในใบชะมวงสดมีปริมาณ phenolic content เท่ากับ 1956.17 μg Gallic acid
 equivalent/g fresh sample เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid

3. การคำนวณหาฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoids)

จากกราฟมาตรฐานของ (+)-catechin ได้สมการเส้นตรงคือ $y = 0.0084x + 0.011$
 $R^2 = 0.9994$ ในการคำนวณจะนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ของสารสกัดตัวอย่าง
 มาเทียบกับสารมาตรฐาน (+)-catechin สามารถคำนวณได้ดังตัวอย่าง

ตัวอย่าง ใบชะมวงสด 5.01 กรัม เมื่อสกัดแล้วได้ total volume เป็น 10 ml และเมื่อนำไปวัดค่า
 การดูดกลืนแสงที่ 510 nm ได้เท่ากับ 1.221

$$\begin{aligned} \text{จาก} & & y & = 0.0084X + 0.011 \\ & & X & = (y-0.011) / 0.0084 \\ \text{จะได้} & & X & = (1.221 - 0.011) / 0.0084 \\ & & & = 144.05 \mu\text{mol} \end{aligned}$$

ในสารสกัด 1000 ml มี flavonoid content 144.05 μmol

ถ้าสารสกัด 10 ml มี flavonoid content 1.4405 μmol

ในการทดลองซึ่งสารมา 5.01 กรัม

ในตัวอย่างใบชะมวงสด 5.02 g มี flavonoid content 1.4405 μmol

ถ้าตัวอย่างใบชะมวงสด 1 g มี flavonoid content 0.2875 μmol

จาก MW ของ (+)-catechin = 290.28 g/mol

จะได้ $0.2875 \mu\text{mol} \times 290.28 \text{ g/mol} = 83.6290 \mu\text{g}$

ดังนั้น ในใบชะมวงสดมีปริมาณ flavonoid content เท่ากับ 1956.17 μg (+)-catechin
 equivalent/g fresh sample เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (+)-catechin

4. การคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

4.1 การคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูล DPPH

$$\% \text{ DPPH radical-scavenging activity} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

A_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control

A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง

ตัวอย่าง ใบชะมวงสด 5.00 กรัม ได้สารสกัด 5 ml และเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm ได้เท่ากับ 0.116 และค่าการดูดกลืนแสงของ control ที่ 515 nm ได้เท่ากับ 1.048

$$\begin{aligned} \text{จะได้ \% DPPH radical scavenging activity} &= ((1.048 - 0.116)/1.048) \times 100 \\ &= 88.93 \end{aligned}$$

4.2 การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

จากกราฟมาตรฐานได้สมการเส้นตรงคือ $y = -0.0014x + 1.0298$ $R^2 = 0.9501$ นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 515 nm มาแทนค่า y ในสมการแล้วหาค่า X ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ตัวอย่าง ใบชะมวงสด 5.00 กรัม ได้สารสกัด 5 ml และเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm ได้เท่ากับ 0.116

$$\text{จาก } y = -0.0014x + 1.0298$$

$$\text{จะได้ } x = (y - 1.0298)/(-0.0014)$$

แทนค่า y ด้วยค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง

$$x = (0.116 - 1.0298)/(-0.0014)$$

$$= 647 \mu\text{g/ml}$$

ในสารสกัด 1 ml มี Trolox equivalent เท่ากับ 647 μg

ถ้าสารสกัด 5 ml มี Trolox equivalent เท่ากับ $(647 \times 5)/1 = 3235 \mu\text{g}$

ในการทดลองซึ่งตัวอย่างมา 5.00 g

ในตัวอย่าง 5 g มี Trolox equivalent เท่ากับ 3235 μg

ในตัวอย่าง 1 g มี Trolox equivalent เท่ากับ $(3235 \times 1)/5 = 647 \mu\text{g}$

ดังนั้น ใบชะมวงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 647 μg Trolox equivalent / g fresh sample เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

5. การคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay

5.1 การคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูล ABTS

$$\% \text{ ABTS radical-scavenging activity} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

A_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control

A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง

ตัวอย่าง ใบชะมวงสด 3.03 กรัม ได้สารสกัด 5 ml เมื่อนำไปทำการวิเคราะห์พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ได้เท่ากับ 0.163 และค่าการดูดกลืนแสงของ control ที่ 734 nm ได้เท่ากับ 0.711

$$\begin{aligned} \text{จะได้ \% ABTS radical scavenging activity} &= ((0.711 - 0.136)/0.711) \times 100 \\ &= 77.07 \end{aligned}$$

5.2 การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

จากกราฟมาตรฐานได้สมการเส้นตรงคือ $y = -0.0094X + 1.2693$ $R^2 = 0.9935$

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 734 nm มาแทนค่า y ในสมการแล้วหาค่า X ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ตัวอย่าง ใบชะมวงสด 3.03 กรัม ได้สารสกัด 5 ml และเมื่อนำไปทำการวิเคราะห์พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ได้เท่ากับ 0.116

$$\text{จาก } y = -0.0094X + 1.2693$$

$$\text{จะได้ } X = (y - 1.2693) / (-0.0094)$$

แทนค่า y ด้วยค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง

$$X = (0.163 - 1.2693) / (-0.0094) = 117.69 \mu\text{g/ml}$$

ในสารสกัด 1 ml มี Trolox equivalent เท่ากับ 117.69 μg

ถ้าสารสกัด 5 ml มี Trolox equivalent เท่ากับ $(117.69 \times 5) / 1 = 588.44 \mu\text{g}$

ในการทดลองซึ่งตัวอย่างมา 3.03 g

ในตัวอย่าง 3.03 g มี Trolox equivalent เท่ากับ 588.44 μg

ในตัวอย่าง 1 g มี Trolox equivalent เท่ากับ $(588.44 \times 1) / 3.03 = 194.20 \mu\text{g}$

ดังนั้น ในใบชะมวงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 194.20 μg Trolox equivalent / g fresh sample เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

6. การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2-Deoxyribose

6.1 การคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูล Hydroxyl

$$\% \text{ Hydroxyl radical-scavenging activity} = \left[1 - \left(\frac{A_s - A_0}{A_c - A_0} \right) \right] \times 100$$

เมื่อ A_c ค่าการดูดกลืนแสงของ control (ใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดตัวอย่าง)

A_s ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์

A_0 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ แต่ไม่เติม H_2O_2

ตัวอย่าง ใบชะมวงสด 3.02 กรัม ได้สารสกัด 25 ml และเมื่อนำไปทำการวิเคราะห์พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ของ A_c เท่ากับ 0.827 A_s เท่ากับ 0.628 และ A_0 เท่ากับ 1.039

จะได้ % Hydroxyl radical-scavenging activity

$$= [1 - ((1.039 - 0.628) / (0.628 - 0.628))] \times 100$$

$$= 30.7$$

6.2 การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (+)-ascorbic acid

จากกราฟมาตรฐานได้สมการเส้นตรงคือ $y = 0.031X + 0.4673$ $R^2 = 0.9562$ นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 734 nm มาแทนค่า y ในสมการแล้วหาค่า X ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ตัวอย่าง ใบชะมวงสด 3.02 กรัม ได้สารสกัด 25 ml และเมื่อนำไปทำการวิเคราะห์พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm ได้เท่ากับ 0.628

จาก $y = 0.031X + 0.4673$

จะได้ $X = (y - 0.4673) / (0.031)$

แทนค่า y ด้วยค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง

$$X = (0.628 - 0.4673) / (0.031) = 18.44 \mu\text{g/ml}$$

ในสารสกัด 1 ml มี (+)-ascorbic acid equivalent เท่ากับ 18.44 μg

ถ้าสารสกัด 25 ml มี (+)-ascorbic acid equivalent เท่ากับ $(18.44 \times 25) / 1 = 461 \mu\text{g}$

ในการทดลองซึ่งตัวอย่างมา 3.02 g

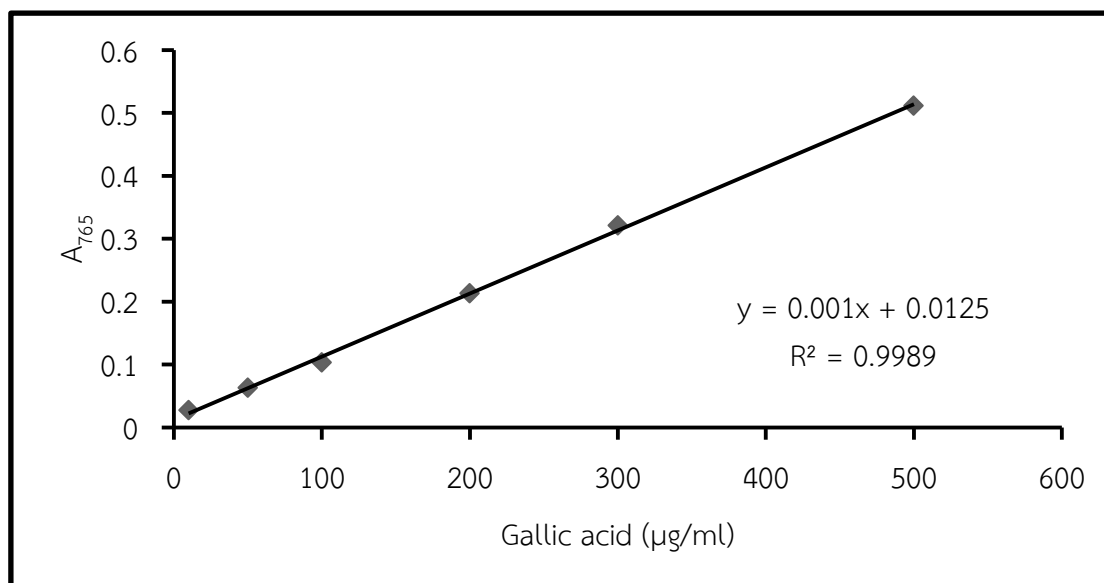
ในตัวอย่าง 3.02 g มี (+)-ascorbic acid equivalent เท่ากับ 461 μg

ในตัวอย่าง 1 g มี (+)-ascorbic acid equivalent เท่ากับ $(461 \times 1) / 3.02 = 152.65 \mu\text{g}$

ดังนั้น ใบชะมวงมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 152.65 μg (+)-ascorbic acid equivalent / g fresh sample เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน มาตรฐาน (+)-ascorbic acid

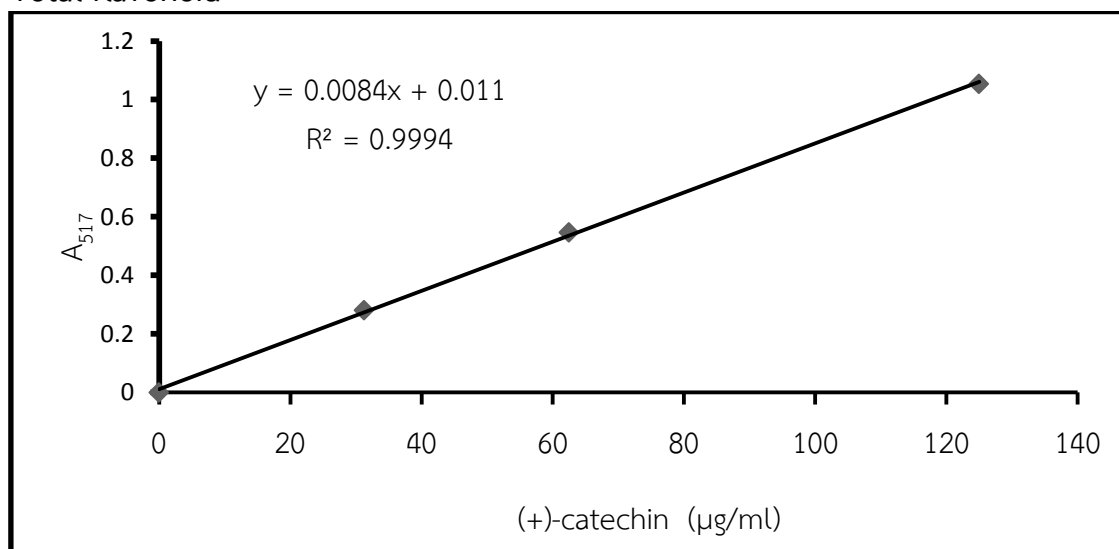
ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

Total Phenolic contents



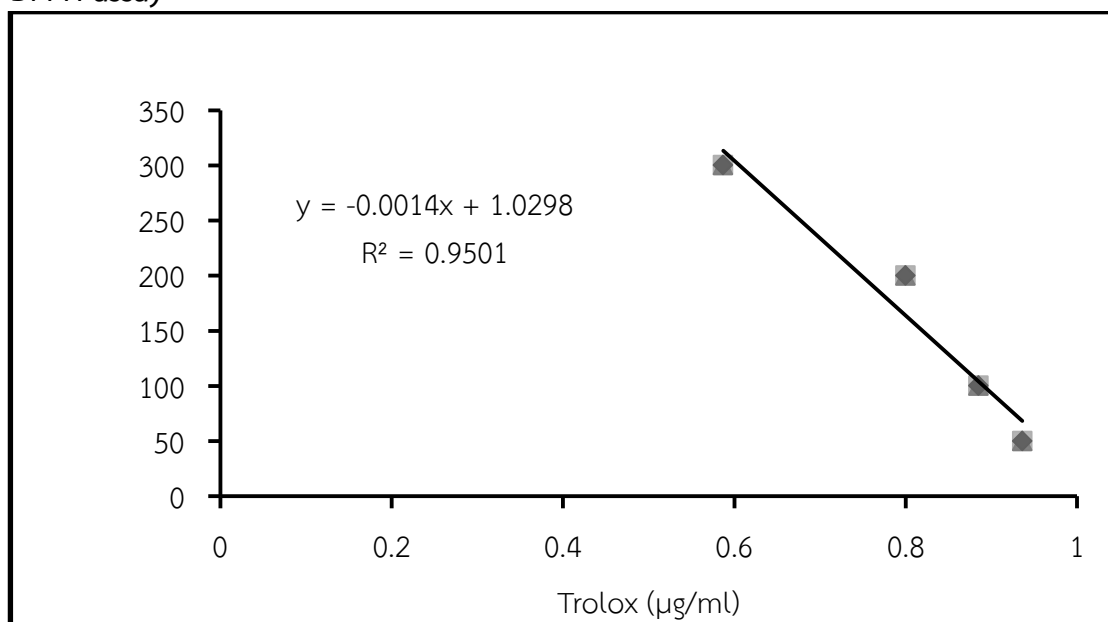
Gallic acid (µg/ml)	10	50	100	200	300	500
A ₇₆₅	0.027	0.063	0.103	0.213	0.321	0.511

Total flavonoid



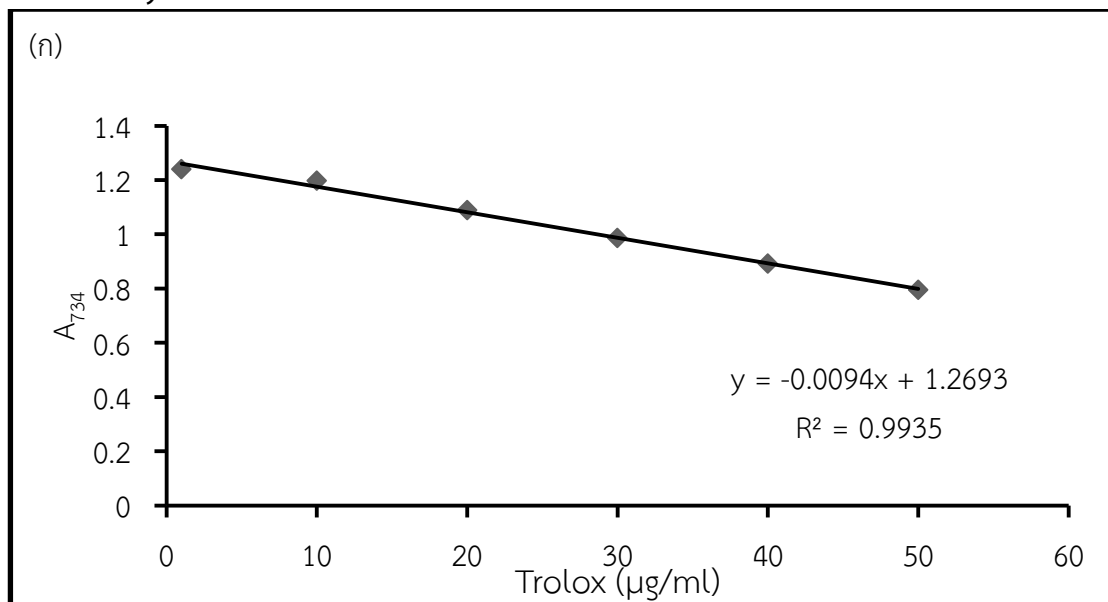
(+)-catechin (µg/ml)	0	31.25	62.5	125
A ₅₁₀	0	0.281	0.546	1.053

DPPH assay

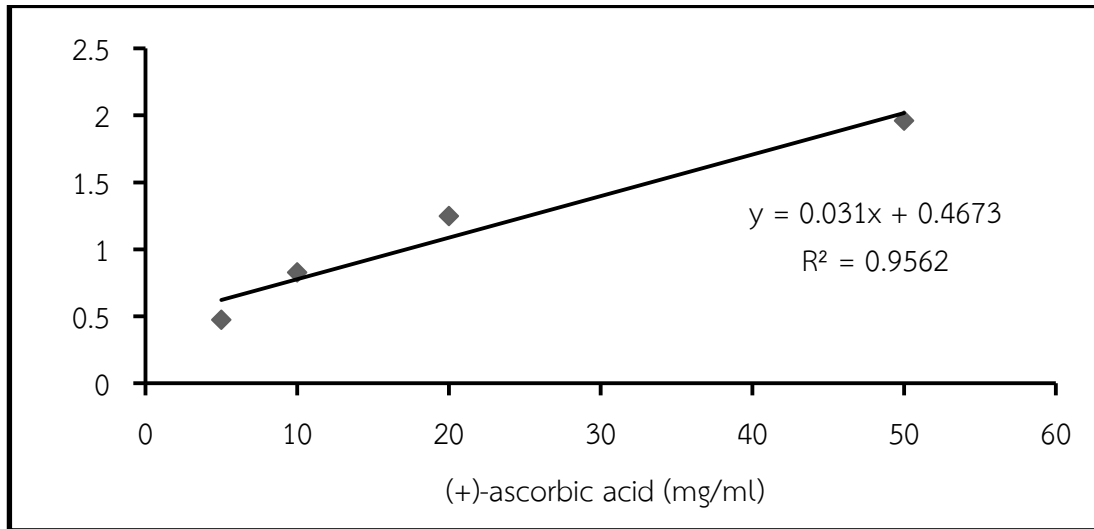


Trolox (µg/ml)	50	100	200	300
A ₅₁₇	0.936	0.885	0.800	0.587

ABTS assay



Trolox (µg/ml)	1	10	20	30	40	50
A ₇₃₄	1.239	1.197	1.088	0.986	0.891	0.795



Ascorbic acid (mg/ml)	0	5	10	20	50
A ₇₃₄	0	0.473	0.825	1.247	1.958

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - ชื่อสกุล	เบญจมาศ นารินทร์
วัน เดือน ปีเกิด	18 พฤศจิกายน 2536
ที่อยู่ปัจจุบัน	120 ม. 3 ต.ป่าปอ อ.บ้านไผ่ จ.ขอนแก่น 40110
เบอร์โทรศัพท์	0800072130
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2549	ระดับประถมศึกษา โรงเรียนบ้านหนองคูดอนเปื่อย
พ.ศ. 2555	ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนบ้านลานวิทยาคม
พ.ศ. 2559	กำลังศึกษาในระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

ชื่อ - ชื่อสกุล	กัญญาณัฐ แสงจาร์
วัน เดือน ปีเกิด	17 มีนาคม 2537
ที่อยู่ปัจจุบัน	127 หมู่ 1 บ้านหนองโพธิ์ ต.หนองโพธิ์ อ.นาเชือก จ.มหาสารคาม 44170
เบอร์โทรศัพท์	0917272116
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2549	ระดับประถมศึกษา โรงเรียนอนุบาลนาเชือกมหามงคล
พ.ศ. 2555	ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนรุ่งอรุณวิทย์
พ.ศ. 2559	กำลังศึกษาในระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม