บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันความสัมพันธ์ระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และการป้องกันโรคได้มีการศึกษาวิจัย โดยมีการรายงานว่า อนุมูลอิสระเป็นตัวที่มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดโรคที่ส่งผลต่อสุขภาพร่างกายของมนุษย์โดยเป็นสาเหตุของโรคที่รุนแรงหลายชนิด เช่น มะเร็ง (Cancer) โรคหลอดเลือดและหัวใจ (Cardiovascular disease) และโรคเบาหวาน (Diabetes) เพราะอนุมูลอิสระจะทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2549) แต่อนุมูลอิสระสามารถเกิดได้จากในระหว่างการทำหน้าที่ของร่างกายปกติและได้รับจากสภาพแวดล้อมภายนอกร่างกาย (Oxygen radical) สัมพันธ์กับการทำงานของเซลล์และความเสียหายจากขบวนการเผาผลาญสารอาหาร ที่มีการศึกษาจริงจังทางระบาทวิทยาและในหลอดทดลอง (in vitro) พบว่าอาหารประกอบไปด้วย สารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีผลในการป้องกันอย่างมีประสิทธิภาพต่อโรคชนิดต่าง ๆ ดังได้กล่าวข้างต้น (Senevirathne, et al.,2006)

อนุมูลอิสระ (Free radical) คืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่หรือไม่มีคู่อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (Unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นได้สูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมของสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมาใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับกับสารโมเลกุลอื่นต่อไป (นฤมล เบญจปัก และคณะ, 2551)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย ในร่างกายมีการป้องกันสภาวะการสะสมของสารอนุมูลอิสระอยู่ 2 ส่วนด้วยกัน คือ ส่วนแรกนั้นเกิดจากการที่ร่างกายมีการสร้างเอนไซม์หรือกลไก เช่น เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant enzymes) ขึ้นมาควบคุมอนุมูลอิสระให้อยู่ในปริมาณที่สมดุล ทั้งนี้ เพราะอนุมูลอิสระเหล่านี้มีหน้าที่ช่วยทำลายสิ่งแปลกปลอม ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อร่างกายเช่นกัน

แต่เมื่อใดที่ร่างกายได้รับสารพิษจากภายนอกมาก เช่น การสูบบุหรี่ สัมผัสกับแสงแดดจ้า หรือเลือกรับประทานอาหารที่มีน้ำมัน อาหารปิ้ง ย่าง เผาไหม้เกรียม ฯลฯ จะส่งผลให้ระบบที่ควบคุมสารพิษในร่างกายทำงานได้น้อยลง สารอนุมูลอิสระจะมีการสะสมตัวมากขึ้นจนกลายเป็นสารพิษที่คอยทำร้ายร่างกายในทันที ดังนั้น กลไกการควบคุมสารต้านอนุมูลอิสระจากร่างกายอย่างเดียวจึงไม่เพียงพอ มีความจำเป็นต้องพึ่งพาในส่วนที่สองนั่น คือ กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้มาจากอาหาร เช่น วิตามินเอ (Vitamin A) วิตามินซี (Vitamin C) วิตามินอี (Vitamin E) บีตา-แคโรทีน ที่มีในอาหาร รวมทั้งกลุ่มพอลิฟีนอล (Polyphenols) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ที่พบมากอยู่ในพืช ผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) ในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น (ศวรรณี เหลืองสุนทรชัย, 2540)

แม้ว่าจะมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับ พฤกษาเคมี หรือสารต้านอนุมูลอิสระจากพืช ผัก สมุนไพร หรือ ผลไม้ มากมายหลายชนิดแล้วก็ตาม (ภูวนาถ นนทรีย์, 2539) แต่การศึกษาหาปริมาณสารต้นอนุมูลอิสระจากมะม่วงป่ายังมีน้อย อีกทั้งมะม่วงป่าก็ยังมีสรรพคุณทางยามากมายทั้ง บำรุงกำลัง เป็นยาระบายอ่อน ๆ ขับปัสสาวะ แก้ท่องร่วง แก้โรคหลอดลม ยางจากผล และต้น ใช้ผสมน้ำส้ม หรือน้ำมันทาแก้คันโรคผิวหนัง (เดชา ศิริภัทร,2535) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากเนื้อมะม่วงป่าสุกด้วย DPPH assay เทียบกับ ABTS assay

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเนื้อผลมะม่วงป่าสุกด้วย DPPH assay เทียบกับ ABTS assay

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 ตัวอย่างมะม่วงป่าสุกได้จากอุทยานสัตว์ป่าอุบลราชธานี (สวนสัตว์) ถูกนำมาขูดเอาส่วนเนื้อของมะม่วง จากนั้นนำตัวอย่างของมะม่วงที่ได้เก็บไว้ในถุงซิบที่อุณหภูมิ - 4°C

1.3.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากเนื้อของผลมะม่วงป่าสุกด้วย DPPH assay เทียบกับ ABTS assay ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นน้ำ 70% เอทานอล และเมทานอล ด้วยวิธี Spectrophometry

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากเนื้อของผลมะม่วงป่าสุกที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายที่เป็นน้ำ 70% เอทานอล และเมทานอล

1.4.2 เป็นการเพิ่มข้อมูลของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดเนื้อของผลมะม่วงป่าสุก

1.4.3 สามารถตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (Unpaired electrons) ในอะตอม หรือโมเลกุลพบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อมในสิ่งมีชีวิต และในเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล กลายเป็นนุมูลอิสระ และ ว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามากและสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ ตลอดเวลา (ดังสมการ 1 และ 2)

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet} \qquad (1)$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet} \qquad (2)$$

อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ ออกซิเจน ไดแก Oxygen radical, อนุพันธ์ของ Oxygen radical เช่น (Superoxide radical และ Hydroxyl radical), Hydrogen peroxide, Transition metals, Carbonate radical ($CO_3^{\bullet-}$), Nitrate radical ($NO_3^{\bullet}$), Methyl radical ($CH_3^{\bullet}$), Superoxide radical ($O_2^{\bullet}$), Peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$), Reactive oxygen species (ROS) เป็นต้น (Halliwell, B., 2542) นอกจากนี้อนุมูลอิสระ สามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภท ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด (Lipid) โปรตีน (Protein) เอนไซม์ (Enzyme) ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) เซลล์เมมเบรน (Cell membrane) คอลลาเจน (Collagen) ไมโตคอนเดรีย (Mitochondria) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissues) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคชรา (Aging) โรคหัวใจขาดเลือด (Coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) โรคข้ออักเสบ (Arthritis) โรคภูมิแพ้ (Allergies) โรคมะเร็ง (Cancer) โรคความดันโลหิต โรคเหงือก โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง และโรคลำไสอักเสบ เป็นต้น (Moon, J. K., & Shibamoto, T. 2552)

อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแลว อนุมูลอิสระสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อโรคไวรัส หรือ เชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (Immune diseases) จากรังสี เช่น รังสีอัลตร้าไวโอเลต รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่น ควันบุหรี่ แก๊สจากท่อไอเสีย ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ ฝุ่นจากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูง ๆ กลับมาใช้อีก การทำให้เกิดอาหารประเภทเกรียมไหม้ หรือเกิดจากการปิ้งย่าง หรือจากยาบางชนิดเช่น โดโซรูบิซิน (Doxorubicin) เพนนิซิลลามิน (penicillamine) พาราเซตามอล (Paracetamol) (ไมตรี สุทธจิตต, 2555)

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระถือว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบ การป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอมไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำ และสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (Singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได (Metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (Synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น ตัวอย่างแสดงการดักจับอนุมูลอิสระดังสมการ 3 และ 4 (เจนจิรา จิรัมย และคณะ, 2554)

$$R^{\bullet} + AH \longrightarrow RH + A^{\bullet} \qquad (3)$$

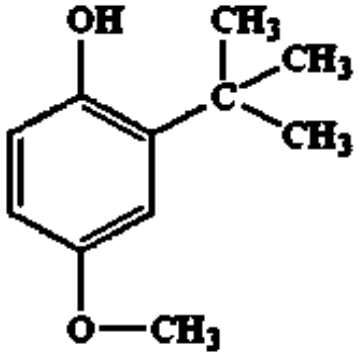
$$RO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROH + A^{\bullet} \qquad (4)$$

โดย $R^{\bullet}$ และ $RO^{\bullet}$ คืออนุมูลอิสระ และ AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง ไดแก สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ Propyl gallate, 2-butylated

hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ Tertiary- butylhydroquinone สารสังเคราะห ดังกล่าวนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป สารสังเคราะหนี้มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภค ขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถพบไดในสิ่งมีชีวิตทั้งพืช และสัตว์ซึ่งเป็นได้ทั้งเอนไซม์ วิตามินและสารอื่น ๆ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น Vitamin C (เป็นสารต้านนุมูลอิสระที่ไซโตพลาซึม) Vitamin E (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เมมเบรน) และ Glutathione (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกัน อันตรายจากอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาซึมและ เมมเบรน) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ Glutathione peroxidase (GPX), Glutathione reductase และ Glutathione transferase ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2 O_2$) เป็น ออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ Superoxid dismutase (SOD) สามารถเปลี่ยน $O_2^{\bullet-}$ เป็น $H_2 O_2$ สารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ได้แก่ Carotenoids และ Ubiquinones เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันอนุมูลอิสระ ออกซิเจนทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ (บุหรัน พันธุสวรรค, และคณะ, 2553) ประโยนช์ของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ชะลอกระบวนการแก่ชรา ช่วยให้ร่างกายขับสารพิษที่ก่อมะเร็ง ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งทุกชนิด ช่วยป้องกันโรคปอดเรื้อรัง หอบหืด หลอดลมอักเสบ ถุงลมโป่งพอง ยับยั้งการเจริญเติบโตจากเนื้องอกต่าง ๆ ในร่างกาย ช่วยลดระดับคลอเลสเตรอลในเลือด ช่วยป้องกันและลดความเสี่ยงของโรคหัวใจ ช่วยบรรเทาอาการของโรคอัลไซเมอร์ได้ ช่วยป้องกันโรคศูนย์กลางจอประสาทตาเสีย และช่วยป้องกันโรคเส้นเลือดโรหิตในสมองตีบ (Dasgupta, N., & De, B. 2550) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆตามแหล่งที่มา ได้แก่ ประเภทแรก คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นเองได้เองโดยร่างกายมนุษย์ซึ่งก็คือเอนไซม์บางชนิด ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase,SOD) คะตาเลส (Catalase) กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase, GPX) นอกจากนี้ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระอีกบางตัวที่พบในร่างกายซึ่งไม่ใช่เอนไซม์ ได้แก่ กลูตาไทโอน (Glutathione) กรดไลโปอิก (Lipoic acid) เป็นต้น แต่ปัญหาคือร่างกายเราได้รับสารพิษมากเกินไป ในปัจจุบันทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายผลิตขึ้นได้เองไม่เพียงพอ ร่างกายจะได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกที่ได้มาจากอาหารโดยเฉพาะอาหารที่ได้จากผัก ผลไม้ ซึ่งผลการศึกษาทางคลินิก และระบาดวิทยาระบุว่า คนที่นิยมบริโภค ผักสด ผลไม้ จะมีความเสี่ยงในการเกิดโรคน้อยกว่าผู้ที่ไม่นิยมบริโภคผักผลไม้ แหล่งอาหารที่

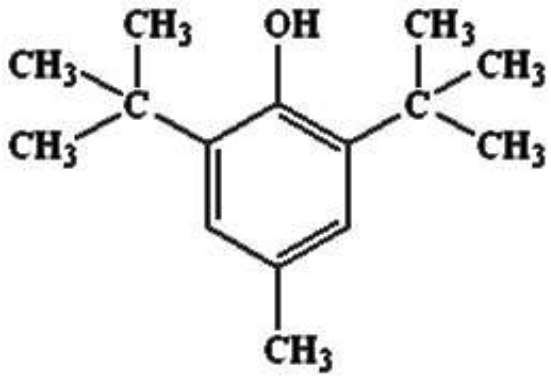
สำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระพบในสารอาหารและแร่ธาตุต่าง ๆ ที่สมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี วิตามินอี วิตามินเอ ซิลิเนียม สังกะสี แคโรทีนอยด์ ที่มีการศึกษาค่อนข้างมากคือ สารพฤกษาเคมี (Phytochemicals) สารเหล่านี้พบได้ทั่วไปในพืช โดยมากพืชสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อจุดประสงค์บางอย่าง เช่น ป้องกันตัวเองจากเชื้อโรคและแมลง ให้สีสันแก่พืช ในการรับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะช่วยให้ระบบแอนติออกซิแดนซ์ของร่างกายทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์, 2548) และ ประเภทที่สองคือ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระที่มีการพัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่แล้วจะถูกออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็ก และใช้โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในธรรมชาติและสมุนไพรมาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมี และมีฤทธิ์ที่ดีขึ้น เช่น

1) บีเอชเอ (Butylated hydroxyl anisole, BHA) มีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2.2 เป็นวัตถุเจือปนอาหาร (Food additive) ที่เป็น Phenolic compound ใช้เป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) ป้องกันการเหม็นหืน (Rancidity) ของไขมัน และน้ำมัน จากปฏิกิริยาการออกซิเดชันของลิพิด (Lipid oxidation)



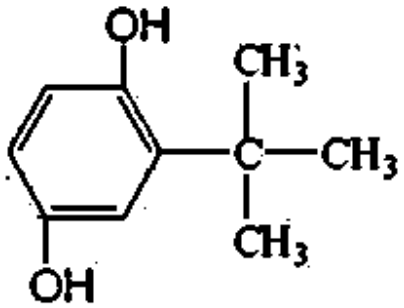
ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของ Butylated Hydroxyl Anisole, BHA
ที่มา http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1577/butylated-hydroxyanisole-bha ค้นเมื่อ 29 กรกฎาคม 2558

2) บีเอชที (Butylated hydroxyl toluene, BHT) มีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2.3 เป็นวัตถุกันหืนชนิดหนึ่งที่นิยมใช้เช่นเดียวกับบีเอชเอแต่มีประสิทธิภาพดีกว่าเล็กน้อย บีเอชทีเป็นสารประกอบที่เป็นผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ไม่ละลายน้ำและ Propane-1, 2-diol แต่ละลายในแอลกอฮอล์ และให้กลิ่นฟีนอล (Phenol) เช่นเดียวกัน มักนิยมใช้ผสมกับวัตถุกันหืนชนิดอื่น เพื่อเสริมให้มีประสิทธิภาพที่ขึ้น นิยมใช้ในอาหารประเภทไขมันสัตว์ น้ำมันพืช ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ผลิตภัณฑ์เนื้อ



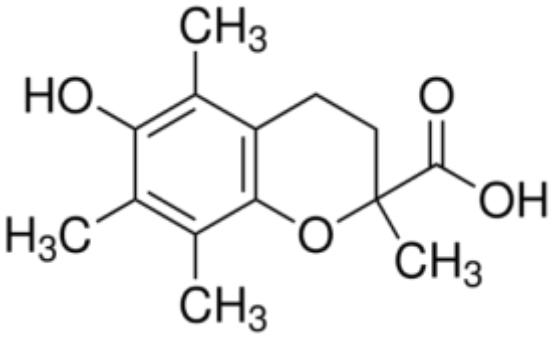
ภาพที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของ Butylated hydroxyltoluene, BHT
ที่มา http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1576/butylated-hydroxytoluene- bht ค้นมื่อวันที่ 29 กรกฎาคม 2558

3) ทีบีเอชคิว (Tert-butyl hydroxyl quinone, TBHQ) มีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2.4 เป็นวัตถุเจือปนอาหาร (Food additive) มี E-number คือ E319 เป็น Phenolic compound ใช้เพื่อเป็นสารกันหืน (Antioxidant) ป้องกันการเหม็นหืน (Rancidity) ที่เกิดจากปฏิกิริยาการออกซิเดชันของลิพิด (Lipid oxidation) ละลายน้ำได้เล็กน้อย ละลายได้ปานกลางในไขมัน ใช้กับอาหารทอด และไขมัน น้ำมันพืชน้ำมันสำหรับทอด (frying) อาหาร



ภาพที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของ tert-butylhydroxyquinone, TBHQ
ที่มา http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2123/tertiary-butyl-hydro-quinone-tbhq ค้นเมื่อ 29 กรกฎาคม 2558

4) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) มีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2.5 เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสารอัลเคนเป็นหมู่คาบอกซิลิก ทำให้สามารถละลายได้ดีในน้ำ และเนื่องจากละลายน้ำได้ดีจึงออกฤทธิ์ได้ดีกว่าวิตามินอี ซึ่งวิตามินอีจะใช้เวลานานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน

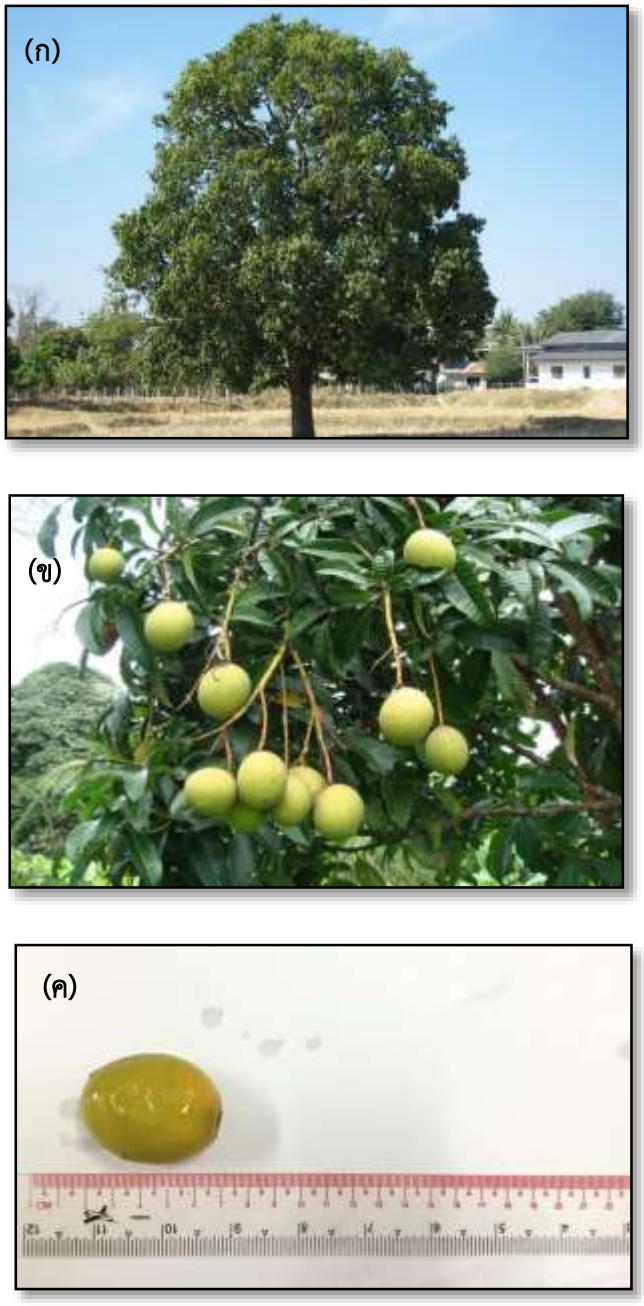


ภาพที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) ที่มา http://en.wikipedia.org/wiki/ Trolox
ค้นเมื่อ 29 กรกฎาคม 2558

2.3 มะม่วงป่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Mangifera pentandra* Kurz. เป็นพืชในสกุลมะม่วง วงศ์ Anacardiaceae ชื่อพื้นเมือง มะม่วงพรวน มะม่วงเทพรส เป็นไม้ยืนต้น ใบเหนียวคล้ายหนัง เห็นเส้นใบชัดเจนทั้งสองด้าน ใบแห้งสีออกแดง ผลสดคล้ายมะม่วงลูกเล็ก สีเขียวอมเหลือง ดอกช่อ ดอกย่อยสีขาวอมเหลืองหรือขาวครีม เนื้อผลนุ่ม ฉ่ำน้ำ สีส้ม รสหวานพบการแพร่กระจายในมาเลเซีย สิงคโปร์ และภาคใต้ของไทย เมื่อสุกเนื้อเหลวเป็นน้ำ รับประทานโดยการเจาะผลดูด ผลดิบกินกับน้ำปลาหวาน ชื่อพื้นเมือง มะม่วงป่า มะม่วงพรวน มะม่วงเทพรส ลำต้นตั้งตรง สูงตั้งแต่ 5–24 เมตร พุ่มกว้าง 5–35 เมตร สีของลำต้นเมื่ออ่อนจะมีสีน้ำตาลปนเขียว เมื่อแก่จะเป็นสีเทา แตกเป็นสะเก็ด ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ใบอ่อนสีน้ำตาลปนแดงเขียว ใบแก่เขียวแก่ กว้าง 3.5–9 เซนติเมตร ยาว 12–38 เซนติเมตรการเรียงตัวเรียงสลับ ดอกสีขาว หรือ เหลืองอ่อน กลีบเลี้ยงแยก 4-5 กลีบ มีกลิ่นหอม ผลมีเนื้อเมื่อดิบจะมีสีเขียวผลแก่จะมีสีเหลือง รสชาติแต่ละพันธุ์จะแตกต่าง เปรี้ยว หวานมัน กรอบ เมล็ด มีลักษณะแบน สีขาวหรือเหลือง การกระจายพันธุ์ พบทั่วทุกภาคการขยายพันธุ์ ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดทาบกิ่ง การติดต่อ ต่อกิ่ง หรือ การเปลี่ยนยอด (กนก ชวนานนท์, [ม.ป.ป.].)

ผลมะม่วงแก่ดิบจะให้พลังงานต่อร่างกาย ซึ่งประกอบด้วย เส้นใย แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก เบต้า – แคโรทีน วิตามินบีหนึ่ง วิตามินบีสอง ไนอาซิน วิตามินซี เป็นต้น ผลดิบและผลสุกสามารถแปรรูปเป็น มะม่วงกวน มะม่วงดอง มะม่วงแช่อิ่ม มะม่วงเค็ม น้ำมะม่วง แยม ฯลฯ และผลดิบสามารถนำมาใช้ปรุงอาหารได้ เช่น แกงส้ม (คนปักษ์ใต้นิยมแกงกัน) น้ำพริก (น้ำพริกมะม่วง) ใช้รับประทานคู่กับผักเหนาะ เช่น แตงกวา ผักกูดลวก สะตอ อื่นๆ อีกมากมาย ความเชื่อ มะม่วงเป็นต้นไม้มงคลชนิดหนึ่งที่มีมาแต่ครั้งพุทธกาล คนโบราณเชื่อว่าหากนำมาปลูกไว้ในบริเวณบ้านทางทิศใต้ (ทักษิณ) จะทำให้เจ้าของบ้านและผู้อยู่อาศัยมีความร่ำรวยยิ่งขึ้น (วีณา เชิดบุญชาติ, 2545) สำหรับการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากเนื้อผลมะม่วงป่าสุก ยังไม่มีรายงานไว้ว่ามีการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระจากเนื้อผลสุกของมะม่วงป่า

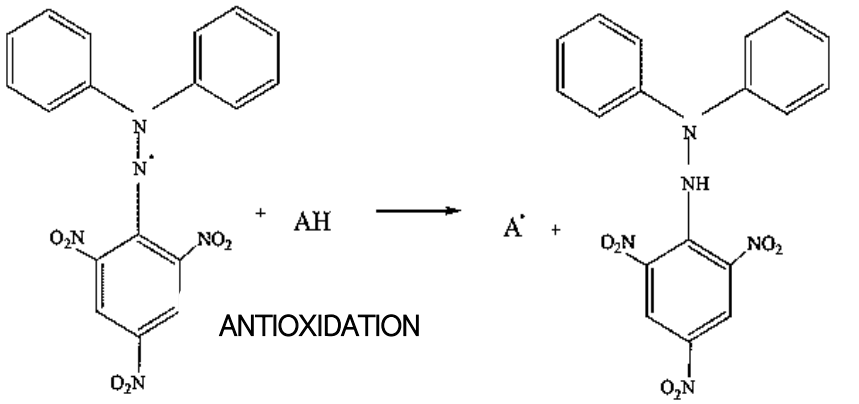


ภาพที่ 2.5 ลักษณะทางกายภาพของมะม่วงป่า (ก) ต้นมะม่วงป่า (ข) ผลมะม่วงป่าดิบ (ค) ผลมะม่วงป่าสุก ที่มา:http://www.baanmaha.com/community/threads/47162 ค้นเมื่อวันที่ 29 กรกฎาคม 2558

2.4 ปฏิกิริยาที่ใช้ในการศึกษาหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

2.4.1) DPPH assay

DPPH radical มีสีม่วง เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปทำให้สีม่วงนั้นจางลง เนื่องมาจากสารต้านอนุมูลอิสระไปให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล DPPH ซึ่งจะติดตามการเกิดปฏิกิริยาที่ค่าความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

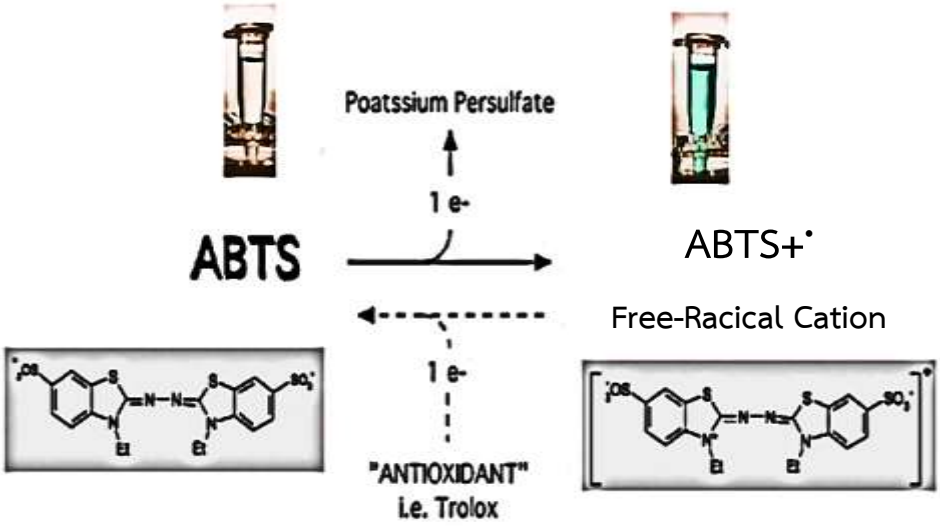


ภาพที่ 2.6 การเกิดปฏิกิริยาของ DPPH assay

ที่มา https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3730368_BMRI2013-251754.sch.001&req=4 ค้นเมื่อ 2 สิงหาคม 2558

2.4.2) ABTS assay

ABTS radical มีสีเขียว เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปทำให้สีเขียวนั้นจางลง เนื่องมาจากสารต้านอนุมูลอิสระไปให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล ABTS ซึ่งจะติดตามการเกิดปฏิกิริยาที่ค่าความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร



ภาพที่ 2.7 การเกิดปฏิกิริยา ABTS assay

ที่มา http://www.omicsonline.org/open-access/technical-evaluation-of-antioxidant-activity-2161-0444.1000517.php?aid=28118 ค้นเมื่อ 2 สิงหาคม 2558

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลอง พบงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้ (ดวงพร ภู่ผะกา 2558) ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการประเมินปริมาณสารพฤกษเคมีบางประการ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกของมะม่วงพื้นเมืองจังหวัดฉะเชิงเทรา จากการทดลองพบว่า มะม่วงจัดเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณทางยานิยมใช้ในการแพทย์ทางเลือกกันอย่างแพร่หลาย ดังนั้นงานวิจัยนี้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณเบต้าแคโรทีนและไลโคปีน รวมทั้งปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิก ในมะม่วงดิบและสุก จะทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ FRAP จากผลการทดลอง พบว่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของมะม่วง 3 สายพันธุ์มีค่าระหว่าง 2.78-4.12 mg gallic acid/100 g FW และมีค่าแตกต่าง

เพียงเล็กน้อยระหว่างสายพันธุ์โดยพบว่ามะม่วงน้ำดอกไม้มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด แต่พบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ FRAP มากเป็นอันดับ 2 รองจากมะม่วงพันธุ์มหาชนก ขณะเดียวกัน ปานทิพย์ บุญส่ง และวัลภา เนตรดวงตา ได้ศึกษาองค์ประกอบสารพฤกษเคมีและความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH จากใบมะม่วง ใบฝรั่ง และใบสับปะรด ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เอทานอล อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์พบว่า ใบสับปะรดที่สกัดด้วยเอทานอล และอะซิโตนให้จำนวนสารพฤกษเคมีได้มากที่สุด ส่วนสารสกัดจากใบฝรั่งและสารสกัดจากใบมะม่วงให้จำนวนสารพฤกษเคมีที่น้อยรองลงมาตามลำดับ ส่วนความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสับปะรดที่สกัด ด้วยเอทานอลให้ปริมาณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 75.25 แต่สารสกัดจากใบมะม่วงที่สกัดด้วย อะซิโตนให้ปริมาณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระน้อยที่สุดเท่ากับ 21.78 ในปี พ.ศ. 2554 ปฏิวิทย์ ลอยพิมาย และคณะ ได้ศึกษาเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของเปลือกผลไม้เหลือทิ้ง 10 ชนิด ผลทดลองพบว่าสารประกอบฟีนอลิกรวม พบว่าเปลือกมะม่วงดิบและมะม่วงสุก มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (IC_{50} เท่ากับ 2.32 และ 2.31 g/ ml ตามลำดับ) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระรวม (เทียบกับกรดแอสคอบิก และแกลลิก) สูงสุดในทำนองเดียวกัน เมื่อทำการศึกษาสารประกอบฟีนอลิกรวม พบว่าเปลือกมะม่วงดิบมีสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ 72.8 mg GAE/ กรัมน้ำหนักแห้ง ดังนั้นเปลือกมะม่วงดิบจึงเป็นแหล่งที่ดีของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิก และในปี พ.ศ.2553 ศิริธร ศิริอมรพรรณ และคณะได้ทำการศึกษามะม่วง 3 สายพันธุ์ พบว่าจากการทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีความสามารถใกล้เคียงกัน คือมีค่า FRAP มีค่าอยู่ในช่วง 0.65-0.86 mg(g/eq) ของ $FeSO_4$ /g น้ำหนักแห้ง DPPH มีค่าอยู่ในช่วง 82% ในมะม่วงน้ำดอกไม้ ถึง 89% ในมะม่วงเขียวเสวย และมะม่วงแก้วมีค่า IC_{50} (1.29 mg/g) น้อยที่สุด

โดยสรุปการวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ว่าผลไม้ไทย เป็นผลไม้ที่ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญต่อร่างกาย และมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเป็นอย่างดี

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี (Instruments and Chemical)

อุปกรณ์ (Instruments)

1) กระดาษฟอยล์ (Aluminium foild)

2) กระบอกตวง (Cylinder)

3) โกร่งบดสาร (Mortar)

4) กรวยกรอง (Filtering funnel)

5) กรวยแยกขนาด (Separating funnel)

6) ขวดน้ำกลั่น (Plastic wash bottle)

7) ขวดสีชา (Amber glass)

8) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

9) ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)

10) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital scale)

11) เครื่อง centrifuge

12) เครื่อง Rotary evaporator (รุ่น RVCHT)

13) เครื่อง Spectrophotometer

14) ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack)

15) แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

16) บีกเกอร์ (Beaker)

17) บิวเรต (Burette)

18) ปิเปต (Pipette)

19) มีด (Knife)

20) ลูกยางสำหรับดูดสารเคมี (Pipettes bulb)

สารเคมี (Chemicals)

1) 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-suphonic acid) (ABTS)

2) Butylated hydroxytoluene (BHT)

3) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

4) Double Distilled water (DDW)

5) Ethanol (CH_3CH_2OH)

6) Methanol (CH_3OH)

7) Potassium sulfate (K_2SO_4)

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างมะม่วงป่า

3.2.1.1) เก็บตัวอย่างผลมะม่วงป่าสุกจากอุทยานสัตว์ป่าอุบลราชธานี (สวนสัตว์) จังหวัดอุบลราชธานี ใส่ถุงซิบ ปิดปากถุงให้สนิทจากนั้นนำมาเก็บไว้ในตู้แช่แข็งเพื่อวิเคราะห์ต่อไป

3.2.1.2) นำผลมะม่วงป่าสุกมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.2.1.3) นำมาขูดเอาส่วนเนื้อของผลมะม่วงป่า และเก็บใส่ถุงปิดปากให้สนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4°C

3.2.2 การเตรียมสารสกัดจากเนื้อผลมะม่วงป่าสุก

3.2.2.1 ตัวอย่างเนื้อผลมะม่วงป่าสุกที่ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4°C นำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วแบ่งชั่งมา 5.0 g จากนั้นบดให้ละเอียดในโกร่งบดสาร แล้วนำสารลงไปใน Centrifuge tube ขนาด 50 ml

3.2.2.2 เติมน้ำ 10 ml จากนั้นเขย่าประมาณ 1 นาที และทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 30 นาที

3.2.2.3 นำไปเขย่าอีกประมาณ 5 นาที เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด

3.2.2.4 นำส่วนผสมนี้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 2,500 rpm นาน 20 นาที กรองเอาเฉพาะตัวอย่างส่วนใสโดยใช้กรวย จะได้สารสกัดน้ำ

3.2.2.5 จากนั้นนำสารสกัดน้ำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 °C จนสารสกัดในขวดก้นกลมเหลือน้อยประมาณ 2 ml

3.2.2.6 กลั้วสารสกัดจากขวดก้นกลมด้วยน้ำ และดูดออกมาใส่ ขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 ml ปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วยน้ำ และเก็บในขวดสีชาปิดสนิทที่ อุณหภูมิ - 20°C เพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป

3.2.2.7 ทำการสกัดตามข้อ 3.2.2.1 ถึง 3.2.2.6 โดยเปลี่ยนตัวทำละลายเป็น 70% เอทานอล และ เมทานอล แทนตัวทำละลายจากน้ำ ตามลำดับ

3.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากผลเนื้อมะม่วงป่าสุก

3.2.3.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของ Trolox เพื่อเทียบกับ DPPH assay

1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox (Stock solution) ความเข้มข้น 1,000 µg/ml โดยชั่ง Trolox 0.01 g แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วยเมทานอล ในขวดวัดปริมาตร

2) ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Trolox (Stock solution) มา 0.25 0.5 1.0 และ 1.5 ml และปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วยเมทานอล ซึ่งจะได้ความเข้มข้นเป็น 50 100 200 และ 300 µg/ml ตามลำดับ

3) ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Trolox แต่ละความเข้มข้นจำนวน 0.2 ml แล้วเติมสารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 0.0001 mM เตรียมในเมทานอล ปริมาตร 3 ml เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที

4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยเครื่อง Spectrophotometer

5) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Trolox กับค่าการดูดกลืนแสง โดยให้แกน x เป็นค่าความเข้มข้นของ Trolox และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสง นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งค่าที่ได้แสดงเป็น µg Trolox quivalent (TE)/g fresh sample

3.2.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากผลเนื้อมะม่วงป่าสุกด้วย DPPH assay

ทดสอบด้วยสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) นำไปทดสอบหาค่าการดูดกลืนแสงและรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) ปิเปตสารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 0.0001 mM (เตรียมในเมทานอล)

ปริมาตร 3 ml กับสารสกัดตัวอย่างด้วยน้ำปริมาตร 0.2 ml เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที

2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยเครื่อง Sperctrophotometer

3) ทำการทดลองซ้ำจากข้อ 1 ถึง 2 แต่เปลี่ยนสารสกัดตัวอย่างด้วยน้ำ เป็น 70% เอทานอล และเมทานอล ตามลำดับ

3.2.3.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของ Trolox เพื่อเทียบกับ ABTS assay

1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 1,000 µg/ml โดยชั่ง Trolox 0.01 g แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วยเมทานอล ในขวดวัดปริมาตรเก็บไว้เป็น Stock solution

2) ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Trolox จาก1,000 µg/ml (Stock solution) มา 0.05 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 ml และปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วยเมทานอล ซึ่งจะได้ความเข้มข้นเป็น 1 10 20 30 40 และ 50 µg/ml ตามลำดับ จะได้สารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

3) ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Trolox แต่ละความเข้มข้นจำนวน 0.1 ml แล้วเติมสารละลาย ABTS ที่มีความเข้มข้น 0.0001 mM ในเมทานอล ปริมาตร 0.1 ml เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที

4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 743 nm โดยเครื่อง Sperctrophotometer

5) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Trolox กับค่าการดูดกลืนแสง โดยให้แกน x เป็นค่าความเข้มข้นของ Trolox และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสง นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งค่าที่ได้แสดงเป็น µg Trolox quivalent (TE)/g fresh sample

3.2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากผลเนื้อมะม่วงป่าสุกด้วย ABTS assay

การเกิดปฏิกิริยาจากการลดลงของสีของ ABTS radical ซึ่งมีสีเขียว หลังเติมสารสกัดตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 734 nm โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) ผสมสารละลาย 7 mM ABTS กับ 2.45 mM KSO_4

แล้วทิ้งไว้ในที่มืดนาน 12-16 ชั่งโมง จะได้ Stock solution

2) ปิเปต Stock solution มาเจือจางด้วย เมทานอล จนได้ค่า A_{734} ประมาณ 0.70±0.05

3) ผสมสารสกัดตัวอย่างจากน้ำ 0.1 ml กับสารละลาย ABTS radical ที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 ml เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที

4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm โดยเครื่อง Sperctrophotometer

5) ทำการทดลองซ้ำจากข้อ 1 ถึง 4 แต่เปลี่ยนสารสกัดตัวอย่างด้วยน้ำ เป็น 70% เอทานอล และเมทานอล ตามลำดับ

3.2.3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

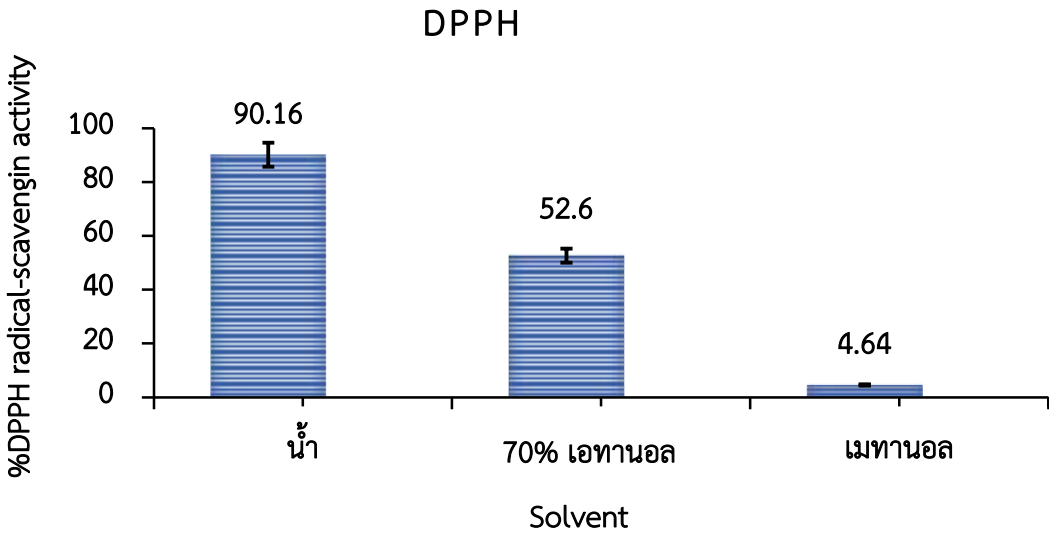
ในการทดสอบจะทำกับการสกัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ การวิเคราะห์หาค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay และ ABTS assay วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ช่วยในการคำนวณค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ และค่าความคลาดเคลื่อน

บทที่4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay (radical-scavenging activity)

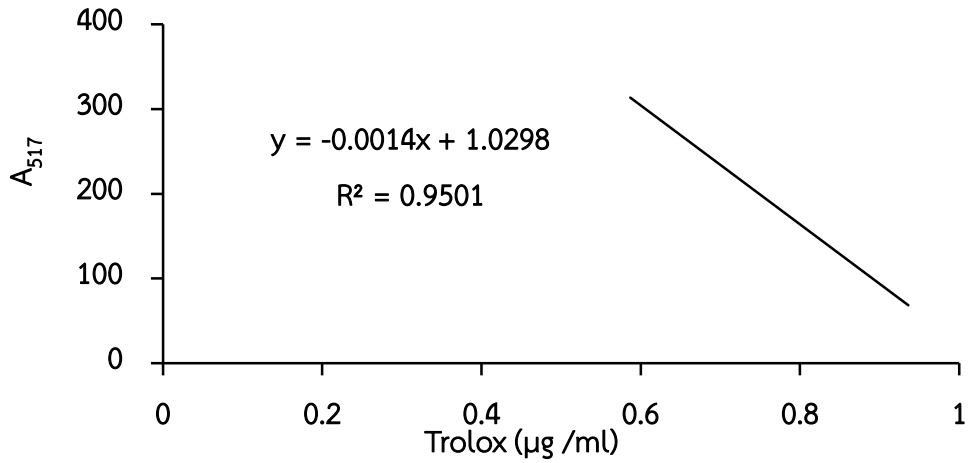
DPPH assay เป็นวิธีที่นิยมกันอย่างมากในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย และมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาสูง ในการวิเคราะห์จะวิเคราะห์จากสีของสารละลาย DPPH radical ที่จางลงเนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระในการสกัดมะม่วงป่าสุกได้ให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล DPPH ทำให้อนุมูลลดลง ซึ่งจะวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีม่วงที่ความยาวคลื่น 517 nm ซึ่งได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.1 ดังนี้



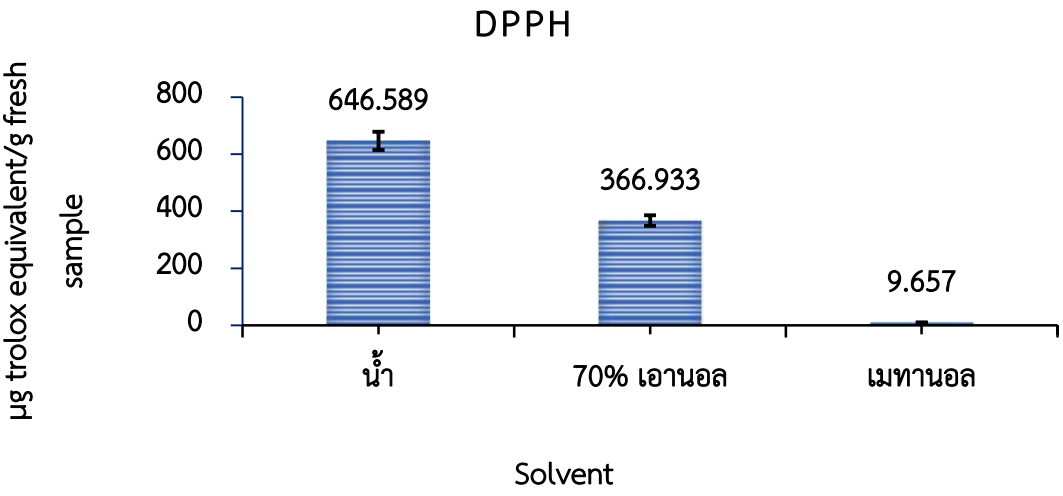
ภาพที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ของสารสกัดมะม่วงป่าสุกที่สกัดด้วยน้ำ 70% เอทานอล และเมทานอล

%Radical-scavenging activity ของมะม่วงป่าสุก จะคำนวณตาม Braca และคณะ จากภาพที่ 4.1 สารสกัดจากเนื้อผลมะม่วงป่าสุกที่มีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH เรียงลำดับจากสูงที่สุดไปหาน้อยที่สุด คือ น้ำ 70% เอทานอล และเมทานอล ตามลำดับ

(ก)



(ข)



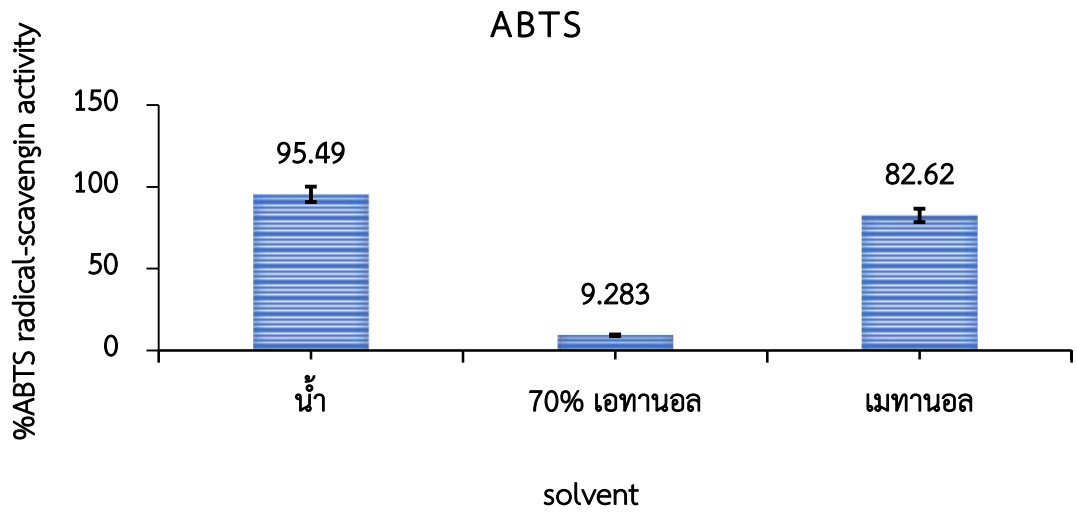
ภาพที่ 4.2 ความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ของมะม่วงป่าสุก (ก) กราฟมาตรฐาน Trolox (ข) ความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ของมะม่วงป่าสุกเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่สกัดด้วยน้ำ 70% เอทานอล และเมทานอล

ความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH ของสารสกัดมะม่วงป่าสุกเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox จากภาพที่ 4.2 (ก) (y= -0.004x + 1.0298 R^2= 0.9501) โดยมะม่วงป่าสุกที่มี Trolox equivalent (TE) สูงสุดคือ ตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำ (646.589 µg TE/g fresh sample) รองลงมาคือตัวอย่างที่สกัดด้วย 70% เอทานอล ส่วนมะม่วงป่าสุกที่มี TE ต่ำสุดคือตัวอย่างที่สกัดด้วยเมทานอล (9.657 µg TE/g fresh sample) จากภาพที่ 4.2 (ค)

4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay (Radical-scavenging activity)

ABTS radical เป็นอนุมูลอิสระที่มีสีเขียว ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดที่มีวิธีการในการทดสอบที่ง่ายอีกวิธีหนึ่ง

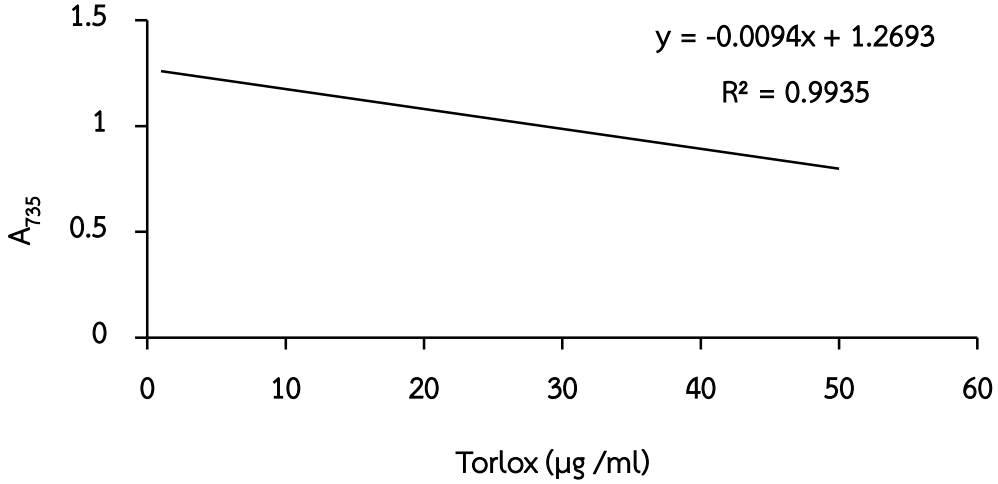
ค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS ที่ใกล้เคียงกันมากนี้อาจจะเกิดเนื่องมาจาก อนุมูล ABTS มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก หรืออาจเกิดจากวิธีในการทดสอบที่ต้องเจือจางสารละลายของ อนุมูล ABTS ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm มีค่าประมาณ 0.7 ก่อนจึงนำมาทดสอบ จึงทำให้ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.3 ดังนี้



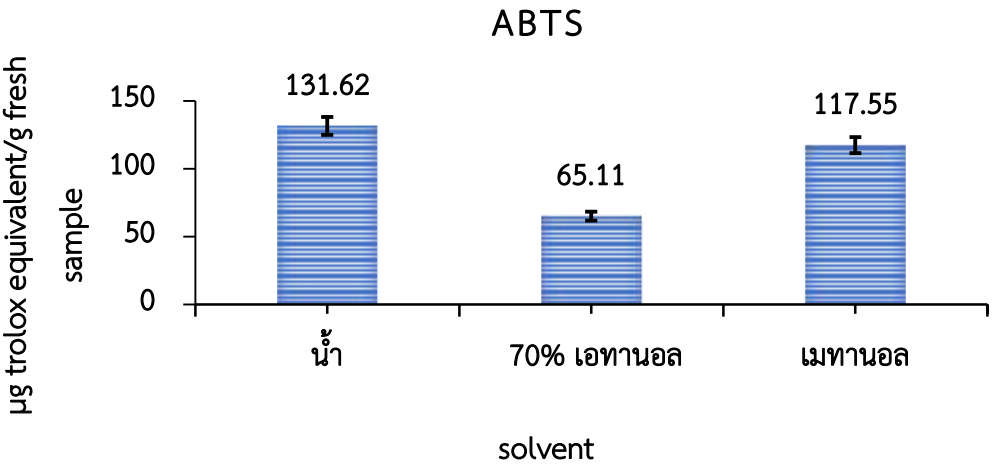
ภาพที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS ของสารสกัดมะม่วงป่าสุกที่สกัดด้วยน้ำ 70% เอทานอล และเมทานอล

จากภาพที่ 4.3 สารสกัดจากมะม่วงป่าสุกที่ใช้ solvent แต่ละชนิดที่นำมาวิจัย มีความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS แตกต่างกันคือ มะม่วงป่าสุกที่มี %Radical-scavenging สูงที่สุดคือ มะม่วงป่าสุกที่สกัดด้วยน้ำ รองลงมาคือ เมทานอล และ 70% เอทานอล ตามลำดับ

(ก)



(ข)



ภาพที่ 4.4 ความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS ของมะม่วงป่าสุก (ก) กราฟมาตรฐาน Trolox (ข) ความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS ของมะม่วงป่าสุกเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่สกัดด้วยน้ำ 70% เอทานอล และเมทานอล

ความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS ของสารสกัดเนื้อผลมะม่วงป่าสุกเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ภาพที่ 4.4 (ก) ($y= -0.0094x + 1.2693$ $R^2=0.9935$) โดยมะม่วงป่าสุกที่มี Trolox equivalent (TE) สูงสุดคือ ตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำ (131.62 µg TE/g fresh sample) รองลงมาคือตัวอย่างสกัดด้วยเมทานอล ส่วนมะม่วงป่าที่มี TE ต่ำสุดคือตัวอย่างที่สกัดด้วย 70% เอทานอล (65.11 µg TE/g fresh sample) ภาพที่ 4.6 (ค)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

เนื้อของผลมะม่วงป่าสุกถูกขูดออกมาเพื่อศึกษาหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยเปรียบเทียบจากการใช้ตัวทำละลายในการสกัด 3 ชนิดคือ น้ำ 70% เอทานอล และเมทานอล โดยวิเคราะห์ด้วย DPPH assay และ ABTS assay จากผลการศึกษาพบว่า ตัวทำละลายที่เป็นน้ำ มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดคือ 90.16% รองลงมาคือตัวทำละลายที่เป็น 70% เอทานอล มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 52.60% และตัวทำละลายที่เป็นเมทานอลมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด เท่ากับ 4.64 % ตามลำดับ เมื่อศึกษาด้วย DPPH assay นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ด้วย ABTS assay นั้นสารสกัดตัวอย่างที่ได้จากตัวทำละลายที่เป็นน้ำจะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดคือ 95.49% รองลงมาคือทำละลายที่เป็นเมทานอลมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 82.62% และตัวทำละลายที่เป็น 70% เอทานอล มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด เท่ากับ 9.28% ตามลำดับ