



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์ชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระในดอกดาหลา

Analysis antioxidants of *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith

โดย

ปิยศิริ

สุนทรนนท์

อุบล

ตันสม

สมภาพ

เกาทอง

ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณบำรุงการศึกษาประจำปี 2554

สถาบันพัฒนาและวิจัยชายแดนภาคใต้

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

ชื่องานวิจัย	การวิเคราะห์หาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในดอกดาหลา
ผู้วิจัย	ปิยศิริ สุนทรนนท์ อุบล ต้นสม และ สมภาพ เกาทอง
สาขาวิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2554

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน สารต้านอนุมูลอิสระที่พบโดยทั่วไปจะพบในผัก ผลไม้ เช่น วิตามินซี วิตามินอี สารกลุ่มคาร์โรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และ กลุ่มไทออล (-SH) ในการวิจัยครั้งนี้ใช้พืชพื้นบ้านในภาคใต้ คือ ดอกดาหลา (*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith) โดยทำการศึกษาศารต้านอนุมูลอิสระ 4 ชนิด คือ สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) วิตามินอี (α -Tocopherol) และ วิตามินซี (Ascorbic acid) จากผลการทดลองหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ในดอกดาหลา พบว่าสารสกัดจากดอกดาหลามีสารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวในปริมาณที่สามารถวิเคราะห์ได้

การหาค่าความสามารถในการดักจับสารอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ด้วยสารสกัดจากดอกดาหลาดัวอย่าง นำสารสกัดจากกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกมารายงานเท่านั้น เนื่องจากดอกดาหลาให้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด โดยรายงานในรูปของค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่สามารถลดค่าการดูดกลืนแสงของ $DPPH^{\bullet}$ ได้ 50%) พบว่า สารสกัดจากดอกดาหลาจะให้ค่า IC_{50} ที่ดีที่สุดที่เวลา 30 นาที เท่ากับ 3.02 ($\mu\text{g/ml}$ GAE) คือ เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาทีมีค่า 3.02 ($\mu\text{g/ml}$ GAE) อย่างไรก็ดีในการศึกษาหาชนิดและโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกดังกล่าวในดอกดาหลานั้น ต้องมีการศึกษาเชิงลึกต่อไป

Title	Analysis antioxidants Of <i>Etlingera elatior</i> (Jack) R. M. Smith.
Researchers	Piyasiri Soontornnon Ubol Tansom and Sompop Paothong
Major Program	Chemistry
Academic Year	2011

Abstract

Nowadays, the study of antioxidative and free radical scavenging activities in food became increasingly prominent. Antioxidants such as Ascorbic acid, α -tocopherol, carotenoids, flavonoids and thiol group (-SH) are found mostly in vegetables and fruits. Thus, in this study we determined 4 antioxidants (phenolic compounds, β -carotene, α -tocopherol and ascorbic acid) from Thai vegetables; *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith

The result shows that vegetables had detectable quantities of α -tocopherol and phenolic compound, β -carotene and ascorbic acid. The plant extracts were assayed for their free radical scavenging activities using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (*DPPH*[•]). The Torch ginger (*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith) extract exhibited the strong scavenging activity (*IC*₅₀ 3.02 $\mu\text{g/ml}$ at 30 minute). However further study need to be performed in order to see their exact structure.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความเสียสละเวลากรุณาให้คำแนะนำแนวทางแก้ปัญหา การถ่ายทอดความรู้และการติดตามช่วยเหลือในการศึกษาค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการเขียนและแก้ไขรายงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมภพ เกาทอง และอาจารย์อุบล ตันสม ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาชายแดนภาคใต้ มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือวิจัย และสนับสนุนทุนวิจัย จากโครงการวิจัยวิจัยจากเงินนอกงบประมาณบำรุงการศึกษา ประเภทอาจารย์ ประจำปีงบประมาณ 2554

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่สาขาวิชาเคมีทุกท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ฉวีวรรณ ธัญญะศิริกุล ที่เอื้อเฟื้อพืชตัวอย่างคือ ดอกดาหลาสีแดง ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่อบรมสั่งสอน และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ผลสำเร็จและสิ่งที่เป็นประโยชน์ของงานวิจัยนี้ ขออุทิศแด่ผู้มีพระคุณที่กล่าวมาทุกท่าน

ปิยศิริ สุนทรนนท์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	ณ
1. บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	2
ขอบเขตการศึกษา	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	
อนุมูลอิสระ	3
สารต้านอนุมูลอิสระ	6
กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ	7
สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ	9
ชีววิทยาของพืชที่นำมาศึกษา	11
3. วิธีดำเนินการวิจัย	
เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	
พืชตัวอย่าง	14
สารเคมีที่ใช้	14
อุปกรณ์	15
การดำเนินการวิจัย	
การเตรียมสารสกัดดอกดาหลาเพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก	16
การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด	16
การเตรียมสารสกัดดอกดาหลาเพื่อหาปริมาณเบต้าแคโรทีน และวิตามินอี	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3. วิธีดำเนินการวิจัย (ต่อ)	
การเตรียมสารสกัดดอกดาหลาและการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี	17
วิธีการทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ <i>DPPH</i> [•]	17
การคำนวณค่า IC_{50} และ % การยับยั้ง	17
การทำบริสุทธิ์สารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี TLC	18
แมสสเปกโตรสโกปี	20
การวิเคราะห์ข้อมูล	21
4. ผลและอภิปรายผลการวิจัย	23
5. สรุป	42
บรรณานุกรม	44
ภาคผนวก	48
หน้าประวัติย่อผู้วิจัย	51

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ตัวอย่างอนุมูลอิสระ	4
2.2	อนุกรมวิธานของดาหลา	11
3.1	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	14
3.2	อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	15
3.3	เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC	20
4.1	ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Gallic acid	23
4.2	ค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานเบต้า-แคโรทีน	25
4.3	ค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานวิตามินอี	28
4.4	ค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานวิตามินซี	30
4.5	สรุปปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ในสารสกัดดอกดาหลา	32
4.6	ค่าการดูดกลืนแสงและ % Inhibition ของสารสกัดดอกดาหลาที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ	33
4.7	ค่า IC_{50} ของสารสกัดจากดอกดาหลา	33
4.8	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากตัวทำละลาย Dichloromethane และ Ethyl Acetate	34
4.9	ค่า IC_{50} ของสารประกอบฟีนอลิกในตัวทำละลาย Dichloromethane และ Ethyl Acetate	35
4.10	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในแถบต่าง ๆ บนแผ่น TLC	37
4.11	การศึกษาสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Mass Spectrometer	40

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation
2.2	สูตรโครงสร้างของ DPPH
2.3	กลไกการจับโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์
2.4	การทำงานของวิตามินอี ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน
2.5	การเปลี่ยนรูปของวิตามินอีและวิตามินซีในร่างกาย
2.6	โครงสร้าง A, B และ C-ring ใน Flavonoids compounds
2.7	ดอกดาหลา
3.1	ตัวอย่างการแยกของผสมของสารบนแผ่น TLC
3.2	ลำดับสภาพขั้วของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ
3.3	ลักษณะของแมสสเปกตรัมของสารตัวอย่างจากแหล่งกำเนิดไอออน
4.1	กราฟมาตรฐานที่ใช้หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด
4.2	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเบต้า-แคโรทีน
4.3	กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเบต้า-แคโรทีน
4.4	พื้นที่ใต้พีคใช้หาปริมาณเบต้า-แคโรทีนในสารสกัด
4.5	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานวิตามินอี
4.6	กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นสารละลายวิตามินอีและพื้นที่ใต้พีคหาปริมาณวิตามินอี
4.7	โครมาโทแกรมวิตามินอีของสารสกัดดอกดาหลา
4.8	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานวิตามินซี
4.9	กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายวิตามินซีและพื้นที่ใต้พีคใช้หาปริมาณวิตามินซี
4.10	โครมาโทแกรมวิตามินซีของสารสกัดจากดอกดาหลา
4.11	กราฟแสดง % การยับยั้งของสารสกัดจากดอกดาหลา ณ ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ
4.12	Activity ของสารสกัดจากดอกดาหลาใน Dichloromethane
4.13	Activity ของสารสกัดจากดอกดาหลาใน Ethyl Acetate
4.14	แถบสารสกัดดอกดาหลาในตัวทำละลาย Ethyl Acetate
4.15	การทดสอบความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยสารที่ได้บน TLC

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.16	โครมาโทแกรมของสารสกัดจากดอกดาหลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Liquid Chromatography ก่อนเข้าสู่เครื่อง Mass Spectrometer	39

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

°ซ	ย่อมาจาก	องศาเซลเซียส
Abs.	ย่อมาจาก	Absorbance
BHT	ย่อมาจาก	Butyl Hydroxyl Toluene
DPPH	ย่อมาจาก	1, 1 – Diphenyl – 2 – picrahydrazyl
DTT	ย่อมาจาก	Dithiothreitol
GAE	ย่อมาจาก	Gallic Acid Equivalent
HPLC	ย่อมาจาก	High Performance Liquid Chromatography
KOH	ย่อมาจาก	Potassium Hydroxide
mg	ย่อมาจาก	milligram
min	ย่อมาจาก	minute
ml	ย่อมาจาก	milliliter
mM	ย่อมาจาก	millimolar
pH	ย่อมาจาก	-log hydrogen ion concentration
ROS	ย่อมาจาก	Reactive Oxygen Species
α	ย่อมาจาก	Alpha
β	ย่อมาจาก	Beta
μg	ย่อมาจาก	microgram
% IHB	ย่อมาจาก	Percent Inhibition
[]	ย่อมาจาก	ความเข้มข้น

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Statement and significance of the Problem)

สุขภาพร่างกายที่แข็งแรงสมบูรณ์เป็นสิ่งที่คนเราต้องการให้เกิดขึ้นในชีวิตแต่ไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัดว่าปัจจัยในการดำรงชีวิตใดบ้างที่มีส่วนเกี่ยวข้อง อย่างไรก็ตามมีปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญและน่าสนใจคือ “สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)” ซึ่งจะมีในพืชผักและผลไม้ให้คุณประโยชน์ที่ดีแก่ร่างกาย และมีคุณประโยชน์อย่างมากต่อระบบที่สำคัญต่าง ๆ ในร่างกาย ได้แก่ ระบบหลอดเลือดและหัวใจ (Akyon, 2002) ระบบภูมิคุ้มกัน กลุ่มเซลล์ประสาทที่ทำงานเฉพาะในสมอง การต่อต้านการเกิดโรคมะเร็งต่าง ๆ (Duncan, 2004; Hakimuddin *et al.*, 2004) การชะลอความชรา รวมทั้งกระบวนการต่าง ๆ ในร่างกาย ระบบต่าง ๆ เหล่านี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับสุขภาพร่างกาย เช่น โรคหัวใจที่เกิดจากการอุดตันของเส้นเลือด ที่อาจเกิดขึ้นอย่างฉับพลัน ซึ่งในบางครั้งอาจเกิดจากการสะสมสารต่าง ๆ ที่บริเวณหลอดเลือดทำให้ผนังหลอดเลือดถูกทำลาย และโรคอื่น ๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) (Shetty, 1997) ไชข้ออักเสบ และต้อกระจก (Ames *et al.*, 1993) เป็นต้น

ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี ซีลีเนียม เบต้า-แคโรทีน วิตามินเอ ฟลักซาเคมีต่างๆ (Phytochemicals) เช่น สารประกอบฟีนอลิกจากชา (Vinson and Dabbagh, 1998) และสมุนไพบบางชนิด เช่น ไอโซฟลาโวน (Isoflavones) จากถั่วเหลือง (Huang *et al.*, 2008) เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหาร ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเรตินอลพบมาก ผักสีเหลืองส้ม ใบผักสีเขียวเข้มต่าง ๆ เช่น ผลมะเขือเทศ เนื้อฟักทอง ใบตำลึง ใบผักบุ้ง ใบผักกวาดตุ้ง ใบผักคะน้า, วิตามินซี (Ascorbic acid) มีมากในฝรั่ง (Suntornsuk *et al.*, 2002) ส้ม มะขามป้อม มีส่วนช่วยในการสังเคราะห์คอลลาเจน แต่วิตามินซีสามารถถูกทำลายได้ง่าย ด้วยความร้อน ความชื้นและแสง, วิตามินอี (α -Tocopherols) มีมากในรำละเอียด เมล็ดธัญพืชที่ไม่ขัดขาว (Fardet *et al.*, 2008) ข้าวโพด ข้าวกล้อง ถั่วแดง ถั่วเหลือง ผักกาดหอม เมล็ดทานตะวัน งา น้ำมันรำ น้ำมันจากเมล็ดพืชชนิดต่างๆ, ซีลีเนียม พบมากในอาหารทะเล (Hamilton, 2004) เนื้อสัตว์ เมล็ดธัญพืชที่ไม่ขัดขาว นอกจากนี้ยังมีสารที่พบในผักและผลไม้ที่มีคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถจับกับอนุมูลอิสระ ลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งได้ พบมากในตระกูลส้ม องุ่น และผลไม้สดอื่นๆ เช่น กระเทียม และผักตระกูลถั่ว

จากการที่มีรายงานว่า สารประกอบกลุ่ม Polyphenols โดยเฉพาะอย่างยิ่งแซนโธน (Xanthonenes) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งพบในพืชพรรณธรรมชาตินานาชนิด สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) (Rice-Evans *et al.*, 1996) ประกอบกับประเทศไทยเป็นแหล่งอุดมสมบูรณ์ด้วยพรรณไม้และสมุนไพรหลากหลายชนิด ที่มีศักยภาพในการใช้รักษาโรคต่าง ๆ อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระได้ดี จึงทำให้การทดสอบสารสกัดจากพืชพื้นบ้านเพื่อสำรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนเป็นเรื่องที่น่าสนใจศึกษาเป็นอย่างยิ่ง

ดอกดาหลาเป็นผักพื้นบ้านอีกชนิดหนึ่งในภาคใต้ที่มีสีสวยงามและยังสามารถนำดอกและลำต้นอ่อนมารับประทานเป็นอาหารได้ด้วย ซึ่งคนภาคใต้จะนิยมทานกันมาก งานวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำวิจัยนี้ขึ้นเพื่อศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและการทำงานของสารประกอบฟีนอลิกในดอกดาหลาสีแดงเพื่อเป็นการนำผักพื้นบ้านไปใช้ประโยชน์ พัฒนาเป็นพืชสมุนไพรให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นและยังเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่ต้องการศึกษาเกี่ยวกับพืชชนิดนี้ต่อไป

วัตถุประสงค์ (Objective)

1. เพื่อศึกษาหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ในดอกดาหลา
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากดอกดาหลา
3. เพื่อศึกษาหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบในดอกดาหลา
4. เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคัดเลือกสารสกัดจากพืชสมุนไพร สำหรับนำไปค้นคว้าศึกษาหาสารออกฤทธิ์ และขยายผลสู่การทดลองในสัตว์ทดลองและในคนต่อไป

ขอบเขตการศึกษา (Scope of study)

วิเคราะห์หาปริมาณ ชนิด ของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ (สารประกอบฟีนอลิก เบต้า-แคโรทีน วิตามินอี และ วิตามินซี) ในดอกดาหลา ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองและปลูกกันอย่างแพร่หลายในเขต 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Benefit)

ทราบถึงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นพืชพื้นบ้าน ในเขต 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ในการพัฒนา ปรับปรุงกระบวนการแปรรูปดอกดาหลาให้ได้ตามความต้องการของผู้บริโภค

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1.อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radicals) เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระ (Unpaired electron) อยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุลจึงมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาโดยรับอิเล็กตรอน จากสารอื่น ๆ ใกล้เคียงยังผลให้ตนเองเสถียรขึ้น ในขณะเดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนไปนั้นมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่จนอาจกลายเป็นสารที่มีความรุนแรง ซึ่งถ้าเกิดขึ้นในระบบสิ่งมีชีวิต อาจทำอันตรายกับส่วนประกอบสำคัญของเซลล์รอบ ๆ บริเวณนั้น ไม่ว่าจะเป็นโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือดีเอ็นเอ ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเสียหายที่การทำงาน ดังนั้นในสภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมากจะก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ได้เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรค Parkinson (Banerjee *et al.*, 2005) โรค Alzheimer ไขข้ออักเสบ และต้อกระจก (Ames *et al.*, 1993) เป็นต้น

Reactive oxygen species (ROS) (Halliwell, 1999) คือ ตัวการสำคัญอีกตัวหนึ่งที่ก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ได้ โดย ROS เป็นโมเลกุลที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ยังผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) (Hsieh *et al.*, 2004) การเปลี่ยนสภาพโปรตีนตลอดจนไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์หรือการสร้างพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) กับโปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิดจนทำให้การทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์นั้น ๆ ผิดปกติไป ทำลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ เช่น กรดนิวคลีอิก คาร์โบไฮเดรต (Prakash *et al.*, 2006) เป็นต้น (วัลยา เนาวรรตน์วัฒนา และพัชร บัญศิริ, 2542) ทั้งอนุมูลอิสระ และ ROS จัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี (ตารางที่ 2.1) โมเลกุลหรืออออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างอนุมูลอิสระ

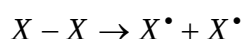
(<http://www.microscopy.ahs.chula.ac.th/Micros/NEWS/antioxidant.htm>)

Radicals	Non-radicals
<i>Reactive oxygen species (ROS)</i>	
Superoxide, $O_2^{\bullet-}$	Hydrogen peroxide, H_2O_2
Hydroxyl, $OH^{\bullet}$	Hypochlorous acid, $HOCl$
Peroxyl, $ROO^{\bullet}$	Ozone, O_3
Alkoxy, $OR^{\bullet}$	Singlet oxygen
<i>Reactive nitrogen species (RNS)</i>	
Nitric oxide, NO	Nitrous acid, HNO_2
Nitrogen dioxide, NO_2	Dinitrogen trioxide, N_2O_3
	Peroxynitrite, $ONOO^-$

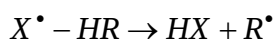
ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ จะพบอนุมูลอิสระของออกซิเจนชนิดต่าง ๆ เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา การเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้ มีสาเหตุมาจากปัจจัยต่าง ๆ ทั้งภายในและภายนอกร่างกาย เช่นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเอง หรือมีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ยารักษาโรค รังสี ควันบุหรี่

1.1 การเกิดอนุมูลอิสระ

1.1.1 ปฏิกิริยาการแยกอย่างสมมาตร (Symmetric separation)



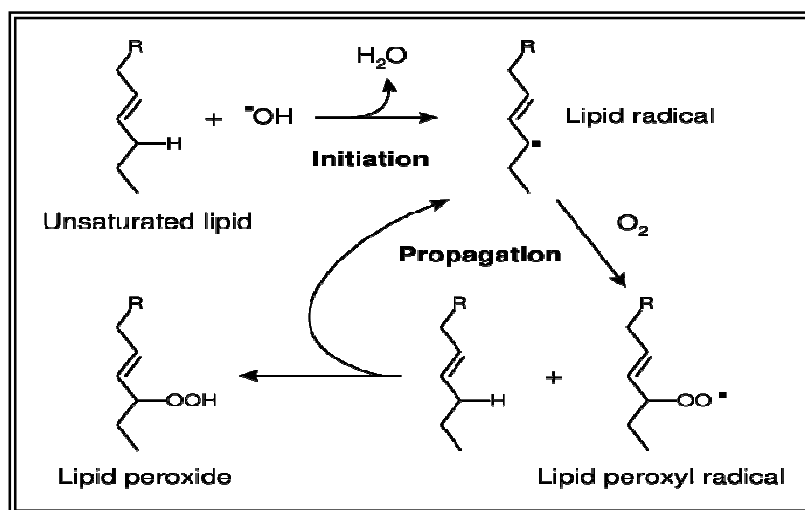
1.3.2 อนุมูลอิสระอื่นๆ



1.2 Lipid peroxidation

คือ การเกิดปฏิกิริยา Oxidative degradation ของไขมัน เป็นกระบวนการที่อนุมูลอิสระแย่งอิเล็กตรอนจากไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Nair *et al.*, 2007) ส่งผลให้เซลล์ถูกทำลาย กระบวนการนี้เกิดผ่านกลไกของปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยอนุมูลอิสระมีผลกระทบอย่างมากสำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acid) เนื่องจากไขมันจำพวกนี้ประกอบด้วยพันธะคู่ หลายพันธะในระหว่างสายของโมเลกุลเมทิลีน (Methylene, $-CH_2-$) ซึ่งทำให้กลุ่มไฮโดรเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (Reactive

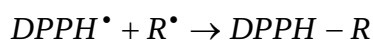
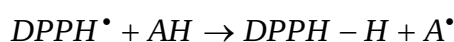
Hydrogen) ในส่วนของการเกิดปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นเริ่มต้น(Initiation) ขั้นดำเนินการ (Propagation) และ ขั้นยุติ (Termination) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



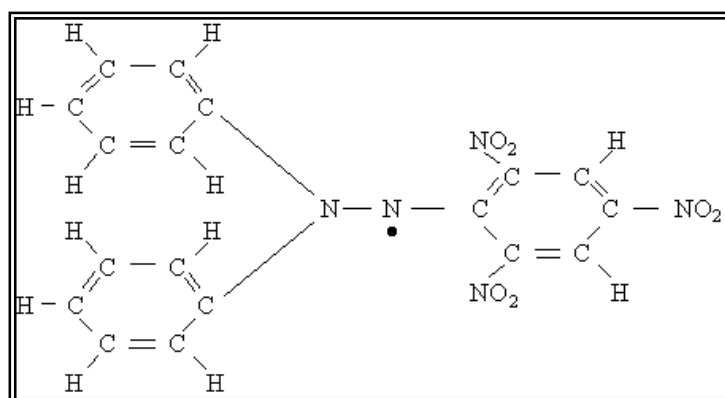
รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Antioxidant>)

1.3 1, 1 – Diphenyl – 2 – picrahydrazyl (DPPH) (Braca *et al.*, 2001)

เป็นสารอนุมูลอิสระที่มีเสถียรภาพสูง และรับอิเล็กตรอนหรืออนุมูลไฮโดรเจนเพื่อกลายเป็น Diamagnetic molecule ที่มีเสถียรภาพสูงขึ้น (Soares *et al.*, 1997) ดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และจะหยุดการดูดกลืนแสงนี้โดยสารต้านอนุมูลอิสระหรือกลุ่มอนุมูลอิสระ (Brand – Williams *et al.*, 1995) กลไกการทำปฏิกิริยามีขั้นตอน ดังนี้



โดยที่ AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ และ $\text{R}^\bullet$ คืออนุมูลอิสระอื่น ๆ



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของ DPPH (รัตนา สัมพันธ์ชิต และ ธารารัตน์ ศุภศิริ, 2546)

DPPH Method เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชธรรมชาติ ในปี 2006 มีการศึกษากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระจากมันเทศด้วย DPPH Method (Huang *et al.*, 2006) และผลการทดลองที่ได้ใช้เป็นข้อมูลต้นแบบในการศึกษาครั้งต่อไป

2. สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ได้ (Halliwell *et al.*, 1995) สารเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (Chelate) กับเหล็ก ป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ เป็นต้น ปกติร่างกายคนเรานั้นจะมีสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติหลากหลายชนิดทั้งที่เป็นเอนไซม์ได้แก่ Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX), Glutathione reductase (GR), Glutathione S-transferase (GST) และไม่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ Glutathione, Lipoic acid, Ceruloplasmin, Albumin, Transferrin เป็นต้น เนื่องจากสารเหล่านี้มีจำนวนจำกัด ดังนั้น เมื่อใดก็ตามที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นเกินกว่าจะกำจัดได้หมด อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้ ดังที่กล่าวมาแล้ว นอกจากนี้พวกวิตามินบางชนิด เช่น Tocopherols, Carotenoids, Ascorbic acid รวมทั้งสารประกอบกลุ่ม Polyphenols ต่าง ๆ ซึ่งมีรายงานพบมากในพืช ผัก ผลไม้ ทั่วไปยังจัดเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งธรรมชาติที่ดีอีกกลุ่มหนึ่ง (Sies, 1991)

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทตามลักษณะการออกฤทธิ์ (Sherwin, 1990) คือ

2.1 สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ

เป็นสารที่หยุดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระโดยการให้อนุมูลไฮโดรเจน ($H^\bullet$) หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระโดยตรงเป็นผลให้อนุมูลนั้นกลายเป็นสารที่มีความเสถียรขึ้น สารออกฤทธิ์ในลักษณะดังกล่าว ได้แก่ สารประกอบกลุ่ม Phenolic เช่น Flavonoids, Eugenol และ Vanillin เป็นต้น มีรายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้ทำหน้าที่ได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ แต่เมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้นอาจกลายเป็นสารเสริมฤทธิ์ออกซิเดชันได้ (Rajalakshmi and Narasimhan, 1996)

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ

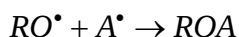
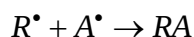
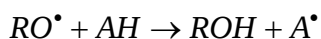
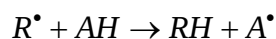
สารต้านอนุมูลอิสระประเภทนี้ไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระแต่จะช่วยการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิในลักษณะต่าง ๆ เช่น จับกับ Fe^{2+} ดักจับออกซิเจน ดูดซับรังสียูวีไว้ เป็นต้น (Gordon, 2001)

3. กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ (Yanishlieva, 2001)

สารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกการทำงานแบ่งได้เป็น 6 แบบใหญ่ ๆ คือ

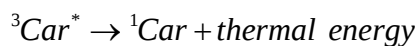
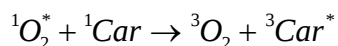
3.1 ดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging)

โดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ดังสมการ



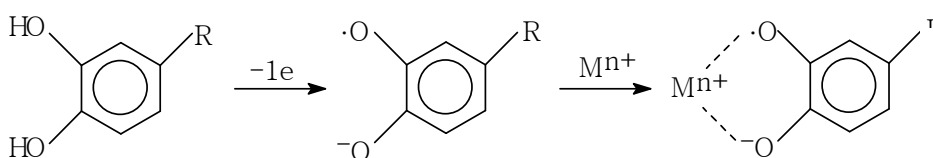
3.2 ยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen (singlet oxygen quenching)

สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) สามารถยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยการเปลี่ยน singlet oxygen ($^1O_2^*$) ให้อยู่ในรูป triplet oxygen (3O_2) และปล่อยพลังงานที่ได้ออกไปในรูปความร้อน โดยที่ แคโรทีนอยด์ (Car) 1 โมเลกุลสามารถทำปฏิกิริยากับ singlet oxygen ได้ถึง 1,000 โมเลกุล (Sies *et al.*, 1992)



3.3 จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Metal chelation)

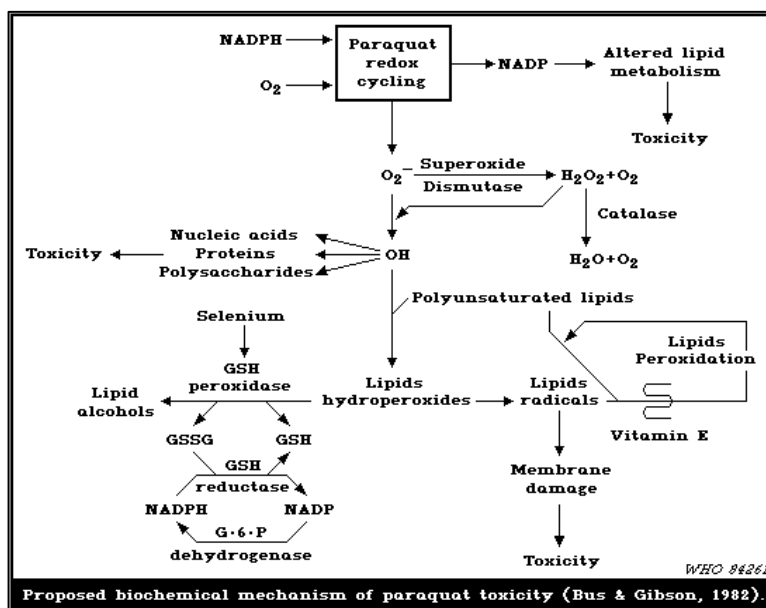
สารที่สามารถจับโลหะที่สำคัญเหล่านี้คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} ได้แก่ Flavonoids, Phosphoric acid และ citric acid เป็นต้น สำหรับกลไกการจับโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 กลไกการจับโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์

3.4 หยุดปฏิกิริยาการส้างอนุมูลอิสระ (Chain-breaking)

วิตามินอี (α -tocopherol, Toc-OH) สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (Lipid autoxidation) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Electron-acceptor antioxidants) จากอนุมูล peroxy (Cu^{2+}) (Burton and Traber, 1990) ดังแสดงในรูปที่ 2.4

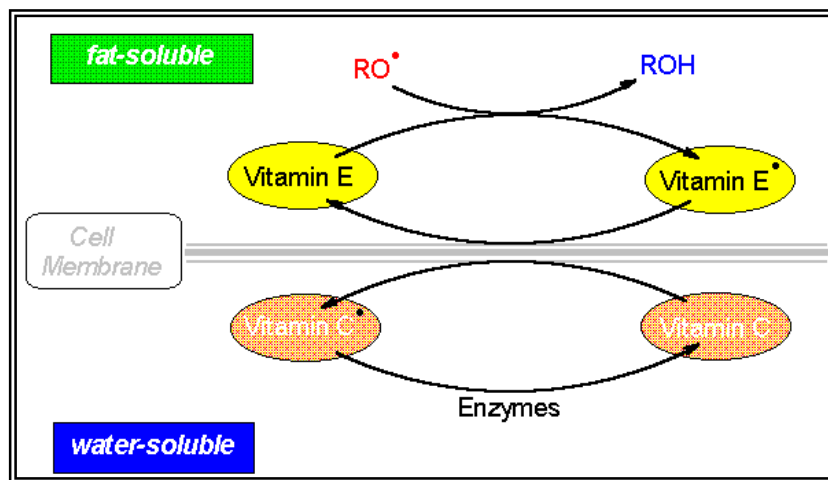


รูปที่ 2.4 การทำงานของวิตามินอี ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน

(www.inchem.org/documents/ehc/ehc/e39_7.gif)

3.5 เสริมฤทธิ์ (Synergism)

สารชนิดนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น ตัวอย่างเช่น การทำงานร่วมกันระหว่าง α -tocopherol กับ Ascorbic acid โดยที่ ascorbic acid ไม่สามารถทำงานในระบบ Hydrophobic ได้เหมือนกับ α -tocopherol แต่จะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูล α -tocopherol peroxy ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง α -tocopherol กับอนุมูล Peroxy ($\text{ROO}^{\bullet}$) เปลี่ยนรูปกลับไปเป็น α -tocopherol ที่สามารถทำงานได้ (Frankel *et al.*, 1998) ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 การเปลี่ยนรูปของวิตามินอีและวิตามินซีในร่างกาย
(www-users.york.ac.uk/~chem77/graph/vitce.gif)

3.6 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (Enzyme inhibition)

สารประกอบ Phenolic บางชนิด เช่น Flavonoids, Phenolic acid และ Gallates สามารถยับยั้ง Lipoxxygenase โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (Cofactor) มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว (Puerta, 1999)

4. สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

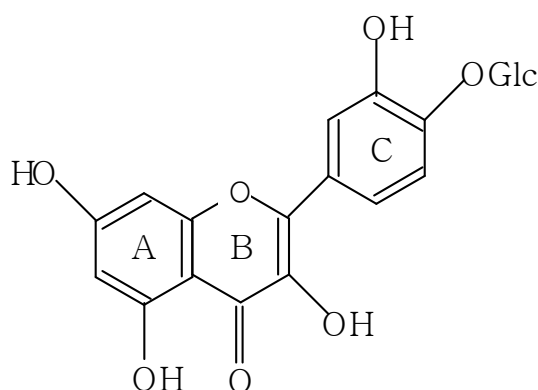
สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการพัฒนาค้นคว้ากันอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากแนวคิดเรื่องการกลับคืนสู่ธรรมชาติ ประกอบกับความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภค สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืชซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (Non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบ Phenolic โดยเฉพาะ Polyphenols เช่น แชนโวน และ ฟลาโวนอยด์ ซึ่งประกอบด้วยหมู่ Aromatic hydroxyl ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชัน (Functional Group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระต่าง ๆ ไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูลของไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น (Van *et al.*, 2000) นอกจากนี้สารประกอบ Polyphenols ที่มีโครงสร้าง *ortho*-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลไฮดรอกซิลในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานสิชัน คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำโดยการเข้าจับกับโลหะนั้นก่อให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนได้อีกด้วย (Sanchez-Moreno *et al.*, 2000)

4.1 พฤษเคมี (Phytochemical)

สถาบันมะเร็ง (NCI: The National Cancer Institute) ของสหรัฐอเมริกาและนักวิทยาศาสตร์จากหน่วยงานอื่นๆ ได้ดำเนินโครงการศึกษาวิจัยพืชผักผลไม้และอาหารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการป้องกันและต่อต้านมะเร็งได้ พบว่าพืชผักบางชนิดจะมีสารที่เกิดจากธรรมชาติบางประเภทเป็นองค์ประกอบสารนี้เรียกว่า Phytochemical ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดมะเร็ง มีอยู่ 14 ประเภทด้วยกัน ดังนี้ Sulfide, Phylate, Flavonoid, Glucarate, Carotenoid, Coumarin, Monoterpene, Triterpene, Lignans, Phenolic acid, Indole, Isothiocyanate, Phthalate, Polyacetylene

4.2 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบในธรรมชาติมากที่สุดชนิดหนึ่ง แบ่งได้ 4 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ Flavonoid compounds, Phenolic acid Hydroxycinnamic acids derivatives และ Lignans จากการศึกษาเมแทบอลิซึมของสารประกอบฟีนอลิกพบว่า Phenolic acids เกิดมาจาก B-ring ของ Flavonoids ด้วยเหตุนี้เองชนิดของ Phenolic acids จึงขึ้นอยู่กับกระบวนการ Hydroxylation ของ Phenolic acids เอง (Williamson *et al.*, 2000) ดังแสดงโครงสร้างในรูป 2.6



รูปที่ 2.6 โครงสร้าง A, B และ C-ring ใน Flavonoids compounds

สารประกอบฟีนอลในพืชโดยทั่วไปแสดงคุณสมบัติเป็นกรด ซึ่งจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลอื่นอย่างรวดเร็ว และพบบ่อยที่ทำปฏิกิริยากับพันธะเปปไทด์ของโปรตีน และเมื่อโปรตีนนี้เป็นเอนไซม์ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมักทำให้เอนไซม์หมดสภาพ ซึ่งมักเป็นปัญหาที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาเอนไซม์ในพืช โดยรวมแล้วสารประกอบฟีนอลิกจะไวต่อการเกิดออกซิเดชันโดยเอนไซม์ Phenolases ซึ่งเปลี่ยน Monophenols ไปเป็น Diphenols และเปลี่ยนต่อไปเป็น Quinones นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลบางตัวยังสามารถ chelate กับโลหะ

สารประกอบฟีนอลิกภายในเซลล์ที่อยู่ในรูปอิสระนั้นพบน้อยมาก ส่วนใหญ่มักพบรวมอยู่กับโมเลกุลอื่น หลายชนิดพบในรูป Glycosides โดยเชื่อมต่อกับโมโนแซคคาไรด์หรือไดแซคคา

ไรต์ โดยเฉพาะกลุ่มของ Flavonoids ซึ่งมีกรวมกับน้ำตาล นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกยังอาจรวมกับสารประกอบอื่นอีกหลายชนิด เช่น Hydroxycinnamic acid อาจพบรวมกับ Organic acids, Amino groups, Lipids, Terpenoids, Phenolics และกลุ่มอื่นๆ นอกเหนือจากน้ำตาล การรวมตัวในลักษณะนี้ภายในเซลล์เป็น Monophenols และ Diphenols ทำให้เกิดความเป็นพิษกับพืช (Phytotoxic) น้อยกว่าในรูปอิสระ

5. ชีวิตวิทยาของพืชที่นำมาศึกษา

5.1 ดาหลา



รูปที่ 2.7 ดอกดาหลา (<http://www.kruaklaibaan.com>)

ตารางที่ 2.2 อนุกรมวิธานของต้นดาหลา (<http://www.kruaklaibaan.com>)

ชื่อวิทยาศาสตร์:	<i>Etlingera elatior</i> (Jack) R.M. Smith
ชื่อพ้อง:	<i>Phaeomeria magnifica</i> , <i>Nicolaia elatior</i>
ชื่อสามัญ :	ดาหลา
วงศ์ :	Zingiberales
ชื่ออื่น ๆ:	กาหลา, กะลา
ถิ่นกำเนิด:	เอเชียตะวันออกเฉียงใต้

5.1.1 การปลูกดาหลา

ดาหลาเป็นไม้ดอกที่มีการปลูกมาเป็นระยะเวลานานแล้วทางภาคใต้ของไทย ซึ่งเดิมได้มีการนำหน่ออ่อนและดอกมาใช้เป็นผักประกอบอาหารบางประเภท ปัจจุบันได้มีการนำมาปลูกเป็นไม้ตัดดอกมากขึ้น เนื่องจากดาหลาเป็นไม้ดอกที่ให้ดอกดกในฤดูร้อน ขณะที่ไม้ดอกชนิดอื่น ๆ ไม่ค่อย

จะมีดอก ประกอบกับดอกมีขนาดใหญ่ สีสดใส รูปทรงแปลกตา ทำให้เป็นที่สนใจ ของผู้พบเห็นและเป็นที่ต้องการของตลาด

ดาหลาเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในที่มีแสงแดดรำไรหรือที่ร่มไม่เย็นต้น ถ้าหากโดนแดดจัดเกินไปสีของกลีบประดับจะจางลง และทำให้ใบไหม้ การปลูกดาหลาสามารถปลูกได้ทุกฤดู แต่ฤดูปลูกที่เหมาะสมที่สุดคือ ฤดูฝน เริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม ซึ่งดาหลาจะมีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและแตกหน่อ ช่วงที่ดาหลาแตกหน่อได้มากคือ เดือนกรกฎาคม ถึงเดือนสิงหาคม แต่ในที่ ๆ มีน้ำเพียงพอไม่จำเป็นต้องรอฤดูฝน

5.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น ดาหลาเป็นพืชที่มีลักษณะคล้ายข่า มีลำต้นใต้ดินเรียกว่าเหง้า (Rhizome) เหง้าเป็นบริเวณที่เกิดของหน่อดอกและหน่อต้น ดาหลา 1 ต้น สามารถให้หน่อใหม่ได้ประมาณ 7 หน่อ ในเวลา 1 ปี ส่วนลำต้นเหนือดินเป็นกาบใบที่โอบซ้อนกันแน่น เช่นเดียวกับพวกกล้วย ส่วนนี้คือลำต้นเทียม (Pseudo stem) ลำต้นเหนือดินสูง 2-3 เมตร มีสีเขียวเข้ม

ใบ มีรูปร่างยาวรี กลางใบกว้างแล้วค่อย ๆ เรียวไปหาปลายใบ และฐานใบใบไม่มีก้านผิวเกลี้ยงทั้งด้านบนและด้านล่าง ใบยาว 30-80 เซนติเมตร กว้าง 10-15 เซนติเมตร ปลายใบแหลมฐานใบเรียวลาดเข้าหาก้านใบ เส้นกลางใบปรากฏชัดทางด้านล่างของใบ

ดอก ดอกดาหลาเป็นดอกช่อมีลักษณะดอกแบบ (Head) ประกอบด้วยกลีบประดับ (Bracts) มี 2 ขนาด ส่วนโคนประกอบด้วยกลีบประดับขนาดใหญ่ จะมีสีแดงขลิบขาวเรียงซ้อนกันอยู่และจะบานออก กลีบประดับขนาดเล็กอยู่ส่วนบนของช่อดอกมีสีเดียวกับกลีบประดับขนาดใหญ่ กลีบประดับเล็กนี้จะหุบเข้าเรียงเป็นระดับ ภายในกลีบประดับขนาดใหญ่ที่บานออกจะมีดอกขนาดเล็กกลีบดอกสีแดง ซึ่งเป็นดอกสมบูรณ์เพศอยู่ จำนวนมาก ดอกบานเต็มที่จะมีขนาดความกว้างดอกประมาณ 14-16 เซนติเมตร ลักษณะก้านช่อดอกแข็งตรง ดอกจะพัฒนามาจากหน่อดอกที่แทงออกมาจากเหง้าใต้ดิน ลักษณะของหน่อจะมีสีชมพู ที่ปลายหน่อ

พันธุ์ ปัจจุบันพันธุ์ดาหลาที่ปลูกตัดดอกมีอยู่ 3 พันธุ์ด้วยกันคือ พันธุ์สีชมพู พันธุ์สีขาวและพันธุ์สีแดง

5.1.3 การขยายพันธุ์พืช

การแยกหน่อควรแยกหน่อที่มีความเหมาะสมนำไปปลูกคือ สูงประมาณ 60-100 เซนติเมตร ขึ้นไปและมีกิ่งอ่อนกิ่งแก่ประมาณ 4-5 ใบ ใช้มีดตัดให้มีเหง้า และรากติดอยู่ด้วย ซึ่งหน่อชนิดนี้จะมีหน่อดอกอ่อน ๆ ติดมาด้วยประมาณ 3 หน่อ นำไปชำในถุงพลาสติก 1 เดือนเพื่อให้หน่อแข็งแรงก่อนปลูก

การแยกเหง้า โดยการแยกเหง้าที่เกิดใหม่ที่โคนต้น แล้วนำไปชำในแปลงเพาะชำ วิธีนี้จะใช้เวลาประมาณ 1 ปี จึงจะเริ่มให้ดอก

การปักชำหน่อแก่ โดยนำไปชำในแปลงเพาะชำให้แตกหน่อใหม่แข็งแรง แล้ว
จึงค่อยย้ายมาปลูกลงแปลง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

1. พืชตัวอย่าง

พืชที่ใช้ในการศึกษาคือดอกดาหลาสีแดง จากบ้านพักผู้ช่วยศาสตราจารย์ฉวีวรรณ ธัญญะศิริกุล มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

2. สารเคมีที่ใช้

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด Analytical และ HPLC Grade ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

ตารางที่ 3.1 แสดงสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้	M.W.	บริษัทผู้ผลิต
<i>Analytical grade</i>		
Absolute Ethanol (EtOH)	46.07	BDH
Acetone	58.08	Lab Scan
Butyl hydroxyl toluene (BHT)	220.30	USB
Chloroform	119.38	BDH
Dichlorometane (DCM)	84.93	Merck
Ethylacetate, (EtOAc)	88.105	BDH
Folin – Ciocalteu reagent	260.20	BDH
Hexane	86.18	Lab Scan
Phosphoric acid	98.0	BDH
Potassium Hydroxide	56.11	J.T Baker
Silicagel 60 GF ₂₅₄	60.09	Merck
Sodium carbonate	105.99	Merck
Toluene	92.14	Lab Scan

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้	M.W.	บริษัทผู้ผลิต
<i>HPLC grade</i>		
Acetonitrile	41.05	Fisher scientific
Tetrahydrofuran (THF)	72.11	Fisher scientific
Potassium dihydrogen phosphate	136.09	Fisher scientific
Methanol (MtOH)	32.40	Fisher scientific
<i>Standard</i>		
Vitamin E (α -Tocopherol)	430.69	Fluka
Gallic acid	170.12	Sigma
Beta carotene (β -carotene)	536.873	Fluka
Vitamin C (Ascorbic acid)	176.13	Sigma
DPPH radical (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)	394.30	Sigma

ตารางที่ 3.2 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง	GT410 และ AB204-5	Ohaus, Switzerland
เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ	5804R	Eppendorf, Germany
Micropipette	Biopette	LabNet
เครื่องวัด ของ pH ของสารละลาย	PHM 61	Radiometer,
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS recording spectrophotometer)	UV-1200series 160A	Denmark Shimadzu
เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)	G-560E	
เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer)	-	Scientific Industries
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	SS40-D	Clifton Cerastir
เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบหมุน	R114	Grant, England

การดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดจากดอกดาหลาเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

นำพืชตัวอย่าง(ดอกดาหลาสีแดง) มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Yi-Fang Chu *et al.*, 2002 ซึ่งสรุปได้ดังนี้คือ นำพืชตัวอย่าง 500-1,000 กรัม ผสมกับ 80% Acetone แล้วนำไป Homogenize และปั่นแยกที่ 10,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสที่ได้มาระเหย Acetone ด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบหมุน (Rotatory Evaporator) ที่อุณหภูมิ 40-50 °C จนมีปริมาตรเหลือประมาณ 10% ของสารละลายเริ่มต้น แล้วเก็บไว้ที่ -40 °C

2. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด

วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method (Singleton. *et al.*, 1999) โดยนำสารละลาย 100 ไมโครลิตร มาเติมน้ำกลั่นจนครบ 3 มิลลิเมตร เติมสาร Folin-Ciocalteu reagent [ประกอบด้วย 10% (w/v) Sodium tungstate และ 0.002% (w/v) Phosphomolybdic acid] ปริมาตร 125 ไมโครลิตร หลังจากวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที เติม 7% Na₂CO₃ 1.25 มิลลิตร ทิ้งไว้นาน 90 นาทีที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดสี จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร เทียบกับ Blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด โดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานซึ่งเตรียมจากสารละลาย Gallic acid ด้วยวิธีการเจือจางแบบอนุกรม (Serial Dilution) จากความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิเมตร ให้ได้ 4 ความเข้มข้น คือ 1:256 1:128 1:64 และ 1:32

3. การเตรียมสารสกัดจากพืชพื้นบ้านตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีน และ วิตามินอี

(Kurilich, A. C. *et al.*, 1999)

นำตัวอย่างพืชมาเตรียมตามวิธีการของ Weber(1987) โดยนำมาทำแห้งด้วยวิธี Lyophilization แล้วนำ 300 – 500 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง) เติมเอทานอลที่มีส่วนผสมของ BHT ที่ความเข้มข้น 0.1% (w/v) ปริมาตร 10 มิลลิตร นำไปบ่มที่ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม 40% KOH เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา Saponification ที่ 70 °C เป็นเวลา 30 นาที นำมาแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิตร จากนั้นเติมสารผสม Hexane/Toluene Mixture อัตราส่วน 10: 8 โดยปริมาตร นำส่วนใสมาระเหยจนแห้ง แล้วละลายด้วย THF หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เพื่อหาปริมาณของวิตามินอี และ สารเบต้า-แคโรทีนต่อไป โดยใช้สารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 292 และ 450 นาโนเมตร ตามลำดับ เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ คือ Acetonitrile: Methanol: Tetrahydrofuran อัตราส่วน 52: 40: 8 โดยปริมาตร โดยใช้สารมาตรฐานคือ α - tocopherol และ β - carotene บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 500 – 1500 ไมโครกรัม / มิลลิเมตร และ 3.0 – 75 ไมโครกรัม / มิลลิเมตร ตามลำดับ

4. การเตรียมสารตัวอย่างและการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี (Kurilich, A. C. *et al.*, 1999)

นำพืชตัวอย่างแช่แข็งมา 50 กรัม (น้ำหนักเปียก) ผสมด้วย 1% Phosphoric acid แล้วปั่น ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วย 1% Phosphoric acid หลังจากนั้นนำไปกรอง นำสารสกัดที่ผ่านการกรองแล้ว 1 มิลลิลิตร เติม 5% DTT (Dithiothreitol) 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย 1% Phosphoric acid แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีด้วยวิธี HPLC ต่อไป โดยใช้ ปริมาณสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้เป็น Acetonitrile: 0.05 M KH_2PO_4 (pH 5.9) (75: 25) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 268 นาโนเมตร ความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินที่ใช้คือ 80 – 800 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

5. วิธีการทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ $\text{DPPH}^\bullet$

ทดสอบความสามารถดักจับอนุมูล $\text{DPPH}^\bullet$ ของสารสกัดตามวิธีการที่ระบุโดย Yen และ hen (1995) โดยนำสารสกัดแต่ละชนิดมาเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันใน Ethanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย 0.05 mM $\text{DPPH}^\bullet$ ใน Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน หลังจากทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง นาน 5, 10, 20, 30, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใส่ Ethanol แทน สารสกัด นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูล $\text{DPPH}^\bullet$ จากสูตร

$$\% \text{scavenging} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟระหว่าง %Scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัด ณ เวลาต่าง ๆ

6. การคำนวณค่า IC_{50} และ % การยับยั้ง

$$\% \text{Inhibition} = \left\{ \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \right\} \times 100$$

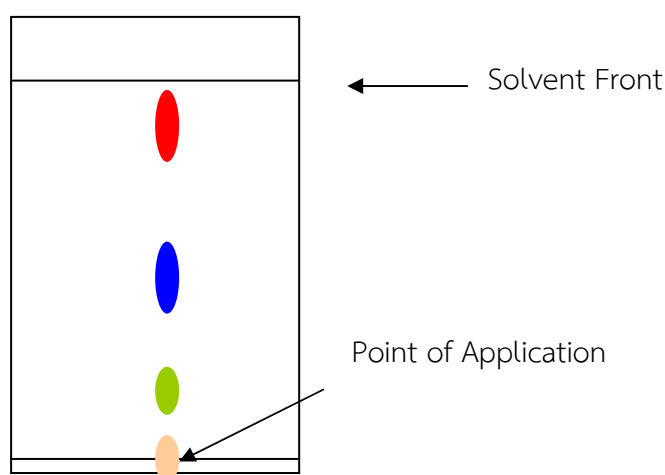
IC_{50} = ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล $\text{DPPH}^\bullet$ ได้ 50%

7. ทำปฏิกิริยาสารประกอบพีนอลิก โดยวิธี Thin Layer Chromatography, TLC

(Kusznierewicz *et al.*, 2008)

7.1 โครมาโทกราฟีแบบบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

มีลักษณะคล้ายกับโครมาโทกราฟีกระดาษที่รู้จักกันดี ต่างกันที่เฟสคงที่เปลี่ยนจากกระดาษมาเป็นแผ่นกระจกเคลือบด้วยผงของแข็งที่มีรูพรุนและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-40 ไมโครเมตร โครมาโทกราฟีชนิดนี้ อาศัยหลักการของตัวเคลื่อนที่ซึ่งเป็นของเหลวจะพาสารให้เคลื่อนที่ไปเนื่องจากสารที่มีโครงสร้างต่างกันจะได้รับแรงผลักดันและแรงหน่วงเหนี่ยวต่างกัน สารที่ถูกดูดซับได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับได้ไม่ดี ทำให้เกิดการแยกของสารออกเป็นแถบ ๆ เรียกว่า “โครมาโทแกรม (Chromatogram)” ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 3.1



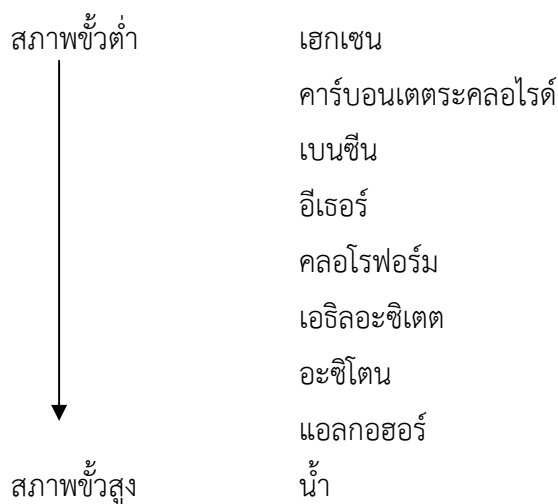
รูปที่ 3.1 ตัวอย่างการแยกของสารบน TLC

7.1.1 ตัวอยู่กับที่ (Stationary Phase)

ตัวอยู่กับที่จะทำหน้าที่รับโมเลกุลของสารเข้ามาสัมผัสกับตัวมัน เรียกว่าเกิด “Adsorption” และปล่อยให้โมเลกุลของสารเคลื่อนที่ต่อไป เรียกว่าเกิด “Desorption” ตัวที่อยู่กับที่ที่นิยมใช้ ได้แก่ ซิลิกาเจล ($\text{SiO}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$) และอลูมินา (Al_2O_3) ซึ่งเป็นสารมีขั้วสูงจึงดูดซับสารที่มีขั้วสูงได้ดี ส่วนสารที่มีขั้วต่ำกว่าจะถูกดูดซับได้น้อยกว่า

7.1.2 ตัวเคลื่อนที่ (Mobile Phase)

ตัวเคลื่อนที่ที่ใช้เป็นตัวเคลื่อนที่ในโครมาโทกราฟีหลายชนิด เรียงลำดับสภาพขั้วได้ดังนี้



รูปที่ 3.2 ลำดับสภาพขั้วของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

การศึกษาในครั้งนี้ เป็นวิธีการที่ใช้แยกองค์ประกอบของสารที่มีปริมาณน้อย ๆ ปริมาณสารที่หยดนั้นควรอยู่ในช่วง 100-500 μg เมื่อใช้แผ่น TLC ขนาด 20 X 20 ซม.² การใช้เวลาในการ Development ของ TLC โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 20-30 นาทีสำหรับระยะทาง 10 ซม. ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเฟสเคลื่อนที่และขนาดของอนุภาคของตัวดูดซับ เมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ไปจนถึงจุดสิ้นสุดตัวทำละลายแล้ว (แผ่น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535)

7.2 การเตรียมแผ่น TLC เพื่อทำบริสุทธิ์สารสกัด

เตรียมแผ่น TLC ได้โดยใช้ผง silica gel 60 GF₂₅₄ ละลายกับน้ำกลั่นปริมาตร 20:40 โดยมวลต่อปริมาตรให้เป็น slurry เทบนแผ่นกระจกใสให้มีลักษณะเหมือนกันทั่วทั้งแผ่น สารละลาย slurry จะเคลือบบนกระจกใสเป็นฟิล์มบาง ๆ โดยทั่วไปหนาประมาณ 0.2-0.3 มม. วางให้แห้งในอากาศ แล้วนำไปอบแห้งอีกครั้งที่อุณหภูมิ 110^oซ แล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นใน Desiccator หลังจากนั้น ใช้หลอดคาพิลลารีจุ่มสารสกัดแล้วนำสารสกัดมาหยดบนแผ่น TLC หย่อนแผ่น TLC ลงในภาชนะที่เตรียมตัวเคลื่อนที่บรรจุไว้ ปิดฝาให้สนิท โดยใช้ตัวเคลื่อนที่ดังตารางที่ 3.3 แล้วนำส่วนที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์หาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดนั้น ๆ ต่อไป

ตารางที่ 3.3 แสดงเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography

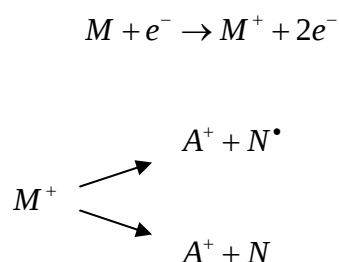
ตัวเคลื่อนที่	อ้างอิง
Acetone: Hexane	-
Acetone: Dichloromethane	-
Chloroform: Methanol	Negi, P.S. <i>et al.</i> , 2001
Chloroform: Ethyl Acetate	-
Toluene: Ethyl Acetate	-
Hexane: Chloroform: Methanol	Victor, N. <i>et al.</i> , 1999
Hexane: Ethyl Acetate	Barbara, K. <i>et al.</i> , 2008
Ethyl acetate-methanol-water	Chang W. Choi <i>et al.</i> , 2002

8. แมสสเปกโตรสโกปี (Mass Spectroscopy, MS)

แมสสเปกโตรเมตรีเป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างและมวลโมเลกุลของสาร โดยอาศัยการทำให้โมเลกุลของสารแตกตัวเป็นไอออนด้วยการให้โมเลกุลรับพลังงานที่มากพอจนทำให้โมเลกุลนั้นเกิดการแตกตัวเป็นไอออน จากนั้นทำการแยกและตรวจสอบไอออนที่เกิดขึ้นนั้นอีกครั้งหนึ่ง ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ สารตัวอย่างที่ใช้จะต้องเสียไป แต่วิธีการวิเคราะห์นี้ใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อยมาก จึงทำให้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง

8.1 หลักการและทฤษฎีทางแมสสเปกโตรสโกปี

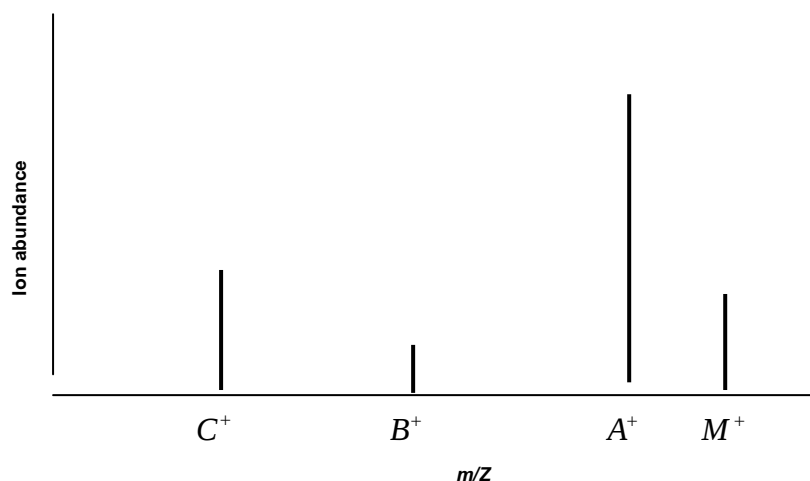
เมื่อทำให้โมเลกุลของสารเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน โมเลกุลนั้นจะกลายเป็นไอออนและมีประจุบวก (Molecular ion, M^+) โมเลกุลที่มีประจุบวกนี้ ถ้ามีพลังงานมากพออาจมีการแตกตัวออกเป็นส่วนย่อย ๆ ซึ่งส่วนย่อย ๆ เหล่านี้อาจเป็นอนุภาคที่เป็นกลาง (Neutral) หรืออาจเป็นไอออนย่อย (Fragment ion) นั่นคือ เป็นแคตไอออนเรดิเคิล ($A^{\bullet+}$) หรือเป็นแคตไอออน (A^+) หรือเป็นอนุภาคที่เป็นกลาง (N) เช่น



ในทำนองเดียวกัน ถ้าไอออนย่อย ($A^{\bullet+}$ หรือ A^+) ยังมีพลังงานมากพอก็จะแตกตัวต่อไป เกิดเป็นไอออนย่อยอันใหม่ต่อไปเรื่อย ๆ จนในที่สุดเหลือพลังงานน้อยลงจนไม่พอจะแตกตัวต่อไปได้อีก เมื่อพิจารณาจากแมสสเปกตรัม จะบ่งบอกถึงลักษณะการแตกตัวของโมเลกุลไอออน หรือรวมรูปแบบของการแตก

ตัวของแต่ละไอออนทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้ว ก็จะได้รูปแบบการแตกตัว (Fragmentation pattern) ของโมเลกุล ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารประกอบแต่ละชนิด

แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass Spectrometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้แยกและวัดมวลของไอออนด้วยการใช้อัตราส่วนของมวลต่อประจุ (m/Z) โดยทั่วไปแล้วไอออนมักมีประจุ $+1$ ($Z = 1$) ดังนั้นค่า m/Z จึงมีค่าเท่ากับมวลของไอออนโดยตรง เมื่อเกิดการไอออไนเซชัน ถ้าทราบปริมาณของไอออนเหล่านั้น จะสามารถหาความสัมพันธ์ของมันได้ โดยให้แกน X แสดงค่า m/Z และแกน Y แสดงปริมาณสัมพัทธ์ (Relative abundance) ก็จะได้แมสสเปกตรัมดังแสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 3.3 แสดงลักษณะของแมสสเปกตรัมของสารตัวอย่างจากแหล่งกำเนิดไอออน

9. ศึกษาชนิดและสูตรโครงสร้างของสารประกอบพีนอลิกโดยวิธี Mass Spectroscopy

(Yamazaki *et al.*, 2007)

นำตัวอย่างสารที่แยกได้ด้วยวิธี TLC มาละลายในเอทานอล แล้วฉีดเข้า Electrospray Ionization (ESI) Source ในเครื่อง Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) หลังจากนั้นนำผลแมสโครมาโทแกรมมาวิเคราะห์หากกลุ่มของสารประกอบพีนอลิกนั้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

ส่วนหนึ่งของการปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ให้มีประสิทธิภาพ คือการหาว่าเกิดความคลาดเคลื่อนตรงไหนของกระบวนการวิเคราะห์ และความคลาดเคลื่อนมีมากน้อยแค่ไหน วิธีหนึ่งที่จะทราบได้ คือ ทำการวิเคราะห์ทั้งกระบวนการใหม่หมด ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ กัน ถ้าผลที่ได้จากการวิเคราะห์ใกล้เคียงกัน แสดงว่าไม่มีความคลาดเคลื่อนที่รุนแรงเกิดขึ้นในการวิเคราะห์ การทำการทดลองซ้ำหลาย ๆ ครั้ง เช่นนี้ เป็นการแสดงความมั่นใจ ในทางสถิติเรียกว่า “ลิมิตความเชื่อมั่น” (Confidence Limit) ในการหาค่าลิมิตความเชื่อมั่น ต้องทราบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงผลการวิเคราะห์แต่ละครั้งจะให้ค่าใกล้เคียงกันมากน้อยแค่ไหน

1. ความแม่นยำ (Accuracy) และ ความเที่ยง (Precision)

ความแม่นยำ ในทางวิทยาศาสตร์ ต้องทราบปริมาณที่แท้จริงของสาร ถ้าผลของการวัดมีค่าใกล้เคียงกับค่าจริงแสดงว่ามีความแม่นยำดี แต่ถ้าห่างไกลแสดงว่ามีความแม่นยำน้อย การวัดแบบนี้เป็นการตรวจสอบกระบวนการวิเคราะห์ว่ามีความแม่นยำแค่ไหน

ความเที่ยง ในด้านวิทยาศาสตร์คำว่า “เที่ยง” ไม่จำเป็นต้อง “แม่นยำ” เสมอไป ในการทดลองทุกครั้งต้องมีความคลาดเคลื่อนชนิดที่แก้ไขไม่ได้เกิดขึ้นเสมอ การทดลองที่ให้ความเที่ยงสูงทำให้สามารถแปลความหมายในเชิงปริมาณวิเคราะห์ได้ถูกต้อง

2. ความคลาดเคลื่อนแบบควบคุมไม่ได้

เกิดจากการผันแปรของวิธีการวิเคราะห์และมาตรวัดต่าง ๆ อยู่เหนือการควบคุมของผู้วิเคราะห์ สำหรับการวิเคราะห์ ผลการวิเคราะห์ที่ทำซ้ำหลาย ๆ ครั้งจะกระจายระหว่างค่าที่มากและค่าน้อย

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N-1}}$$

เมื่อ	σ	=	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	X_i	=	ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ครั้งที่ i
	$\bar{X}$	=	ค่าเฉลี่ย
	N	=	จำนวนครั้งของการวิเคราะห์กับสารตัวอย่างอันเดียวกัน

ในการทำการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งจึงได้นำวิธีการหาค่าความคลาดเคลื่อนแบบควบคุมไม่ได้หรือการหาค่า S.D. มาใช้

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

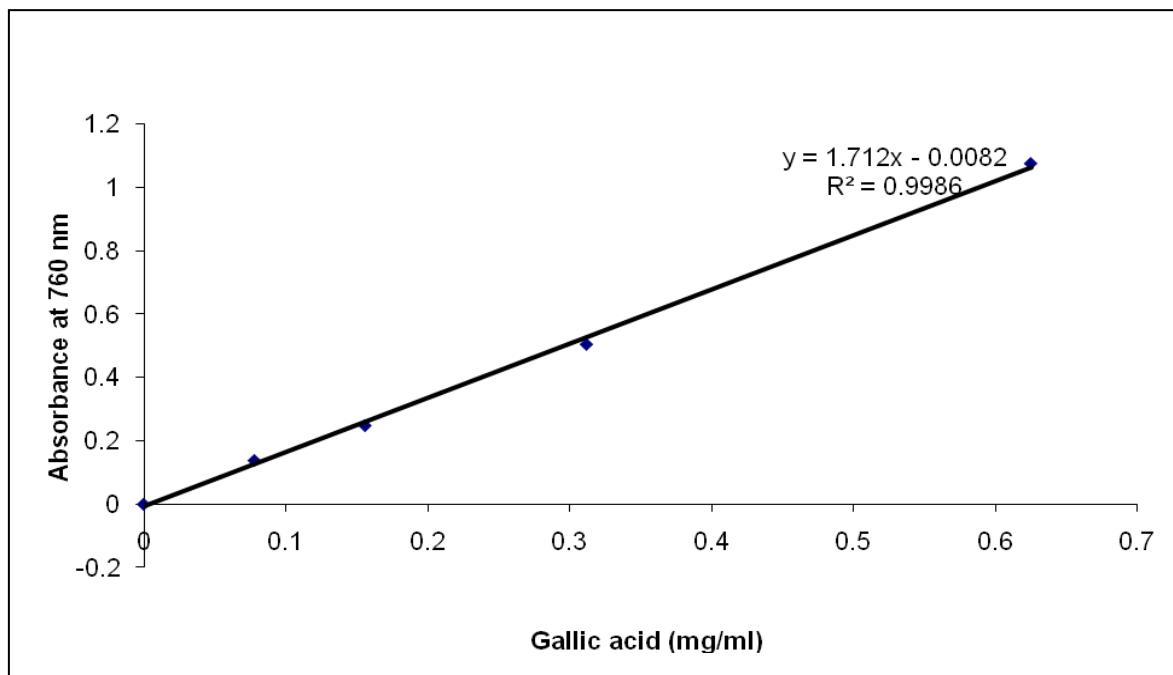
งานวิจัยชิ้นนี้ศึกษาเกี่ยวกับขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารประกอบฟีนอลิก เบต้า-แคโรทีน วิตามินอี และวิตามินซี ในดอกดาหลา โดยแต่ละชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระจะมีวิธีสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันออกไป ตัวอย่างตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้คือ อะซิโตน (Acetone) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) และ เอทิลอะซิเตต (Ethyl Acetate) เฮกเซน (Hexane) โทลูอีน (Toluene) เป็นต้น แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (Ultraviolet and Visible Spectroscopy) ปริมาณเบต้า-แคโรทีน วิตามินอี วิตามินซีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) และศึกษาโครงสร้างสารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

1.ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด

สารประกอบฟีนอลิกจัดเป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ซึ่งพบได้ในพืชทั่วไป แต่ปริมาณและตำแหน่งที่พบสารกลุ่มนี้มักแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช (Duh and Yen, 1997) จากผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดดอกดาหลา โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) (รูปที่ 4.1) ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกจากพืชที่ประกอบด้วยหมู่ Phenolic พบว่า ในแต่ละมิลลิกรัมของสารสกัดจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ ดังนั้น สารสกัดจากดอกดาหลาให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก $2,673 \pm 5.80$ mg GAE/100 g fresh weight (ผลที่แสดงเป็นค่าจากการทดลอง 3 ครั้ง , GAE = Gallic acid equivalent) ปริมาณสารที่ได้นั้นมาจากการเทียบเท่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกชนิดกรดแกลลิก โดยใช้วิธีนำกรดแกลลิกความเข้มข้นต่าง ๆ มาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน ดังตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Gallic acid

Serial Dilution	[Gallic acid] (mg/ml)	Absorbance at 760 nm
Blank	0	0
1:256	0.078	0.138
1:128	0.156	0.248
1:64	0.312	0.504
1:32	0.625	1.074



รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานที่ใช้หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด

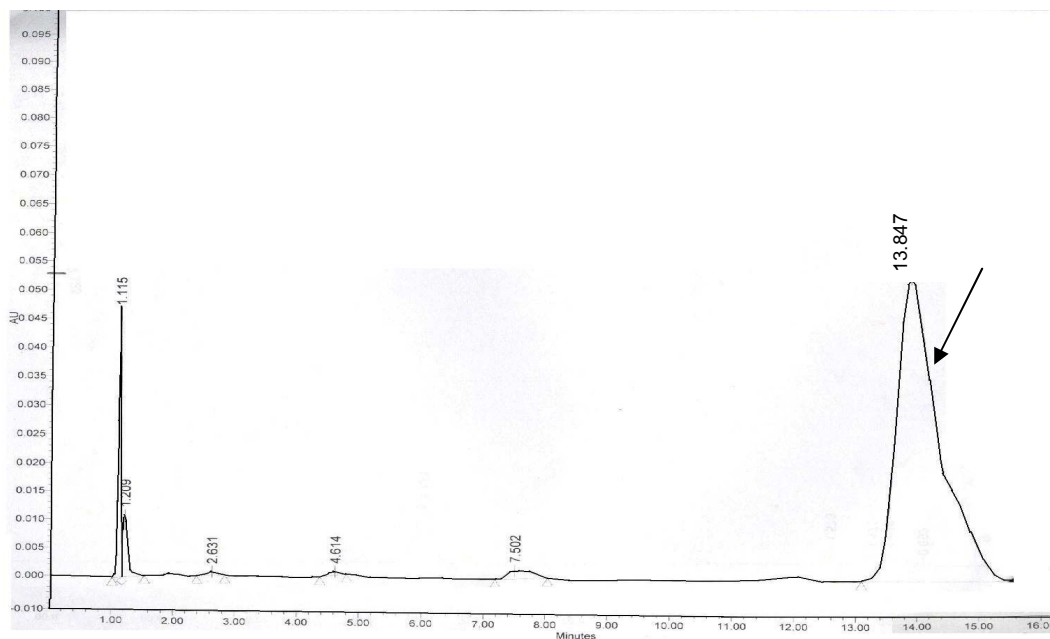
นำสารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 20 mg/ml มาเจือจางด้วยสารละลาย 95%

Ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 4 ระดับคือ 1:256 1:128 1:64 1:32 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย 80% Ethanol เป็น Blank

2. การศึกษาหาปริมาณสารประกอบเบต้า-แคโรทีน

แหล่งของเบต้า-แคโรทีน จะพบได้ในผัก และผลไม้ที่มีสีส้ม เหลือง หรือ แดง สารประกอบเบต้า-แคโรทีน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญอีกตัวหนึ่งพบได้ในส่วนที่เป็นไขมันในระบบทางชีวภาพ เบต้า-แคโรทีน เป็นสารแคโรทีนอยด์ตัวหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (Kurilich *et al.*, 1999) ทำหน้าที่ป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์จากรังสีจากสารก่อมะเร็ง

การศึกษาหาปริมาณเบต้า-แคโรทีนในครั้งนี้วิเคราะห์ด้วยวิธีทาง HPLC โดยนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานเบต้า-แคโรทีนกับพื้นที่ใต้พีค ดังแสดงในรูป 4.3 จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC นั้นพีคที่แสดงเบต้า-แคโรทีน มีค่ารีเทนชันไทม์ (Retention time, T_R) ประมาณ 13.00-15.00 นาทีทราบได้จากเมื่อฉีดสารที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จะได้พีคที่มีพื้นที่เพิ่มขึ้นเช่นกันโดยที่พีคอื่น ๆ มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย แสดงตัวอย่างในรูปที่ 4.2 ซึ่งเป็นโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 12 µg/ml

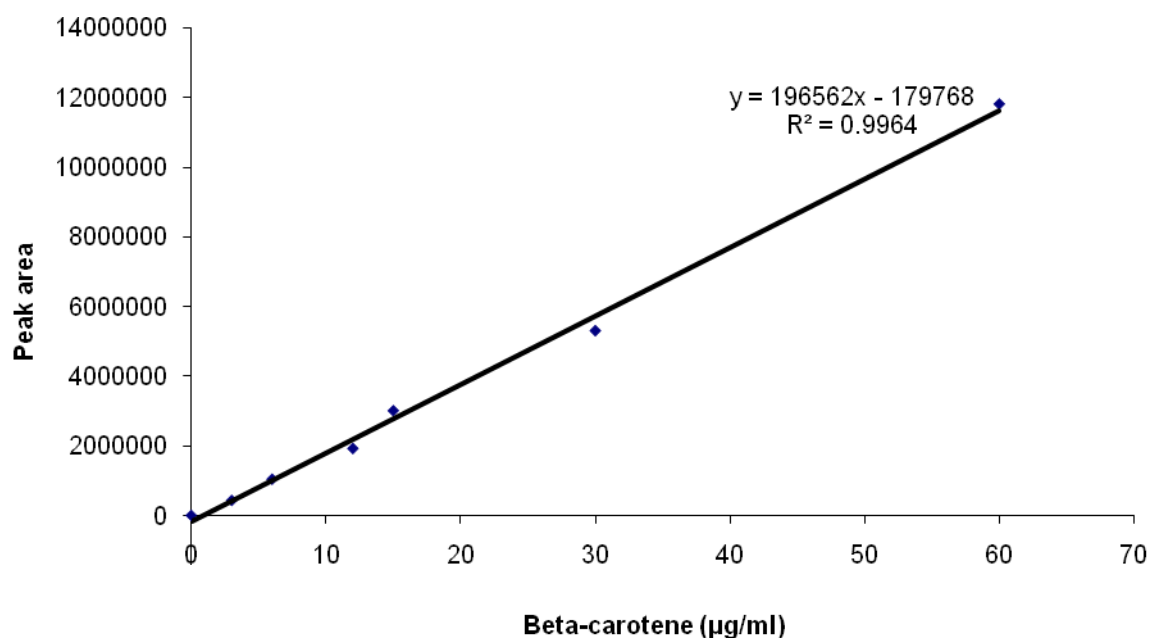


รูปที่ 4.2 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานเบต้า-แคโรทีน

นำสารละลายมาตรฐานเบต้า-แคโรทีนในคลอโรฟอร์ม ฉีดเข้าในเครื่อง HPLC (C₁₈ column) ซะคอลัมน์ด้วย Acetonitrile: Methanol: Tetrahydrofuran อัตราส่วน 52: 40: 8 โดยปริมาตร อัตราการไหล 0.1 mL/min ตั้งเวลา 16 นาที

ตารางที่ 4.2 พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานเบต้า-แคโรทีน

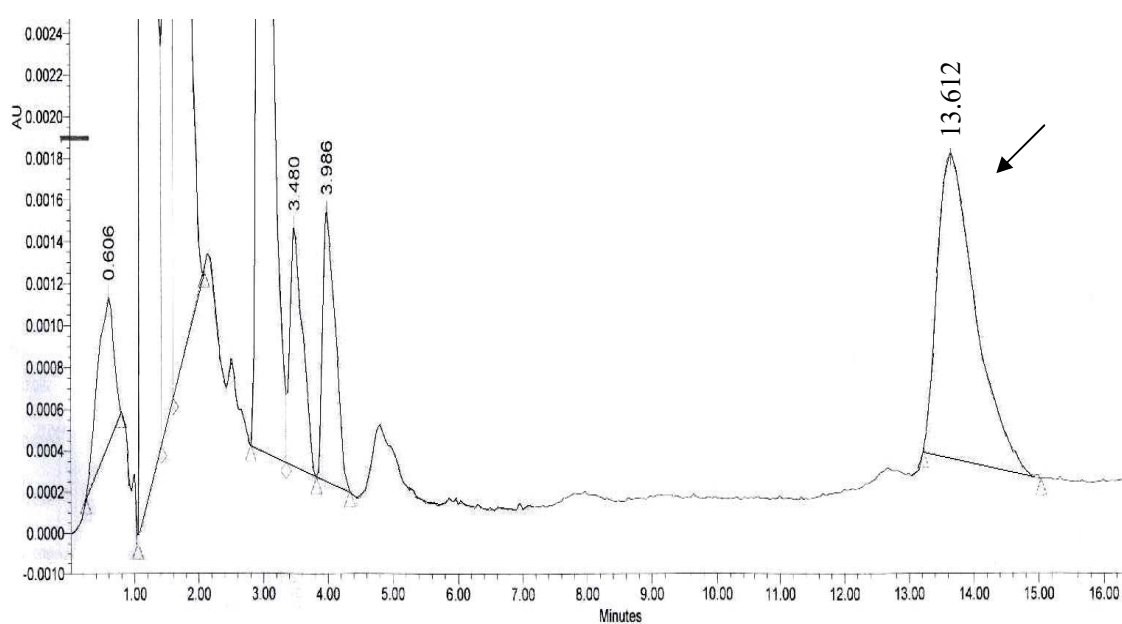
Betacarotene (µg/mL)	Peak area
Baseline	0
3.0	431239
6.0	1039981
12.0	1920546
15.0	3005893
30.0	5301976
60.0	11808755



รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณสารละลายเบต้า-แคโรทีน และพื้นที่ใต้พีค

นำสารละลายมาตรฐานเบต้า-แคโรทีนในคลอโรฟอร์มความเข้มข้น 0.15 mg/ml เจือจางด้วยคลอโรฟอร์มให้ได้ปริมาณสาร 3.0, 6.0, 12.0, 15.0 30.0 และ 60.0 µg/ml ฉีดเข้า HPLC ได้พื้นที่ใต้พีคของแต่ละความเข้มข้นแล้วนำมาเขียนกราฟ

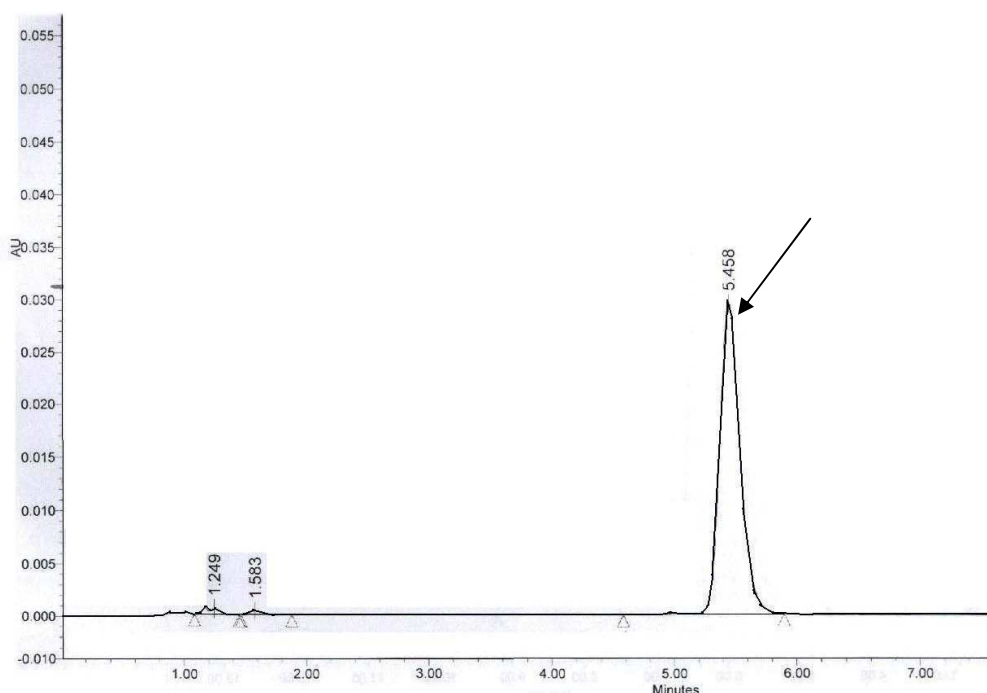
จากผลการทดลอง บ่งชี้ว่า ดอกดาหลาให้ปริมาณสารเบต้า- แคโรทีนน้อย (2.096 µg /100 g fresh weight) แม้จะเป็นพืชที่มีสีเข้มเช่นกันแต่อาจจะเป็นเม็ดสีชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่เบต้า-แคโรทีน (Seeram *et al.*, 2005) ส่วนรูปที่ 4.4 เป็นโครมาโทแกรมของสารสกัดดอกดาหลา ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากดอกดาหลา

3. การศึกษาหาปริมาณวิตามินอี

วิตามินอี (α - Tocopherol) เป็นวิตามินที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย ทำหน้าที่ป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์จากสารว่องไวต่อปฏิกิริยา (Free Radical) (Weber *et al.*, 1997) การศึกษาหาปริมาณวิตามินอีในครั้งนี้ใช้วิธีวิเคราะห์เดียวกับการหาปริมาณสารเบต้า-แคโรทีน โดยนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินอีกับพื้นที่ใต้พีค ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และรูป 4.6 จากการวิเคราะห์นั้นพีคที่แสดงวิตามินอีจะมีค่ารีเทนชันไทม์ (Retention time, T_R) ประมาณ 5.00-7.00 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งเป็นโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานวิตามินอีที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$

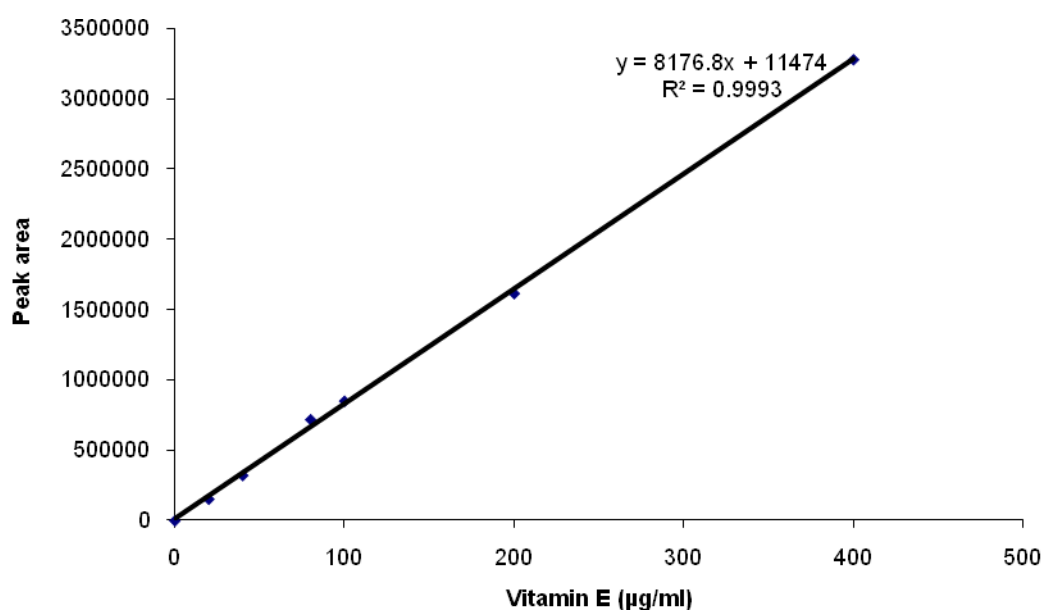


รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานวิตามินอี

นำสารละลายวิตามินอีในเอทานอลมาฉีดเข้า HPLC (C_{18} column) ชะลอด้วย Acetonitrile: Methanol: Tetrahydrofuran อัตราส่วน 52: 40: 8 โดยปริมาตร อัตราการไหล 0.1 mL/min ตั้งเวลาที่ 10 นาที

ตารางที่ 4.3 พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานวิตามินอี

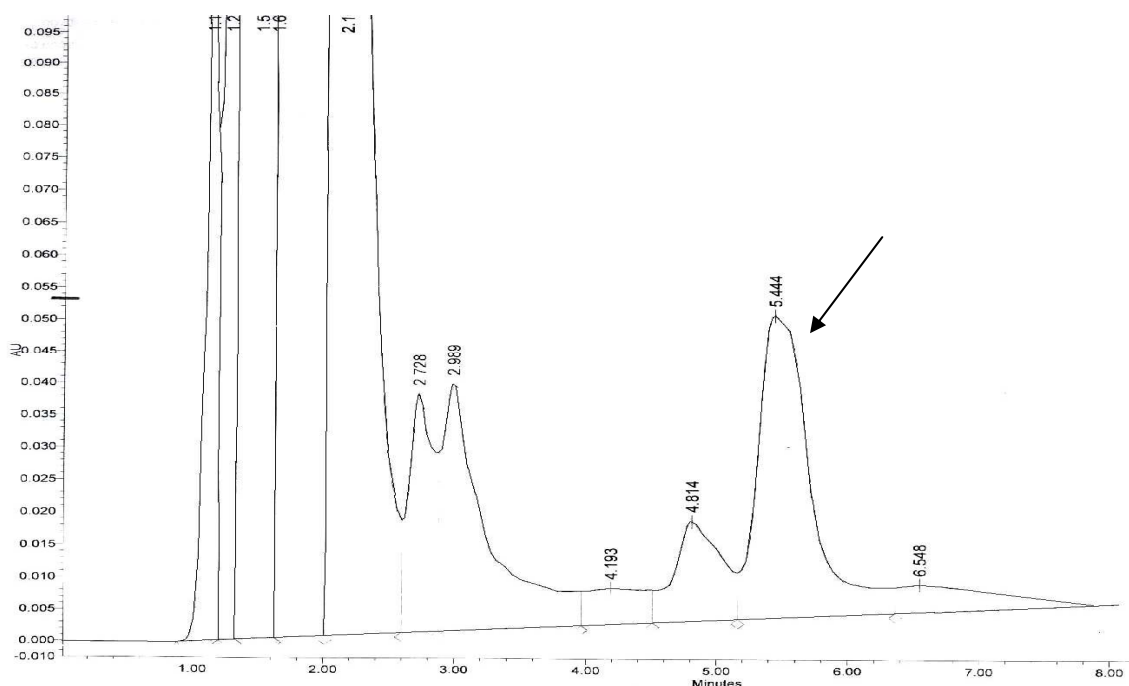
vitamin E ($\mu\text{g/ml}$)	Peak area
Baseline	0
20	153879
40	322576
80	719861
100	852057
200	1617524
400	3282921



รูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณสารละลาย Vitamin E และพื้นที่ใต้พีค

นำสารละลายวิตามินอีในเอทานอลความเข้มข้น 1 mg/ml มาเจือจางให้ได้ปริมาณสาร 20 40 80 100 200 และ 400 $\mu\text{g/ml}$ มาฉีดเข้า HPLC แล้วนำค่าพื้นที่ใต้พีคมาเขียนกราฟ

จากการทดลอง พบว่าสารสกัดดอกดาหลาให้ปริมาณวิตามินอี 62.03 μg / 100 g fresh weight ดังแสดงในรูป 4.7



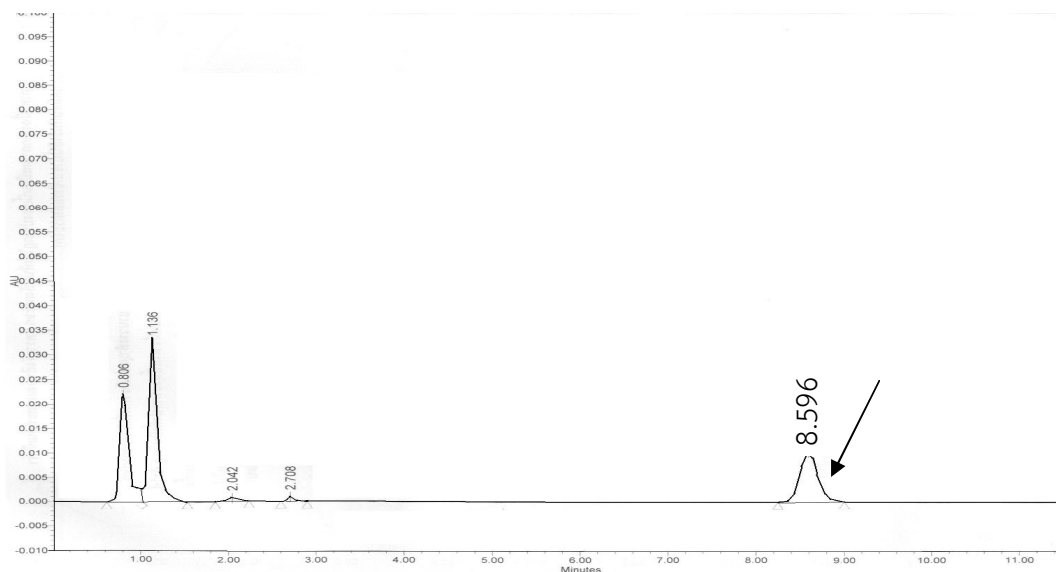
รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากดอกดาหลา

4. การศึกษาหาปริมาณวิตามินซี

วิตามินซีในอาหารมี 2 รูปแบบซึ่งร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ทั้ง 2 ชนิดคือ Ascorbic acid และ Dihydroascorbic acid ซึ่งมีผลึกสีขาวมีรสเปรี้ยว เป็นวิตามินชนิดที่ละลายน้ำได้ (water soluble) เมื่อละลายน้ำมีฤทธิ์เป็นกรดและเป็นวิตามินที่สลายตัวเร็วที่สุดในจำพวกวิตามินด้วยกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งไวต่อออกซิเจนมาก (ปฏิกิริยาออกซิเดชัน) เมื่อตั้งทิ้งไว้ในบรรยากาศที่มีทองแดงและในสิ่งแวดล้อมที่มีสภาพเป็นด่างและ ascorbic oxidase enzyme ที่มีอยู่ในผลไม้ คุณสมบัติอย่างหนึ่งของวิตามินซีที่ทราบกันดีก็คือช่วยป้องกันและรักษาโรคคลักปิดลักเปิด (scurvy) ได้

จากการศึกษาทางระบาดวิทยามีข้อมูลสนับสนุนว่าวิตามินซี อาจจะเป็นปัจจัยประกอบปัจจัยหนึ่งซึ่งช่วยลดอัตราการเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง และโรคหัวใจ (Byers and Perry, 1992) วิตามินซีอาจจะทำปฏิกิริยาโดยทางอ้อมในการป้องกันการสลายตัวของไขมันในเยื่อเซลล์โดยช่วยในการสังเคราะห์วิตามินอีที่ติดกับผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่เป็นการป้องกันโรคมะเร็งอาจเนื่องจากวิตามินซีช่วยในการทำลายพิษของสารก่อมะเร็งโดยการสกัดขบวนการเกิดเซลล์มะเร็งเนื่องมาจากคุณสมบัติที่เป็น Antioxidant โดยการจับกับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและกระตุ้นให้มีภูมิต้านทาน

รูปที่ 4.9 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณวิตามินซีและค่าพื้นที่ใต้พีคของโครมาโทแกรมวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อใช้หาปริมาณวิตามินซีในสารสกัด โดยโครมาโทแกรมที่แสดงปริมาณวิตามินซีนั้นจะออกมาที่เวลาประมาณ 8.00-9.00 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.8

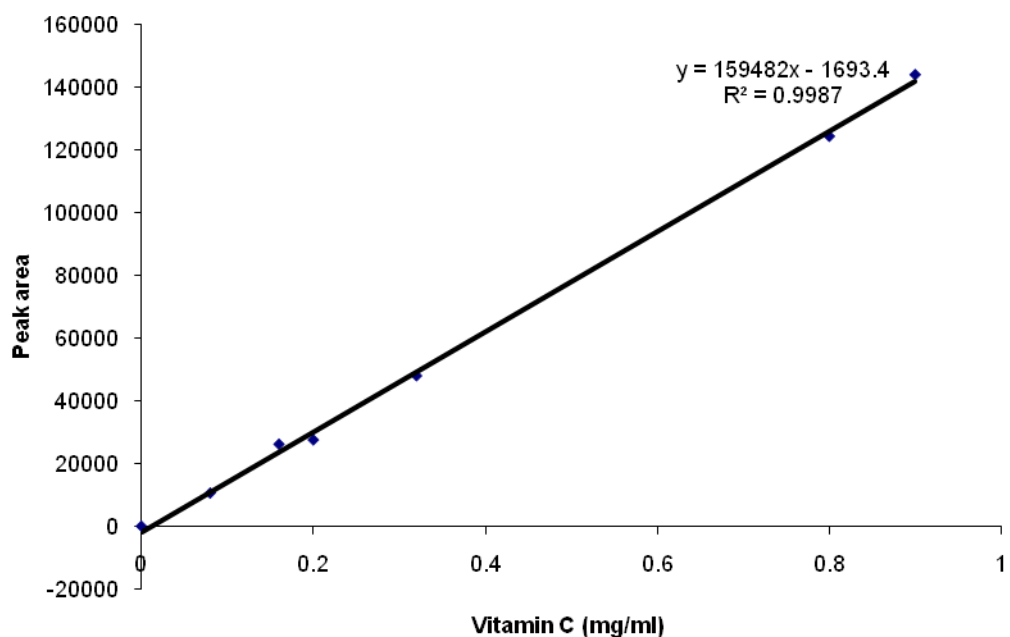


รูปที่ 4.8 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานวิตามินซี

นำสารละลายวิตามินซีในน้ำ เติม 1% กรดฟอสฟอริก และ 5% DDT มาฉีดเข้า HPLC (C18 Column) ซะคอลัมน์ด้วย Acetonitrile: 0.05 M KH_2PO_4 (pH 5.95) อัตราส่วน 75:25 โดยปริมาตร อัตราการไหล 0.1 mL/min ตั้งเวลาที่ 12 นาที

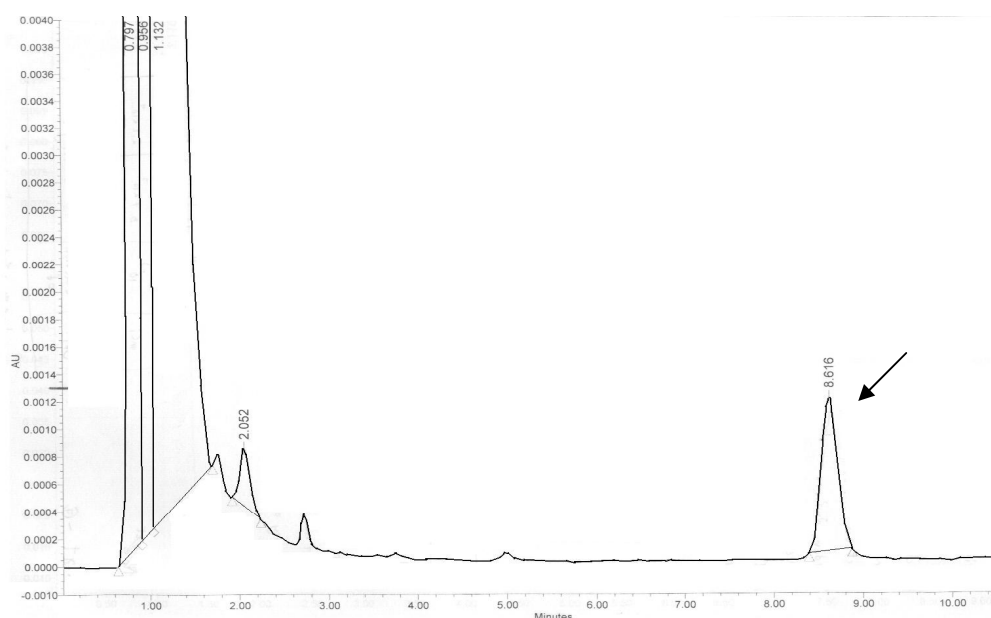
ตารางที่ 4.4 พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานวิตามินซี

[Vitamin C] (mg/ml)	Peak area
Baseline	0
0.08	10564
0.16	26147
0.20	27520
0.32	47967
0.80	124318
0.90	143956



รูปที่ 4.9 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณสารละลาย Vitamin C และพื้นที่ใต้พีค

นำสารละลายวิตามินซีในน้ำ เติม 1% กรดฟอสฟอริก และ 5% DDT ความเข้มข้น 0.002 g/ml มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.08 0.16 0.20 0.32 0.80 และ 0.90 mg/ml มาฉีดเข้า HPLC แล้วนำค่าพื้นที่ใต้พีคมาเขียนกราฟ จากการทดลองพบว่าดอกดาหลาให้ปริมาณวิตามินซี 89.68 mg/100 g wet weight ดังแสดงในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากดอกดาหลา

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 4 ชนิดที่พบในสารสกัดจากดอกดาหลา โดยนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับพืชที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันจากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกดาหลาในการวิจัยครั้งนี้ส่วนใหญ่ให้ปริมาณสารมากกว่า

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ในสารสกัดดอกดาหลาเปรียบเทียบกับพืชในตระกูลเดียวกัน

ตัวอย่างพืช	ตระกูล	Phenolic ^a	α -Tocopherol ^b	β - carotene ^b	Vitamin C ^c
ดาหลา	Zingiberales	462.51 $\pm$ 5.80	62.031	2.096	89.683
ขิง	Zingiberales	200	NR	NR	NR

หมายเหตุ a = หน่วยของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกคือ mg GAE/100g fresh weight)

b = หน่วยของปริมาณเบต้าแคโรทีนและวิตามินอี คือ μ g/100 g wet weight

c = หน่วยของปริมาณวิตามินซี คือ mg/100 g fresh weight

5. ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ

การทดลองหาค่าความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในครั้งนี้ ได้ใช้สารสกัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในการทดสอบ เนื่องจากสารสกัดเบต้า-แคโรทีน และสารสกัดวิตามินอีเป็นสารที่ไม่มีขั้ว ไม่สามารถละลายเข้ากับสารละลาย $DPPH^{\bullet}$ ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วสูงได้ ส่วนสารสกัดปริมาณวิตามินซีนั้นเป็นสารที่ละลายตัวได้ง่าย ทำให้สารสกัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความเหมาะสมที่สุด จากผลการทดลองของสารสกัดดอกดาหลา ปรากฏว่าสามารถดักจับอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ ได้ดี คือมีค่า IC_{50} 3.02 μ g/ml ซึ่งจัดเป็นฤทธิ์ที่ดีเมื่อเทียบกับสารออกฤทธิ์มาตรฐานคือ BHT ซึ่งให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.76 μ g/ml และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองดังกล่าวกับผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในดอกดาหลา จะเห็นว่า มีความใกล้เคียงกันเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งแสดงว่า ระดับของการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน่าจะขึ้นกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดนั้น ๆ

5.1 การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ *DPPH*^{*} ของสารสกัดดอกดาหลา

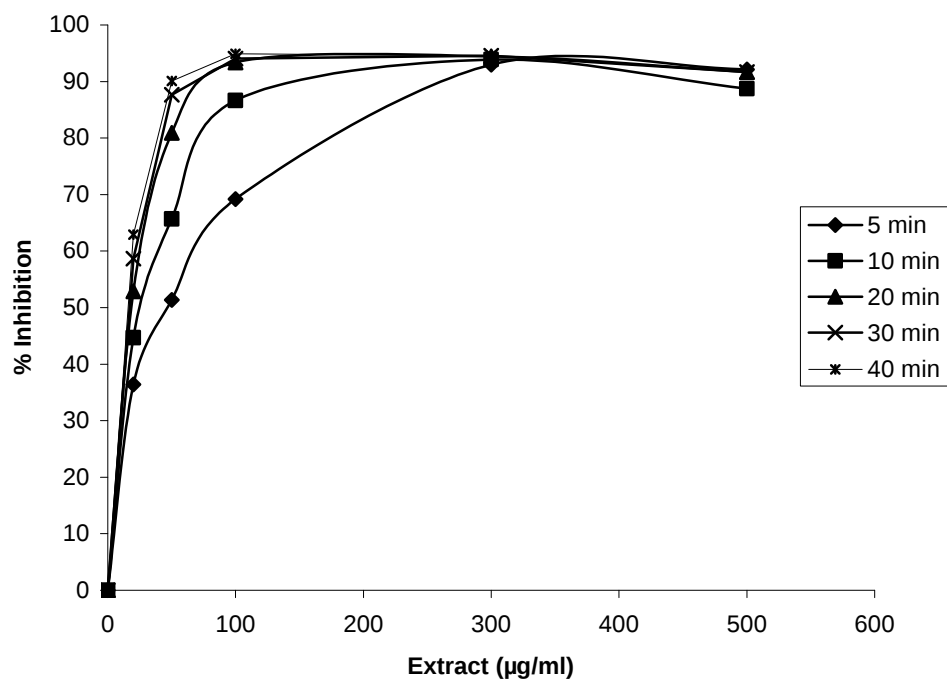
จากผลการทดลองตารางที่ 4.6 พบว่า ดาหลามี % การยับยั้งสูงสุด ที่เวลา 30 นาทีเป็น 3.02 μg GAE /ml ดังแสดงในตาราง 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และ % Inhibition ของสารสกัดจากดอกดาหลาที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

[Extract]	5 min		10 min		20 min		30 min		40 min	
($\mu\text{g/ml}$)	A_{515}	% IHB	A_{515}	% IHB	A_{515}	% IHB	A_{515}	% IHB	A_{515}	% IHB
20	0.607	36.41	0.336	44.65	0.286	52.88	0.251	58.65	0.225	62.93
50	0.802	51.37	0.275	65.71	0.153	80.92	0.099	87.66	0.072	90.10
100	0.727	69.19	0.097	86.66	0.048	93.40	0.043	94.08	0.041	94.89
300	0.868	92.97	0.053	93.89	0.048	94.47	0.047	94.58	0.047	94.58
500	0.838	92.12	0.068	88.71	0.070	91.65	0.070	91.65	0.070	91.65

ตารางที่ 4.7 ค่า IC_{50} ของสารสกัดจากดอกดาหลา

เวลา	สมการ	IC_{50} (μg GAE /ml)
5 min	$y = 18.793\text{Ln}(x) - 19.658$	40.71
10 min	$y = 15.264\text{Ln}(x) + 3.9941$	20.37
20 min	$y = 11.525\text{Ln}(x) + 26.655$	7.58
30 min	$y = 9.5876\text{Ln}(x) + 39.394$	3.02
40 min	$y = 7.6767\text{Ln}(x) + 50.855$	0.89



รูปที่ 4.11 กราฟแสดง % การยับยั้งของสารสกัดจากดอกดาหลา
ณ ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ

6. ผลการทำบริสุทธิ์สารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดดอกดาหลาด้วยตัวทำละลาย

จากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดจากดอกดาหลานั้นมีปริมาณสูง (2,673 mg GAE/100 g fresh weight) เมื่อนำมาหยดบนแผ่น TLC ทำให้สารแยกกันได้ไม่ดีเท่าที่ควร ผู้วิจัยจึงนำสารสกัดที่ได้นั้นมาสกัดอีกครั้งด้วยตัวทำละลาย 2 ตัวคือ Dichloromethane และ Ethyl Acetate และนำไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอีกครั้งดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากตัวทำละลาย Dichloromethane และ Ethyl Acetate

[Phenolic] mg GAE/100 g FW* in acetone**	[Phenolic] mg GAE/100 g FW in Dichloromethane**	[Phenolic] mg GAE/100 g FW in Ethyl acetate**
2,673	150.60	150.70

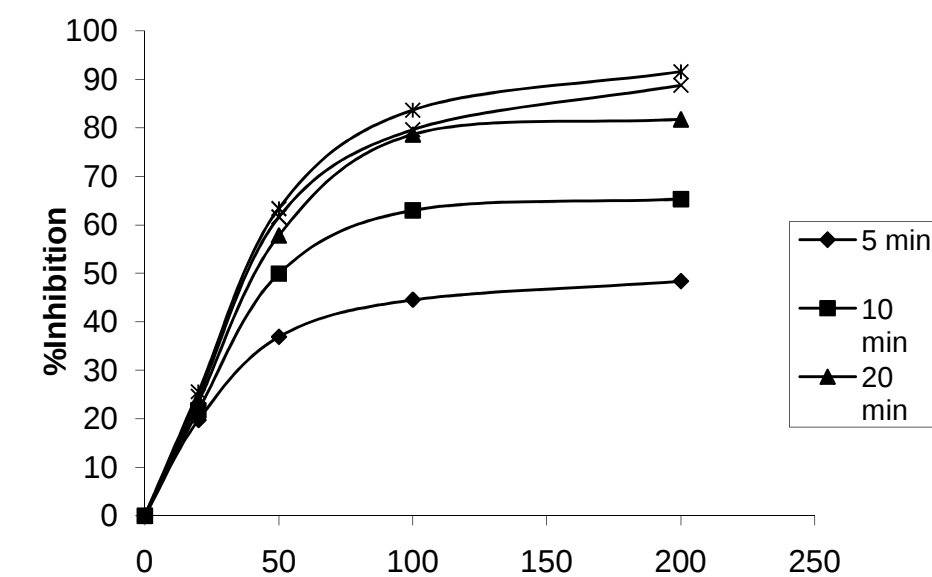
**หมายเหตุ ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 2 ครั้ง

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.8 จะพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด (Dichloromethane และ Ethyl acetate) ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ใกล้เคียงกัน คือ 150.60 mg GAE/100 g fresh weight และ 150.70 mg GAE/100 g fresh weight ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 2 มาวัดค่าการดักจับอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ซึ่งแสดงตามตาราง 4.9 พบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากตัวทำละลาย Ethyl Acetate จะให้สารประกอบฟีนอลิกที่มี Activity ในการดักจับอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ที่ดีกว่าสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากตัวทำละลาย Dichloromethane สังเกตได้จากกราฟในรูปที่ 4.12 และ รูปที่ 4.13 โดยกราฟความสามารถการดักจับอนุมูลที่ได้นั้นจะต้องมีความเข้มข้นของสารสกัดที่ต่ำและทำงานได้ดีที่เวลาน้อย ๆ

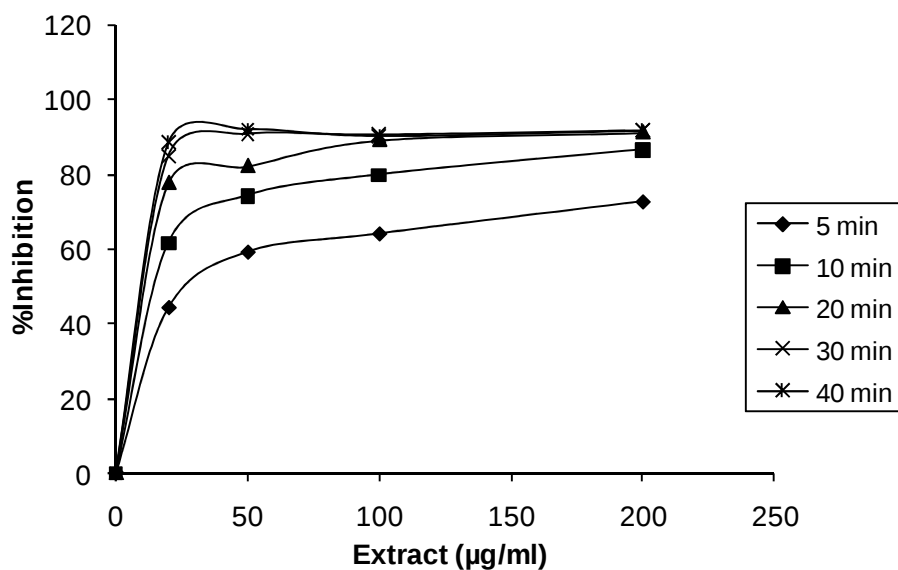
ตารางที่ 4.9 ค่า IC_{50} ของสารประกอบฟีนอลิกในตัวทำละลาย Dichloromethane และ Ethyl Acetate

เวลา	IC_{50} ใน Dichloromethane	IC_{50} ใน Ethyl Acetate
5 min	242.94	38.95
10 min	58.90	12.30
20 min	45.50	11.19
30 min	41.17	8.02
40 min	38.58	6.33

จากตาราง 4.9 ทำให้ทราบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากตัวทำละลาย Dichloromethane นั้น แม้ว่าจะมีปริมาณมากแต่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระชนิด $DPPH^{\bullet}$ ได้น้อยหรืออาจหมายความว่ามีความได้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ได้ดีกว่า



รูปที่ 4.12 กราฟ Activity ของสารสกัดจากดอกดาหลาใน Dichloromethane

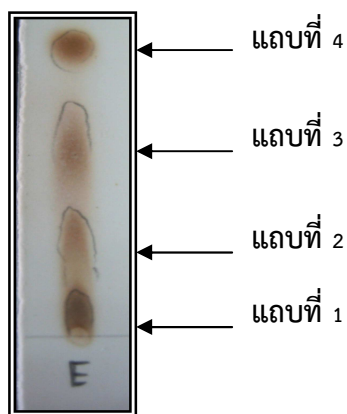


รูปที่ 4.13 กราฟ Activity ของสารสกัดจากดอกดาหลาใน Ethyl Acetate

จากรูป 4.12 และ รูป 4.13 เป็นกราฟแสดง Activity ของสารสกัดในตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด ณ เวลาต่าง ๆ กันคือ ทุก 5 นาทีจนครบ 40 นาที จากรูปกราฟที่ได้มานั้น ทำให้ทราบว่าสารสกัดจากดอกดาหลาในตัวทำละลายทั้ง 2 มี Activity ที่ต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยดูจากลักษณะการโค้ง และการคงที่ของกราฟ คือ สารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย Dichloromethane นั้นจะต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดมากกว่าในตัวทำละลาย Ethyl Acetate ในการต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ผู้วิจัยจึงนำสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย Ethyl Acetate เท่านั้นไปศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC ต่อไป

7. ผลจากการทำให้บริสุทธิ์สารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี TLC

หลังจากการทำให้บริสุทธิ์สารสกัดดอกดาหลาด้วยตัวทำละลาย Dichloromethane และ Ethyl Acetate แล้วนั้น ขั้นตอนต่อไปคือการนำสารสกัดที่ได้นั้นไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC จากการทดลองพบว่า สารสกัดดอกดาหลาในตัวทำละลาย Ethyl Acetate จะให้แถบของสารออกมา 4 แถบ ดังแสดงในรูปที่ 3.40 จากผลการทดลองทำให้ทราบว่า สารสกัดในตัวทำละลาย Ethyl Acetate ประกอบด้วยสารฟีนอลิก 4 ชนิดเป็นอย่างต่ำ โดยในแถบที่ 1 มีสีที่เข้มอาจมีสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น ๆ เจือปนอยู่อีก



รูปที่ 4.14 การแยกแถบสารสกัดดอกดาหลาในตัวทำละลาย Ethyl Acetate

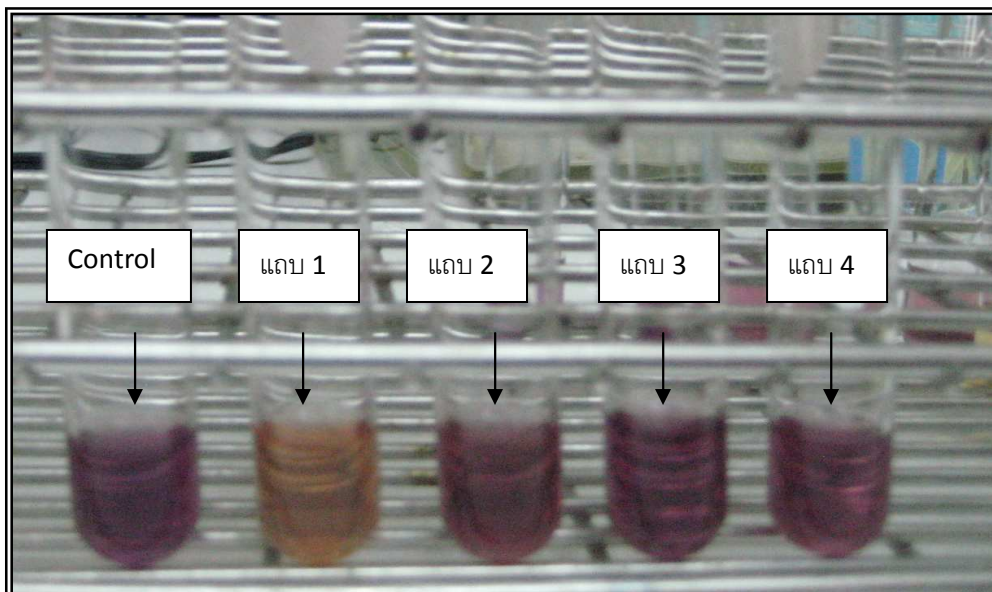
หยดสารสกัดลงบน TLC Plate รอให้แห้งแล้วนำมาแช่ในตัวเคลื่อนที่

Hexane: Chloroform: Methanol อัตราส่วน 2: 6: 2 โดยปริมาตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

หลังจากได้แถบการแยกของสารในตัวทำละลาย Ethyl Acetate แล้ว ผู้วิจัยได้นำแถบที่ได้ทั้งหมดนั้นไปวิเคราะห์เพื่อวัดหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.15

ตารางที่ 4.10 แสดงค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในแถบสารต่าง ๆ บน TLC

ตัวอย่าง	[phenolic] ($\mu\text{g GAE/ml}$)
แถบที่ 1	327.476
แถบที่ 2	54.381
แถบที่ 3	27.476
แถบที่ 4	32.238



รูปที่ 4.15 การทดสอบความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$
ด้วยสารที่ได้จากแถบบน TLC

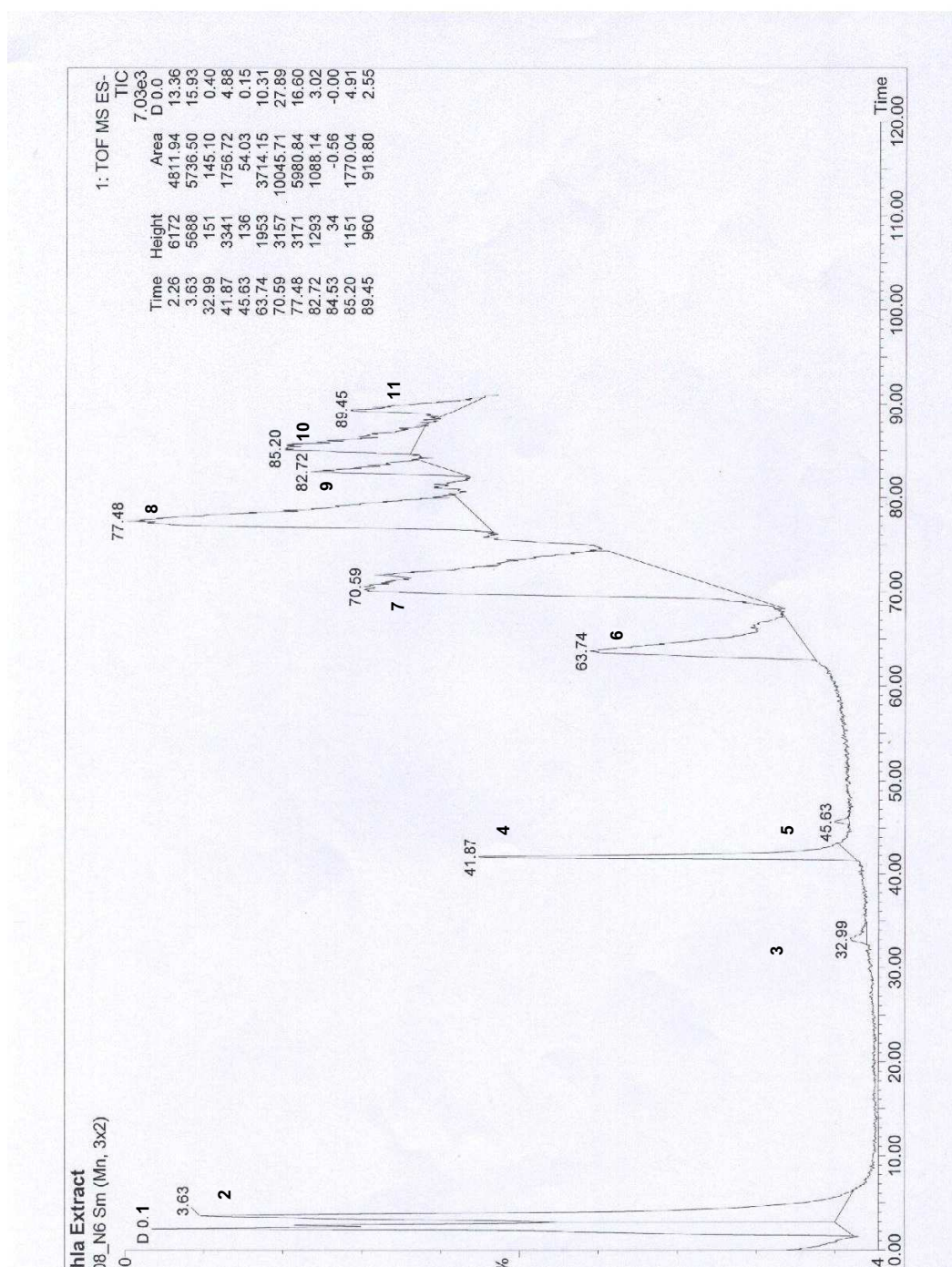
จากรูปที่ 4.15 ทำให้ทราบว่าแถบสารบน TLC ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ได้นั้น เป็นแถบสารบนแถบที่ 1 ซึ่งจะเห็นได้จากรูปด้านบนว่า หลังจากเวลาผ่านไป 15 นาที สารในหลอดที่ 2 (แถบที่ 1) สามารถเปลี่ยนสีของสารละลาย $DPPH^{\bullet}$ ซึ่งมีสีม่วงให้จางลงเรื่อย ๆ จนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองใสถาวร แสดงว่าสารในแถบที่ 1 มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ สูงที่สุด

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ผู้วิจัยจึงทำการขูดสารแถบที่ 1 บน TLC ไปศึกษาหาคุณสมบัติของสารต่อไปด้วยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรสโกปี (Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy, LC-MS)

8. ผลการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ด้วยเครื่อง Mass Spectrometer

หลังจากที่ทำบริสุทธิ์อย่างหายาด้วยวิธี TLC และนำมาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแล้วนั้น เห็นว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้นั้นมีปริมาณที่มากกว่าปริมาณที่ได้จากแถบอื่นอย่างเห็นได้ชัด (ตารางที่ 4.10) อาจเป็นไปได้ว่ายังมีสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่น ๆ ปะปนอยู่อีกคือ ความบริสุทธิ์ยังไม่มากนัก ผู้วิจัยจึงนำตัวอย่างที่ได้จาก TLC มาทำบริสุทธิ์ต่ออีกขั้นด้วยวิธี LC แล้วนำไปวิเคราะห์กลุ่มของสารที่สนใจด้วยวิธี MS พบว่า โครมาโทแกรมซึ่งเป็นกราฟแสดงการแยกของสารที่ได้นั้นยังมีสารอีกจำนวนมากที่ยังรวมกันอยู่หลังจากทำบริสุทธิ์อย่างหายาด้วยวิธี TLC แล้ว ดังรูปที่ 4.16 จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าในสารสกัดจากดอกดาหลานั้นมีสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดรวมกันอยู่

จากรูปที่ 4.16 จะเห็นว่า พีคที่ 1 3 7 9 10 และ 11 นั้นให้พีคที่แสดงถึงความไม่บริสุทธิ์เพียงพอ หากที่จะนำมาพิจารณาของกลุ่มของสารได้ ส่วนพีคที่ 2 4 5 และ 6 เป็นพีคที่นำมาพิจารณามวลของสารได้พอสมควร ผู้วิจัยจึงนำพีคที่ได้มาจากการวิเคราะห์ผ่าน MS นี้มาเปรียบเทียบกับกลุ่มของสารฟีนอลิกในพืชของการศึกษาก่อนหน้านี้ ตามตารางที่ 4.11



รูปที่ 4.16 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดจากดอกดาหลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Liquid Chromatography ก่อนจะเข้าสู่เครื่อง Mass spectrometer

เมื่อสารตัวอย่างผ่านการแยกด้วยเครื่อง LC แล้วจะผ่านเข้าสู่เครื่อง MS เพื่อทำการวิเคราะห์มวลของสารตัวอย่างดังกล่าว หลังจากนั้นเมื่อทำการอ่านค่าที่ได้จากโครมาโทแกรมแล้วพบว่าสารประกอบส่วนใหญ่ที่ได้นั้นน่าจะเป็นสารประกอบประเภท Flavonoid compound เนื่องจากมวลของสารที่ได้นั้นมีค่าสูง ควรจะประกอบไปด้วยโครงสร้างวงแหวนอย่างต่ำ 3 วงแหวนซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลิกจำพวก Flavonoid compound ได้เคยมีการศึกษาสรรพคุณทางยาของพืชซึ่งเป็นพืชในกลุ่มเดียวกันกับดอกดาหลาพบว่าสารประกอบที่พบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยทั่วไปจะมีโมเลกุลของน้ำตาลเกาะติดอยู่ด้วยเสมอทำให้มวลที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนใหญ่มีค่าสูง (<http://www.rx12.wsnhosting.com/herb/king.html>)

ตารางที่ 4.11 การศึกษาสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Mass Spectrometer

Compounds	MW	MS	MS/MS	Reference
Procyanidin trimer	866	865	695, 577, 407, 287, 289 301, 447, 373, 271, 255	Seeram <i>et al.</i> , 2005
Rutin	610	609	245, 206, 205, 272 165	Seeram <i>et al.</i> , 2005
Epicatechin	290	289		Bystrom <i>et al.</i> , 2008
<i>p</i> -Coumaric cinnamyl ester	282	267	245 257, 229	Gardana <i>et al.</i> , 2005
Catechin	290	289	265, 187, 163, 145	Bystrom <i>et al.</i> , 2008
Ellagic acid	302	301	312, 297, 342	Seeram <i>et al.</i> , 2005
<i>p</i> -Coumaroyl-glycoside	326	325	295, 235	Seeram <i>et al.</i> , 2005
Syringic acid	342	327	301, 179, 151	Proestos <i>et al.</i> , 2005
Ferulic acid derivative	398	397	301, 179, 151	Bystrom <i>et al.</i> , 2008
Methyl-EA-pentose	448	449	301, 179, 151	Seeram <i>et al.</i> , 2005
Quercetin-glucoside	464	463	725, 549, 255, 135	Seeram <i>et al.</i> , 2005
Quercetin-rutinoside	610	609	481, 301, 257, 229	Seeram <i>et al.</i> , 2005
Licorice glycoside A	726	725	898, 633, 463, 301,	Zheng <i>et al.</i> , 2008
Gallotannin/Ellagitannin	784	783	257, 229	Seeram <i>et al.</i> , 2005
Galloyl-HHDP-glucoside	936	935	1567, 1265, 935, 633, 301, 257, 229	Seeram <i>et al.</i> , 2005
Sanguin-H6	1870	1869		Bystrom <i>et al.</i> , 2008

จากการนำมาวิเคราะห์ผลนั้นทำให้ทราบว่าสารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากดอกดาหลาน่าจะเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ส่วนจะเป็นสารชนิดใด มีโครงสร้างอย่างไร ควรที่ใช้วิธีการวิเคราะห์หลาย ๆ วิธีเพื่อยืนยันผลที่ได้ เช่น วิธี Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Infared Spectrometer (IR) และ Ultraviolet Spectrometer (UV) เป็นต้น เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืชมีหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดก็มีค่าความแตกต่างของมวลเพียงเล็กน้อยเท่านั้นทางผู้วิจัยจะมีการศึกษาต่อไปอย่างต่อเนื่องต่อไป

บทที่ 5

สรุป

จากการศึกษาหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ในสารสกัดดอกดาหลา ในงานวิจัยนี้สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. สามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเบต้า-แคโรทีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และวิเคราะห์ผลโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงหรือ HPLC จากดอกดาหลาได้ในปริมาณน้อย คือ $2.096 \mu\text{g} / 100 \text{ g fresh weight}$ แม้จะเป็นพืชที่มีสีเข้มอาจเนื่องมาจากมีเม็ดสีอื่นที่ไม่ใช่เบต้า-แคโรทีนเป็นองค์ประกอบ

2. สามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระชนิดวิตามินอีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และวิเคราะห์ผลโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงหรือ HPLC จากดอกดาหลาได้ $62.03 \mu\text{g} / 100 \text{ g fresh-weight}$ เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับการศึกษาในพืชชนิดอื่น ๆ พบว่าปริมาณวิตามินพบมากในส่วนใบของพืช

3. สามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระชนิดวิตามินซีด้วย 1% กรดฟอสฟอริก โดยปริมาตร และวิเคราะห์ผลโดยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงหรือ HPLC จากดอกดาหลาได้ $89.68 \text{ mg}/100 \text{ g wet weight}$ ซึ่งถือว่ามีค่าสูงระดับหนึ่ง อาจเนื่องจากวิตามินซีสามารถพบได้ในพืชที่มีรสชาดเปรี้ยว และฝาด

4. สามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระชนิด Phenolic compounds ด้วย 80% Acetone จาก ดอกดาหลา ได้ $2,673 \text{ mg GAE}/100\text{g fresh weight}$

5. เมื่อนำสารสกัดจากดอกดาหลามาศึกษาความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ แล้วพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที สารสกัดจากดอกดาหลามีค่าความสามารถในการดักจับสูงเท่ากับ $3.02 \mu\text{g GAE}/\text{ml}$ โดยวัดจากค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าที่ทำให้อนุมูล $DPPH^{\bullet}$ ดูดกลืนแสงได้ลดลง 50% และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ BHT ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยตรงแล้วมีค่าไปในทางเดียวกัน

6. การศึกษาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่มีในสารสกัดจากดอกดาหลาโดยการทำบริสุทธิ์สารด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิด Dichloromethane และ Ethyl Acetate พบว่า สารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย Ethyl Acetate ให้ค่าความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ได้ดีกว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย Dichloromethane

7. จากการแยกสารประกอบด้วยวิธี TLC ของสารสกัดจากดอกดาหลาในตัวทำละลาย Ethyl Acetate พบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกรวมกันอยู่อย่างน้อย 4 ชนิด โดยสารในแถบที่ 1 (แถบล่างสุด) ให้ค่าความสามารถการดักจับอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ได้เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที

8. เมื่อนำสารสกัดดอกดาหลาในตัวทำละลาย Ethyl Acetate ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC จากแถบที่ 1 มาศึกษาหาโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกชนิดนั้น ๆ ด้วยวิธี LC-MS พบว่ายังมีสารประกอบฟีนอลิกอีกจำนวนมากรวมกันอยู่ในสารสกัดจึงยากที่จะระบุได้ว่าสารตัวไหนที่มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ *DPPH*• อย่างแท้จริง

9. ในการวิจัยครั้งนี้จึงสามารถระบุได้ว่าสารสกัดจากดอกดาหลาที่มีความสามารถในการดักจับ *DPPH*• นั้นน่าจะเป็นสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่ม Flavonoid compounds เนื่องจากโครมาโทแกรมจาก MS ที่ได้นั้นมีมวลของสารสูง การที่จะศึกษาว่าสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากดอกดาหลาตัวใดบ้างที่มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ *DPPH*• นั้นสามารถทำได้ด้วยการทำสารให้บริสุทธิ์อย่างสูงสุดแล้วจึงศึกษาในเชิงลึกต่อไปโดยผ่านขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ NMR, IR, UV และ MS ถึงจะได้โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกดังกล่าวอย่างแท้จริง

บทที่ 6

บรรณานุกรม

- รัตนา สัมพันธจิต และ ธารารัตน์ ศุภศิริ. 2546. การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของผักและไม้ไทย 4 ชนิด. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- วัลยา เนาวรัตน์วัฒนา และ พิชรี บุญศรี. 2542. โปรออกซิแดนซ์: อีกโฉมหน้าของแอนติออกซิแดนซ์. ว.วิทยาศาสตร์. 53(3): 196-198.
- Akyon Y. 2002. Effect of antioxidants on the immune response of *Helicobacter pylori*. Chin Microbiol Infect. 8, 438 – 441.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90, 7915-7922.
- Banerjee, A., Dasgupta, N., & De, B. 2005. *In vitro* study of antioxidant activity of Syzygium cumini fruit. J. Food Chemistry. 90, 727 – 733.
- Braca, A., Nunziatina, De Tommasi, Lorenzo, De Bari, Cosimo, Pizza, Mateo, Politi & Ivano, Morelli. 2001. Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. J. Natural Products. 64, 276 – 287.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technol 20, 25 – 30.
- Burton, G. W. and Traber, M. G. 1990. Vitamin E antioxidant activity biokinetics and bioavailability. Annu. Rev. Nutr. 10, 357-382.
- Duncan, A. M. 2004. The role of nutrition in the prevention of breast cancer. AACN Clinical. 15, 119 – 135.
- Fardet, A., Rock, E. and Rémésy. C. 2008. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? J. Cereal Science. 48(2), 258-276
- Frankel, E. N., Bosanek, C. A., Meyer, A. S., Siliman, K. and Kirk, L. L. 1998. Commercial grape juices inhibit the *in vitro* oxidation of human low-density lipoproteins. J. Am. Oil Chem. Soc. 46, 834-838.

- Gordon, M. 2001. The development of oxidative rancidity in foods. In J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon (eds.), *Antioxidants in food: practical applications*. 7-21. New York: CRC Press.
- Hakimuddin, F., Paliyath, G. and Meckling, K. 2004. Selective cytotoxicity of a red grape Wine flavonoid fraction against MCF-7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. 85, 65 – 79.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., Arouma, O. I. 1995. The characterization of antioxidants. *J. Food Chem. Toxic.* 33, 601-617.
- Halliwell, B. 1999. Antioxidant defense mechanism: from the beginning to the end. (of the beginning). *Free Rad. Res.* 31, 261-272.
- Hsieh, T. J., Lui, T. Z., Chia, Y. C., Chern, C. L., Chuang, M. C., Mau, S. Y. 2004. Protective effect of methyl gallate from *Toona sinensis* (Meliaceae) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage in MDCK cells. *Food and Chemical Toxicology*. 42, 843-850.
- http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_peroxidation
- <http://www.kruaklaibaan.com>
- <http://www.microscopy.ahs.chula.ac.th/Micros/NEWS/antioxidant.htm>
- Huang, Yu-Ching., Chang, Yung-Ho. and Shao, Yi-Yuan. 2006. Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan. *J. Food Chemistry*. 98(3), 529-538.
- Kurilich, A.C., Tsau, G.J., Brown, A. 1999. Carotene, Tocopherol and Ascorbate contents in subspecies of *Brassica oleracea*. *J. Agri. Food Chem.* 47(4), 1576 – 1581.
- Kusznierewicz, B., Smiechowska, A., Bartoszex, A., namiesnik, J. 2008. The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage. *J. Food. Chem.* 108, 853-861.
- Nair, U., Bartsch, H., and Nair, J. 2007. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: A review of published adduct types and levels in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 1109-1120.
- Prakash, D., Singh, B. N., and Upadhyay, G. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of phenol from onion(*Allium cepa*). *J. Food chemistry*. 1389-1393.
- Puerta, T. 1999. Inhibition of leukocytes lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *J. Biochem. Pharm.* 57(4), 445-449

- Rajalakshmi, D. and Narasimhan. 1996. Food antioxidants: Sources and method of evaluation. In: D. L. Madhavi, S. S. Deshpande and D. K. Salunkhe (eds.). Food Antioxidants, 5-64. New York: Marcel Dekker.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. 1996. Structure antioxidant activity relationship of flavonoid and phenolic acid. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 20(7), 933-956.
- Sanchez-Moreno, C, Jimenez-Escoria, A. and Saura-Calixto. J. 2000. Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutr. Res*. 20(7), 941-953.
- Sherwin, E. R. 1990. Antioxidants In A. Bromen, P. M. Daidson and S. Salmine (eds.), Food additive, 139-193. New York.
- Shetty K. 1997. Biotechnology to Harness the benefits of dietary phenolic: focus on Lamiaceae. *Asia Pacific. J. Clin Nutr*. 6, 162 – 171.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress, oxidants and antioxidants. New York: Academic Press.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 299, 152-178.
- Soares, J. R., Dins, T. C. P., Cunha, A. P., & Ameida, L. M. 1997. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free radical Research*. 26. 469 – 478
- Stamler, J. S., Single, D. J. and Loscalzo, L. 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science*. 258, 1898-1902.
- Suntornsuk, L., Gritsanapun, W., Nilkamhank, S and Paochom, A. 2002. Quantitation of vitamin C content in herbal juice using direct titration. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 28(5), 849-855.
- Van Acker, F. A. A., *et. al.*, 2000. Flavanoid can replace alpha-tocopherol as an antioxidant. *FEBS Lett*. 473, 145-148.
- Vinson, Joe A. and Dabbagh, Yousef A. 1998. Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrition Research*. 18(6), 1067-1075.
- Weber, P., Bendich, A., Machlin, L., 1987. Vitamin E and Human health: rationale for determining recommended intake levels. *Nutrition*. 13, 450 – 460.

- Williamson, G., Day, J. A., Plumb, G. W. and Couteau, D. 2000. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *J. Biochemical Society Transaction*. 28(2), 16-22.
- Yamazaki, E., Inagaki, M., Kurita, O., Inoue, T. 2007. Antioxidant activity of Japanese peppers (*Zanthoxylum piperitum* DC.) fruit. *J. Food. Chem.* 100, 171-177.
- Yen, G. C., Chen, H. Y., 1995 antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food. Chem.* 43, 27-37.
- Yang, J-H., Mau, J-L., Ko, P-T. and Huang, L-C. 2000. Antioxidant properties of fermented soybean broth. *J. Food Chem.* 71, 249-254.
- Yi Fang Chu and Xianzona Wu (2002). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. pp. 381-385.

ภาคผนวก

การเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์

1. 7% Na_2CO_3 โดยมวลต่อปริมาตร

ชั่ง Na_2CO_3 35 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร คนตลอดเวลาจนสารละลายหมดได้สารละลายใสไม่มีสี ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตรด้วยขวดวัดปริมาตร เก็บไว้ในขวดสีชาขนาด 500 มิลลิลิตร แช่ไว้ในตู้เย็น

2. เตรียมสารมาตรฐาน Gallic acid ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐาน Gallic acid 30 มิลลิกรัม ละลายใน absolute Ethanol 1.5 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 20 mg/ml เก็บไว้ในภาชนะห่อฟรอยด์ หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วย 95% Ethanol ด้วยวิธี Serial Dilution ให้ได้ 4 ความเข้มข้น เก็บไว้ในตู้เย็น

3. เตรียมสารมาตรฐาน β -carotene ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐาน β -carotene 7.5 มิลลิกรัม ละลายในคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ในภาชนะห่อฟรอยด์ หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วย Tetrahydrofuran ให้ได้ความเข้มข้น 3.0 – 60 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

4. เตรียมสารมาตรฐาน α -tocopherol ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐาน α -tocopherol 5 มิลลิกรัม ละลายใน absolute Ethanol 5 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ในภาชนะห่อฟรอยด์ หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วย Tetrahydrofuran ให้ได้ความเข้มข้น 20 - 400 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

5. เตรียมสารมาตรฐาน Vitamin C ความเข้มข้น 2 กรัม / มิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐาน Vitamin C 2 กรัม ละลายใน 1% กรดฟอสฟอริก 1 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 2 กรัม / มิลลิลิตร เติม 5% DDT 1 มิลลิลิตร ป้องกันการสลายตัว ในภาชนะห่อฟรอยด์ หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วย 1% กรดฟอสฟอริก ให้ได้ความเข้มข้น 0.08 – 0.90 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

6. เตรียมสารละลาย *DPPH*[•] ความเข้มข้น 0.05 mM 50 มิลลิตร

ชั่ง *DPPH* 0.001 กรัม ละลายใน absolute Ethanol 50 มิลลิตรได้ความเข้มข้น 50 mM *DPPH* ในขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น

หมายเหตุ : การเตรียมสารละลาย *DPPH*[•] ควรเก็บไว้ใช้แค่ 2 – 3 วันเท่านั้น ในการเตรียมแต่ละครั้งจะเตรียมในปริมาณน้อย

7. เตรียมสารละลาย BHT สำหรับเป็น Positive control

ชั่ง BHT 0.055 g ละลายใน absolute Ethanol 50 g ได้ความเข้มข้น 0.1 mM ในขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น

หมายเหตุ : สารละลาย BHT ใช้เพื่อเป็น Positive control ในการศึกษาความสามารถการดักจับอนุมูลอิสระในสารละลาย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ สกุล	นางสาวปิยศิริ สุนทรนนท์ นางสาวอุบล ตันสม ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมภพ เกาทอง
สาขาวิชา	เคมี
ทุนวิจัย	ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณการศึกษา สำหรับอาจารย์ ปีการศึกษา 2554 จากสถาบันวิจัยและพัฒนาชายแดนภาคใต้