

รายงานการวิจัย

สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและ  
ผลของน้ำตาล ชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน  
ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงและหมูแผ่น

Antioxidant properties of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract  
and its antioxidant efficiency in Chinese style sausages and pork chips  
as affected by various types of sugar

RCM

QD

63

.09

ป 319 ส

นาย ประพันธ์ ปันศิริโรดม

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน 116968

วัน,เดือน,ปี 21 ส.ย. 2554

b. 123303314  
i. ....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2551

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องสมบัติการต้านปฏิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและผลของ น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงและหมูแผ่น ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2551 ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณสุภามาส มุสิกะ ผู้ช่วยวิจัยที่มีส่วนให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการให้บริการมาโดยตลอด



ประพันธ์ ปิ่นศิริโรตม  
หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ชื่อโครงการ** สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงและหมูแผ่น

Antioxidant properties of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract and its antioxidant efficiency in Chinese style sausages and pork chips as affected by various types of sugar

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2551

จำนวนเงิน 198,800 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2550 ถึง กันยายน 2551

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสเปรียบเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ต่อประสิทธิภาพของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ 2 ชนิด คือ กุนเชียงและหมูแผ่น จากการวิเคราะห์ปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีปริมาณสารประกอบ โพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมด  $21.39$  และ  $0.45 \pm 0.08$  มิลลิกรัม/กรัม ในรูปของกรดแกลลิกและไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ และการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดคลิโนเลอิกโดยวิธี FTC ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ การต้านอนุมูลอิสระ DPPH การทำลาย  $H_2O_2$  และการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}OH$  ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินซีและโทรลอกซ์ พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ได้ใกล้เคียงกับโทรลอกซ์ แต่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH การทำลาย  $H_2O_2$  และการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}OH$  น้อยกว่าวิตามินซีและโทรลอกซ์

จากการศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในกุนเชียงและหมูแผ่นดิบ โดยเติมน้ำตาลซูโครสในกุนเชียงและหมูแผ่น ที่ระดับความเข้มข้น 0, 7, 13, 16 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากนั้นวิเคราะห์ค่า TBARS ของกุนเชียงและหมูแผ่นดิบ ในระหว่างการเก็บรักษาโดยบรรจุแบบสุญญากาศในถุงพลาสติกชนิด nylon/LLDPE ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  เซลเซียส) เป็นเวลา 28 วัน พบว่า การเติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงลงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหรือหมูแผ่นในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครส จะทำให้ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลง กล่าวคือ ระดับของน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาสูงขึ้นมากกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมน้ำตาลซูโครส เมื่อเปรียบเทียบผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร

สกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียง โดยเติมสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเติมน้ำตาลต่างชนิดกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลไซลิทอล ที่ระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน คือ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่า น้ำตาลซูโครสมีผลทำให้ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงลดลงมากที่สุด รองลงมาคือ กลูโคส ในขณะที่ไซลิทอล ซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ไม่มีผลต่อการลดประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียง

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate antioxidant properties of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract and its antioxidant efficiency in raw Chinese sausages and pork chips as affected by sucrose contents compared to other sugars. Total polyphenol and total anthocyanin contents in roselle extract were analyzed. The total contents of polyphenols and anthocyanins in the extract were 21.39 and  $0.45 \pm 0.08$  mg/g extract expressed as gallic acid and cyanidin-3-glucoside, respectively. The roselle extract was then evaluated for its antiradical and antioxidant properties using different approaches; including DPPH free radical scavenging activity,  $^{\circ}\text{OH}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  scavenging activity as well as inhibition of linoleic acid oxidation by ferric thiocyanate colorimetric method (FTC). Results showed that, the extract exhibited the highest capacity in inhibition of linoleic acid oxidation, following by DPPH free radical,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $^{\circ}\text{OH}$  scavenging activity, respectively. Comparing to vitamin C and trolox, a capacity of the roselle extract to inhibit linoleic acid oxidation was similar to that of trolox, while all other antioxidant activities evaluated were relatively lower than those of both vitamin C and trolox.

Antioxidant efficiency of the roselle extract in raw Chinese sausages and pork chips as affected by sucrose contents at the concentration of 0, 7, 13, 16 and 20 %w/w were investigated by measuring changes in TBARS values during storage. The raw Chinese sausages and pork chips were vacuum-packed in laminate nylon/LLDPE bags and stored at room temperature ( $30 \pm 3$  °C). During 28-day storage, a decreased antioxidant efficiency of the roselle extract in the two products towards an increase of sucrose contents was observed. The increased TBARS values of the Chinese sausage and pork chip samples were found to correlate with high concentration of sucrose contents. Effects of different sugars; glucose, sucrose and xylitol, added to the raw Chinese sausages on the antioxidant capacity of the roselle extract were studied. Comparing to glucose, addition of sucrose in the products resulted in greater reduction in antioxidant efficiency; whereas xylitol exhibited no influence on the antioxidant property of the roselle extract.

# สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	I
บทคัดย่อภาษาไทย.....	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญรูป.....	VII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 กระเจียบแดง.....	4
2.2 อนุมูลอิสระ.....	6
2.3 สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน.....	6
2.4 สารประกอบฟีนอลิก.....	7
2.5 สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่พบในกระเจียบแดง.....	8
2.6 ผลของน้ำตาลต่อแอนโทไซยานิน.....	11
2.7 วิธีวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตัวอย่าง.....	13
2.8 ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์กึ่งแห้ง.....	15
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดจากกระเจียบแดง.....	16
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง.....	18
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	18
3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง.....	19
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	25
4.1 ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ในสารสกัดกระเจียบแดง.....	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ สารสกัดกระเจี๊ยบแดง.....	26
4.3 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ สารสกัดกระเจี๊ยบแดง.....	31
4.4 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในกุนเชียงและหมูแผ่น.....	33
4.5 ผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในกุนเชียง.....	37
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	39
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	39
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	40
บรรณานุกรม.....	41
ภาคผนวก.....	45
ภาคผนวก ก. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol contents) และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (total anthocyanin contents).....	46
ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol contents) และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (total anthocyanin contents).....	52
ภาคผนวก ค. การวิเคราะห์ค่า TBARS.....	63

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 โครงสร้างหลักของแอนโรไซยานิดิน.....	9
3.1 ส่วนผสมสำหรับกุนเชียง.....	21
3.2 ส่วนผสมสำหรับหมูแผ่น.....	22
4.1 ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโรไซยานินทั้งหมดในสารสกัด กระเจี๊ยบแดงและกระเจี๊ยบแดงแห้ง.....	25
4.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $^{\circ}\text{OH}$ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับ ความเข้มข้นต่างกัน.....	27
4.3 ความสามารถในการทำลาย $\text{H}_2\text{O}_2$ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน .....	29
4.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบ ต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง.....	30



# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างฟลาวิลียม แคทไอออน (flavylum cation).....	9
2.2 โครงสร้างของเคลฟีนิดิน-3-แชนมูไบโอไซด์และไซยานิดิน-3-แชนมูไบโอไซด์ ที่พบในกระเจียบแดง.....	10
2.3 โครงสร้างของเคลฟีนิดิน-3-กลูโคไซด์และไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ที่พบใน กระเจียบแดง.....	10
2.4 โครงสร้างของไฮบิซิทีนและไฮบิซิทริน.....	11
2.5 โครงสร้างของกรดโปรโตแคทีชวอิก.....	11
2.6 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่ออัตราการสลายตัวของเพลาร์โกนิน-3- กลูโคไซด์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส .....	12
4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ของสารละลายปฏิกิริยากับ เวลาในการเกิดปฏิกิริยาในการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด กระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน.....	26
4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร กับเวลาใน การเกิดปฏิกิริยาของสารละลายปฏิกิริยาในการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยา ออกซิเดชัน โดยวิธี FTC ของสารสกัดกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน.....	28
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร กับเวลาใน การเกิดปฏิกิริยาของสารละลายปฏิกิริยาในการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยา ออกซิเดชัน โดยวิธี FTC ของสารสกัดกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล ซูโครสต่าง ๆ กัน.....	32
4.4 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาคุณภาพเชิงคิบที่เติมสารสกัด จากกระเจียบแดง 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ต่างกัน.....	33
4.5 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาคุณภาพเชิงคิบที่เติมสารสกัด จากกระเจียบแดง 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ต่างกัน.....	34
4.6 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาคุณภาพเชิงคิบที่เติมน้ำตาลซูโครส ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยไม่มีการเติมสารสกัดกระเจียบแดง. ....	36

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาอุณหภูมิที่เดิมสารสกัดจาก กระเจี๊ยบแดง 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในสภาวะที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน.....	37
ก 1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด.....	49
ก 2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานินเมื่อพีเอชในสารละลายเปลี่ยนไป.....	49
ข 1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย DPPH.....	54
ข 2 ปริมาณ DPPH ที่เหลือ เมื่อใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	55
ข 3 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $^{\circ}\text{OH}$ เมื่อใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดง ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน.....	57
ข 4 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี FTC ของ สารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน.....	60
ข 5 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลาย $\text{H}_2\text{O}_2$ เมื่อใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับ ความเข้มข้นต่างกัน.....	62

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มา

อาหารเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญในการดูแลสุขภาพ ปัจจุบันพบว่าการบริโภคพืชผักผลไม้ต่าง ๆ เป็นประจำมีส่วนช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น (Yeum *et al.*, 2003) สาเหตุเบื้องต้นสำคัญของการเกิดโรคร้ายแรงต่าง ๆ นั้นส่วนหนึ่งมีสาเหตุมาจากภาวะถูกออกซิไดซ์จนเกินสมดุล หรือ “oxidative stress” ซึ่งเป็นภาวะที่เกิดความไม่สมดุลขึ้นระหว่างการเกิดอนุมูลอิสระและกระบวนการป้องกันโดยเอนไซม์และสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์หรือร่างกาย (Prenesti *et al.*, 2007) โดยเกิดมีอนุมูลอิสระและสารเกี่ยวข้องที่เป็นผลผลิตของอนุมูลอิสระที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาในปริมาณที่สูงเกินกว่าที่กระบวนการป้องกันจะกำจัดได้ทัน ส่งผลให้สมบัติของชีวโมเลกุลเปลี่ยนไป อาหารประเภทผักและผลไม้ นอกจากจะมีเส้นใยอาหารสูงแล้วยังเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมี (phytochemical) หลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ หรือต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี สารต้านอนุมูลอิสระที่พบเป็นส่วนใหญ่ในผักผลไม้ ได้แก่ กลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ที่มีมากมายหลายชนิด (Rhodes, 1996) โดยฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มใหญ่ที่กำลังได้รับความสนใจมาก ตัวอย่างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ฟลาโวน (flavone) ฟลาโวนอล (flavanol) และแอนโทไซยานิน (anthocyanidins) เป็นต้น องค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืชหรือแม้แต่วิธีการเพาะปลูกของพืชนั้น ๆ

กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชสมุนไพรที่คนไทยคุ้นเคยกันดี องค์ประกอบหลักของกระเจี๊ยบแดง ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์ และแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ให้สีแดงและจัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ โดยแอนโทไซยานินที่เป็นองค์ประกอบหลักในกระเจี๊ยบแดง คือ เดลฟินิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์ (delphinidin-3-sambubioside) และไซยานิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์ (cyanidin-3-sambubioside) Tee และคณะ (2002a) พบว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าบีเอชเอ นอกจากนี้ Lee และคณะ (2002) พบว่ากรดโปรโตแคเทค (protocatechuic, PCA) ที่สกัดได้จากกระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ได้ดีกว่าวิตามินอี

โดยทั่วไปสารที่ถือว่ามีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันควรมีสมบัติขိုได้อ่อนหนึ่งหรือหลายข้อต่อไปนี้ ได้แก่ สมบัติในการทำลายอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (antilipoperoxidant activity) สมบัติในการต้านปฏิกิริยาอันเนื่องมาจากออกซิเจนและอนุพันธ์ (antioxigen and antireactive oxygen species activity) สมบัติในการจับกับไอออนของโลหะ (chelating property) โดยที่สารแต่ละชนิดจะมีศักยภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแตกต่างกันไป นอกจากนี้สารชนิดเดียวกันอาจมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระแต่ละชนิดแตกต่างกันด้วย ดังนั้นในการประเมินความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือในการทำลายอนุมูลอิสระของสารใด ๆ จึงจำเป็นต้องใช้วิธีทดสอบหลาย ๆ วิธีในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือเกี่ยวกับการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารนั้น ๆ

จากรายงานวิจัยของ Pinsirodom และคณะ (2004) ซึ่งศึกษาการใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ พบว่าการใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับ 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เติมลงในส่วนผสมของหมูแผ่นจะมีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ไม่มีการเติมสารสกัด) แต่ให้ผลตรงกันข้ามในผลิตภัณฑ์กุนเชียง กล่าวคือ เมื่อเติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงลงในส่วนผสมของกุนเชียงจะมีผลในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งสันนิษฐานว่าน้ำตาลซูโครสที่เติมในกุนเชียงในปริมาณที่สูงกว่าในหมูแผ่นมีผลต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งประเด็นการศึกษาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกุนเชียงและหมูแผ่น รวมทั้งเปรียบเทียบผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในกุนเชียง

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาปริมาณสารประกอบ โพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดกระเจี๊ยบแดง
2. วิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง
3. ศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงและหมูแผ่น
4. เปรียบเทียบผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้จะวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกชนิดทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดกระเจียบแดงที่เตรียมได้ จากนั้นศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันและการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระเจียบแดง 4 วิธีคือ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ( $^{\circ}\text{OH}$ ) ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate colorimetric method (FTC) นอกจากนี้ยังศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น ซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส แลค-โตส และ ไซลิทอล เป็นต้น ต่อสมบัติการเป็นโปรออกซิแดนซ์ของสารสกัดกระเจียบแดงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ 2 ชนิด คือ กุนเชียงและหมูแผ่น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 กระเจี๊ยบแดง

กระเจี๊ยบแดง เป็นพืชพื้นเมืองของทวีปแอฟริกา มีแหล่งกำเนิดในประเทศซูดาน (Chang *et al.*, 2004) มีการบันทึกไว้ว่าเมื่อปี พ.ศ. 2510 กรมประมงกระทรวงได้ได้นำกระเจี๊ยบแดงพันธุ์ซูดานมาทดลองปลูกที่นิคมสร้างตนเอง อำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี ปรากฏว่าให้ผลดี ไม่มีโรคและแมลงรบกวนมากนัก ได้ผลผลิตมากและทำรายได้ดีให้กับเกษตรกร (เกษม, 2545)

กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชล้มลุก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Hibiscus sabdariffa* L. อยู่ในวงศ์ Malvaceae ชื่อสามัญ Roselle, Rosella, Red Sorrel, Jamaica Sorrel คนไทยในแต่ละพื้นที่จะเรียกชื่อกระเจี๊ยบแดงแตกต่างกันไป เช่น ส้มพอเหมาะ กระเจี๊ยบเปรี้ยว ส้มเก็งเก็ง ส้มตะแลงแกง การตั้งชื่อแต่ละชื่อให้กระเจี๊ยบแดงมีพื้นฐานมาจากการรับรู้รสเปรี้ยวจากดอกและใบของกระเจี๊ยบแดงนั่นเอง (สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดลและมูลนิธิโตโยต้าประเทศไทย, 2545) กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชใบแฉก สามารถปลูกได้ทั่วไป ชอบอากาศร้อน หรือค่อนข้างร้อน ทนต่อความแห้งแล้งไม่ชอบน้ำขัง โดยเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-2.4 เมตร ลำต้นและกิ่งก้านอ่อนสีเขียว เมื่อแก่มีสีแดงอมม่วง ผิวค่อนข้างเกลี้ยง ใบเดี่ยว (simple leaf) มีหลายรูปแบบ เรียงสลับ (alternate) ขนาดกว้างยาวพอ ๆ กัน ประมาณ 7.5-12.5 เซนติเมตร ใบของต้นที่อายุน้อยและใบที่อยู่ใกล้ดอกบางใบมีแผ่นใบคล้ายรูปไข่ (ovate like) และมีขนาดเล็กกว่าใบโดยทั่วไป ซึ่งมีแผ่นใบคล้ายรูปไข่และมีขอบใบหยักลึกคล้ายนิ้วมือ 3 หรือ 5 แฉก แต่ละแฉกกว้าง 0.5-3 เซนติเมตร ยาว 3-8 เซนติเมตร ปลายหยักแหลม โคนมน เส้นใบ (vein) ออกจากโคนใบ 3-5 เส้น แผ่นใบด้านล่าง (lower lamina) มีเส้นใบขนานเด่นชัด โคนเส้นกลางใบมีต่อม 1 ต่อม ก้านใบยาว 4-15 เซนติเมตร หูใบ (stipule) เป็นเส้นเรียว ยาว 0.8-1.5 เซนติเมตร ดอก (flower) ใหญ่ มีสีชมพูหรือสีเหลือง ตรงกลางดอกมีสีเข้มมากกว่าขอบนอกของกลีบ ดอกที่ได้รับการผสมเกสรแล้วกลีบดอกจะร่วงกลีบรองดอกและกลีบเลี้ยงก็จะเจริญเติบโตขึ้นอีกเกิดเป็นสีม่วงแดงเข้มหุ้มเมล็ดเอาไว้ภายในกลีบเลี้ยง ผลเป็นรูปรีปลายแหลมยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร หุ้มไว้ด้วยกลีบเลี้ยงสีแดง (Morton, 1987) ส่วนใหญ่คนทั่วไปมักจะรู้จักกระเจี๊ยบแดงในรูปของน้ำกระเจี๊ยบรสเปรี้ยวอมหวาน ชุ่มคอ แก้กกระหายน้ำได้เป็นอย่างดี ซึ่งได้จากส่วนของกลีบเลี้ยงและกลีบรองดอกของกระเจี๊ยบ นอกจากนี้ยังมีการนำมาทำเป็นแยม เยลลี่ ไวน์ (Tsai and Ou, 1996) ได้สีส้มสีแดงม่วง สวยงามตามธรรมชาติ และสามารถใช้เป็นสารแต่งสี แต่งกลิ่นได้ด้วย โดยกลีบรองดอกของกระเจี๊ยบแดงเป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันที่ดีเนื่องจากมีรงควัตถุแอนโทไซยานิน และกรดแอสคอร์บิก (Ali *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังมีกรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดซัลฟูริก กรดออกซาลิก กรดมาลิก กรดซัคซินิก และกรดทาทาริก ซึ่งกรดเหล่านี้ทำให้กระเจี๊ยบมีรสเปรี้ยว และยังมีวิตามินเอ เพคติน และแร่ธาตุอื่น ๆ ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม เป็นต้น

จากข้อมูลของสำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร (2549) ได้วิเคราะห์สถานการณ์การผลิตกระเจี๊ยบแดงในประเทศไทยปี 2548 พบว่า มีพื้นที่ปลูกกระเจี๊ยบแดง 7,724 ไร่ แหล่งผลิตที่สำคัญ ได้แก่ อำเภอพัฒนานิคม โคกสำโรง จังหวัดลพบุรี อำเภอเดิมบางนางบวช ด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี และอำเภอมโนรมย์ จังหวัดชัยนาท ผลผลิตกระเจี๊ยบแดงแห้งเฉลี่ย 32 กิโลกรัม/ไร่ (ผลผลิตสด : แห้ง เท่ากับ 10 : 1) ผลผลิตรวม 250 ตัน ราคาที่เกษตรกรขายได้ในปี 2547 ถึง 2548 ประมาณ 30-60 บาท/กิโลกรัม โดยสภาพการปลูกกระเจี๊ยบแดงนั้น เกษตรกรจะปลูกกระเจี๊ยบแดงเป็นอาชีพเสริมจากการทำนา ปลูกข้าวโพดข้าวฟ่างซึ่งเป็นอาชีพหลัก โดยปลูก 2 ลักษณะ คือ ปลูกเป็นพืชเดี่ยวแปลงใหญ่ และปลูกแซมในแปลงข้าวโพดหรือพืชไร่ชนิดอื่น ๆ พันธุ์ที่ใช้ปลูกคือพันธุ์ชูดานหรือพันธุ์เกษตร เริ่มปลูกในเดือนพฤษภาคม ถึง มิถุนายน กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชไวแสงชอบอากาศร้อน ทนต่อความแห้งแล้งและไม่ชอบน้ำขัง เกษตรกรเก็บเกี่ยวกระเจี๊ยบแดงช่วงเดือนเดือนพฤศจิกายน ถึง ธันวาคม โดยเก็บเกี่ยว 2 วิธี คือ เก็บเฉพาะดอก และเก็บเกี่ยวทั้งต้น

ส่วนสถานการณ์ด้านการตลาดนั้น ประเทศไทยผลิตกระเจี๊ยบแดงได้ 250 – 600 ตัน/ปี (กลีบดอกตากแห้ง) ใช้บริโภคภายในประเทศ ร้อยละ 30 ของผลผลิตทั้งหมด โดยใช้ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ชาชง เครื่องดื่ม ใช้ในอุตสาหกรรมสียผสมอาหารและอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ เยลลี่ แยม ไอศกรีม ซอส ไวน์ น้ำหวาน ฯลฯ สำหรับในภาคใต้จะปลูกกระเจี๊ยบเพื่อทำแยมใช้ผลผลิตกระเจี๊ยบสด เนื่องจากฝนตกเกือบทั้งปี จึงไม่นิยมตากแห้ง ผลผลิตร้อยละ 70 ของผลผลิตทั้งหมดส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ ตลาดส่งออกที่สำคัญ คือ สหรัฐอเมริกาและเยอรมนี ราคาซื้อขายในตลาดโลก ตันละ 1,000 – 1,200 เหรียญสหรัฐฯ ผลผลิตที่ส่งออกไปจะใช้เป็นส่วนผสมสำคัญสำหรับชาสมุนไพรและใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

การวิเคราะห์แนวโน้มการผลิตในปี 2548 พบว่า พื้นที่ปลูกกระเจี๊ยบแดงลดลงจากปีที่ผ่านมา ร้อยละ 50 เนื่องจากในปี 2547 เกษตรกรขายผลผลิตได้ราคาต่ำ (กิโลกรัมละประมาณ 35 – 40 บาท) ผลตอบแทนไม่คุ้มค่ากับการลงทุน เกษตรกรบางส่วนหันไปปลูกยางพาราแทน ซึ่งจะให้ผลตอบแทนที่ดีกว่า สาเหตุที่ทำให้ราคาผลผลิตตกต่ำเนื่องจากราคาดตลาดโลกลดลงครึ่งหนึ่งจากที่เคยขายได้ ประเทศผู้ผลิตกระเจี๊ยบแดงรายใหญ่ ได้แก่ จีนและอัฟริกาใต้ ผลิตได้จำนวนมากจนผลผลิตล้นตลาด ผู้นำเข้าจึงหันไปซื้อผลผลิตจากจีน และอัฟริกาใต้ ทำให้ราคากระเจี๊ยบแดงของไทยราคาตกต่ำ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่ากระเจี๊ยบแดงจากประเทศจีนและอัฟริกาใต้จะมีราคาถูกกว่า แต่กระเจี๊ยบแดงของไทยก็มีคุณภาพดีกว่าและมีจุดเด่นคือมีรสชาติเฉพาะ เป็นที่ยอมรับว่ามีรสชาติดีที่สุดในโลก ตลาดโลกจึงยังมีความต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ กลุ่มของสารที่มีอิเล็กตรอนวงนอกที่ยังไม่ได้จับคู่มากกว่าหรือเท่ากับหนึ่งอิเล็กตรอน (Halliwell *et al.*, 1995) ดังนั้นจึงมีความว่องไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย โดยทั่วไปภายในเซลล์อนุมูลอิสระส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของออกซิเจนไปยังโมเลกุลของน้ำ เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า reactive oxygen species (ROS) ซึ่งสารกลุ่มนี้ได้แก่ อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical,  $^{\circ}\text{OH}$ ) ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion,  $^{\circ}\text{O}_2$ ) อนุพันธ์ของออกซิเจนบางตัว ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ไฮโปคลอไรต์ (hypochlorous,  $\text{HOCl}$ ) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มของสารที่เรียกว่า reactive nitrogen species (RNS) ที่สำคัญ ได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide,  $\text{NO}^{\circ}$ ) และ เปอร์ออกซีไนไตรท์ (peroxynitrite,  $\text{ONOO}^{\circ}$ ) เป็นต้น (Kalyanaraman and Gutterman, 2003) ทั้งกลุ่มของ ROS และ RNS จัดเป็นแหล่งของอนุมูลอิสระที่สำคัญของร่างกาย

ปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน (oxidation reaction) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารอาหารต่าง ๆ ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจน ในแต่ละวันมีไม่น้อยกว่า 1000 ปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระ ซึ่งความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระจัดเป็นปัญหาที่สำคัญเกี่ยวกับสุขภาพของมนุษย์ และตลอดอายุขัยของเราไม่อาจหลีกเลี่ยงอนุมูลอิสระได้ เมื่อใดที่ร่างกายมีปริมาณอนุมูลอิสระสูงกว่าความสามารถที่ร่างกายจะสามารถกำจัดได้ทันจะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ซึ่งเป็นสาเหตุเบื้องต้นสำคัญที่ทำให้เกิดความเสื่อมชรา (aging) ของเซลล์และโรคเรื้อรังหลายชนิด เช่น หัวใจ เส้นเลือดอุดตัน และโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ (ประไพภัทร, 2547)

## 2.3 สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidants)

สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน คือ สารที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดกระบวนการออกซิเดชันที่เป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ โดยสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน จะทำหน้าที่เป็นแหล่งของไฮโดรเจนเพื่อรวมตัวกับอนุมูลอิสระ สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่พบในธรรมชาติมี 4 ประเภท (Frankel and Meyer, 2000) ได้แก่

1. สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกลุ่มของเอนไซม์ที่สร้างได้ในเซลล์ร่างกาย ได้แก่ คาตาเลส (catalase) ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase) และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส
2. สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกลุ่มของวิตามิน ได้แก่ วิตามินอี ในถั่ว ธัญพืช รำข้าว งา และวิตามินซีในผลไม้ ผักสด เป็นต้น

3. สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกลุ่มของแร่ธาตุ เช่น ซีลีเนียม และสังกะสี เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน

4. สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกลุ่มของสารเคมีจากพืช (phytochemicals) เป็นสารเคมีจากพืชที่ไม่ใช่วิตามินและสารอาหาร เช่น แคโรทีน ไลโคปีน แทนนิน และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น

## 2.4 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารในกลุ่ม secondary metabolite ที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในกระบวนการเจริญเติบโต และการขยายพันธุ์ของพืชแต่ละชนิด โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลิกจะเกิดจากการรวมตัวของโมเลกุลน้ำตาลตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไปกับหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) โดยน้ำตาลดังกล่าวอาจจะเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharides) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ก็ได้ แต่น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุด โมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิก คือ กลูโคส (glucose) ส่วนน้ำตาลชนิดอื่นที่พบ ได้แก่ กาแลคโตส (galactose) แรมโนส (ramnose) ไชโรส (xyrose) อะราบิโนส (arabinose) และอนุพันธ์ของน้ำตาลเหล่านี้ เช่น กรดกลูโคโรนิก (glucuronic acid) กรดกาแลคตูโรนิก (galacturonic acid) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับสารประกอบฟีนอลิกด้วยกันเองหรือสารประกอบฟีนอลิกกับสารประกอบอื่น ๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acids) กรดอินทรีย์ (organic acids) เอมีน (amines) และไขมัน สารประกอบฟีนอลิกสามารถถูกพบได้ในอาหารและเครื่องดื่มที่ได้มาจากพืช เช่น ผัก ผลไม้ ไวน์ ชา น้ำผลไม้ เป็นต้น แต่จะพบในปริมาณที่แตกต่างกันออกไปในพืชต่างชนิดกัน หรือแม้ในพืชชนิดเดียวกันแต่มาจากสถานที่ผลิตแตกต่างกัน เนื่องจากการสร้างสารประกอบฟีนอลิกของพืชจะมีทั้งปัจจัยทางด้านพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง นอกจากนี้ยังพบว่า วิธีการเพาะปลูก ระดับความสูง กระบวนการแปรรูป หรือแม้แต่วิธีการเก็บรักษาก็ล้วนมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งสิ้น

สารประกอบฟีนอลิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งสามารถพบได้โดยทั่วไปและมีความสำคัญประกอบด้วยฟีนอล (phenol,  $C_6$ ) กรดฟีนอลิก (phenolic acids,  $C_6-C_1$ ) ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid,  $C_6-C_3$ ) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่กำลังได้รับความสนใจมากที่สุดในขณะนี้ จัดเป็นกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกพบมากที่สุดในบรรดาสารประกอบจากพืชทั้งหมด เนื่องจากมีการค้นพบฟลาโวนอยด์ แล้วมากกว่า 5000 ชนิด โดยมีโครงสร้างพื้นฐานเป็นแบบ diphenylpropanes เป็น flavan nucleus มีคาร์บอน 15 อะตอม ประกอบขึ้นเป็นวงแหวน 3 วง ( $C_6-C_3-C_6$ ) และมีระบบที่ใช้ในการระบุตำแหน่งของคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลของฟลาโวนอยด์ โดยทั่วไปฟลาโวนอยด์มักถูกพบในลักษณะของอนุพันธ์ของไกลโคไซด์ โดยอยู่ในส่วนของอะไกลโคนในโมเลกุลไกลโคไซด์ สารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่น่าสนใจ

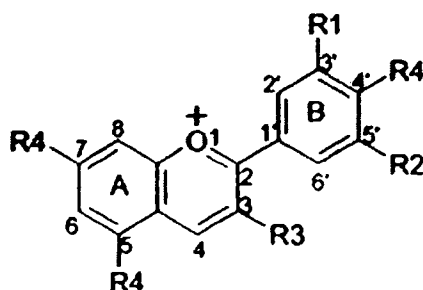
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขณะนี้ ได้แก่ ฟลาโวน (flavones) ฟลาวาโนน (flavanones) ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาวานอล (flavanols) ไอโซฟลาโวน (isoflavones) และแอนโทไซยานิน (anthocyanidins) เป็นต้น (Bravo, 1998)

## 2.5 สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่พบในกระเจี๊ยบแดง

### 2.5.1 แอนโทไซยานิน (anthocyanins)

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่พบมากที่สุดในการเจียบแดง จัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ โมเลกุลของแอนโทไซยานินเป็นไกลโคไซด์ ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็นน้ำตาลและส่วนที่เป็นอะไกลโคน (aglycone) เรียกว่า แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) ซึ่งโมเลกุลของไกลโคไซด์นั้นสามารถแยกออกจากกันได้โดยการไฮโดรไลซิสด้วยกรด ในเนื้อเยื่อพืชจะไม่พบอะไกลโคนที่อยู่ในรูปอิสระจะพบเฉพาะที่อยู่ในรูปไกลโคไซด์ คือ รวมอยู่กับน้ำตาลเท่านั้น ปัจจุบันแอนโทไซยานิดินที่ปรากฏอยู่ในธรรมชาติมีประมาณ 17 ชนิด และมีเพียง 6 ชนิดเท่านั้นที่พบได้ทั่ว ๆ ไปในผักและผลไม้ ได้แก่ พีลาร์จอนิดิน (pelargonidin) ไซยานิดิน (cyanidin) พีโอนิดิน (peonidin) พีทูนิดีน (petunidin) มาลวิดิดิน (malvidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) ซึ่งแตกต่างกันที่หมู่ของตำแหน่งที่ 3' และ 5' ในธรรมชาติอะไกลโคนอยู่ในรูปอิสระน้อยมาก แต่จะอยู่ในรูปที่รวมอยู่กับน้ำตาล หรือทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยน้ำตาลที่เป็นได้ทั้งโมโน- ได- และไตรแซ็กคาไรด์ น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของแอนโทไซยานิน จะมี 1, 2 หรือ 3 โมเลกุลก็ได้ โมเลกุลของน้ำตาลส่วนใหญ่จะเกาะกับหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของแอนโทไซยานิดิน โดยเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่ตำแหน่ง 3 ถ้าเป็นได-ไกลโคไซด์ โมเลกุลของน้ำตาลจะเกาะกับหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 และ 5 หรือ 3 และ 7 (Kong *et al.*, 2003) โดยพบว่ามีน้ำตาลเพียง 5 ชนิดที่พบมากและรวมเป็นไกลโคไซด์กับแอนโทไซยานิดิน ได้แก่ กลูโคส (glucose) กาแล็กโทส (galactose) แรมโนส (rhamnose) อะราบินโนส (arabinose) และไซโรส (xylose) โครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลแอนโทไซยานิดิน ประกอบด้วยวงแหวนเบนโซไพแรน (benzopyran) 2 วงต่อกับวงแหวนฟีนิล (phenyl ring) 1 วง โดยแอนโทไซยานิดินจะมีประจุบวก (flavylium cation) ในโครงสร้าง (รูปที่ 2.1) จึงทำให้มีความไวต่อปฏิกิริยามากและสามารถถูกไอออนไนซ์ (ionized) ได้ง่าย ซึ่งความแตกต่างของแอนโทไซยานิดินแต่ละชนิด ขึ้นกับจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิล ชนิดและจำนวนหรือตำแหน่งที่มีน้ำตาลมาเกาะกับโมเลกุล รวมถึงจำนวนของกรดอะลิฟาติกหรืออะโรมาติกที่มาเกาะกับโมเลกุลของน้ำตาลภายในโมเลกุล



รูปที่ 2.1 โครงสร้างฟลาเวียม แคทไอออน (flavylium cation) โดย R1 และ R2 คือ H, OH หรือ OCH<sub>3</sub>; R3 คือ ไกลโคซิล (glycosyl) หรือ H; และ R4 คือ OH หรือ ไกลโคซิล (glycosyl)

ที่มา : Kong และคณะ (2003)

สีของแอนโทไซยานินจะขึ้นกับหมู่ฟังก์ชันบนวงแหวนบี ถ้ามีหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้น จะทำให้น้ำเงินเข้มขึ้น แต่ถ้ามีหมู่เมทอกซิล (methoxyl group) เพิ่มขึ้น จะมีสีแดงเพิ่มขึ้น แสดงได้ดังตารางที่ 2.1 โดยจะขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความเป็นกรดต่าง ในสภาวะต่างแอนโทไซยานินจะมีสีน้ำเงิน แต่ในสภาวะกรดจะเป็นสีแดง ที่ความเป็นกรดต่างสูง เกลือออกโซเนียมจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปซิวโคเบส (pseudobase) ซึ่งไม่มีสี (Brouillard, 1982) ดังนั้น เมื่อความเป็นกรดต่างสูงขึ้นความเข้มของสีจะลดลงด้วย และในพืชแต่ละชนิดก็จะมีปริมาณแอนโทไซยานินที่แตกต่างกันไป

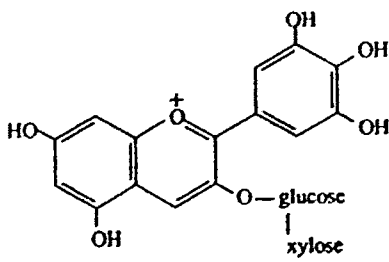
ตารางที่ 2.1 โครงสร้างหลักของแอนโทไซยานิน

anthocyanidin	R1	R2	colour
pelargonidin	H	H	orange-red
cyanidin	OH	H	red
delphinidin	OH	OH	pink
peonidin	OCH <sub>3</sub>	H	bluish purple
petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH	purple
malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	redish purple

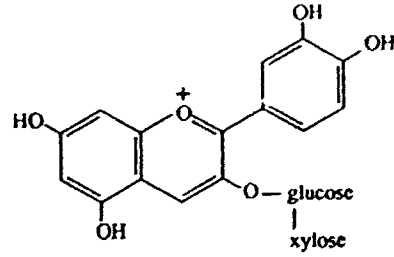
ที่มา : Julie และคณะ (2005)

แอนโทไซยานินที่เป็นองค์ประกอบหลักในกระเจี๊ยบแดง คือ เดลฟินิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์ (delphinidin-3-sambubioside) เป็นรงควัตถุที่ทำให้กระเจี๊ยบมีสีแดงและไซยานิน-3-แซมบูไบโอไซด์ (cyanidin-3-sambubioside) แสดงดังรูปที่ 2.2 สำหรับแอนโทไซยานินที่พบรองลงมา คือ

เดลฟิnidin-3-กลูโคไซด์ (delphinidin-3-glucoside) และไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidin-3-glucoside) แสดงดังรูปที่ 2.3



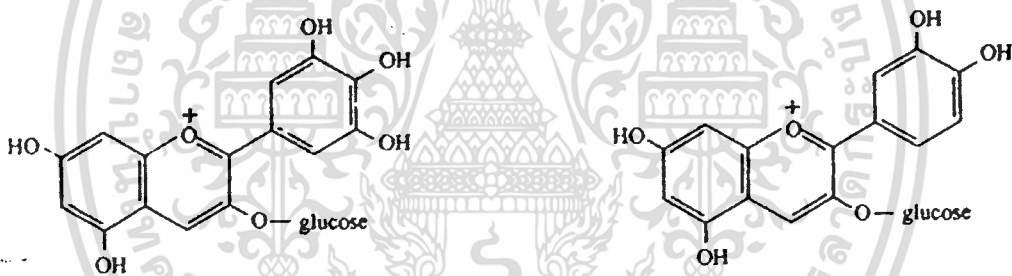
เดลฟิnidin-3-แซมบูไบโอไซด์  
(delphinidin-3-sambubioside)



ไซยานิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์  
(cyanidin-3-sambubioside)

รูปที่ 2.2 โครงสร้างของเดลฟิnidin-3-แซมบูไบโอไซด์และไซยานิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์ที่พบในกระเจี๊ยบแดง

ที่มา : Mishra และคณะ (1999)



เดลฟิnidin-3-กลูโคไซด์  
(delphinidin-3-glucoside)

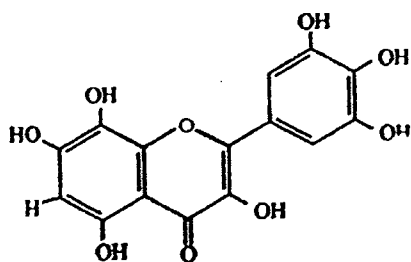
ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์  
(cyanidin-3-glucoside)

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเดลฟิnidin-3-กลูโคไซด์และไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ที่พบในกระเจี๊ยบแดง

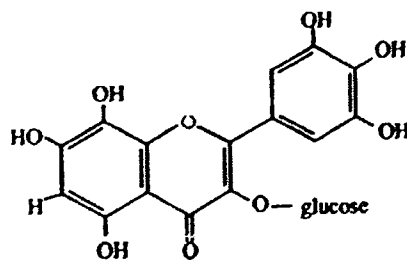
ที่มา : Mishra และคณะ (1999)

### 2.5.2 ไฮบิซซีทิน (hibiscetin) และไฮบิซซีทรีน (hibiscitrin)

ไฮบิซซีทิน ( $C_{15}H_{10}O_9$ ) และไฮบิซซีทรีน ( $C_{27}H_{30}O_{19}$ ) เป็นสารประกอบที่อยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์พบในกระเจี๊ยบแดงมีปริมาณน้อย แต่ก็มีสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เช่นเดียวกับแอนโทไซยานิน โครงสร้างของสารประกอบทั้งสองชนิดแสดงดังรูปที่ 2.4



ไฮบิซซีทิน ( $C_{15}H_{10}O_9$ )  
(hibiscetin)



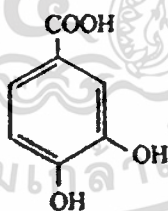
ไฮบิซซีทริน ( $C_{27}H_{30}O_{19}$ )  
(hibiscitrin)

#### รูปที่ 2.4 โครงสร้างของไฮบิซซีทินและไฮบิซซีทริน

ที่มา : Mishra และคณะ (1999)

#### 2.5.3 กรดโปรโตแคทีชีวอิก (Protocatechuric acid)

จากการศึกษาของ Lee และคณะ (2002) พบว่ากรดโปรโตแคทีชีวอิกเป็นสารประกอบในกลุ่มของกรดฟีนอลิก (phenolic acid) ซึ่งสกัดแยกได้จากกระเจี๊ยบแดง กรดชนิดนี้มีสมบัติเป็นสารต้านสารก่อมะเร็ง (anticarcinogenesis) และมีสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วย โดยจากการทดสอบแสดงให้เห็นว่ากรดโปรโตแคทีชีวอิกสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำได้ ซึ่งส่งผลให้อัตราเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) ลดลงเป็นผลให้อัตราเสี่ยงการเกิดโรคหัวใจลดลงด้วย โครงสร้างของกรดโปรโตแคทีชีวอิก แสดงดังรูปที่ 2.5



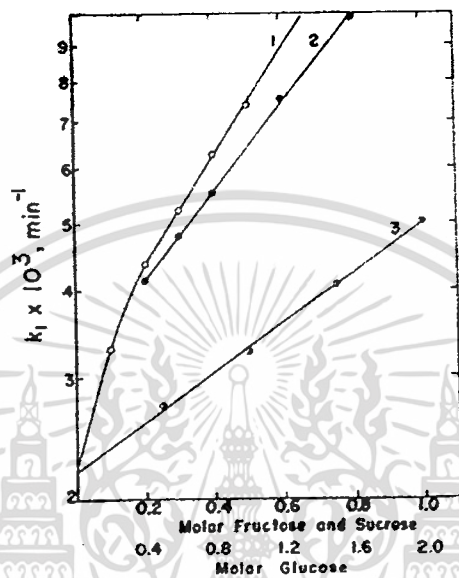
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของกรดโปรโตแคทีชีวอิก

ที่มา : Lee และคณะ (2002)

#### 2.6 ผลของน้ำตาลต่อแอนโรไซยานิน

Tinley และ Bokian (1959) ศึกษาผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่ออัตราการสลายตัว (breakdown) ของเพลาร์โกนิน-3-กลูโคไซด์ (pelargonidin-3-glucoside) โดยทดสอบในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลฟรุกโตสมีผลทำให้เพลาร์โกนิติน-3-กลูโคไซด์ เกิดการสลายตัวมากที่สุด รองลงมาคือ ซูโครสและกลูโคส ตามลำดับ ส่วนซอบิทอลซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sugar alcohol) และกรดกลูโคนิกซึ่งเป็นน้ำตาลกรด (sugar acid) จะทำให้แอนโทไซยานินเกิดการสลายตัวช้าที่สุด และเมื่อระดับความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตส ซูโครส และกลูโคสเพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้เกิดการสลายตัวของเพลาร์โกนิติน-3-กลูโคไซด์ ได้เร็วขึ้น โดยสังเกตจากค่าคงที่ของการสลายตัว ( $k_1$ ) ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่ออัตราการสลายตัวของเพลาร์โกนิติน-3-กลูโคไซด์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส โดย กราฟเส้นที่ 1, 2 และ 3 คือ น้ำตาลฟรุกโตส ซูโครส และกลูโคส ตามลำดับ

ที่มา : Tinley และ Bokian (1959)

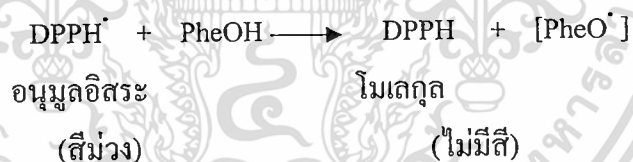
นอกจากนี้งานวิจัยของ Meschter (1953) ซึ่งอ้างอิงโดย Tinley และ Bokian (1959) ได้กล่าวว่า รงควัตถุที่มีอยู่ในสตอเบอร์รี่เกิดการสลายตัวได้ในสภาวะที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส โดยพบว่าน้ำตาลที่มีความเสถียรต่อความร้อนต่ำ (heat labile) เช่น น้ำตาลอะราบินโนส (arabinose) ลิวูโลส (levulose) และซอร์โบส (sorbose) จะเกิดการแตกตัวให้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ของ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล (5-hydroxymethylfurfural) และเฟอร์ฟิวรอล (furfural) ซึ่งจะมีผลทำให้รงควัตถุแอนโทไซยานินเกิดการสลายตัวได้มากกว่าน้ำตาลที่มีความคงตัวสูงกว่า ได้แก่ น้ำตาลมอลโตสและซอรับิทอลซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ และเมื่อน้ำตาลเกิดการแตกตัวให้ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล และเฟอร์ฟิวรอล เป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นก็จะเร่งให้รงควัตถุในสตอเบอร์รี่เกิดการสลายตัวเร็วขึ้น

## 2.7 วิธีวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของตัวอย่าง

ในการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของตัวอย่างสารสกัดจากพืชจะมีปัจจัยหลายประการที่มีอิทธิพลต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่วิเคราะห์ได้ เช่น ความสามารถในการกระจายตัวในเฟสของน้ำมันและน้ำของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สภาวะการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและสภาวะทางกายภาพของสารตั้งต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นต้น จากอิทธิพลของพารามิเตอร์เหล่านี้ ทำให้ไม่สามารถใช้วิธีใดเพียงวิธีหนึ่งในการตรวจสอบสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารใด ๆ วิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของอาหารหรือสารประกอบต่าง ๆ มีหลายวิธี สำหรับวิธีที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้มี 3 วิธี ดังนี้

### 1. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay

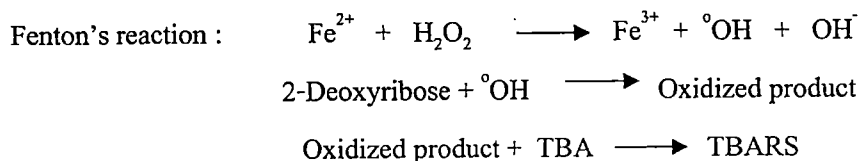
การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่นิยมใช้ทั่วไปในการประเมินประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัดจากพืช เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีสมบัติต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมได้ อนุมูลอิสระ DPPH จะถูกรีดิวซ์ไปเป็นโมเลกุล DPPH และเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเข้มไปเป็นไม่มีสี สามารถติดตามประสิทธิภาพการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังนี้ (Murakami *et. al.* , 2004)



จากสมการปฏิกิริยาจะเห็นได้ว่าสารตัวอย่างที่มีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีจะทำให้สีม่วงจางหายไปมากขึ้น

### 2. The deoxyribose assay

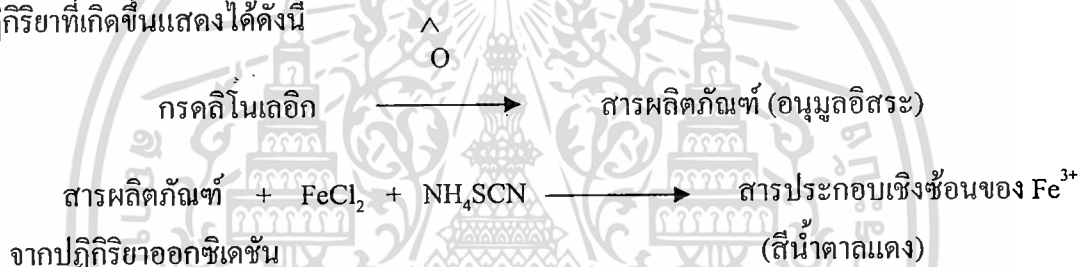
การติดตามความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ( $^{\circ}\text{OH}$ ) จะใช้วิธีวิเคราะห์การติดตามการสลายตัวของดีออกซีไรโบส (deoxyribose) โดยมีหลักการคือ  $\text{Fe}^{2+}$  จะทำปฏิกิริยากับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ทำให้เกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล เนื่องจากปฏิกิริยา Fenton จากนั้นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลจะทำปฏิกิริยากับดีออกซีไรโบสทำให้เกิดการสลายตัวของดีออกซีไรโบสและเกิดสารผลิตภัณฑ์ที่ทำให้สารละลายปฏิกิริยามีสีชมพู ซึ่งดูดกลืนแสงได้ที่ 532 นาโนเมตร ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังนี้ (Aruoma, 1994)



จากสมการข้างต้นถ้ามีปริมาณอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเกิดขึ้นมาก จะทำให้ดีออกซีไรโบสไป-โบสสลายตัวมากขึ้น สารละลายปฏิกิริยาจึงมีสีชมพูเข้มขึ้น ดังนั้นถ้าตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดี จะทำให้สีชมพูจางลงได้มากกว่าตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระได้น้อย

### 3. Ferric thiocyanate colorimetric method (FTC)

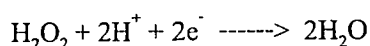
การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC นิยมใช้ในการประเมินความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในอาหาร (antilipoperoxidant) โดยวัดความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังนี้



กรดลิโนเลอิกเมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเกิดสารผลิตภัณฑ์ เช่น  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{ROO}\cdot$  เป็นต้น สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเหล่านี้ เมื่อทำปฏิกิริยากับเฟอร์รัสคลอไรด์ ( $\text{FeCl}_2$ ) โดยไปรีดิวซ์  $\text{Fe}^{2+}$  ให้เป็น  $\text{Fe}^{3+}$  และในสภาวะที่มีแอมโมเนียมไซโอไซยาเนต ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) จะเกิดสารเชิงซ้อนที่มีสีน้ำตาลแดงของ  $\text{Fe}^{3+}$  ขึ้น สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร (Larrauri *et al.*, 1997) จากสมการปฏิกิริยาข้างต้น จะเห็นได้ว่าถ้าในระบบของสารละลายปฏิกิริยามีสารตัวอย่างที่มีสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ดี สารประกอบเชิงซ้อนน้ำตาลแดงจะเกิดน้อย

### 4. Hydrogen peroxide assay

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ  $\text{H}_2\text{O}_2$  สามารถใช้ในการประเมินความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันอันเนื่องมาจาก อนุพันธ์ของออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (ROS) จะใช้วิธีที่รายงานโดย Yen และ Chen (1995) โดยวัดปริมาณ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ที่เหลืออยู่ ซึ่งดูดกลืนแสงได้ที่ 230 นาโนเมตร ดังสมการ



ในกรณีสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการทำลาย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ได้ดี จะทำให้เกิดการสลายตัวของ  $\text{H}_2\text{O}_2$  มาก เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธีที่ใช้ในการทดลองนั้น จะใช้ค่า  $EC_{50}$  ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือทำลายอนุมูลอิสระลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ใดที่ให้ค่า  $EC_{50}$  ต่ำ แสดงว่า สารตัวอย่างนั้นมีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระหรือต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในวิธีวิเคราะห์นั้น ๆ ได้ดี

## 2.8 ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์กึ่งแห้ง (intermediate moisture meat)

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์กึ่งแห้ง เป็นผลิตภัณฑ์อีกกลุ่มหนึ่งในอาหารกึ่งแห้ง (intermediate moisture food) ที่ได้รับความนิยมในการบริโภคมาเป็นเวลานาน เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตที่มีสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น อาหารสด โดยเฉพาะเนื้อสัตว์จะเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ได้ง่าย ดังนั้นจึงมีการนำเนื้อสัตว์มาปรับปรุงและแปรรูปเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ยาวนานมากที่สุด โดยเน้นในด้านความคงทนต่อจุลินทรีย์ (Lawrie, 1991) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์กึ่งแห้ง เช่น เนื้อสวรรค์ เนื้อหวาน กุนเชียง และหมูแผ่น เป็นต้น ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์กึ่งแห้งสามารถผลิตได้หลายวิธี โดยแต่ละวิธีอาศัยหลักการเดียวกันคือการทำให้ น้ำในผลิตภัณฑ์ลดลง ปัจจุบัน ได้มีการใช้สารดูดความชื้นหรือฮิวแมคแทน (humectant) เติมลงในส่วนผสมเนื่องจากสารดูดความชื้นมีสมบัติในการรวมตัวกับน้ำ โดยจับน้ำส่วนที่เหลืออยู่ในอาหารทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถนำน้ำดังกล่าวไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ อาหารจึงมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น (Varnam and Sutherland, 1995) นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์กึ่งแห้งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีค่าวอเตอร์แอกติวิตีอยู่ในช่วง 0.60-0.92 และมีความชื้นประมาณ 15-50 เปอร์เซ็นต์ ผลิตภัณฑ์ประเภทนี้จึงสามารถเก็บรักษาและวางจำหน่ายภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้องในสภาพภูมิอากาศร้อนชื้นได้เป็นระยะเวลาโดย ไม่ต้องแช่แข็ง เนื่องจากมีค่าวอเตอร์แอกติวิตีอยู่ในระดับต่ำซึ่งเป็นระดับที่จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ และส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ยังมีองค์ประกอบของเกลือ (1.7-9 เปอร์เซ็นต์) และน้ำตาล (15-35 เปอร์เซ็นต์) ในปริมาณสูง ซึ่งส่วนผสมทั้งสองชนิดเมื่อละลายจะรวมตัวกับน้ำเพื่อดึงน้ำออกจากอาหาร ทำให้อาหารมีปริมาณน้ำลดลงจุลินทรีย์จึงไม่สามารถจะใช้น้ำได้ และสารดังกล่าวยังสามารถดึงน้ำออกจากเซลล์ของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นสูงกว่า (high osmotic pressure) ทำให้เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เกิดการย่น พิการ และตายในที่สุด (Huang and Nip, 2001)

## 2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

Wong และคณะ (2002) ตรวจวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพของกระเจี๊ยบแดงพบว่าองค์ประกอบหลักทางเคมีของกระเจี๊ยบแดงประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส กรดซัคซินิก และกรดออกซาลิก นอกจากนี้ยังพบสารที่มีสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันธรรมชาติในกระเจี๊ยบแดง 100 กรัม คือ วิตามินซี 141.09 มิลลิกรัม เบต้าแคโรทีน 1.88 มิลลิกรัม และไลโคปีน 164.34 ไมโครกรัม รังควัตถุหลักที่พบมากที่สุดและทำให้กระเจี๊ยบแดงมีสีแดง คือ แอนโทไซยานิน โดยแอนโทไซยานินที่เป็นองค์ประกอบหลักในกระเจี๊ยบแดง คือ เคลฟิโนดิน-3-แชนมูไบโอไซด์ และไซยานิดิน-3-แชนมูไบโอไซด์

Tee และคณะ (2002a) ศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง โดยตรวจติดตามปฏิกิริยาออกซิเดชันจากการเกิด diene-conjugated compound และ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ในระบบจำลองของกรดไขมันไม่อิ่มตัว เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานบีเอชเอ และวิตามินอี จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าบีเอชเอและวิตามินอี โดยสารสกัดกระเจี๊ยบแดงสามารถยับยั้งการเกิด diene-conjugated compound ได้ดีกว่าบีเอชเอและวิตามินอี แสดงว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเป็นแหล่งของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันตามธรรมชาติที่ดี โดยสมบัติดังกล่าวอาจเป็นผลมาจาก วิตามินซี เบต้าแคโรทีน และสารประกอบฟีนอลิก

Tee และคณะ (2002b) ศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยตรวจติดตามฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง จากผลการทดลองพบว่าหนูทดลองที่ได้รับการเสริมสารอาหารด้วยกระเจี๊ยบแดงจะมีน้ำหนักตัวลดลงและมีระดับไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง (HDL) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารตามปกติและกลุ่มที่ได้รับน้ำมันเป็นอาหารเพียงอย่างเดียว และยังพบว่าระดับไตรกลีเซอไรด์ในเซรัมลดลงอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมกระเจี๊ยบแดงลงในน้ำมันนั้นสามารถลดการสร้างสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malon-dialdehyde) ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการออกซิเดชันของไขมันได้ โดยงานวิจัยนี้แนะนำว่ากระเจี๊ยบแดงอาจจะมีบทบาทในการป้องกันการเกิดผนังหลอดเลือดแดงแข็งตัว (atherosclerosis) และโรคอ้วนได้

Pinsirodom และคณะ (2004) ศึกษาการใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดง เติมลงในส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ 2 ชนิดคือ หมูแผ่นและกุนเชียง โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับสารบีเอชเอที่ พบว่าการใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับ 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เติมลงในส่วนผสมของหมูแผ่นจะมีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม แต่การใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเติมนลงในส่วนผสมของกุนเชียงกลับมีผลในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในกุนเชียง ซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นผลมาจากน้ำตาลซูโครสซึ่งในส่วนผสมของกุนเชียงมีปริมาณสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหมูแผ่น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามการเติมสารสกัดในระดับดังกล่าวยังคงมีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำกว่าการใช้บีเอชที 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

Hirunpanich และคณะ (2005) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระเจียบแดงในการลดภาวะไขมันในเลือดสูง (hypolipidemic property) และสมบัติในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของ LDL ในหนูทดลอง เมื่อหนูทดลองได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงร่วมกับสารสกัดกระเจียบแดง พบว่าระดับของโคเลสเตอรอล (serum cholesterol) ระดับไตรกลีเซอไรด์ (serum triglycerides) และระดับของ LDL (serum LDL) ลดลง นอกจากนี้สารสกัดดอกกระเจียบยังสามารถช่วยให้การเกิด thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) ลดลงอีกด้วย ดังนั้น สารสกัดกระเจียบแดงมีประสิทธิภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชันของ LDL และการเกิดภาวะโคเลสเตอรอลสูงในหนูทดลองได้ดี

Liu และคณะ (2006) ศึกษาผลของการใช้สารสกัดกระเจียบแดงในการป้องกันการอักเสบของเซลล์ตับในหนูทดลอง จากการถูกทำลายด้วยสารคาร์บอนเตตระคลอไรด์ พบว่า เมื่อหนูทดลองได้รับอาหารร่วมกับสารสกัดกระเจียบแดง สามารถลดการอักเสบของเซลล์ตับจากการถูกทำลายด้วยสารคาร์บอนเตตระคลอไรด์ โดยลดการสะสมของไขมันในเซลล์ตับ (steatosis) และลดการเหนียวทำให้เกิดพังผืดภายในเซลล์ตับ (fibrosis) ซึ่งมีผลทำให้การทำงานของตับเสื่อมลงจนเกิดภาวะตับวาย นอกจากนี้ยังพบว่าหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดกระเจียบแดงสามารถลดการทำงานของแอสพาร์เทต อะมิโนทรานเฟอเรส (aspartate aminotransferase, AST) และอะลานิน อะมิโนทรานเฟอเรส (alanine aminotransferase, ALT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการผิดปกติของตับ ขณะเดียวกันยังช่วยลดปริมาณเอนไซม์กลูตาไธโอนและยับยั้งการเกิดภาวะถูกออกซิไดซ์จนเกินสมดุล (oxidative stress) ที่ทำให้เกิด lipid peroxidative ในเซลล์ตับในสภาวะที่มีคาร์บอนเตตระคลอไรด์

### บทที่ 3

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 3.1 วัสดุอุปกรณ์

#### 3.1.1 วัสดุดิบในการเตรียมสารสกัดกระเจียบ

กระเจียบแดงแห้ง พันธุ์เกษตร ตราแพะภูเขา ซึ่งจากเทศโก้โลดัส

#### 3.1.2 วัสดุดิบในการเตรียมผลิตภัณฑ์กุนเชียง

- |                       |           |
|-----------------------|-----------|
| - เนื้อหมูบริเวณสะโพก | - ผงพะโล้ |
| - มันแข็ง             | - ผงเพรค  |
| - น้ำตาลทราย          | - ผงชูรส  |
| - ซีอิ้วขาว           | - เกลือ   |

#### 3.1.3 เครื่องมือ

##### 3.1.3.1 เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ทางเคมี

- |                                    |  |
|------------------------------------|--|
| - ยูวี-วิสซิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ | Shimadzu, UV-1601, Japan               |
| - เครื่องชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด   | Sartorius BP 3100S                     |
| - เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง    | Mettler Toledo MP220                   |
| - เครื่องระเหยสูญญากาศ             | Rotavapor BUCHI R-114, Switzerland     |
| - ปัมสูญญากาศ                      | Vacuum system BUCHI B-169, Switzerland |
| - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ            | Water bath BUCHI B-480, Switzerland    |

##### 3.1.3.2 เครื่องมือที่ใช้เตรียมกุนเชียง

- |                        |                            |
|------------------------|----------------------------|
| - เครื่องบดเนื้อ       | US Berkel, Germany         |
| - เครื่องบรรจุไส้      | Handtman, Germany          |
| - เครื่องทำแห้งแบบถาด  | Tray dryer B.W.S.-3, Japan |
| - เครื่องบรรจุสูญญากาศ | Sammic S.A., Spain         |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.1.4 สารเคมี

- เอทานอล 95เปอร์เซ็นต์ (ethanol)	องค์การสุรา	ไทย
- 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)	Sigma	เยอรมัน
- โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Merck	เยอรมัน
- Folin-Ciocalteu	BHD	อังกฤษ
- กรดแกลลิก (gallic acid)	Sigma	เยอรมัน
- กรดลิโนเลอิก (linoleic acid)	Aldrich	เยอรมัน
- เฟอรัรัสคลอไรด์ (iron (II) chloride)	Merck	เยอรมัน
- แอมโมเนียมไซโอไอโซยานาต (ammonium thiocyanate)	Sigma	อเมริกา
- ซัลฟานิลามิด (sulfanilamide)	Merck	เยอรมัน
- กรดไตรโอบาร์บิวทริก (TBA)	BHD	อังกฤษ
- กรดอะซิติก (acetic acid)	Lab scan analytical science	ไทย

## 3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

### 3.2.1 ศึกษาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดในสารสกัดจากกระเจียบแดง

#### 3.2.1.1 การเตรียมสารสกัดจากกระเจียบแดง

นำกระเจียบแดงแห้งมาบดละเอียดโดยใช้เครื่องบดผสม (blender) จากนั้นสกัดตัวอย่างโดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนของกระเจียบแดงต่อตัวทำละลาย 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สกัดโดยใช้วิธีแช่ด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารสกัดผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป (สุริยญา, 2547)

#### 3.2.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol contents)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด จะใช้วิธีที่รายงานโดย ประพันธ์ และวันทนี (2545) โดยที่สารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร ใช้กรดแกลลิกเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลมาตรฐาน รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงใน ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (total anthocyanin contents)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินทั้งหมด จะใช้วิธี pH-different ที่รายงานโดย Giusti และ Wrolstad (2001) โดยแอนโทไซยานินมีการเปลี่ยนฟอร์มของโครงสร้างเมื่อพีเอชเปลี่ยนแปลง มีผลทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorbance spectra) เปลี่ยนไป ซึ่งฟอร์มของออกโซเนียม (oxonium) จะให้สีที่พีเอช 1.0 และจะไม่มีสีเมื่ออยู่ในฟอร์มของเฮมิเคทอล (hemiketal) ที่พีเอช 4.5 รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงใน ภาคผนวก ก

### 3.2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง

วิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ อนุพันธ์ของออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยาต่าง ๆ และการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนี้

- 1) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ตามวิธีที่รายงานโดย Murakami และคณะ (2004) รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงใน ภาคผนวก ข
- 2) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ( $^{\circ}\text{OH}$ ) ตามวิธีที่รายงานโดย Aruoma (1994) รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงใน ภาคผนวก ข
- 3) ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก โดยวิธี Ferric thiocyanate colorimetric method (FTC) ตามวิธีที่รายงานโดย Larrauri และคณะ (1996) รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงใน ภาคผนวก ข
- 4) ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ตามวิธีที่รายงานโดย Yen และ Chen (1995) รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงใน ภาคผนวก ข

### 3.2.3 ศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate colorimetric method (FTC) ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง

จากรายงานวิจัยของ Pinsirodom และคณะ (2004) ซึ่งศึกษาการใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ พบว่าการใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับ 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เติมลงในส่วนผสมของหมูแผ่นจะมีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ไม่มีสารสกัด) แต่เมื่อเติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงลงในส่วนผสมของกุนเชียงกลับมีผลในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งสันนิษฐานว่าน้ำตาลซูโครสที่เติมในกุนเชียงในปริมาณที่สูงกว่าในหมูแผ่นมีผลต่อการเป็น โปรออกซิเดนต์ (pro-oxidant) ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของน้ำตาลซูโครส (0-50 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา) ต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงโดยวิธี FTC โดยเตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา ในสภาวะที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส

ต่างกัน คือ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา (เตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครสโดยการละลายน้ำตาลซูโครสด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์) ตรวจวัดปริมาณเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในขั้นเริ่มต้น (initial stages) ของปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) ตามรายละเอียดวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ข

### 3.2.4 ศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงและหมูแผ่น

#### 3.2.4.1 สูตรมาตรฐานของกุนเชียง

สูตรมาตรฐานที่ใช้ในการเตรียมกุนเชียง ขั้นตอนการเตรียมจะเหมือนกับที่รายงานโดยสุริยญา (2547) โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมสำหรับกุนเชียง

ส่วนผสม	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
เนื้อหมู	65
มันแข็ง	16
ผงเพรก	0.2
ผงพะโล้	0.1
เกลือ	1.8
น้ำตาลทราย	16.6
ผงชูรส	0.3

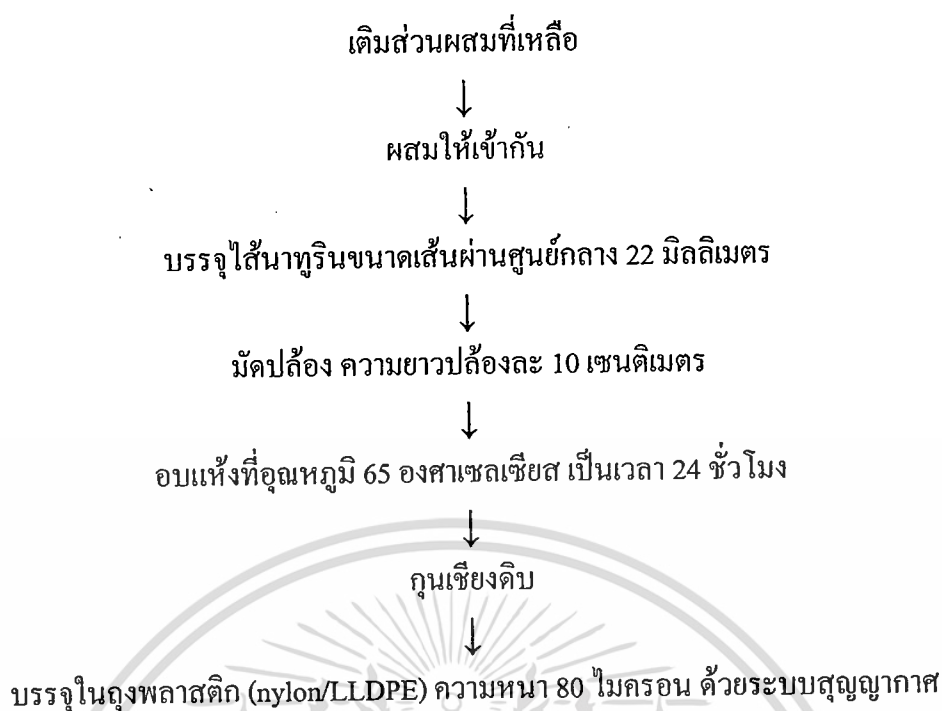
ที่มา : สุริยญา (2547)

#### 3.2.4.2 ขั้นตอนการเตรียมกุนเชียง

การเตรียมกุนเชียงจะใช้เนื้อหมูบริเวณสะโพกที่ตัดแต่งส่วนของไขมันด้านนอกแล้ว นำมาหั่นและบดหยาบผ่านแผ่นแว่นที่มีรูตะแกรงขนาด 4 มิลลิเมตร ส่วนมันแข็งนำมาหั่นและบดหยาบผ่านแผ่นแว่นที่มีรูตะแกรงขนาดเดียวกัน โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการเตรียมดังนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



### 3.2.4.3 สูตรมาตรฐานของหมูแผ่น

สูตรมาตรฐานที่ใช้ในการเตรียมหมูแผ่น ขั้นตอนการเตรียมจะเหมือนกับที่รายงานโดยสุริยญา (2547) โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 3.2

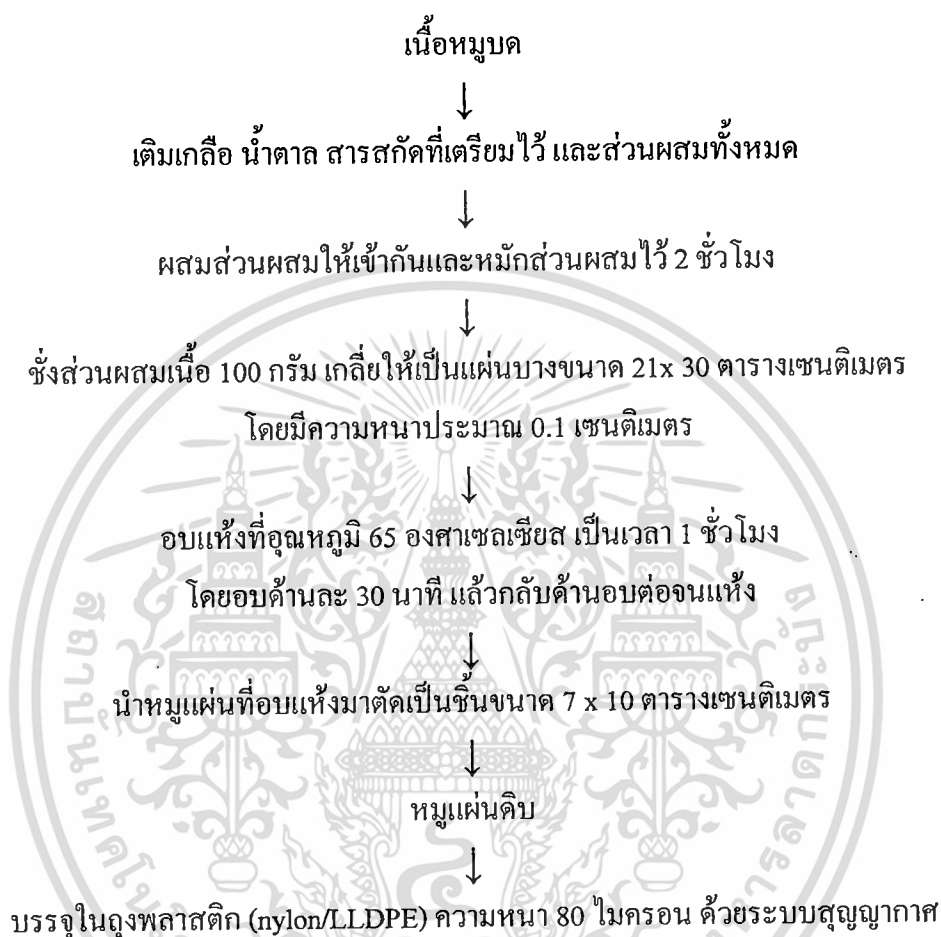
ตารางที่ 3.2 ส่วนผสมสำหรับหมูแผ่น

ส่วนผสม	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
เนื้อหมู	86.83
น้ำตาลทราย	7.23
ซีอิ้วขาว	4.34
น้ำเปล่า	1.4
ผงเพรค	0.2

ที่มา : สุริยญา (2547)

### 3.2.4.4 ขั้นตอนการเตรียมหมูแผ่น

การเตรียมหมูแผ่นจะใช้เนื้อหมูบริเวณสะโพกที่ตัดแต่งส่วนของไขมันด้านนอก แล้วนำมาหั่นและบดหยาบผ่านแผ่นแว่นที่มีตระแกรงขนาด 4 มิลลิเมตร โดยมีรายละเอียดขั้นตอน ดังนี้



### 3.2.4.5 ศึกษาประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงใน กุนเชียงและหมูแผ่นที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสต่างกัน

ใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดง ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักส่วนผสม โดยแปรระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ กัน คือ 0, 7, 13, 16, 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักส่วนผสม เติมลงในส่วนผสมกุนเชียงหรือหมูแผ่นในหัวข้อ 3.2.4.2 หรือ 3.2.4.4 ตามลำดับ และดำเนินการผลิตกุนเชียงหรือหมูแผ่นตามขั้นตอนจนกระทั่งได้กุนเชียงและหมูแผ่นดิบ บรรจุในถุงพลาสติก (nylon/LLDPE ความหนา 80 ไมครอน) ด้วยระบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) จากนั้นติดตามประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 1, 7, 14, 21 และ 28 ของการเก็บรักษา มาวิเคราะห์ค่า thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) ตามวิธีที่รายงานโดย Shahidi และคณะ (1985)

รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงใน ภาคผนวก ค

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงในกุนเชียงและหมูแผ่นที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสต่างกัน โดยใช้แผนการทดสอบแบบ Complete Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

### 3.2.5 ผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงในกุนเชียง

เติมสารสกัดจากกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของส่วนผสม และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลไซลิทอล ที่ระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน คือ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของส่วนผสม ในส่วนผสมกุนเชียงและดำเนินการผลิตกุนเชียงตามขั้นตอนในข้อ 3.2.4.2 จนกระทั่งได้กุนเชียงดิบ นำมาบรรจุในถุงพลาสติก (nylon/LLDPE ความหนา 80 ไมครอน) ด้วยระบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) จากนั้นติดตามประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดง โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 1, 14 และ 28 ของการเก็บรักษามาวิเคราะห์ค่า thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) ตามวิธีที่รายงานโดย Shahidi และคณะ (1985) ดูรายละเอียดวิธีการวิเคราะห์ ในภาคผนวก ค

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงในกุนเชียงที่มีปริมาณน้ำตาลต่างชนิดกัน โดยใช้แผนการทดสอบแบบ Complete Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดกระเจียบแดง

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดกระเจียบแดงและในกระเจียบแดงแห้ง ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดกระเจียบแดงและกระเจียบแดงแห้ง

สารประกอบ	ปริมาณในสารสกัดกระเจียบแดง (มิลลิกรัม/กรัม)	ปริมาณในกระเจียบแดงแห้ง (มิลลิกรัม/100 กรัม)
สารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในรูปของกรดแกลลิก	$21.39 \pm 0.11$	$207.87 \pm 1.02$
แอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์	$0.45 \pm 0.08$	$4.35 \pm 0.52$

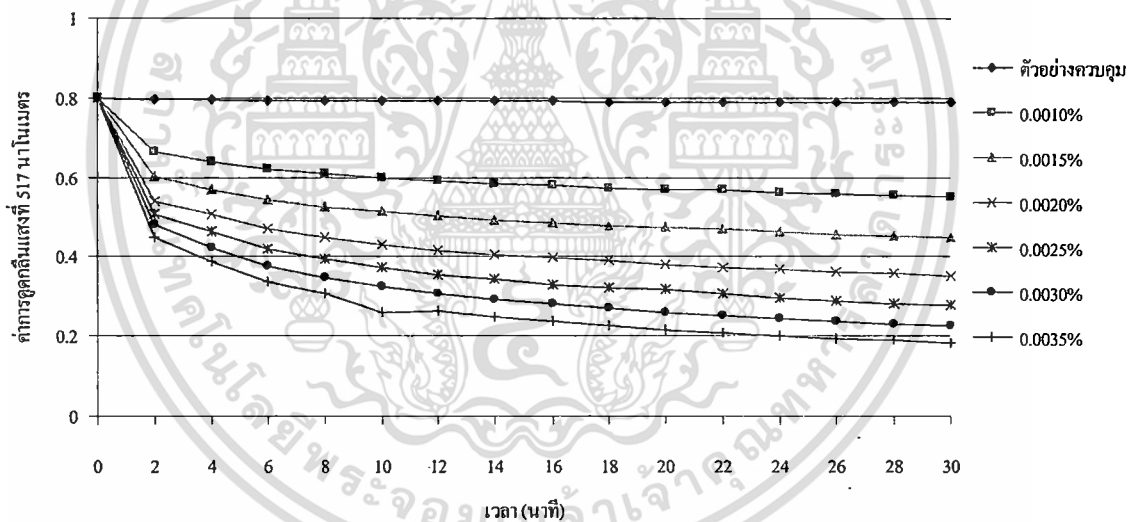
จากตารางที่ 4.1 สารสกัดกระเจียบแดงมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมด  $21.39 \pm 0.11$  และ  $0.45 \pm 0.08$  มิลลิกรัม/กรัม ในรูปของกรดแกลลิกและไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ตามลำดับ เมื่อคำนวณปริมาณของสารประกอบทั้งสองดังกล่าวในกระเจียบแดงแห้งเริ่มต้น พบว่ากระเจียบแดงแห้งมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมด  $207.87 \pm 1.02$  และ  $4.35 \pm 0.52$  มิลลิกรัม/100 กรัม ในรูปของกรดแกลลิกและไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ตามลำดับ โดย Wong และคณะ (2002) รายงานว่า กระเจียบแดงมีปริมาณ 2,530 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ในรูปเดลฟิnidin-3-กลูโคไซด์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่ได้จากการทดลองซึ่งใช้กระเจียบแดงแห้งเปรียบเทียบกับที่รายงานโดย Wong และคณะ (2002) ซึ่งใช้กระเจียบแดงสด พบว่า ในกระเจียบแดงแห้งที่ได้จากการทดลองจะมีแอนโทไซยานินทั้งหมดน้อยกว่าในกระเจียบแดงสดมาก อาจเป็นเพราะว่าการนำกระเจียบแดงสดมาทำให้แห้งนั้นอาจทำให้สารสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลงไปได้ นอกจากนี้วิธีเตรียมสารสกัดตัวอย่างจากกระเจียบแดงและการวิเคราะห์แอนโทไซยานินทั้งหมดที่ใช้ก็แตกต่างกัน และปริมาณสารสำคัญในกระเจียบแดงหรือพืชชนิดอื่น ๆ ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ฤดูกาลเก็บเกี่ยว ระยะเวลาที่เก็บพืช สภาพดิน สภาพอากาศ ปริมาณน้ำ ชนิดและปริมาณสัดส่วนของปุ๋ยและอาหารเสริม เป็น

ต้น แต่ผลดีของการทำพีชสคให้แห้งจะช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีอยู่ในพีชสคนั้น (รัตนา, 2547) นอกจากนี้

## 4.2 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดง

### 4.2.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกระเจียบแดงที่ความเข้มข้น 0.0010 - 0.0035 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา ในกรณีตัวอย่างสารสกัดกระเจียบแดงมีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดี จะทำให้สีม่วงแดงของสารละลาย DPPH จางลงได้มาก และเมื่อติดตามสีม่วงแดงของสารละลายปฏิกิริยาที่เปลี่ยนแปลงไป โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ให้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ของสารละลายปฏิกิริยากับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาในการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาควบคุม (control) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ประมาณ 0.8 และคงที่ตลอดระยะเวลาของปฏิกิริยา 30 นาที แต่ในกรณีตัวอย่างสารสกัดกระเจียบแดง พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายปฏิกิริยาลดลงมากขึ้น แสดงว่า สารสกัดกระเจียบแดงมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี โดยประสิทธิภาพการทำลายอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DPPH จะสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดกระเจียบแดงมากขึ้น กล่าวคือ ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 30 นาที เปอร์เซ็นต์ DPPH ลดลงจาก 68.51 เป็น 22.63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดกระเจียบแดงเพิ่มขึ้นจาก 0.0010 เป็น 0.0035 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา

#### 4.2.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ( $^{\circ}\text{OH}$ )

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}\text{OH}$  ของสารสกัดกระเจียบแดง ที่ความเข้มข้น 0.0002 - 0.0010 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา ในกรณีตัวอย่างสารสกัดกระเจียบแดงมีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดี จะทำให้สีชมพูของสารละลายปฏิกิริยาซึ่งดูดกลืนแสงได้ที่ 532 นาโนเมตร จางลงได้มากขึ้น ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}\text{OH}$  ของสารสกัดกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ระดับความเข้มข้น ( $\times 10^{-3}$ เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก/ปริมาตรสารละลายปฏิกิริยา)	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $^{\circ}\text{OH}$ ของสารสกัดกระเจียบแดง (เปอร์เซ็นต์)
0.2	44.39 $\pm$ 0.07
0.4	46.40 $\pm$ 2.11
0.6	48.17 $\pm$ 1.35
0.8	49.50 $\pm$ 1.39
1.0	51.36 $\pm$ 0.17

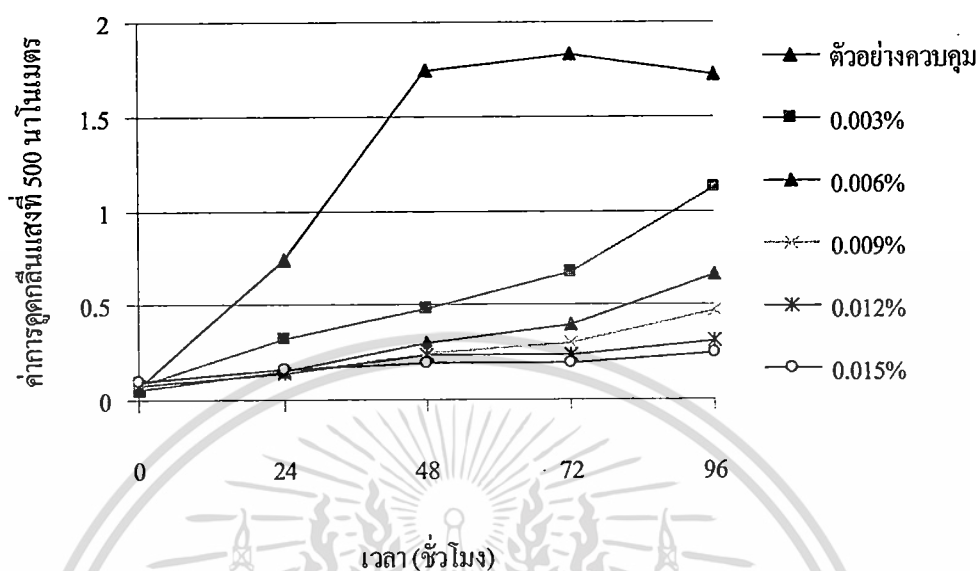
เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}\text{OH}$  ของสารสกัดกระเจียบแดงจากการทดลองในตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่า เมื่อระดับความเข้มข้นของสารสกัดกระเจียบแดงเพิ่มขึ้น จาก 0.0002 เป็น 0.0010 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา ความสามารถในการทำลาย  $^{\circ}\text{OH}$  จะมีค่าเพิ่มขึ้น จาก 44.39 เป็น 51.36 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารสกัดกระเจียบแดงมีผลต่อความสามารถในการทำลาย  $^{\circ}\text{OH}$  ได้ดี

#### 4.2.3 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC

จากการศึกษาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดง ที่ระดับความเข้มข้น 0.003 - 0.015 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา โดยวิธี FTC ซึ่งมีหลักการคือ วัดปริมาณเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในขั้นเริ่มต้น (initiatial stage) ของปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) โดยเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไปออกซิไดซ์  $\text{Fe}^{2+}$  ไปเป็น  $\text{Fe}^{3+}$  ในสถานะที่มีแอมโมเนียมไรโอไซยานเนท  $\text{Fe}^{3+}$  จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีแดง และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ 500 นาโนเมตร ดังนั้นถ้ามีปริมาณเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นในปฏิกิริยามาก สีแดงที่เกิดขึ้นก็จะเข้มมากผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของสารละลายปฏิกิริยาในการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิโดโดยวิธี FTC ของสารสกัดกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.2 จะเห็นได้ว่า เมื่อระดับความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายปฏิกิริยามีค่าลดลง และเมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เวลาของปฏิกิริยา 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 44.02, 51.68, 74.82, 84.47, 90.13 เปอร์เซ็นต์ สำหรับความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับ 0.003, 0.006, 0.009, 0.012, 0.015 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกราฟของปฏิกิริยาควบคุม (control) ซึ่งไม่มีการเติมสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันใดๆ พบว่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปและหลังจาก 48 ชั่วโมง จะมีค่าค่อนข้างคงที่ ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเติมสารสกัดกระเจียบแดงในสารละลายปฏิกิริยาในปริมาณที่สูงขึ้นมีผลทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกถูกยับยั้งมากขึ้น

#### 4.2.4 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ )

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำลาย  $H_2O_2$  ของสารสกัดกระเจียบแดงที่ความเข้มข้น 0.025 ถึง 0.125 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตรสารละลายปฏิกิริยา ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการทำลาย  $H_2O_2$  ของสารสกัดกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ระดับความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ ปริมาตรสารละลายปฏิกิริยา)	ความสามารถในการทำลาย $H_2O_2$ ของสารสกัดกระเจียบแดง (เปอร์เซ็นต์)
0.025	33.92 ± 1.30
0.050	39.11 ± 0.84
0.075	46.96 ± 1.39
0.100	52.74 ± 0.49
0.125	59.64 ± 0.59

เมื่อพิจารณาความสามารถในการทำลาย  $H_2O_2$  ของสกัดกระเจียบแดง จากผลการทดลองในตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่า เมื่อปริมาณของสารสกัดกระเจียบแดงเพิ่มขึ้น จาก 0.025 เป็น 0.125 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา ความสามารถในการทำลาย  $H_2O_2$  จะมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 33.92 เป็น 59.64 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกระเจียบแดงมีประสิทธิภาพในการทำลาย  $H_2O_2$  ได้ดี

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธีที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 วิธี จะใช้ค่า  $EC_{50}$  โดยคำนวณให้อยู่ในหน่วยของมิลลิกรัมสารสกัดกระเจียบแดงต่อมิลลิกรัมของอนุมูลอิสระหรือสารตั้งต้นของปฏิกิริยานั้น ๆ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ใดที่ให้ค่า  $EC_{50}$  ต่ำ แสดงว่า ตัวอย่างสารสกัดกระเจียบแดงมีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระหรือต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้น ในวิธีวิเคราะห์นั้น ๆ ได้ดี ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจียบแดง

สารตัวอย่าง	EC <sub>50</sub> ของความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ			
	DPPH (มิลลิกรัมสารตัวอย่าง/ มิลลิกรัม DPPH)	°OH (มิลลิกรัมสารตัวอย่าง/ มิลลิกรัม °OH)	FTC (มิลลิกรัมสารตัวอย่าง/ มิลลิกรัม กรดลิโนเลอิก)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (มิลลิกรัมสารตัวอย่าง/ มิลลิกรัม H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
สารสกัดกระเจียบแดง	1.16	7.12	0.02	4.44
วิตามินซี	0.17	0.04	1.12	1.78
โทรลอกซ์	0.26	4.27	0.01	0.80

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจียบแดง โดยใช้ EC<sub>50</sub> ซึ่งหมายถึงปริมาณของสารสกัดกระเจียบแดงที่ต้องการใช้ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันลง 50 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ชัดเจนว่า สารสกัดกระเจียบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (วิธี FTC) ได้ดีที่สุดในแง่ที่ได้จากค่า EC<sub>50</sub> ที่ต่ำที่สุดนั่นเอง รองลงมาคือการต้านอนุมูลอิสระ DPPH การทำลาย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และการต้านอนุมูลอิสระ °OH ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงกับวิตามินซีและโทรลอกซ์ พบว่า สารสกัดกระเจียบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ได้ใกล้เคียงกับโทรลอกซ์ แต่กลับพบว่าวิตามินซีมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ต่ำที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธีนี้ สารละลายปฏิกิริยาจะอยู่ในรูปของอิมัลชัน ซึ่งถ้าสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมีสมบัติละลายได้ดีในไขมัน (lipophilic) สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะจับอยู่กับน้ำมันที่บริเวณผิวสัมผัส (interface) ระหว่างน้ำมันและน้ำ ซึ่งจะช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี แต่สำหรับวิตามินซีซึ่งเป็นสารที่ละลายได้ดีในน้ำ (hydrophilic) จึงแยกไปอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำมากกว่าที่จะจับอยู่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำมันและน้ำ ดังนั้นประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันจึงต่ำ (Frankel and Meyer, 2000)

เมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกระเจียบแดง พบว่า มีค่า EC<sub>50</sub> มากกว่าวิตามินซีและโทรลอกซ์ ประมาณ 6.8 และ 4.4 เท่า ตามลำดับ สำหรับค่า EC<sub>50</sub> ของความสามารถในการทำลาย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ของสารสกัดกระเจียบแดง จะสูงกว่าของวิตามินซีและ

โทรลอคซ์ ประมาณ 2.5 และ 5.5 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ ค่า  $EC_{50}$  ในการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}OH$  ของสารสกัดกระเจียบแดงมีค่ามากกว่าโทรลอคซ์ประมาณ 1.7 เท่า แต่มีค่าสูงกว่าวิตามินซีมากถึง 178 เท่า แสดงว่าวิตามินซีมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}OH$  ได้ดีกว่าสารสกัดกระเจียบแดงมาก จากข้อมูลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า วิตามินซีและโทรลอคซ์มีประสิทธิภาพในการทำลาย  $H_2O_2$  และการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}OH$  ได้ดีกว่าสารสกัดกระเจียบแดง

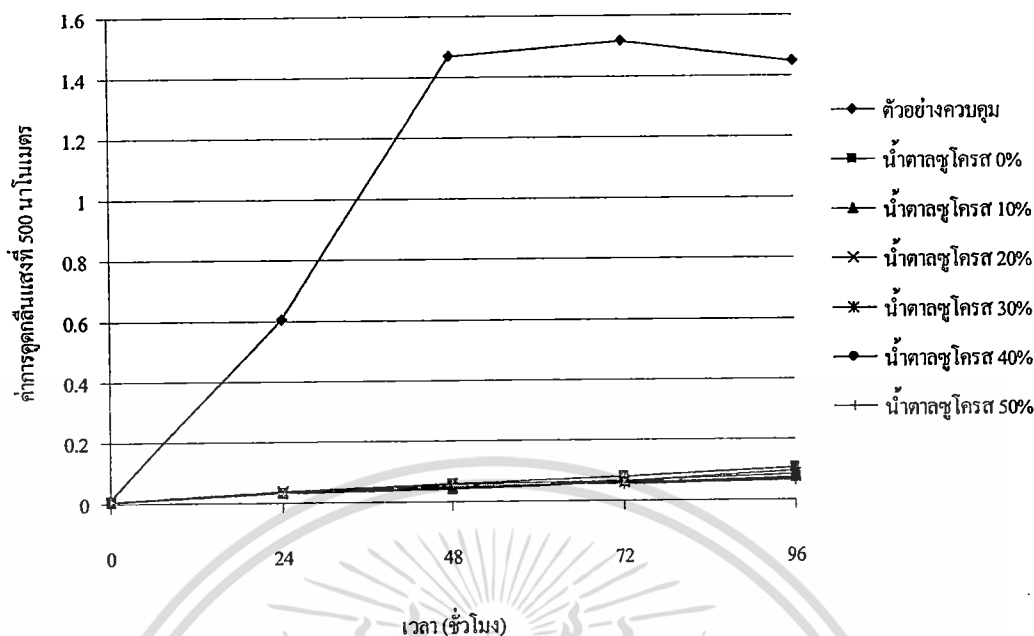
จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจียบแดงกับวิตามินซีและโทรลอคซ์ ที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 วิธีข้างต้น พบว่า โดยส่วนใหญ่สารสกัดกระเจียบแดงจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำกว่าวิตามินซีและโทรลอคซ์ เนื่องจากสารสกัดกระเจียบแดงจะอยู่ในรูปของสารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งเป็นสารสกัดจากพืชที่นำมาใช้โดยไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ มีองค์ประกอบของสารประกอบหลายชนิด ย่อมมีผลทำให้มีประสิทธิภาพด้อยกว่าวิตามินซีและโทรลอคซ์ซึ่งอยู่ในรูปของสารบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในตารางที่ 4.4 พบว่า สารสกัดกระเจียบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ได้ใกล้เคียงกับโทรลอคซ์ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกระเจียบแดงเป็นสารต้านออกซิเดชันธรรมชาติที่ดีและอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป

เป็นที่น่าสังเกตว่าสารสกัดกระเจียบแดง วิตามินซี และโทรลอคซ์ จะมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแตกต่างกันในแต่ละวิธี เช่น วิตามินซีมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}OH$  ได้ดีกว่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC และการทำลาย  $H_2O_2$  4.3, 28 และ 45 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่โทรลอคซ์มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ได้ดีกว่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH การทำลาย  $H_2O_2$  และการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}OH$  ถึง 26, 80 และ 427 เท่า ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารแต่ละชนิดจะมีศักยภาพในการทำลายอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแตกต่างกันไป และสารชนิดเดียวกันอาจมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแต่ละชนิดแตกต่างกันด้วย

#### 4.3 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ของสารสกัดกระเจียบแดง

จากการศึกษาผลของน้ำตาลซูโครส (0-50 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา) ต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงในหลอดทดลองโดยใช้วิธี FTC ซึ่งน่าจะเป็นวิธีที่มีปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเกิดขึ้นเทียบเคียงได้กับที่เกิดในกุนเชียงมากกว่าวิธีอื่น ๆ อีก 3 วิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ผลการทดลอง แสดงดังรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

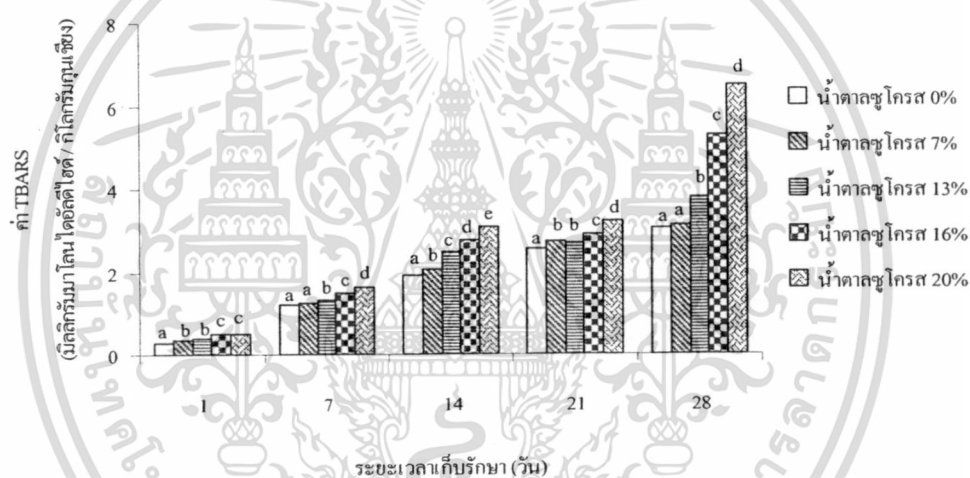


**รูปที่ 4.3** ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของสารละลายปฏิกิริยาในการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี FTC ของสารสกัดกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ กัน

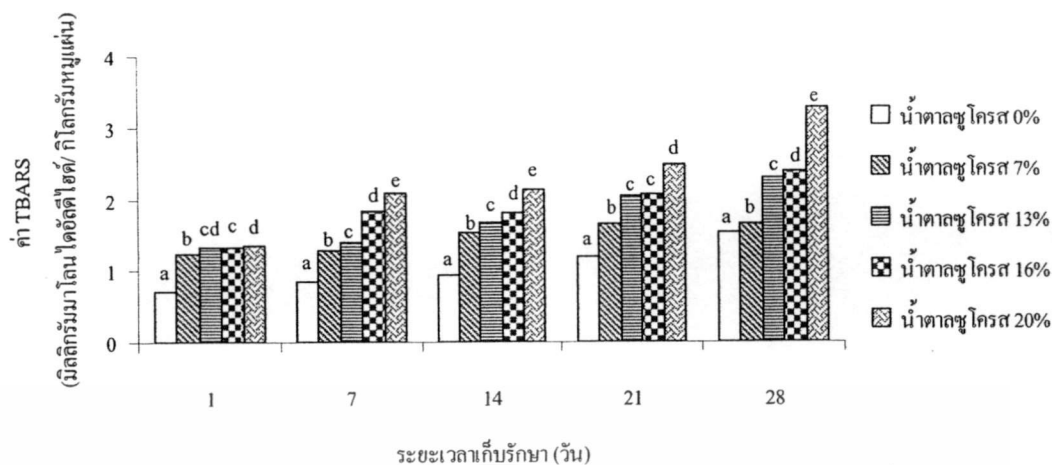
จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสทุกระดับ การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตรของสารละลายปฏิกิริยาที่เวลาต่าง ๆ มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกระเจียบแดงมีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี FTC ใกล้เคียงกันที่ทุกระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ดังนั้นสถานะที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่สามารถตรวจพบผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากสถานะในหลอดทดลองมีความเข้มข้นของสารสกัดกระเจียบแดงที่สูงเกินไป (0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา) รวมทั้งในกุนเชียงจะมีองค์ประกอบทางเคมีอื่น ๆ ที่แตกต่างจากในหลอดทดลอง จึงทำให้เห็นผลการทดลองแตกต่างกัน และไม่เห็นผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเป็นโปร-ออกซิแดนซ์ของสารสกัดกระเจียบแดงในหลอดทดลอง

#### 4.4 ผลของน้ำตาชชูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัด กระเจียบแดงในกุนเชียงและหมูแผ่น

จากการศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงและหมูแผ่น โดยเตรียมกุนเชียงหรือหมูแผ่นที่เติมสารสกัดจากกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเติมน้ำตาชชูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0, 7, 13, 16 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยเติมลงในส่วนผสมกุนเชียงหรือหมูแผ่นและดำเนินการผลิตตามขั้นตอนจนกระทั่งได้กุนเชียงหรือหมูแผ่นดิบ นำมาบรรจุในถุงพลาสติก (nylon/LLDPE ความหนา 80 ไมครอน) ด้วยระบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) วิเคราะห์ค่า TBARS ของกุนเชียงหรือหมูแผ่นทุก 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4-4.5



รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษา กุนเชียงดิบที่เติมสารสกัดจากกระเจียบแดง 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาชชูโครสต่างกัน หมายถึง a-e อักษรที่ต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ของค่า TBARS ของตัวอย่างในวันที่เก็บรักษาเดียวกัน



**รูปที่ 4.5** การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาหมูแผ่นคิบที่เติมสารสกัดจากกระเจียบแดง 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่างกัน หมายถึง a-e อักษรที่ต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ของค่า TBARS ในวันที่เก็บรักษาเดียวกัน

จากรูปที่ 4.4 จะเห็นได้ว่า น้ำตาลซูโครสมีผลต่อค่า TBARS ของกุนเชียงคิบที่เติมสารสกัดกระเจียบแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดยจะเห็นได้ชัดเจนว่าเมื่อระดับของน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ผลิตภัณฑ์มีค่า TBARS เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาและสูงกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำตาลซูโครส กล่าวคือ กุนเชียงคิบที่เติมน้ำตาลซูโครส 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะมีค่า TBARS สูงกว่าตัวอย่างควบคุมเล็กน้อย แต่จะเริ่มสังเกตเห็นว่าเมื่อระดับน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นเป็น 13 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตัวอย่างกุนเชียงจะมีค่า TBARS ที่สูงขึ้น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นชัดเจนที่ระดับของน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 16 เปอร์เซ็นต์และสูงสุดเมื่อระดับน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า น้ำตาลซูโครสที่เติมลงในส่วนผสมของกุนเชียง มีผลต่อการลดประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงสำหรับสาเหตุสำคัญที่น้ำตาลซูโครสมีผลต่อการแสดงสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงนั้น น่าจะมีผลมาจากน้ำตาลซูโครสไปทำให้เกิดกลไกการสลายตัวของแอนโทไซยานินที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดกระเจียบแดง ซึ่งเหตุผลดังกล่าวสามารถสนับสนุนด้วยข้อมูลการวิจัยที่รายงานโดย Tinley และ Bockian (1959) ที่พบว่าน้ำตาลซูโครสมีผลในการเร่งการสลายตัวของแอนโทไซยานิน และที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูงขึ้น ก็จะมีผลต่อการทำลายแอนโทไซยานินได้เร็วขึ้นด้วย

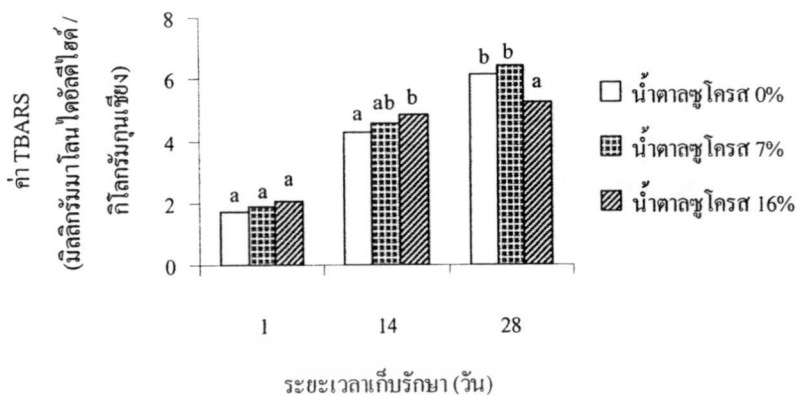
รูปที่ 4.5 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า TBARS ของหมูแผ่นคิบที่เติมสารสกัดกระเจียบแดง 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ กัน ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 28 วัน พบว่าเมื่อระดับน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีค่า TBARS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ของตัวอย่างหมูแผ่นดังกล่าว เป็นไปในลักษณะเดียวกันกับกรณีของตัวอย่างกุนเชียง

จากผลการทดลองข้างต้นเมื่อเปรียบเทียบค่า TBARS ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ทั้ง 2 ชนิด คือ กุนเชียงและหมูแผ่นดิบที่เติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่า ที่ระดับ น้ำตาลซูโครสเท่ากัน กุนเชียงดิบจะมีค่า TBARS สูงกว่าในหมูแผ่นดิบมาก ตัวอย่างเช่น ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษาตัวอย่างกุนเชียงที่เติมน้ำตาลซูโครส 16 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่า TBARS เท่ากับ 5.23 มิลลิกรัมมาโลนไดอิล-ดีไฮด์/กิโลกรัมกุนเชียง ในขณะที่ตัวอย่างหมูแผ่นที่เติมน้ำตาลเท่ากันมีค่า TBARS เท่ากับ 2.37 มิลลิกรัมมาโลนไดอิล-ดีไฮด์/กิโลกรัมหมูแผ่น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าใน กุนเชียงจะมีส่วนผสมของไขมัน (มันแข็ง) ปริมาณที่สูงกว่าหมูแผ่นประมาณ 2 เท่า นอกจากนี้ ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการผลิตกุนเชียงนั้น ใช้เวลาในการอบแห้งที่นานกว่าหมูแผ่นมาก กล่าวคือ กุนเชียงจะใช้เวลาในการอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง ในขณะที่ หมูแผ่นใช้เวลาอบที่อุณหภูมิเดียวกันเพียง 1-2 ชั่วโมง ดังนั้นกุนเชียงจึงมีโอกาสเกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชันของไขมันได้มากกว่าหมูแผ่น การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS จึงสูงกว่าในหมูแผ่นดิบ

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ชัดเจนว่า กุนเชียงและหมูแผ่นดิบที่เติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในสถานะที่มีน้ำตาลซูโครสจะทำให้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยา ออกซิเดชันลดลง และระดับของน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาสูงขึ้นกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมน้ำตาลซูโครส จากผลการทดลองใน รูปที่ 4.4 อาจเกิดคำถามขึ้นว่าในสถานะที่มีน้ำตาลซูโครสเพียงอย่างเดียว โดยไม่มีการเติมสารสกัด กระเจี๊ยบแดง จะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า TBARS ในตัวอย่างกุนเชียงหรือไม่ และเพื่อเป็นการ ยืนยันผลของน้ำตาลซูโครสต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงใน ผลิตภัณฑ์กุนเชียง จึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมอีกครั้ง โดยเตรียมกุนเชียงดิบที่เติมปริมาณน้ำตาล ซูโครสแตกต่างกัน คือ 0, 7 และ 16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยไม่มีการเติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดง นำมาบรรจุในถุงพลาสติก (nylon/LLDPE ความหนา 80 ไมครอน) ด้วยระบบสุญญากาศ เก็บรักษา ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) จากนั้นเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่า TBARS ทุก 14 วัน เป็น เวลา 28 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6



**รูปที่ 4.6** การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาคุกกี้เชิงคิปที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยไม่มีการเติมสารสกัดกระเจียบแดง  
 หมายเหตุ a-b อักษรที่ต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ของค่า TBARS ของตัวอย่างในวันที่เก็บรักษาเดียวกัน

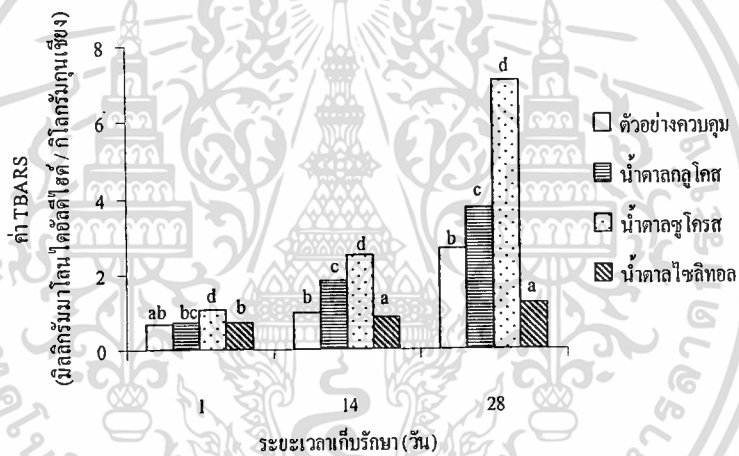
จากรูปที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าในสภาวะที่ไม่มีการเติมสารสกัดกระเจียบแดง ตัวอย่างคุกกี้เชิงคิปที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับ 0, 7 และ 16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีค่า TBARS ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษา อยู่ในช่วง 5 – 7 มิลลิกรัมมาโลนไดอัลดีไฮด์/กิโลกรัมคุกกี้ ซึ่งมีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยคุกกี้เชิงคิปที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับ 7 และ 16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีค่า TBARS ต่ำกว่าหรือใกล้เคียงกับคุกกี้เชิงคิปที่ไม่มีการเติมน้ำตาลซูโครส จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของค่า TBARS ในตัวอย่างคุกกี้เชิงคิปที่เติมสารสกัดกระเจียบแดงและน้ำตาลซูโครสที่ปริมาณต่าง ๆ กัน ตามผลการทดลองในรูปที่ 4.4 นั้นจึงไม่ใช่เป็นผลของน้ำตาลซูโครสเอง แต่เป็นผลมาจากการสลายตัวของแอนโทไซยานินในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสอยู่นั่นเอง

จากผลการทดลองทั้งหมดข้างต้นสรุปได้ว่าการเติมสารสกัดกระเจียบแดงลงในผลิตภัณฑ์คุกกี้และหมูแผ่นในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสจะทำให้แอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุสำคัญในสารสกัดกระเจียบแดงซึ่งทำหน้าที่ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดการสลายตัว ทำให้ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลง โดยระดับการสลายตัวของแอนโทไซยานินจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูงขึ้น สำหรับกรณีของน้ำตาลซูโครสมีผลต่อการเป็นโปรออกซิแดนซ์ของสารสกัดกระเจียบแดงตามที่ Pinsirotom และคณะ (2004) ได้นำเสนอไว้ นั้นยังไม่สามารถยืนยันได้จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.4 นี้ เนื่องจากต้องมีการทดลองที่เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในตัวอย่างคุกกี้เชิงคิปที่เติมสารสกัดกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันและไม่เติมสารสกัดกระเจียบแดง (ตัวอย่างควบคุม) ในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสเท่ากัน ซึ่งควรที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5 ผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงในกุ้งเชียง

จากการทดลองเปรียบเทียบผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงในผลิตภัณฑ์กุ้งเชียง โดยเติมสารสกัดจากกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเติมน้ำตาลต่างชนิดกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และไซลิทอล ที่ระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน คือ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ลงในส่วนผสมกุ้งเชียงและดำเนินการผลิตกุ้งเชียงตามขั้นตอนจนกระทั่งได้กุ้งเชียงดิบ นำมาบรรจุในถุงพลาสติก (nylon/LLDPE ความหนา 80 ไมครอน) ด้วยระบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 3$  องศาเซลเซียส) วิเคราะห์ค่า TBARS ของกุ้งเชียงทุก 14 วัน เป็นเวลา 28 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษากุ้งเชียงดิบที่เติมสารสกัดจากกระเจียบแดง 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในสถานะที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน  
หมายเหตุ a-d อักษรที่ต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ของค่า TBARS ของตัวอย่างกุ้งเชียงในวันที่เก็บรักษาเดียวกัน

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.7 จะเห็นได้ว่า น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคส มีผลทำให้ตัวอย่างกุ้งเชียงมีค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาสูงกว่า ตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมน้ำตาลเลย ในขณะที่ตัวอย่างกุ้งเชียงที่เติมน้ำตาลไซลิทอลมีค่า TBARS ใกล้เคียงหรือต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมมาก จากงานวิจัยของ Tinley และ Bockian (1959) พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากัน น้ำตาลซูโครสจะทำให้แอนโทไซยานินเกิดการสลายตัวได้เร็วกว่าน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซอร์บิทอลซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์จะทำให้แอนโทไซยานินเกิดการสลายตัวช้าที่สุด ซึ่งน้ำตาลไซลิทอลที่ใช้ในการทดลองนี้จัดเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์เช่นเดียวกับซอร์บิทอล ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซลิตอลมีผลต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานินน้อยเช่นเดียวกับซอร์บิทอล นอกจากนี้ข้อมูลจากผลการทดลองไม่สามารถสรุปได้ว่า การสลายตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงในสถานะที่มีน้ำตาลจะเป็นผลของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) หรือน้ำตาลนอนรีดิวซ์ (non-reducing sugar) เนื่องจากน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลโซลิตอลจัดเป็นน้ำตาลนอนรีดิวซ์เหมือนกัน แต่ให้ผลที่แตกต่างกัน

ข้อมูลงานวิจัยของ Tinley และ Bockian (1959) ชำงต้นจึงสนับสนุนผลการทดลองที่ได้ในรูปแบบที่ 4.7 เป็นอย่างดี กล่าวคือ น้ำตาลซูโครสซึ่งมีผลต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานินสูงกว่าน้ำตาลกลูโคส จึงทำให้ตัวอย่างกุนเชียงที่เติมน้ำตาลซูโครสมีค่า TBARS สูงกว่าตัวอย่างกุนเชียงที่เติมน้ำตาลกลูโคส ในขณะที่ตัวอย่างกุนเชียงที่เติมน้ำตาลโซลิตอลซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์นั้นมีค่า TBARS ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษาต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) สาเหตุที่น้ำตาลโซลิตอลมีผลในการทำให้ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมนี้ ยังไม่ทราบแน่ชัด ซึ่งควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



## บทที่ 5

# สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมด  $21.39 \pm 0.11$  และ  $0.45 \pm 0.08$  มิลลิกรัม/กรัม ในรูปของกรดแกลลิกและไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ตามลำดับ เมื่อคำนวณปริมาณของสารประกอบทั้งสองดังกล่าวในกระเจี๊ยบแดงแห้ง พบว่ากระเจี๊ยบแดงแห้งมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมด  $207.87 \pm 1.02$  และ  $4.35 \pm 0.52$  กรัม/100 กรัม ในรูปของกรดแกลลิกและไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ และการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ คือ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}\text{OH}$  ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC และความสามารถในการทำลาย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (วิธี FTC) ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ การต้านอนุมูลอิสระ DPPH การทำลาย  $\text{H}_2\text{O}_2$  และการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}\text{OH}$  ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินซีและโทรลอกซ์ พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ได้ใกล้เคียงกับโทรลอกซ์ แต่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH การทำลาย  $\text{H}_2\text{O}_2$  และการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}\text{OH}$  น้อยกว่าวิตามินซีและโทรลอกซ์

เมื่อศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง โดยวิธี FTC โดยทดสอบในหลอดทดลอง พบว่า ไม่สามารถตรวจพบผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง

การศึกษาค้นคว้าของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในตัวอย่างกุนเชียงและหมูแผ่น พบว่า การเติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงลงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหรือหมูแผ่นในสถานะที่มีน้ำตาลซูโครสจะทำให้ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลง โดยการลดลงของประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเห็นได้ชัดเจนขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูงขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และไซลิทอล ต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียง พบว่า น้ำตาลซูโครสมีผลทำให้ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดกระเจี๊ยบแดงลดลงมากที่สุด รองลงมาคือ กลูโคส ในขณะที่ไซลิทอล ซึ่งเป็นน้ำตาล แอลกอฮอล์ไม่มีผลต่อการลดประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง ในผลิตภัณฑ์กุนเชียง

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองที่ได้มีเหตุผลสนับสนุนชัดเจนว่า น้ำตาลซูโครสมีผลต่อการสลายตัวของ แอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดง ทำให้ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงลดลง อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าผลที่เกิดขึ้นดังกล่าวเป็นสาเหตุทำให้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงแสดงสมบัติโปรออกซิแดนซ์ตามที่เสนอโดย Pinsirotom และคณะ (2004) ด้วยหรือไม่ ดังนั้นจึงน่าจะมีการทดลองเพื่อหาข้อสรุปเกี่ยวกับผลของ น้ำตาลซูโครสต่อการเป็นโปรออกซิแดนซ์ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในกุนเชียงต่อไป

นอกจากนี้ในการทดลองที่ใช้น้ำตาลไซลิทอลเติมลงในส่วนผสมกุนเชียง พบว่า มีแนวโน้มในการเสริมให้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกุนเชียงได้ดีขึ้น จึงน่าจะมีการทดลองต่อไปว่า น้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดอื่น ๆ เช่น ซอร์บิทอล แมนนิทอล เป็นต้น รวมทั้งระดับความเข้มข้นของน้ำตาลดังกล่าวมีผลอย่างไรต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง ซึ่งจะเป็นการยืนยันผลการทดลองที่ได้ดังกล่าว รวมทั้งได้ ข้อมูลใหม่ๆ ในการประยุกต์ใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

## บรรณานุกรม

- เกษม สร้อยทอง. 2545. *พืชสมุนไพร*. กรุงเทพฯ : งานเอกสารการพิมพ์ สำนักเลขานุการ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม, วันทนี ช่างน้อย. 2545. การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล ทั้งหมดและศักยภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปลูกในประเทศไทย. *อาหาร*. 32 : 300-307.
- ประไพภัทร คลังทรัพย์. 2547. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารจากพืช. *Lab. Today*. 3 : 36-41.
- รัตนา อินทรานุกรณ์. 2547. *การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร*. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร. 2549. สถานการณ์พืชผัก. *จดหมายข่าวส่วนส่งเสริมการผลิตผัก ไม้ดอก ไม้ประดับและสมุนไพร*. 3 (11) : 38-39. (Online). เข้าถึงได้จาก : <http://www2.doae.go.th/www/floriade/06year/11.pdf>.
- สุริยญา โพธิ์ดิษฐ์ศิริ. 2547. การใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาบัณฑิต, คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล, มูลนิธิโตโยต้าประเทศไทย. 2545. *มหัศจรรย์ผัก 108 / คณะทำงานรวบรวมความรู้เกี่ยวกับผักในโครงการอนุรักษ์ผักสีเขียว*. พิมพ์ครั้งที่ 8. กรุงเทพฯ : มูลนิธิโตโยต้าประเทศไทย: โครงการจัดพิมพ์คบไฟ.
- Ali, B.H., Mousa, H.M., El-Mougy, S. 2003. The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res*. 17 : 56-59.
- Aruoma, O.I. 1994. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *In Methods in enzymology*, vol. 233 (Packer, L., ed.). New York : Academic Press, Inc. 57-66.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols : chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev*. 56 : 317-333.
- Brouillard, R. 1982. Chemical structure of anthocyanins. *In Anthocyanins as food colors*. (Markakis, P. ed) New York : Academic Press.

Chang, Y.C., Huang, H.P., Hsu J.D., Yang, S.F., Wang, C.J., 2004. *Hibiscus* anthocyanins rich เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205 : 201–212.
- Du, C.T., Francis, F.L. 1973. Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J. Food Sci.* 38 : 810-812.
- Frankel, E.N., Meyer, A.S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 80 : 1925-1941.
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by uv-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry.* (Ronald, E.W., Terry, E.A., Haejung, A., Eric, A.D., Michael, H.P., Davis, S.R., Steven, J.S., Charles, F.S., Peter, S. eds.). New York : John Wiley & Sons, Inc.
- Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S., Aruoma, O.I. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35 : 7–20.
- Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N.P., Bunyapraphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A., Suthissang, C. 2006. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *J. Ethnopharmacol.* 103 : 252–260.
- Huang, T.C., Nip, W.K. 2001. Intermediate moisture meat and dehydrated meat. *In Meat science and applications.* (Hui, Y.H., Nip, W.K., Rogers, R.W., Young, O.A. eds). New York : Mercel Dekker.
- Julie, B., Alan, C., Garry, G.D. 2005. Potential health benefits of berries. *Current Nutr. & Food Sci.* 1 : 71-86.
- Kalyanaraman, B., Gutterman, D.D. 2003. Vascular signaling by free radicals prologue: vascular effects of free radical. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285 : 2253–2254.
- Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T., Brouillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem.* 64 : 923-933.
- Larrauri, J.A., Goni, I., Martin-Carron, N., Ruperez, P., Saura-Calixto, F. 1996. Measurement of health-promoting properties in fruit dietary fibers: antioxidant capacity, fermentability and glucose retardation index. *J. Sci. Food Agric.* 71 : 515-519.
- Lawrie, R.A. 1991. The storage and preservation of meat-II. *In Meat science.* 5th ed. Oxford : Pergaman Press.

- Lee, M.J., Chou, F.P., Tseng, T.H., Hsieh, M.H., Lin, M.C., Wang, C.J. 2002. *Hibiscus* protocatechuic acid or esculetin can inhibit oxidative LDL induced by either copper ion or nitric oxide donor. *J. Agric. Food Chem.* 50 : 2130-2136.
- Lui, J.Y., Chen, C.C., Wang, W.H., Hsu, J.D., Yang, M.Y., Wang, C.J. 2005. The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats. *Food Chem. Toxicol.* 44 : 336-343.
- Mishra, M., Shukla, Y.N., Jain, S.P., Kumar, S. 1999. Chemistry and pharmacology of some *Hibiscus spp.*- a review. *J. Med. Aromatic Plant Sci.* 24 : 1169-1186. .
- Morton, J.F. 1987. Roselle. In *Fruits of warm climates.* (Curtis C.F., ed.). Miami : Winterville, N.C. (Online). Available : <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/roselle.html>.
- Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. 2004. Effect of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. *J. Food Sci.* 69 : FCT7-FCT10.
- Pinsirodom, P., Phoditsiri, S., Surapunpid, Y. 2004. Antioxidant and pro-oxidant activities of red sorrel (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract in ethnic meat products. The 10th World Congress on Clinical Nutrition, Nov. 30-Dec. 3, Phuket, Thailand. 167p. (Abstract).
- Prenci, E., Berto, S., Daniele, P.G., Toso S. 2007. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chem.* 100 : 433-438.
- Rhodes, M. J. 1996. Physiologically-active compounds in plant food : an overview. *Proc. Nutr. Soc.*, 55 : 371-384.
- Shahidi, F., Rubin, L.J., Diosady, L.L., Woud, D.F. 1985. Effect of sulphanilamide on the TBA value of cured meats. *J. Food Sci.* 50 : 274-275.
- Tee, P.L., Yusof, S., Mohamed, S. 2002a. Antioxidative properties of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in linoleic acid model system. *Nutr. Food Sci.* 32 : 17-20.
- Tee, P.L., Yusof, S., Mohmed, S., Umar, N.A., Mustapha, N.M. 2002b. Effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) on serum lipids of Sprague Dawley rats. *Nutr. Food Sci.* 32 : 190-196.
- Tinsley, I.J., Bockian, A.H., 1959. Some effects of sugars on the breakdown of peragonidin-3-glucoside in model systems at 90°C. *Food Res.* 25 : 161-173.
- Tsai, P. J., Ou, A.S.M. 1996. Colour degradation of dried roselle during storage. *Food Sci.* 23 : 629-640.

Varnam, A.H., Sutherland, J.P. 1995. Dried meats, intermediate moisture meats and extracts.

*In Meat and meat products : technology, chemistry and microbiology.* London :  
Chapman and Hall.

Wong, P.K., Yusof, S., Ghazali, H.M., Che Man, Y.B. 2002. Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutr. Food Sci.* 32 : 68-73.

Yeum, K.J., Aldini, G., Chung, H.Y., Krinsky, N. I., Russell, R.M. 2003. The activities of antioxidant nutrients in human plasma depend on the localization of attacking radical species. *J. Nutr.* 133 : 2688-2691.

Yen, G.C., Chen, A.Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43 : 27-37.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก  
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol contents)  
และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (total anthocyanin contents)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (ประพันธ์ และวันทนีย์, 2545)

### 1.1 สารเคมี

1.1.1 Folin-Ciocalteu

1.1.2 โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

1.1.3 สารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

### 1.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

1.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้นเริ่มต้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย

1.2.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานดังกล่าวใส่หลอดทดลอง หลอดละ 0, 0.05, 0.15, 0.20, 0.30 และ 0.35 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 10 มิลลิลิตร

1.2.3 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

1.2.4 เติมสารละลาย โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

1.2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร

1.2.6 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดแกลลิกในหน่วย ไมโครกรัม

### 1.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลในตัวอย่างสารสกัด

1.3.1 ปิเปตตัวอย่างสารละลายสารสกัดที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยใช้เอธานอล 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเป็น 10 มิลลิลิตร

1.3.2 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

1.3.3 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

1.3.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร โดยใช้เอธานอล 40 เปอร์เซ็นต์เป็น blank

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 1.4 ตัวอย่างการคำนวณ

คำนวณปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมดของตัวอย่างสารสกัดกระเจียบแดง โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวิเคราะห์ในข้อ 1.3 มาแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานของกรด- แกลลิก ดังรูปที่ ก 1 โดยมีตัวอย่างการคำนวณดังนี้

เตรียมสารละลายสารสกัดกระเจียบแดงความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยละลายสารสกัดกระเจียบแดง 1.0 กรัม ด้วยเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดกระเจียบแดง 1 เปอร์เซ็นต์จะได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.614 เมื่อนำไปแทนในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก คือ  $y = 0.0057x + 0.0045$  ดังนั้นค่า  $x = 106.929$  ไมโครกรัม หรือ 0.107 มิลลิกรัม

ปีเปตตัวอย่างสารสกัดกระเจียบแดงมา 0.5 มิลลิลิตร มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด 0.107 มิลลิกรัม

ปีเปตตัวอย่างสารสกัดกระเจียบแดงมา 100 มิลลิลิตร มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด เท่ากับ  $(0.107 / 0.5) \times 100$  เท่ากับ 21.386 มิลลิกรัม

โดยที่ตัวอย่างสารสกัด 100 มิลลิลิตรนั้นมีเนื้อของสารสกัดอยู่ 1 กรัม (จากการเตรียมสารสกัดกระเจียบแดง 1 เปอร์เซ็นต์)

ดังนั้นสารสกัด 1.0 กรัม จึงมีปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมด 21.386 มิลลิกรัม

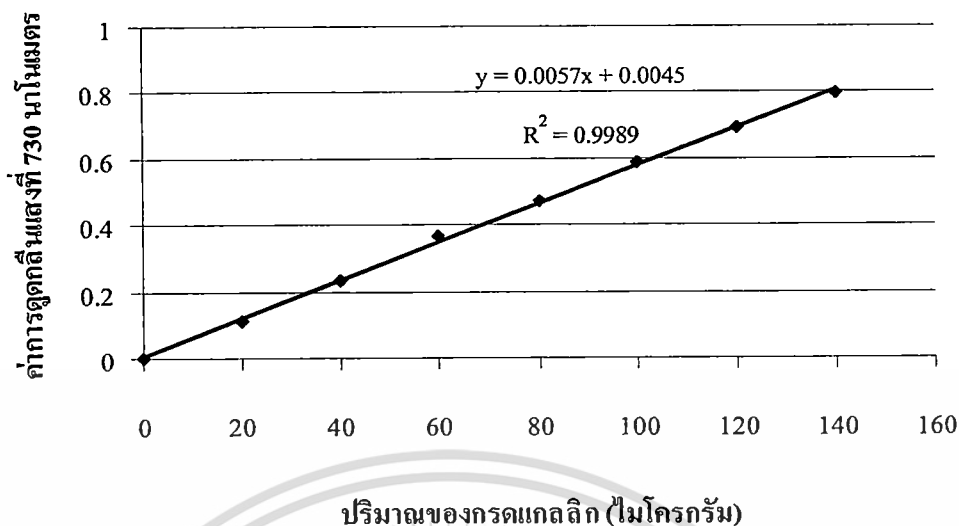
เมื่อสกัดกระเจียบแดงแห้ง 25 กรัม จะได้ปริมาณสารสกัดกระเจียบแดง 2.43 กรัม

สารสกัดกระเจียบแดง 1.0 กรัม มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด 21.386 มิลลิกรัม

สารสกัดกระเจียบแดง 2.43 กรัม มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด  $(21.386 / 1.0) \times 2.43 = 51.97$  มิลลิกรัม

เพราะฉะนั้นกระเจียบแดงแห้ง 25 กรัม จะมีปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมด 51.97 มิลลิกรัม

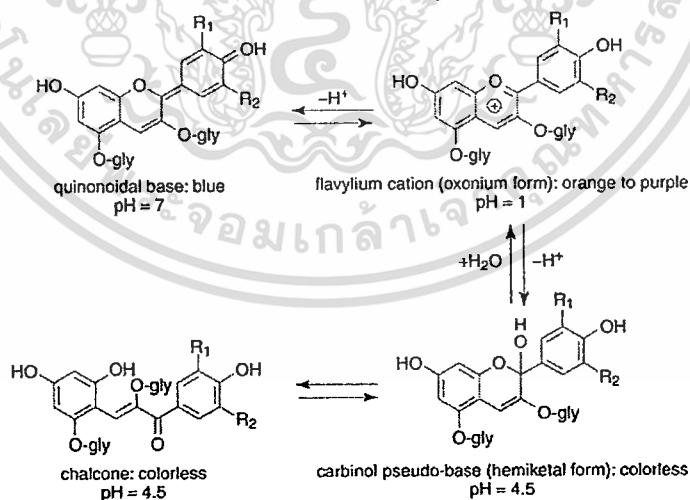
กระเจียบแดงแห้ง 100 กรัม จะมีปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมด 207.88 มิลลิกรัม



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินทั้งหมด ในรูปของ cyanidin-3-glucoside จะใช้วิธี pH-different ที่รายงานโดย Giusti และ Wrolstad (2001) โดยแอนโทไซยานินมีการเปลี่ยนฟอร์มของโครงสร้างเมื่อพีเอชเปลี่ยนแปลงมีผลทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorbance spectra) เปลี่ยนไป ซึ่งฟอร์มของออกโซเนียม (oxonium) จะให้สีที่พีเอช 1.0 และจะไม่มีสีเมื่ออยู่ในฟอร์มของเฮมิเคทอล (hemiketal) ที่พีเอช 4.5 ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานินเมื่อพีเอชในสารละลายเปลี่ยนไป

## 2.1 สารเคมี

- 2.1.1 เตรียม 0.025 โมลาร์ โปแทสเซียมคลอไรด์ บัฟเฟอร์ (KCl), pH 1.0 ละลาย โปแทสเซียมคลอไรด์ 1.86 กรัม ในน้ำกลั่น 980 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชจนอ่านได้ 1.0 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก 37 เปอร์เซ็นต์ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น
- 2.1.2 เตรียม 0.4 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), พีเอช 4.5 ละลาย โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 54.43 กรัม ในน้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชจนอ่านได้ 4.5 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก 37 เปอร์เซ็นต์ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

## 2.2 วิธีวิเคราะห์

- 2.2.1 สแกนหาความยาวคลื่นสูงสุด ( $\lambda_{\text{vis-max}}$ ) ของตัวอย่างสารละลายของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงโดยการเจือจางสารสกัดด้วยโปแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์พีเอช 1.0 ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ในระดับปริมาณของสารสกัดไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรรวมของสารละลายเจือจางและสามารถคำนวณค่า dilution factor (DF) ได้ เพื่อรักษาภาวะของ buffer capacity และมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.1-0.9A
- 2.2.2 เตรียมสารละลายตัวอย่าง 2 ชุด และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาทีดังนี้  
ชุดที่ 1 เจือจางสารสกัดกระเจี๊ยบแดงโดยใช้โปแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์พีเอช 1.0  
ชุดที่ 2 เจือจางสารสกัดกระเจี๊ยบแดงโดยใช้โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์พีเอช 4.5
- 2.2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละชุดตัวอย่างสารสกัดที่ความยาวคลื่นสูงสุดและที่ 700 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

## 2.3 ตัวอย่างการคำนวณ

- 2.3.1 ปิเปิดสารละลายตัวอย่างสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 1 เปอร์เซ็นต์มา 1.0 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ( $\text{DF} = 10$ ) ด้วยโปแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์พีเอช 1.0 จะได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.464 ที่ความยาวคลื่นสูงสุด เท่ากับ 520 นาโนเมตร
- 2.3.2 คำนวณค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ของสารละลายตัวอย่าง ดังนี้

$$\begin{aligned} A &= (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700})_{\text{pH } 4.5} \\ &= (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4.5} \\ &= (0.464 - 0.087) - (0.198 - 0.089) = 0.268 \end{aligned}$$

2.3.3 นำค่าการดูดกลืนแสง (A) เท่ากับ 0.2 ไปคำนวณความเข้มข้นของแอนโทไซยานินในตัวอย่าง โดยมีตัวอย่างการคำนวณดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณแอนโทไซยานิน} &= (A \times MW \times DF \times 100) / (\epsilon \times l) \\ &= (0.268 \times 449.2 \times 10 \times 100) / (26900 \times 1) \\ &= 4.48 \text{ มิลลิกรัม/ลิตร} \end{aligned}$$

โดยที่ MW = น้ำหนักโมเลกุล 449.2 (ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์)

DF = dilution factor (สำหรับตัวอย่าง เช่นตัวอย่าง 1.0 มิลลิตร เจือจางได้ ปริมาตรรวมเท่ากับ 10 มิลลิตร, DF = 10)

$\epsilon$  = molar absorptivity ของ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (26,900)

l = ความกว้างของคิวเวต เท่ากับ 1 เซนติเมตร

สารละลายสกัดกระเจี๊ยบแดง 1 % มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด 4.48 มิลลิกรัม/ลิตร

สารละลายสกัดกระเจี๊ยบแดง 1 % 100 มิลลิตร มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด  $(4.48 \times 100) / 1000 = 0.448$  มิลลิกรัม

โดยที่ตัวอย่างสารสกัด 100 มิลลิตร นั้นมีเนื้อของสารสกัดอยู่ 1 กรัม (จากการเตรียมสารละลายสารสกัดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์)

ดังนั้นสารสกัด 1 กรัม จึงมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด 0.448 มิลลิกรัม

เมื่อสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้ง 25 กรัม จะได้ปริมาณสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 2.43 กรัม

ถ้าสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 2.43 กรัม มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด  $(0.448/1) \times 2.43 = 1.09$  มิลลิกรัม

นั่นคือ กระเจี๊ยบแดงแห้ง 25 กรัม มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปของ cyanidin-3-glucoside เท่ากับ 1.088 มิลลิกรัม

หรือกระเจี๊ยบแดงแห้ง 100 กรัม มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปของ cyanidin-3-glucoside เท่ากับ  $(1.088 \times 100) / 25 = 4.35$  มิลลิกรัม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ

### 1. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Murakami *et al.*, 2004)

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH จะใช้วิธีที่รายงานโดย Murakami และคณะ (2004) โดยมีหลักการคือ สารละลายของอนุมูลอิสระ DPPH จะมีสีม่วงแดง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ที่ 517 นาโนเมตร ในกรณีตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ ในการทำลายอนุมูลอิสระ ได้ดี จะทำให้สีม่วงแดงของสารละลาย DPPH จางลง ได้มากกว่าตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ ในการทำลายอนุมูลอิสระ

ได้น้อย

#### 1.1 สารเคมี

1.1.1 สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง DPPH 0.0158 กรัม ละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร

1.1.2 เอทานอล ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์

#### 1.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ DPPH

1.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน DPPH ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.8 มิลลิโมลาร์

1.2.2 ปิเปิดสารละลายมาตรฐานดังกล่าวใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 0.60, 0.53, 0.45, 0.38, 0.30, 0.23, 0.15 และ 0.075 มิลลิลิตร (จะ ได้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ) ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ให้เป็น 6 มิลลิลิตร

1.2.3 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

1.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

1.2.5 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย DPPH (มิลลิโมลาร์)

#### 1.3 การวิเคราะห์สามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในตัวอย่างสารสกัด

1.2.1 ปิเปิดสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ 0.12 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง

1.2.2 ปิเปิดตัวอย่างสารสกัด และเอทานอล ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ปริมาตรของสารละลายที่ทำปฏิกิริยารวมทั้งหมดเป็น 1.2 มิลลิลิตร นั่นคือปริมาตรรวมของตัวอย่างสารสกัด และเอทานอล ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ จะต้องเท่ากับ 1.08 มิลลิลิตร

1.2.3 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

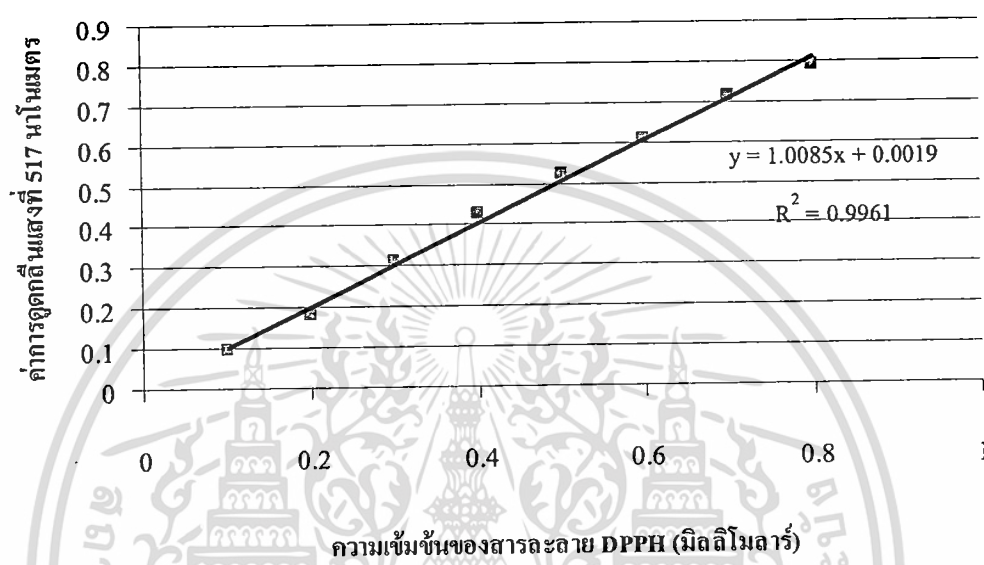
1.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอลความเข้มข้น

เอทธานอล 40 เปอร์เซ็นต์เป็น blank เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1.2.5 กำหนดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

### 1.3 ตัวอย่างการคำนวณ (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998)

1.3.1 สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย DPPH จากวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 1.2 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร มีสมการเส้นตรงคือ  $y = 1.00856x + 0.0019$  และค่า  $R^2 = 0.9961$  ดังแสดงในรูปที่ ข 1



รูปที่ ข 1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย DPPH

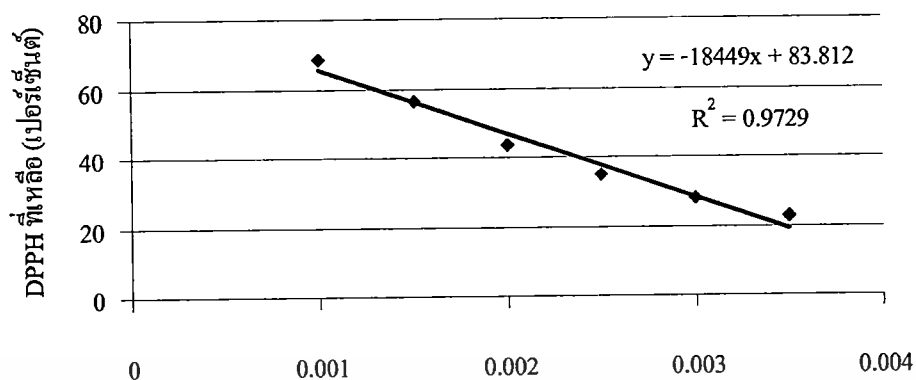
1.3.2 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง แทนค่าในสมการ  $y = 1.00856x + 0.0019$  เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารละลาย DPPH ( $[DPPH]_T$ )

1.3.3 นำค่าความเข้มข้นของสารละลาย DPPH ( $[DPPH]_T$ ) ที่ได้จากการคำนวณในข้อ 1.3.2 แทนค่าในสมการ

$$\% \text{ DPPH ที่เหลือ} = [DPPH]_T / [DPPH]_{T=0} \times 100$$

โดยที่  $[DPPH]_{T=0}$  คือ ความเข้มข้นของสารละลาย DPPH ของหลอดควบคุม (control)

1.3.4 นำค่า % DPPH ที่เหลือ ที่ได้จากการคำนวณในข้อ 1.3.3 มาสร้างกราฟ ที่มีระดับความเข้มข้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงต่าง ๆ กัน โดยในการทดลองนี้ใช้ระดับความเข้มข้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 0.0010 ถึง 0.0035 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา ดังรูปที่ ข 2



ความเข้มข้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง  
(เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตรสารละลายปฏิกิริยา)

รูปที่ ข 2 ปริมาณ DPPH ที่เหลือ เมื่อใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้นต่างกัน

1.3.5 คำนวณหาค่า  $EC_{50}$  จากสมการเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟในข้อ 1.3.4 นั่นคือ

$y = -1852.3x + 84.176$  โดยให้ค่า  $y = 50$  เปอร์เซ็นต์

1.3.6 จากนั้นคำนวณค่า  $EC_{50}$  ของเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่เหลือจากหน่วยเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตรสารละลายปฏิกิริยาให้เป็นหน่วยของมิลลิกรัมของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง/มิลลิกรัมของอนุมูลอิสระ DPPH

## 2. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ( $^{\circ}\text{OH}$ )

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}\text{OH}$  จะใช้วิธีที่รายงานโดย Aruoma (1994) โดยมีหลักการคือ  $\text{Fe}^{2+}$  จะทำปฏิกิริยากับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ  $^{\circ}\text{OH}$  เนื่องจากปฏิกิริยา Fenton จากนั้นอนุมูลอิสระ  $^{\circ}\text{OH}$  จะทำปฏิกิริยากับ deoxyribose ทำให้เกิดการสลายตัวของ deoxyribose และทำให้เกิดสีชมพูซึ่งดูดกลืนแสงได้ที่ 532 นาโนเมตร ดังนั้นถ้ามีอนุมูลอิสระ  $^{\circ}\text{OH}$  มาก deoxyribose ก็จะสลายตัวมาก สีชมพูที่เกิดขึ้นจึงเข้ม แต่ถ้าตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดี จะทำให้สีชมพูจางลงได้มากกว่าตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระได้น้อย

### 2.1 สารเคมี

#### 2.1.1 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก/ไตรบาบิทวริก (TCA / TBA)

2.1.1.1 ชั่ง กรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) 15 กรัม และ ไตรบาบิทวริก (TBA) 0.375 กรัม ละลายใน HCl ความเข้มข้น 0.25 นอร์มอล แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2.1.1.2 ผสมสารละลายในข้อ 2.1.1.1 กับ BHT ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (โดยชั่ง BHT 0.2 กรัม ละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร โดยผสมก่อนที่จะใช้เท่านั้น

#### 2.1.2 สารละลาย Deoxyribose-Ascorbic acid

ชั่ง deoxyribose 90 มิลลิกรัม และ ascorbic acid 8.45 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร

#### 2.1.3 สารละลาย EDTA- $\text{FeCl}_3$

ชั่ง EDTA 37.2 มิลลิกรัม และ  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  27 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

#### 2.1.4 $\text{H}_2\text{O}_2$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

### 2.2 วิธีวิเคราะห์

2.2.1 ปิเปตสารละลาย EDTA- $\text{FeCl}_3$  ปริมาตร 60 ไมโครลิตร

2.2.2 เติมสารละลาย Deoxyribose-Ascorbic acid ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

2.2.3 เติม  $\text{H}_2\text{O}_2$  ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร

2.2.4 เติมตัวอย่างสารสกัด ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

2.2.5 เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 945 ไมโครลิตร

2.2.6 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) นำไปบ่มไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่

37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.7 เมื่อครบ 1 ชั่วโมง บีบสารละลายปฏิกิริยาข้างต้น 0.6 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย TCA / TBA ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร

2.2.8 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) และนำไปป้อนในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

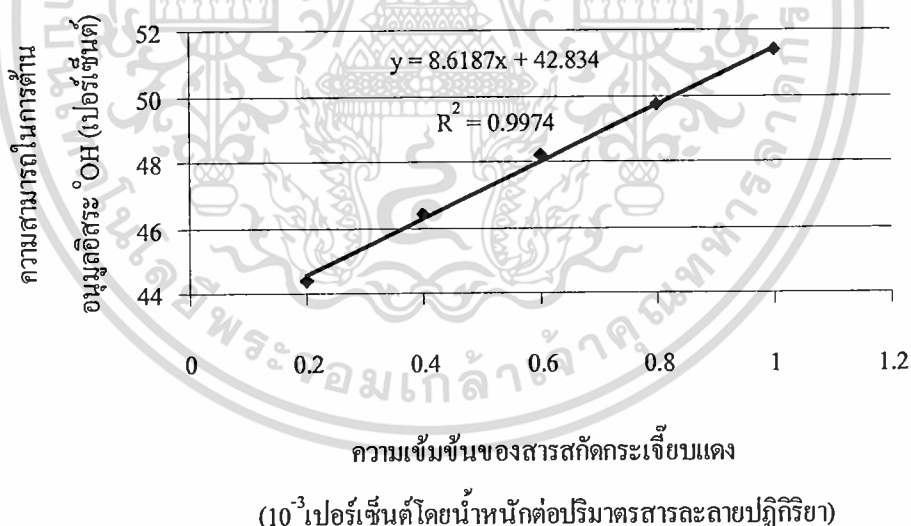
2.2.9 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร โดยที่หลอดควบคุม (control) จะใช้ ฟอสเฟตบัพเฟอร์แทนตัวอย่าง สำหรับ blank ให้ใช้ HCl ความเข้มข้น 0.25 นอร์มอล แทนสารละลาย TCA / TBA

### 2.3 ตัวอย่างการคำนวณ

2.3.1 คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ °OH ของตัวอย่างสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 0.0002 ถึง 0.0010 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายปฏิกิริยาโดยแทนค่าในสมการดังนี้

$$\{1 - (\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} / \text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม})\} \times 100$$

2.3.2 นำค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ °OH ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดกระเจียบแดงต่าง ๆ กัน ซึ่งได้จากการคำนวณในข้อ 2.3.1 มาสร้างกราฟดังรูปที่ ข 3



รูปที่ ข 3 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ °OH เมื่อใช้สารสกัดกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

2.3.3 คำนวณหาค่า  $EC_{50}$  จากสมการเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟในข้อ 2.3.2 นั่นคือ

$$y = 8.5824x + 42.85 \text{ โดยให้ค่า } y = 50 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

2.3.4 จากนั้นคำนวณค่า  $EC_{50}$  ของของเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ  $^{\circ}OH$  จากหน่วยเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตรสารละลายปฏิกิริยาให้เป็นหน่วยของมิลลิกรัมของสารสกัดกระเจียบแดง/มิลลิกรัมอนุมูลอิสระ  $^{\circ}OH$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate colorimetric method (FTC)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC จะใช้วิธีที่รายงานโดย Larrauri และคณะ (1996) มีหลักการคือ วัดปริมาณเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในขั้นเริ่มต้น (initial stages) ของปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) โดยให้ทำปฏิกิริยากับ  $\text{FeCl}_2$  เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีแดง และสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ 500 นาโนเมตร ดังนั้นถ้ามีปริมาณเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยามากสีแดงที่เกิดขึ้นก็จะเข้มมาก

#### 3.1 สารเคมี

3.1.1 สารละลายกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) 2.51 เปอร์เซ็นต์

ชั่งกรดลิโนเลอิก 2.51 กรัม ละลายใน เอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.1.2 สารละลายแอมโมเนียมไรโอไซยาเนต (ammonium thiocyanate) 30 เปอร์เซ็นต์

3.1.3 สารละลายเฟอร์รัสคลอไรด์ (ferrous chloride) 0.02 โมลาร์

ชั่ง  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.199 กรัม ละลายใน HCl ความเข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร

3.1.4 ฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

3.1.5 เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์

#### 3.2 วิธีวิเคราะห์

3.2.1 ปิเปตสารละลายกรดลิโนเลอิก ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

3.2.2 เติมฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.2.3 เติมตัวอย่างสารสกัด ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

3.2.4 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

3.2.5 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) นำไปปั่นไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ในที่ไม่มีแสงรบกวน

3.2.6 ปิเปตสารละลายปฏิกิริยาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ที่เวลาของปฏิกิริยาทุก ๆ 24 ชั่วโมง คือ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงตามลำดับ

3.2.7 เติมเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9.7 มิลลิลิตร

3.2.8 เติมสารละลายแอมโมเนียมไรโอไซยาเนต 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

3.2.9 เติมสารละลายเฟอร์รัสคลอไรด์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที

3.2.10 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยที่หลอดควบคุมจะใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง สำหรับ blank ใช้ เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ แทนตัวอย่าง

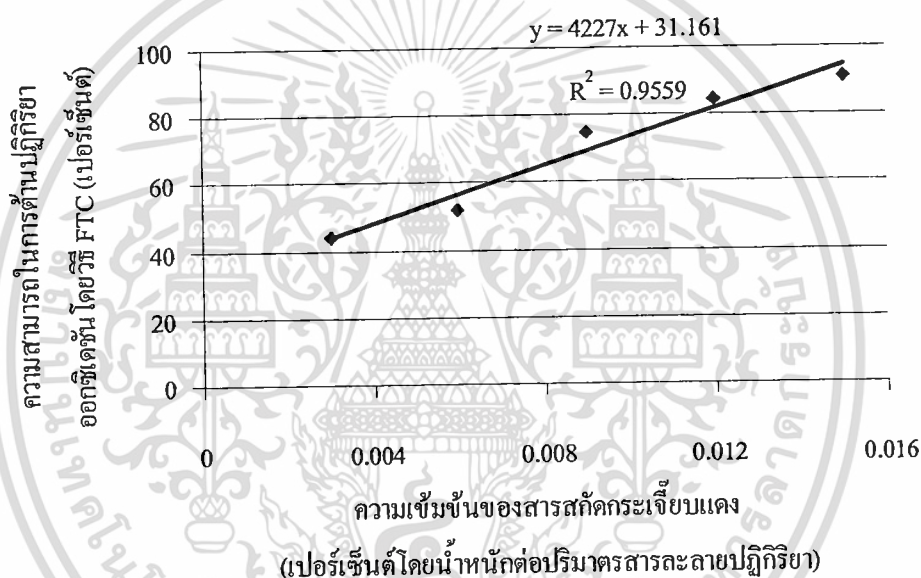
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนเพื่อการค้าเท่านั้น เมื่อผู้ผู้ใดเห็นประโยชน์ประการใด  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 ตัวอย่างการคำนวณ

3.3.1 คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านปฏิบัติการออกซิเดชันโดยวิธี FTC ของตัวอย่างสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 0.003 ถึง 0.015 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายปฏิบัติการโดยแทนค่าในสมการดังนี้

$$100 - \left\{ \frac{[\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างชั่วโมงที่ 96} / \text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างชั่วโมงที่ 0}]}{[\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมชั่วโมงที่ 96} / \text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมชั่วโมงที่ 0}]} \times 100 \right\}$$

3.3.2 นำค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านปฏิบัติการออกซิเดชันโดยวิธี FTC ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดกระเจียบต่าง ๆ กัน ซึ่งได้จากการคำนวณในข้อ 3.3.1 มาสร้างกราฟ ดังรูปที่ ข 4



รูปที่ ข 4 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านปฏิบัติการออกซิเดชันโดยวิธี FTC ของสารสกัดกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

3.3.3 คำนวณหาค่า  $EC_{50}$  จากสมการเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟในข้อ 3.3.2 นั่นคือ  $y = 4227x + 31.161$  โดยให้ค่า  $y = 50$  เปอร์เซ็นต์

3.3.4 จากนั้นคำนวณค่า  $EC_{50}$  ของเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านปฏิบัติการออกซิเดชันโดยวิธี FTC จากหน่วยเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตรสารละลายปฏิบัติการให้เป็นหน่วยของมิลลิกรัมของสารสกัดกระเจียบแดง/มิลลิกรัมกรดลิโนเลอิก

#### 4. ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ )

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลาย  $H_2O_2$  จะใช้วิธีที่รายงานโดย Yen และ Chen (1995) โดยวัดปริมาณ  $H_2O_2$  ที่เหลืออยู่ ซึ่งดูดกลืนแสงได้ที่ 230 นาโนเมตร ในกรณีตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการทำลาย  $H_2O_2$  ได้ดี จะทำให้เกิดการสลายตัวของ  $H_2O_2$  มาก

##### 4.1 สารเคมี

###### 4.1.1 $H_2O_2$ ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์

ปิเปต  $H_2O_2$  ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ มา 0.459 มิลลิลิตร ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร

###### 4.1.2 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

##### 4.2 วิธีทดลอง

###### 4.2.1 ปิเปตตัวอย่างสารสกัด ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

###### 4.2.2 เติม $H_2O_2$ ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร

###### 4.2.3 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

###### 4.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร

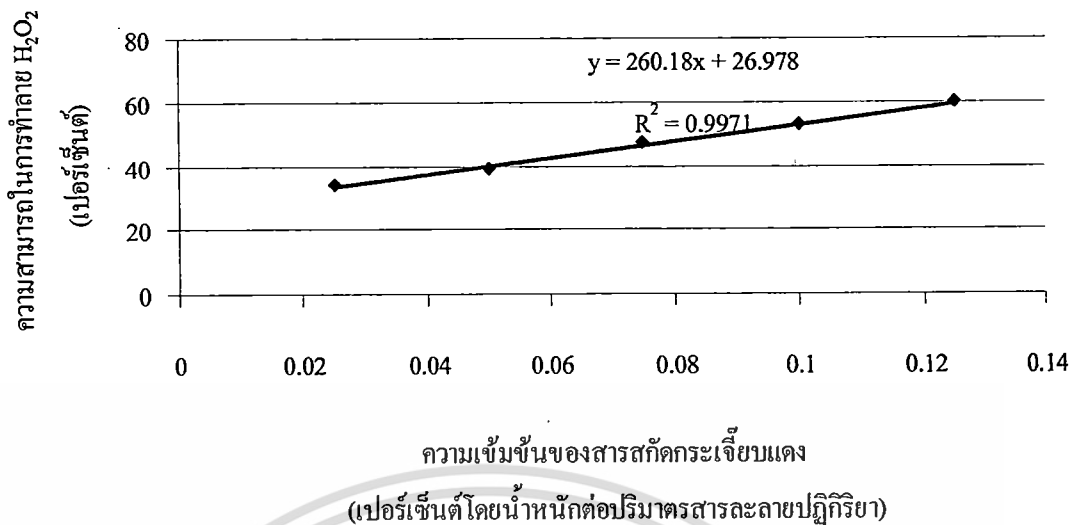
###### 4.2.5 สำหรับ blank ให้ใช้ ตัวอย่างที่วิเคราะห์ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 โดยไม่ต้องมี $H_2O_2$

##### 4.3 ตัวอย่างการคำนวณ

###### 4.3.1 คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลาย $H_2O_2$ ของตัวอย่างสารสกัดโดยแทนค่าในสมการดังนี้

$$\{1 - (\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} / \text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม})\} \times 100$$

###### 4.3.2 นำค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลาย $H_2O_2$ ที่ได้จากการคำนวณในข้อ 4.3.1 มาสร้างกราฟดังรูปที่ ข 5



รูปที่ ๕ เปร้เซ็นต์ความสามารถในการทำลาย  $H_2O_2$  เมื่อใช้สารสัคตะระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

4.3.3 คำนวณหาค่า  $EC_{50}$  จากสมการเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟในข้อ 4.3.2 นั่นคือ  $y = 260.18x + 26.978$  โดยให้ค่า  $y = 50$  เปร้เซ็นต์

4.4.4 จากนั้นคำนวณค่า  $EC_{50}$  ของเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลาย  $H_2O_2$  จากหน่วยเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตรสารละลายปฏิกิริยาให้เป็นหน่วยของมิลลิกรัมของสารสัคตะระเจียบแดง/มิลลิกรัม  $H_2O_2$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1. การวิเคราะห์ค่า thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)

การวิเคราะห์ค่า TBARS จะใช้ตามวิธีที่รายงานโดย Shahidi และคณะ (1995) โดย TBARS เป็นค่าที่ใช้วัดคุณภาพของอาหารประเภทไขมัน เมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในขั้นตอนที่สอง หลังจากไฮโดรเปอร์ออกไซด์เกิดการแตกตัวได้เป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สารที่เกิดขึ้นจะมีกลิ่นรส ได้แก่ อัลเคน (alkanes) อัลคีน (alkenes) อัลดีไฮด์ (aldehydes) คีโตน (ketones) แอลกอฮอล์ (alcohols) เอสเทอร์ (esters) สารในกลุ่มนี้จะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีกลิ่นหืน การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในขั้นตอนนี้ ทำได้โดยใช้หลักการของวิธีการวัดความเข้มของสีชมพูแดงที่ความยาวคลื่น 530-532 นาโนเมตร ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไฮโอบาร์บิฟูริก (thiobarbituric) กับ oxidized lipids ได้เป็นสารประกอบที่มีสีชมพูแดง ซึ่งสารประกอบดังกล่าวเกิดจากปฏิกิริยาคอนเดนเซชันของมาโลนัลดีไฮด์ (malondialdehyde, MDA) กับกรดไฮโอบาร์บิฟูริก 2 โมเลกุล อย่างไรก็ตามการเกิดออกซิเดชันไม่จำเป็นต้องได้มาโลนัลดีไฮด์เสมอไป เพราะสารประกอบประเภทแอลคานอล (alkanals) แอลคีนอล (alkenals) และ 2,4-ไดอีนัล (2,4-dienals) สามารถทำปฏิกิริยากับกรดไฮโอบาร์บิฟูริกได้และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530-532 นาโนเมตร ได้เช่นเดียวกับมาโลนัลดีไฮด์ ดังนั้นจึงเปลี่ยนการเรียกชื่อวิธีการวิเคราะห์จาก TBA เป็น TBARS เนื่องจากการเรียกชื่อแบบเดิมจะหมายถึงสารมาโลนัลดีไฮด์เพียงชนิดเดียว แต่ TBARS จะหมายถึงกลุ่มของสารดังกล่าวด้วย การรายงานผลการวิเคราะห์ค่า TBARS จะรายงานผลเป็น มิลลิกรัมของมาโลนัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมตัวอย่าง (milligrams of malondialdehyde equivalents/kg of sample) โดยมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

- 1.1 ชั่งตัวอย่างที่บดหยาบแล้วจำนวน 10 กรัม ใส่ฟาส์กรูบมะเฟืองแล้วปั่นกับน้ำกลั่น 96.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 นาที
- 1.2 ถ่ายตัวอย่างใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริก 4 โมลาร์ จำนวน 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายซัลฟานิลาร์ไมด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 20 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 มิลลิลิตร
- 1.3 นำตัวอย่างไปกลั่นจนได้ส่วนใสจำนวน 50 มิลลิลิตร (ใช้เวลา 30-45 นาที)
- 1.4 นำส่วนใสที่กลั่นได้จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมกรดไฮโอบาร์บิฟูริก 0.02 โมลาร์ ที่ละลายใน 90 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก จำนวน 5 มิลลิลิตร ปิดฝาทดลองให้สนิท
- 1.5 เขย่าสารละลายและจุ่มลงในอ่างน้ำเดือดนานประมาณ 35 นาที
- 1.6 เมื่อครบกำหนดเวลาทำให้เย็นลงภายในเวลา 10 นาที
- 1.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

### 1.8 คำนวณค่า TBARS จากสูตร

ค่า TBARS number (mg malondialdehyde/kg sample) = 8.1 x absorbance

หมายเหตุ : เนื่องจากการใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเต็มลงในส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ แล้วใช้วิธีการทดสอบ TBARS ด้วยวิธีการสกัดด้วยกรด (aqueous acid extraction method : เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจสอบการเกิดออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์) ไม่ได้เนื่องจากสารแอนโทไซยานินในกระเจี๊ยบแดงที่เติมลงในส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์จะละลายออกมาด้วยขณะทำการทดลอง ซึ่งทำให้การดูดกลืนแสงผิดพลาด (ที่ความยาวคลื่น 530-532 นาโนเมตร ซึ่งสารละลายที่มีสีชมพูแดงดูดกลืนได้) ดังนั้นจึงใช้วิธีการกลั่นแทน (steam distillation method) แต่วิธีการกลั่นจะไม่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีสารประกอบประเภทไนเตรทและไนไตรต์อยู่ในส่วนผสมเนื่องจากสารนี้จะทำให้เกิด interfere ขณะกลั่นตัวอย่าง ดังนั้นจึงต้องเติมสารซัลฟานิลาร์ไมด์ขณะทำการทดลอง เพื่อลดการเกิด interfere แต่ไม่สามารถลดการเกิด interfere ได้ทั้งหมด

