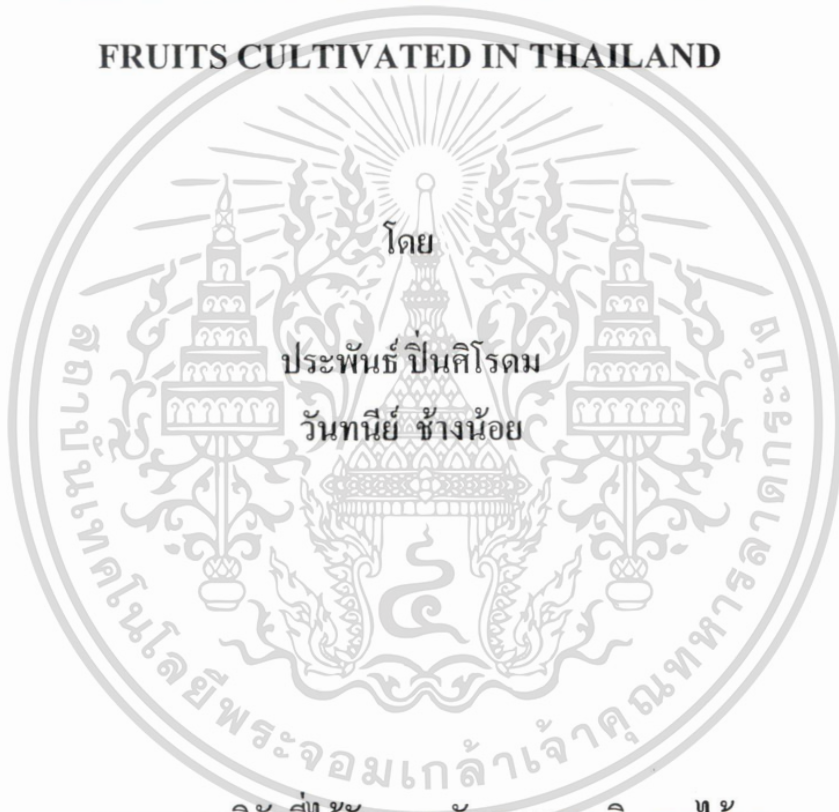


ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน
ของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มที่ปลูกในประเทศไทย

TOTAL POLYPHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT
PROPERTIES OF THE EXTRACTS FROM SEEDS OF CITRUS
FRUITS CULTIVATED IN THAILAND



รายงานผลงานวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้ของ

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปีงบประมาณ 2545

RCH

OK

A95

R98

๒๖๑๗

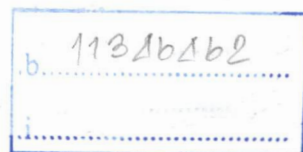
เลขหมู่.....

เลขทะเบียน..... 64470

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันเดือนปี..... 11 ก.ย. 2549

.....



ชื่อโครงการวิจัย: ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน
ของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มที่ปลูกในประเทศไทย

TOTAL POLYPHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF
THE EXTRACTS FROM SEEDS OF CITRUS FRUITS CULTIVATED IN
THAILAND

ชื่อผู้วิจัย: นาย ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม และ น.ส. วันทนีย์ ช่างน้อย

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย: จากเงินรายได้ของโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบัน
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2545

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย: 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2544 ถึง กันยายน 2545

หน่วยงานที่สังกัด: โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ-
ทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในเมล็ดพืชตระกูลส้มที่ปลูกในประเทศไทย 7 ชนิด ได้แก่ ส้มเขียวหวาน, ส้มฟรุ้ง, ส้มสายน้ำผึ้ง, ส้มโชกุน, มะนาว, ส้มโอทองดี และส้มโอขาวน้ำผึ้ง พบว่า เมล็ดส้มเขียวหวานมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลสูงที่สุด คือ 170.3 ± 4.6 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก / 100 กรัมเมล็ดแห้ง รองลงมาคือ เมล็ดส้มฟรุ้ง, ส้มโชกุน, ส้มสายน้ำผึ้ง, ส้มโอขาวน้ำผึ้ง, ส้มโอทองดี และมะนาว โดยมีปริมาณเท่ากับ 157.3 ± 1.3 , 130.5 ± 2.0 , 123.1 ± 3.4 , 112.6 ± 2.1 , 108.1 ± 2.6 และ 101.3 ± 2.1 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก / 100 กรัมเมล็ดแห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบศักยภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดส้มสายพันธุ์ต่างๆ ข้างต้น โดยวัดความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของ 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazolinesulfonate) หรือ ABTS พบว่า สารสกัดจากเมล็ดส้มสายน้ำผึ้งมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงที่สุด รองลงมาคือเมล็ดส้มเขียวหวาน, ส้มฟรุ้ง, ส้มโอทองดี, มะนาว, ส้มโชกุน และ ส้มโอขาวน้ำผึ้ง ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารสกัดจากเมล็ดส้มทุกสายพันธุ์ที่ศึกษามีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำกว่ากรดแอสคอร์บิก และโพรพิลแกลเลต นอกจากนี้ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดไม่มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนกับสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดส้มสายพันธุ์ต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TOTAL POLYPHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF THE EXTRACTS FROM SEEDS OF CITRUS FRUITS CULTIVATED IN THAILAND

Praphan Pinsiromdom and Wantanee Changnoi

ABSTRACT

The total polyphenol contents of seven citrus seeds cultivated in Thailand (Kaewwan, Fremont, Sainamphueng, Choghun, Lime, Pamelo-tongdee, and Pamelo-kaonamphueng) were analyzed and expressed as gallic acid equivalents (GAE). The highest content of polyphenols was found in Kaewwan seeds (170.3 ± 4.6 mg of GAE /100 g dry seed). The seeds of Fremont, Choghun, Sainamphueng, Pamelo-kaonamphueng, Pamelo-tongdee and Lime contained 157.3 ± 1.3 , 130.5 ± 2.0 , 123.1 ± 3.4 , 112.6 ± 2.1 , 108.1 ± 2.6 and 101.3 ± 2.1 mg of GAE / 100 g dry seed of total polyphenols, respectively. The antioxidant potential of the seven citrus seed extracts was evaluated by measuring the ability to scavenge 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazolinesulfonate), ABTS free radicals. The antioxidant potentials of the seven citrus seed extracts were Sainamphueng > Kaewwan > Fremont > Pamelo-tongdee > Lime > Choghun > Pamelo-kaonamphueng. However, all the studied citrus seed extracts possessed lower antioxidative activities compared to L-ascorbic acid and propyl gallate. In addition, no clear relationship could be shown between antioxidant activity and the total polyphenol content.

สารบัญ

บทคัดย่อ	ก
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	2
2.1 พีชตระกูลส้ม	2
2.2 อนุมูลอิสระ	4
2.3 สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน	7
2.4 สารประกอบโพลีฟีนอล	10
2.5 ฟลาโวนอยด์	10
2.6 กลไกการต้านออกซิเดชันของฟลาโวนอยด์	11
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณ, ชนิด, และสมบัติของฟลาโวนอยด์	16
2.8 กลไกการทำงานของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน	16
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	19
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	19
3.2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	20
บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์	23
4.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ โพลีฟีนอลทั้งหมดในเมล็ดพีชตระกูลส้ม	23
4.2 สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดพีชตระกูลส้ม	24
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	32

สารบัญตาราง

ตารางที่

2.1 ศักยภาพการเกิดรีดักชันของฟลาโวนอยด์	12
2.2 ฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่ที่สำคัญในพืชตระกูลส้มแสดงโครงสร้างของสารที่เชื่อมต่อกันด้วยหมู่แทนที่ต่างๆ	14
2.3 ปริมาณฟลาโวนอยด์ในส่วนที่กินได้ของพืชตระกูลส้มพันธุ์ต่างๆ	15
4.1 ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในเมล็ดพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ	24
4.2 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 8 นาที	26
4.3 เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6	27



สารบัญรูป

รูปที่

2.1 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของฟลาไวโนอยด์	10
2.2 แสดงโครงสร้างของฟลาไวโนอลและเคอวอซิทิน	11
2.3 แสดงตำแหน่งการจับโลหะของฟลาไวโนอยด์	13
2.4 สูตรโครงสร้างของเคอวอซิทิน รุทีน ลูทีโอลีน และเคมเฟอร์อล	14
4.1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด	23
4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ของสารละลายปฏิกิริยาในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ	25



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 พืชตระกูลส้ม (วัฒนา, 2538)

พืชตระกูลส้ม (Citrus fruit) มีสมาชิกทั้งหมด 130 สกุล และ 1,500 ชนิด มีทั้งที่เป็นไม้ยืนต้น ไม้ล้มลุกและไม้พุ่ม มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนและกึ่งร้อนของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และพบมากในเขตร้อนที่ค่อนข้างแห้งแล้ง จึงมีการปลูกกันทั่วโลกในบริเวณพื้นที่เขตร้อนและกึ่งร้อนโดยเฉพาะในสภาพกึ่งร้อนของภูมิอากาศแบบเมดิเตอร์เรเนียน

การแบ่งกลุ่มพืชตระกูลส้ม สามารถแบ่งกลุ่มได้ ดังนี้

1. กลุ่มของส้มเกลี้ยงและส้มตรา (Oranges group)
2. กลุ่มของส้มเขียวหวานและส้มจีน (Tangerin and Mandarin group)
3. กลุ่มของส้มโอและเกรฟฟรุต (Pomelo and Grapefruits)
4. กลุ่มของมะนาว (Common Acid Members group)

2.1.1 กลุ่มของส้มเกลี้ยงและส้มตรา แยกออกเป็น

2.1.1.1 ส้มที่มีรสหวาน มีชื่อทั่วไปว่า *Sweet Orange* ส่วนชื่อทางพฤกษศาสตร์ คือ *Citrus sinensis* เป็นกลุ่มส้มที่ใหญ่ที่สุดและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดในโลกด้วย สามารถแบ่งออกได้อีกหลายชนิด ได้แก่

- พวกส้มธรรมดา(Common Oranges) นิยมปลูกกันแพร่หลายมากที่สุด ในจำพวกส้มที่มีรสหวาน
- พวกส้มที่มีน้ำตาลหรือไม่มีกรด (Sugar or Acidless orange) เป็นกลุ่มส้มที่มีเปอร์เซ็นต์กรดต่ำมาก มีเพียง 0.1% เท่านั้น จึงมีรสชาติหวานมาก
- พวกส้มที่มีสีเข้ม (Pigmented or Blood oranges) มีลักษณะคล้ายส้มพวกแรกจะแตกต่างกันคือเนื้อผลมีสีแดง หรือสีชมพู
- พวกส้มเนเวล (Navel oranges) ผลส้มชนิดนี้ไม่ค่อยมีเมล็ดที่รู้จักโดยมากคือพันธุ์วอชิงตันเนเวล

2.1.3.2 เกรฟฟрут ชื่อทางพฤกษศาสตร์คือ *Citrus paradisi*

มีถิ่นกำเนิดในเขตทวีปอเมริกา มีการติดผลเป็นพวง คล้ายองุ่น และมีรายงานว่าเป็นการกลายพันธุ์ของส้มโอ แต่บ้างก็ว่าเป็นลูกผสมระหว่างส้มโอกับส้มอื่นๆ

2.1.4 กลุ่มมะนาว (Common acid members) ได้แก่ พวงซิตรอน (citron) เลมอน (lemon) และมะนาว (Lime)

2.1.4.1 ซิตรอน (citron) ชื่อทางพฤกษศาสตร์ คือ *Citrus medica*

2.1.4.2 เลมอน (lemon) ชื่อทางพฤกษศาสตร์ คือ *Citrus limon* สามารถได้เป็น

- พวงที่มีรสเปรี้ยว (acid lemon)
- พวงที่มีรสหวาน (sweet lemon)
- อะนอมมาลัส เลมอน (anomalous lemon)

2.1.4.3 มะนาว (Lime) เป็นไม้ยืนต้นขนาดย่อม ชื่อทางพฤกษศาสตร์ คือ *Citrus Aurantifolia* มีหลากหลายพันธุ์ ได้แก่

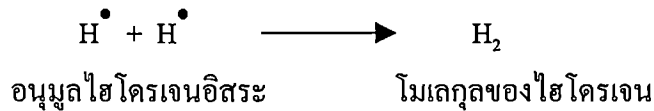
- | | |
|---------------------|-------------|
| - มะนาวไข่ | - มะนาวหวาน |
| - มะนาวหนัง | - มะนาวปิ้ง |
| - มะนาวทวาย | - มะนาวโมพี |
| - มะนาวพันธุ์ตาฮิติ | - มะนาวพม่า |

2.2 อนุมูลอิสระ (ไกรสิทธิ์, 2538)

โดยปกติแล้วโมเลกุลของสสารทุกชนิดจะประกอบไปด้วยนิวตรอน โปรตอนและอิเล็กตรอน ซึ่งเป็นอนุภาคที่โคจรอยู่ส่วนนอกสุด และเป็นประจุไฟฟ้าที่ว่องไวมาก โมเลกุลจึงสูญเสียอิเล็กตรอนได้ง่าย ซึ่งเมื่อโมเลกุลเหล่านี้สูญเสียอิเล็กตรอนที่เคยมีอยู่ไป มันก็จะเสียดังประกอบที่ทำให้โมเลกุลหรืออะตอมเหล่านี้มีความเสถียร โมเลกุลนั้นๆก็จะไปดึงเอาอิเล็กตรอนของโมเลกุลข้างเคียงมากู้กับตัวเอง เพื่อทำให้ตัวมันเสถียรดังเดิม โดยลักษณะธรรมชาติของโมเลกุล อนุมูลอิสระและปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนประจุอิเล็กตรอนก็จะเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา

ดังนั้นถ้าจะให้คำจำกัดความของอนุมูลอิสระจะได้ว่า อนุมูลอิสระ คือโมเลกุลที่สูญเสียอิเล็กตรอนชั้นนอกสุดไป ทำให้ตัวมันเองไม่สามารถคงความเสถียร ดังนั้นอนุมูลเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ ได้หลายรูปแบบตัวอย่างเช่น อนุมูลอิสระ 2 ตัว พบกัน จะรวมอิเล็กตรอนเดี่ยวของแต่ละอนุมูล (สัญลักษณ์ของอิเล็กตรอนเดี่ยวคือ “•”) เข้าด้วยกันทำให้เกิดเป็นโมเลกุลที่คงตัวได้ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



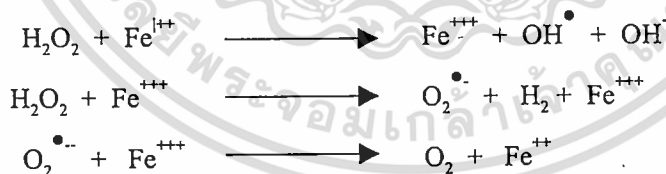
ในขณะที่เดียวกันอนุมูลอิสระอาจทำปฏิกิริยากับอนุมูลหรือโมเลกุลที่คงตัวได้หลายแบบ เช่น ส่งผลต่ออิเล็กตรอนเดี่ยวให้ หรือรับอิเล็กตรอนเพิ่มเข้ามา หรือรวมตัวกัน ซึ่งไม่ว่าจะเป็นแบบใดก็ตาม ผลที่ได้รับคือ อนุมูลหรือโมเลกุลที่คงตัวจะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระ และปฏิกิริยาดังกล่าวนี้นักจะเกิดต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ ส่วนมากแล้วจะพบอนุมูลออกซิเจนอิสระเป็นส่วนใหญ่ ตัวอย่างของอนุมูลออกซิเจนอิสระ ได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide anion, $\text{O}_2^{\bullet-}$), อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical, OH^\bullet), และอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxy radical, ROO^\bullet) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีโมเลกุลของออกซิเจนบางตัวที่มีความไวต่อการทำปฏิกิริยาสูง และอาจก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ และปฏิกิริยาลูกโซ่ในร่างกายได้ ตัวอย่างของโมเลกุลเหล่านี้เช่น โมเลกุลออกซิเจนพลังงานสูง (singlet Oxygen, $^1\text{O}_2$) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2)

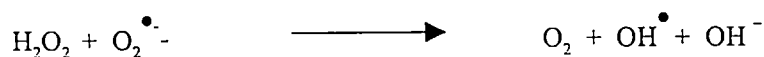
ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในธรรมชาติเกิดขึ้นเสมอ ซึ่งเป็นต้นเหตุให้เกิดความเสื่อมของแต่ละสรรพสิ่ง การรวมตัวกับออกซิเจนในบรรยากาศไม่ว่าจะเกิดขึ้นในกรณีไหน จัดเป็นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระพื้นฐานของโมเลกุลใดๆ



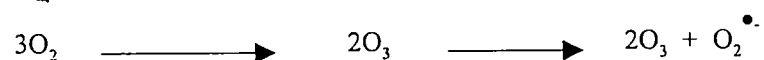
ปฏิกิริยา fenton ของเม็ดเลือดขาว



ปฏิกิริยา Harber-Weiss เช่น การหืนของน้ำมัน การทอดอาหารซ้ำ



ปฏิกิริยา singlet oxygen เกิดในธรรมชาติ และกระบวนการเผาไหม้ของเครื่องยนต์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 แหล่งที่มาของอนุมูลอิสระ

นอกจากอนุมูลอิสระจะเกิดขึ้นตามธรรมชาติจากกระบวนการทางชีวเคมีหรือเมตาบอลิซึมของเซลล์สัตว์ที่ใช้ออกซิเจนในการหายใจแล้ว อนุมูลอิสระยังสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 2 ทาง คือ ทางอาหารและทางอากาศที่เราหายใจ

2.2.1.1 อนุมูลอิสระในอาหาร พบมากในอาหารประเภท

1) อาหารปิ้งย่าง ทอดที่เกรียมจัด เพราะเมื่อใดก็ตามที่มีการรวมตัวกับออกซิเจนในอากาศหรือเกิดการเผาไหม้ขึ้น เมื่อนั้นจะมีการรวมตัวกับออกซิเจน และเกิดอนุมูลอิสระขึ้น ดังนั้นอาหารปิ้งย่างที่เกรียมไหม้ จึงเป็นแหล่งอุดมด้วยอนุมูลอิสระ

2) อาหารแปรรูปเนื้อสัตว์ อาหารกลุ่มนี้หมายถึงอาหารที่อาจจะแปรรูปเนื้อสัตว์ได้ออกซิเจน เช่น พืชผักที่ใช้ยาฆ่าแมลงเกินขนาด แปรรูปยาฆ่าหญ้า ซึ่งล้วนแต่เป็นสารก่อมะเร็งทั้งสิ้น

3) อาหารสำเร็จรูป และอาหารขยะ(junk food) อาหารกลุ่มนี้เป็นอาหารที่ผลิตจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งมักมีสารกันบูด กันเชื้อรา เพื่อให้มีอายุอยู่ได้นานๆ นอกจากนี้กลุ่มอาหารผสมสี ซึ่งเป็นสารเคมี ก็เป็นแหล่งอนุมูลอิสระ

2.2.1.2 อนุมูลอิสระในอากาศ พบได้จาก คิววีบี, คิววีซี, คิววีดีที่แผ่ออกมาจากโรงงาน, ท่อไอเสียที่แผ่ออกมาจากรถยนต์, ควันทูบหรี่, และมลภาวะอื่นๆ เช่น ฝุ่นซีเมนต์จากการก่อสร้าง เป็นต้น

2.2.2 ผลของอนุมูลอิสระต่อสุขภาพมนุษย์

จากการที่อนุมูลอิสระมีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวคือปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป้าหมายที่จะเกิดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้แก่ ไขมัน โปรตีน หรือดีเอ็นเอ (Rice-Evan, 1999) ภาวะที่มีการทำลายโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันมากๆ จะเป็นผลร้ายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อและเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคร้ายแรงต่างๆ (ไมตรีและคณะ, 2543)

ออกซิเดชัน คือ ปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนให้แก่ธาตุหรือสาร หรือการลดจำนวนอิเล็กตรอน ธาตุคาร์บอนอินทรีย์ที่ถูกเติมออกซิเจนจนกลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ จะหมดศักยภาพของความเป็นสารที่มีสมบัติทางชีววิทยา เชื้อจุลินทรีย์และพืชที่สังเคราะห์แสงพยายามที่จะเพิ่มสถานะของคาร์บอนให้เป็นรีดิวซ์คาร์บอน คือเปลี่ยนจากคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำให้เป็นสารอินทรีย์หรือสารอาหารเพื่อรักษาสภาพพลังงานที่เป็นประโยชน์ต่อชีวิตในเมตาบอลิซึมของเซลล์ เช่น ไมโทคอนเดรีย ไมโครโซม มีออกซิเดชันตลอดเวลา ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ขาดการควบคุมจะเกิดขึ้นเนื่องไปกับการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นของผสมระหว่าง 2,6-di-butyl-4-methylphenol เป็นสารสีขาว เป็นของแข็งมีคุณสมบัติคล้าย BHT ใช้เป็น fat antioxidant ซึ่งสามารถละลายได้ใน glyceride แต่ไม่ละลายในน้ำ และอาจทำปฏิกิริยากับเหล็กที่พบในภาชนะบรรจุอาหารให้สารสีเหลือง BHT ใช้ได้ดีพอสมควรกับอาหารทอดและอบ และสามารถใช้ได้ร่วมกับ BHT PG และ TBHQ

4.) Propyl gallate (PG)

มีลักษณะเป็นผงสีขาวถึงเทาอ่อน ซึ่งจะใช้ปรับปรุงเสถียรภาพในการoxidation ในอาหารพวกไขมันและน้ำมัน PG ใช้กับไขมันสัตว์ได้ดี แต่จะเกิดปัญหาเรื่องสี โดยเฉพาะเมื่อสารนี้สร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของเหล็กเกิดสีดำหรือม่วงเข้ม จะพบเห็นได้เป็นจุดดำในน้ำมันหมู แต่จะป้องกันโดยเติม chelating agent เพื่อรวมกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็ก ทองแดง สารนี้ได้แก่ ซิตริก แอสคอบิกและเลซิทิน PG จะใช้ได้ดีเมื่อใช้ร่วมกับ BHA และ BHT

5.) Di-tert-butyl hydroquinone (TBHQ)

ละลายในไขมันหรือน้ำมันได้เล็กน้อย (5-10%) และไม่เกิดสีเมื่อทำปฏิกิริยากับโลหะ แต่จะทำปฏิกิริยากับเอมีนให้สารสีแดง จะใช้กับผลิตภัณฑ์ที่ทอดแล้ว แต่จะใช้ไม่ได้ผลกับผลิตภัณฑ์อาหารหลังจากอบแล้ว โดยใช้ผสมกับกรดซิตริกใน propylene glycol ป้องกันการเหม็นหืนในน้ำมันพืชและอาหารที่ทอดในน้ำมันพืช เช่น มันฝรั่งทอด กฎหมายอนุญาตให้ใช้ร่วมกับ BHA หรือ BHT เท่านั้น ในประเทศแคนาดาไม่อนุญาตให้ใช้สารชนิดนี้ เพราะยังไม่แน่ใจในความปลอดภัยของสารกันหืนชนิดนี้

2.3.2 สารกันหืนธรรมชาติ (Natural antioxidant) พบในธรรมชาติทั้งในพืชและสัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถแยกตามแหล่งที่พบดังนี้

2.3.2.1 จากแหล่งพืชน้ำมัน

1.) Tocopherols หรือวิตามิน E จะพบในน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง ซอสถั่วเหลือง พบในพืชมากกว่าในสัตว์ เป็นสารที่ละลายได้ในน้ำมัน ปัจจุบันได้มีการใช้สารกันหืนชนิดนี้อย่างกว้างขวางในวงการอุตสาหกรรม tocopherols ในธรรมชาติจะมีด้วยกัน 4 รูปคือ $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ tocopherols แต่ละโครงสร้างแตกต่างกันที่ตำแหน่งของหมู่ methyl ที่ aromatic ring จะมี phenolic hydroxy function ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของการเกิดปฏิกิริยา มีกลไกการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเติมออกซิเจนของไขมันเหมือนกับสารกันหืนสังเคราะห์ โดยหยุดปฏิกิริยาถูกโซ่ของอนุมูลอิสระให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่ hydroperoxyl radical ซึ่งอนุพันธ์ของ tocopherol radical มีความคงตัวและทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาถูกโซ่ α - tocopherols มีปริมาณสูงในพืชน้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.) Hydroxytyrosol และ caffeic acid ซึ่งสกัดได้จากน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ สารทั้ง 2 ชนิดนี้ มีความสามารถในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนของน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์สูงกว่า BHT

3.) Phytic acid พบมากในพืช เช่น พืชตระกูลถั่ว พืชน้ำมัน ธัญพืช ซึ่งสามารถเกิดการฟอร์ม chelate กับเหล็กได้ เป็นการป้องกันไม่ให้เหล็กซึ่งเป็นตัวเร่งการเกิดอนุมูลไฮโดรเจนอิสระ และเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนของไขมันและน้ำมันในน้ำที่มีลักษณะเป็นอิมัลชัน (emulsion) พบว่าใช้ได้ดีกับไข่เข้เย็น ป้องกันการเกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์จากสาร malondialdehyde

4.) Ferlate พบมากในน้ำมันรำดิบ ซึ่งใช้ได้ดีกับน้ำมันพืช

2.3.2.2 จากแหล่งเครื่องเทศและสมุนไพร ส่วนมากเป็นพวกที่ให้กลิ่นรสและเป็นสารกันหืนในตัว ได้แก่ กานพลู, อบเชย, เสจ (sage), โรสแมรี่ (rosemary), ดอกจันทน์, ออริกาโน (oregano), ลูกจันทน์, ออลสไปซ์, ซึ่งแสดงปฏิกิริยากันหืนและเสริมสารกันหืนเมื่อใช้ร่วมกับ BHT ตัวอย่างที่สำคัญของสารกันหืนที่ได้จากเครื่องเทศเช่นสารสกัดจากโรสแมรี่ สารสกัดดังกล่าวเป็นสารกันหืนที่มีคุณภาพสูง ประกอบด้วยสาร rosmanol rosmaridiphenol rosmariquinone rosmarinic acid และ carnosol ซึ่งสามารถป้องกันการหืนเทียบเท่าหรือสูงกว่า BHA และพบว่าเมื่อใช้ร่วมกับ sodium tripolyphosphate จะช่วยป้องกันการหืนของเนื้อที่ใช้ทำสติกเก็ตได้ดี

2.3.2.3 จากแหล่งอื่นๆ

1.) Atrovenetin เป็นสารสกัดได้จากเชื้อราสายพันธุ์ *Penicilium sp.* ใช้เป็นสารกันหืนและเป็นสารเสริมสารกันหืนของ tocopherol ซึ่งใช้ในน้ำมันหมู

2.) อนุพันธ์ polyphenolic สกัดได้จากกุ่มโดยใช้ตัวทำละลายต่างๆ พบว่า ในส่วนของเอธานอล จะมีคุณสมบัติของสารกันหืนดีที่สุด สารในส่วนนี้เป็นอนุพันธ์ polyphenolic ของ aromatic amino acid เมื่อใช้ผสมกับน้ำมันปลาซาลมอน (salmon oil) จะทำให้สีไม่เปลี่ยนและผลิตภัณฑ์นี้เก็บได้นานขึ้น

โดยทั่วไปสารกันหืนสังเคราะห์ไม่เป็นที่ยอมรับเพราะต้องตระหนักถึงความปลอดภัย ดังนั้นผู้บริโภคต้องการใช้สารกันหืนจากธรรมชาติมากกว่า เพราะไม่ต้องกังวลถึงปริมาณที่เกินขีดความปลอดภัย สามารถเติมได้ตามความเหมาะสม เช่น สาร tocopherols และสารสกัดจากโรสแมรี่ แต่สารกันหืนธรรมชาติ ราคาค่อนข้างแพง และบางกรณีต้องใช้ในปริมาณมากกว่าสารสังเคราะห์ เช่น น้ำมันพืชจะใช้สารที่สกัดจากโรสแมรี่ในปริมาณสูงกว่า TBHQ อย่างไรก็ตามปริมาณสารกันหืนหลายๆ ชนิดให้เลือก เพราะแต่ละชนิดก็เหมาะกับอาหารแต่ละประเภทแต่ต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของสารกันหืนด้วยว่าต้องไม่มีสี ไม่มีกลิ่นรส ที่จะไปรบกวนต่อผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 สารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenols)

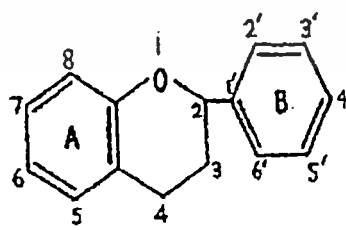
สารประกอบโพลีฟีนอลแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และนอนฟลาโวนอยด์ (non-flavonoids) (Burns *et al.*, 2000)

2.4.1 ฟลาโวนอยด์ มี 12 กลุ่มย่อย ได้แก่ ฟลาโวน(Flavone) ไอโซฟลาโวน(iso flavone) ฟลาโวนอล(Flavonol) ฟลาวาโนน(Flavanone) ฟลาวาโนนอล(Flavanonol) ฟลาวานอล(Flavonol) ลูโคแอนโทไซยานิน(lucoanthocyanin) แอนโทไซยานิน(anthocyanin) ซาลิโคน(chalcone) ไดไฮโดรซาลิโคน(dihydrochalcone) ออโรน(aurone) และแซนโทน(xanthone)

2.4.2 นอนฟลาโวนอยด์ เช่น กรดแกแลลิก(gallic acid) ไฮดรอกซีซินนามेट (hydroxycinnamate) สติลบินเนส (stibinase)

2.5 ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลพบมากในพืชชั้นสูง ทั้งราก, ลำต้น, ดอก, ผล, เมล็ด, เปลือก, ก้านดอก และละอองเกสรดอกไม้ โครงสร้างทางเคมีทั่วไปประกอบด้วย โครงสร้างไดฟีนิล โพรเพน (C6-C3-C6) กับกลุ่มฟีนอลิกไฮดรอกซี ดังรูปที่ 2.1 ในธรรมชาติพบฟลาโวนอยด์มีมากกว่า 4,000 ชนิด ฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่ที่พบจะอยู่ในรูปไกลโคไซด์ (glycoside) (Terao, 1999) คือ มีหมู่ไฮดรอกซิลหรือน้ำตาลเกาะที่ตำแหน่งที่ 3 (Beecher, 1999) เชื้อจุลินทรีย์ในระบบย่อยอาหารสามารถทำให้เกิดไฮโดรไลซิส อะไกลโคน (aglycone) จึงถูกปลดปล่อยออกมาจากไกลโคไซด์ เควซิตินเป็นฟลาโวนอยด์ที่พบบ่อยมากในพืชผักหลายชนิด เช่น บรอกโคลี, หัวหอม, และผักกะหล่ำ ซึ่งมีกลุ่มฟีนอลิกไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 5 และ 7 ของวงแหวนเอและที่ตำแหน่ง 3' และ 4' ของวงแหวนบี ดังรูปที่ 2.2 เควซิตินไกลโคไซด์ที่พบในอาหารมักมีกลุ่มของน้ำตาลที่ตำแหน่ง 3 (Terao, 1999)



Flavonoid

รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์

ที่มา : Terao, 1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์ออกซิลที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเพิ่มขึ้น ศักยภาพในการเกิดรีดักชันของฟลาโวนอยด์ แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ศักยภาพการเกิดรีดักชันของฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์	TEAC ^a
เคอควิซิทิน (quercetin)	4.7
อีพิกอลโลแคทีชิน แกลเลท (epigallocatechin gallate)	4.8
อีพิกอลโลแคทีชิน (epigallocatechin)	3.8
ทาคซิโฟลีน (taxifolin)	1.9
แคทีชิน (catechin)	2.4
ลูทีโอลิน (luteolin)	2.1
รูทีน (rutin)	2.4
เคมเฟอร์อล (kaempferol)	1.3

^aTEAC คือ Trolox equivalent antioxidant capacity

ที่มา : Rice-Evan, 1999

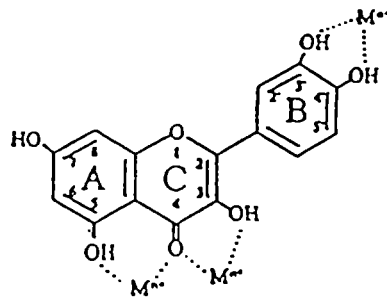
การวิเคราะห์ทางเคมีที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง ในการวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันของโพลีฟีนอล คือการวัดความสามารถในการลดอนุมูลเอบีทีเอส [ABTS;2,2-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] โดยมักเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอคซ์ (trolox) ซึ่งแสดงค่าเป็น TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) จากตารางที่ 2.1 จะเห็นว่าเคอควิซิทินซึ่งเป็นโพลีฟีนอลที่พบในพืชตระกูลส้มมีฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันค่อนข้างสูง

2.6.2 การจับกับโลหะแทรนซิชัน (transition metal chelation)

ตำแหน่งโมเลกุลของฟลาโวนอยด์ที่จะจับกับโลหะได้ คือ กลุ่มแคทาคอล 3',4'-ไดไฮดรอกซี (catechol 3',4'-dihydroxy) โดยมี 3-ไฮดรอกซี (3-hydroxy) และ 4-คีโต (4-keto) บนวงแหวนซี และ 5-ไฮดรอกซี และ 4-คีโต ระหว่างวงแหวนเอและซี ดังรูปที่ 2.3 ฟลาโวนอยด์ 4 ชนิด ที่มีประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยจับกับทองแดง คือ เคอควิซิทิน รูทีน ลูทีโอลิน และเคมเฟอร์อล ดังรูปที่ 2.4 เคอควิซิทินและรูทีนมีโครงสร้างคล้ายกัน โดยรูทีนเป็น 3-รามโนกลูโคไซด์ (3-rhamnoglucoside) ของ เคอควิซิทิน ลูทีโอลินเป็น 3-ดิซอกซีเคอควิซิทิน (3-disoxyquercetin) เคมเฟอร์อลมีโครงสร้างคล้ายเคอควิซิทิน ยกเว้นเคมเฟอร์อลไม่มีโครงสร้างแคทาคอลบนวงแหวนบี จึงไม่มีกลุ่ม 3'-ไฮดรอกซี

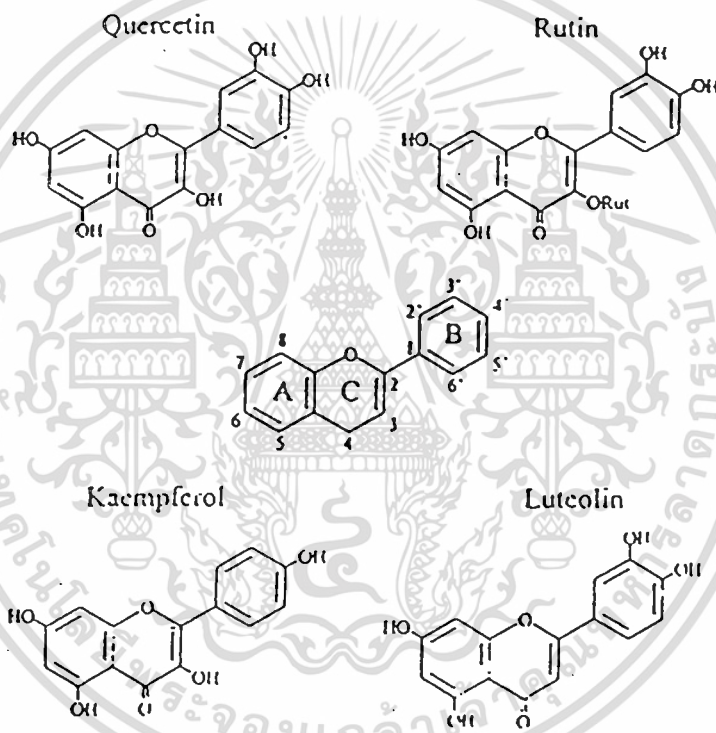
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Quercetin



รูปที่ 2.3 แสดงตำแหน่งการจับโลหะของฟลาโวนอยด์

ที่มา : Rice-Evan, 1999



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของเคออสติน รูทีน ลูทีโอลิน และเคมเฟอร์อล

ที่มา : Rice-Evan, 1999

2.6.3 การกำจัดอนุมูลพันธุ์ของไนโตรเจนว่องไว

เปอร์ออกซีไนไตรท์ (peroxynitrite) เป็นสารออกซิไดซ์ที่เป็นพิษ และเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจากปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์กับไนตริกออกไซด์ ยับยั้งการเพิ่มทวีของลูกโซ่การเกิดอนุมูล โดยกำจัดอนุมูลไลปิดเปอร์ออกไซด์ (Rice-Evan, 1999)

2.6.4 กำจัดอนุมูลไลปิดเปอร์ออกไซด์ (lipid peroxy)

โดยการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเกิดไลปิดเปอร์ออกไซด์ เช่น กลุ่มคาเตคอลบนวงแหวนบี มีพันธะคู่ 2-3 ตำแหน่ง สังยุค (conjugate) กับ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่ม 4-ออกโซ (4-oxo) และกลุ่ม 3-และ 5-ไฮดรอกซิล ซึ่งมีประสิทธิภาพในการให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลไลปิดเปอร์ออกไซด์ แต่คุณสมบัติที่สำคัญ คือ ฟลาโวนอยด์ต้องสามารถละลายในไขมันและเข้ากันได้กับอนุมูลไลปิด เช่น แคทีชินหรือแคทีชินแกลเลท ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ LDL ได้เนื่องจากมีคุณสมบัติในการละลายในไขมัน ส่วนเคอควิติน รูทีน ลูทีโอลิน และเคมเฟอร์อลสามารถยับยั้งการเกิดไลปิดเปอร์ออกซิเดชันในไขมันได้โดยจับกับทองแดง ป้องกันการเกิดไลปิดเปอร์ออกซิเดชันจากการเหนี่ยวนำของทองแดง

ฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่ที่พบกันมากในพืชตระกูลส้ม ได้แก่กลุ่ม flavanones, flavone หรือ flavonol และ โครงสร้างของสารเหล่านี้ที่มีการเชื่อมต่อกันด้วยหมู่แทนที่ต่างๆ (substitution groups) ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่ที่สำคัญในพืชตระกูลส้มแสดงโครงสร้างของสารที่เชื่อมต่อกันด้วยหมู่แทนที่ต่างๆ

flavonoid	<i>Citrus</i> sp.	C-ring structure ^a	substitution pattern
naringin	<i>C. paradisi</i> <i>C. aurantium</i>	FLA	5,4'-OH 7-O-Neo ^b
neohesperidin	<i>C. aurantium</i>	FLA	5,3',4'-OH 7-O-Neo
hesperidin	<i>C. sinensis</i>	FLA	5,3'-OH, 1'-OMe 7-O-Rut ^b
diosmin	<i>C. sinensis</i> <i>C. limonia</i>	FLO	5,3'-OH 4'-OMe
rutin	<i>C. limonia</i>	FOL	7-O-Rut ^b 5,7,3',4'-OH 3-O-Rut
naringenin	<i>C. paradisi</i>	FLA	5,7,4'-OH
eriodictyol	<i>C. aurantium</i>	FLA	5,7,2',4'-OH
hesperetin	<i>C. sinensis</i>	FLA	5,7,3'-OH 4'-OMe
apigenin	<i>C. paradisi</i>	FLO	5,7,4'-OH
luteolin	<i>C. Limonia</i> <i>C. aurantium</i>	FLO	5,7,3',4'-OH
diosmetin	<i>C. sinensis</i>	FLO	5,7,3'-OH 4'-OMe
kaempferol	<i>C. paradisi</i>	FOL	5,7,3,4'-OH
quercetin	<i>C. limonia</i>	FOL	5,7,3,3',4'-OH
tangeretin	<i>C. aurantium</i> <i>C. paradisi</i> <i>C. limonia</i>	FLO	5,6,7,8,4'-OMe

ที่มา : Burda, and Oleszek., 2001

หมายเหตุ FLA = Flavanone , FLO = Flavone , FOL = Flavonol

Neo = Neohesperidoside , Rut = Rutinoside

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณ, ชนิด, และสมบัติของฟลาโวนอยด์

2.7.1 พันธุ์ พืชแต่ละชนิดมีปริมาณและชนิดของฟลาโวนอยด์ แตกต่างกันไป แม้ว่าจะเป็นพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ก็มีปริมาณและชนิดของฟลาโวนอยด์ต่างกัน

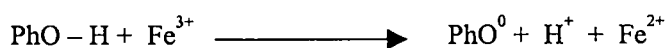
2.7.2 ความแก่-อ่อน (Maturity) ผลไม้ที่สุกจะมีปริมาณฟลาโวนอยด์ลดลง Rouseff และ Dougherty (1980) พบว่าปริมาณของ naringin ใน florida grapefruit juice ลดลงเมื่อผลไม้สุกนอกจากนั้นเมื่อปริมาณฟลาโวนอยด์หลักตัวอื่นๆ ก็ลดลงด้วยเช่นกัน

2.7.3 กระบวนการแปรรูป Spanos และคณะ(1990) ได้ศึกษาผลของกระบวนการแปรรูปที่มีต่อปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลใน Granny Smith apple juice พบว่าการบีบอัด (press stage) จะมีผลทำให้ปริมาณของ cinnamics น้อยที่สุดเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase, การใช้ความร้อนสูงเวลาสั้น (high temperature short time) จะช่วยป้องกันสารประกอบโพลีฟีนอล ไม่ให้สูญเสียไปเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase , การใช้เอนไซม์เพื่อทำให้น้ำแอปเปิ้ลใส จะทำให้ปริมาณของสารประกอบโพลีฟีนอลบางตัวเช่น chlorogenic , conjugated coumarics และ coumaric ลดลง แต่ทำให้ caffeic และ coumaric acid เพิ่มขึ้น โดยพบว่าทุกๆ 1 มิลลิกรัมที่ chlorogenic acid ถูกไฮโดรไลซ์จะทำให้มี caffeic acid เพิ่มขึ้น 0.5 มิลลิกรัม นอกจากนี้การกรอง (fining) โดยการใช้ bentonite , gelatin, silica sol หลังจากใช้เอนไซม์ในการทำให้ใสแล้ว จะช่วยยับยั้งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารประกอบโพลีฟีนอลที่เกิดจากเอนไซม์ได้, การเก็บรักษาน้ำแอปเปิ้ล ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 เดือน จะทำให้ cinnamics ลดลงประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์

2.7.4 ความแตกต่างของภูมิอากาศอุณหภูมิ (climatic different) Rouseffและคณะ(19..)และ Maraulja และคณะ (19..) พบว่า ปริมาณ hesperidin ใน Florida orange มีปริมาณสูงขึ้นในฤดูหนาว นอกจากนี้ Dougherty และ Fisher (19..) ยังพบว่า naringin ใน grapefruit เพิ่มขึ้นหลังจากทำการ แช่แข็ง และเช่นเดียวกัน Herzog and Monselise พบว่า Grapefruit ที่ปลูกในแถบภูมิอากาศอบอุ่น จะมีปริมาณ naringin ต่ำกว่า grapefruit ที่ปลูกในภูมิอากาศเย็น

2.8 กลไกการทำงานของ สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันส่วนมากจะเป็นสารประกอบพวกฟีนอลิก (Phenolic Compound) ซึ่งพันธะ O-H ของฟีนอล จะเกิดการแตกหัก แบบ homolytic ให้อนุมูลอิสระ ซึ่ง จะเกิดปฏิกิริยาได้เร็วถ้ามีตัวออกซิไดส์เช่น FeCl_3 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, PbO_2 และ MnO_2 อยู่ด้วย ในสารละลายที่เป็นกลางหรือด่าง เช่น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุมูลฟีนอกซี (phenoxy) จะมีเสถียรภาพสูง เนื่องจากผลของเรโซแนนซ์ (resonance) ทำให้อิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ที่ตำแหน่งออร์โธ หรือ พารา อนุมูลอิสระประเภทนี้จะเกิดปฏิกิริยา coupling ต่อได้ เช่น 2,6 - Di - t - butylphenol

การรวมตัวของสารประกอบใดๆกับออกซิเจนในอากาศจะเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ดังนั้นการเกิดปฏิกิริยา coupling จะเป็นขั้นตอนสุดท้ายที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ด้วยกลไกข้างต้นจะเห็นว่า สารประกอบที่มีสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สามารถป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน กับ ออกซิเจนในอากาศได้

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Benavente-Garcia (1995) รายงานว่า สารประกอบฟลาโวนอยด์จากพืชตระกูลส้มมีความสามารถในการยับยั้งและ / หรือทำลายโมเลกุลต่างๆ ที่เป็นสาเหตุสำคัญของปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้แก่ singlet oxygen, superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogenperoxide (H_2O_2) และ hydroxyl radical ($^{\cdot}OH$) เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถต้านปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน (autoxidation) ที่เกิดขึ้นในกรดไขมันไม่อิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว

Bocco และคณะ(1998) ศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดของพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดในการสกัด ได้แก่ methanol และ ethyl acetate พบว่าสารสกัดจากเมล็ดโดยทั่วไปจะมีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันดีกว่าสารสกัดจากเปลือก นอกจากนี้สายพันธุ์ของพืชตระกูลส้มที่ต่างกันจะให้สารสกัดจากเมล็ดและเปลือกที่มีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแตกต่างกันด้วย สำหรับชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้นั้นจะมีผลต่อกลุ่มของสารประกอบที่ถูกสกัดออกมาแตกต่างกัน โดยที่สารสกัดที่ได้จากการใช้ methanol จะมีองค์ประกอบของ flavones และ glycosylated flavanones เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่ สารสกัดที่ได้จากการใช้ ethyl acetate จะมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น phenolic acids และ flavonols อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้ไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันกับชนิดหรือองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดดังกล่าว

Gorinstein และคณะ (2001) ศึกษาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล และสารประกอบอื่นๆที่มีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในสารสกัดที่ได้จากเปลือกและผลของพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ รวมทั้งความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบเหล่านั้น พบว่าในส่วนของเปลือกจะมีปริมาณของสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดสูงกว่าส่วนของผล นอกจากนี้ สารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลง 64470 ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากเปลือยกยังแสดงสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าสารสกัดจากผลของพืชตระกูลส้มทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุ

- 1.) เมล็ดส้มเขียวหวาน
- 2.) เมล็ดส้มฟริมองต์
- 3.) เมล็ดส้มสายน้ำผึ้ง
- 4.) เมล็ดส้มโชกุน
- 5.) เมล็ดมะนาว
- 6.) เมล็ดส้มโอขาวน้ำผึ้ง
- 7.) เมล็ดส้มโอทองดี

3.1.2 อุปกรณ์

- 1.) ขวดก้นกลม
- 2.) Condenser ตรง
- 3.) เตาหลุม
- 4.) Cooling
- 5.) UV Spectrophotometer ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-1601 ผลิตโดย Shimadzu corporation ประเทศออสเตรเลีย
- 6.) Soxhlet Apparatus ยี่ห้อ Buchi 810
- 7.) เครื่องชั่งชนิดละเอียด ยี่ห้อ Metter รุ่น AE 3000 ผลิตในประเทศ สวิตเซอร์แลนด์
- 8.) ถ้วยกระเบื้อง
- 9.) เทอร์โมมิเตอร์
- 10.) เครื่องบดละเอียด (Blender)
- 11.) Water bath
- 12.) นาฬิกาจับเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 สารเคมี

- 1.) petroleum ether
- 2.) 95% Ethanol
- 3.) 10% Na_2CO_3
- 4.) Folin-Ciocalteu
- 5.) Chlorogenic acid
- 6.) ABTS = 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazolinesulfonate)
- 7.) PBS = Phosphate buffer solution ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$)
- 8.) NaCl
- 9.) myoglobin
- 10.) Potassium ferricyanide [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$]
- 11.) H_2O_2

3.2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมเมล็ดพืชตระกูลส้ม

เมล็ดพืชตระกูลส้ม ได้จากผลส้มพันธุ์ต่างๆ ซึ่งหาซื้อจากตลาดสี่มุมเมือง จังหวัดปทุมธานี โดยนำเมล็ดพืชตระกูลส้มดังกล่าวมาผึ่งแดดจนแห้ง(ความชื้น < 5%) เก็บตัวอย่างเมล็ดไว้ในถุงพลาสติกและแช่เย็นที่อุณหภูมิ 8 – 10 °C จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลอง

3.2.2 การสกัดสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้ม

ในขั้นตอนการสกัดจะนำเมล็ดพืชตระกูลส้มมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด จากนั้นชั่งตัวอย่างเมล็ดส้มแต่ละตัวอย่าง ตัวอย่างละ 10 กรัม สกัดไขมันออกโดยใช้เครื่อง Soxhlet และใช้ petroleum ether เป็นตัวสกัด ใช้เวลาในการสกัด 2 ชั่วโมง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกจากตัวอย่างเมล็ดส้มโดยตั้งทิ้งไว้ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปสกัดด้วยเอทานอลต่อไป

3.2.3 การสกัดสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้ม

นำเมล็ดส้มบดละเอียดที่สกัดไขมันออกหมดแล้วใส่ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติม เอทานอล (95%) 100 มิลลิลิตร สกัดโดยวิธีการรีฟลักซ์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80 °C จากนั้นกรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยใช้กรวยบุชเนอร์(Buchner funnel) ปรับปริมาตรของสารสกัดที่ได้ให้เป็น 100 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตรด้วย เอทานอล 95%

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดจะใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีที่รายงานโดย Yieldirim และคณะ (2001) โดยให้สารประกอบโพลีฟีนอลทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu และติดตามสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลมาตรฐาน

3.2.4.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยละลายกรดแกลลิก 0.02 กรัมในเอทานอล (95%) ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร จากนั้นบีบอัดสารละลายมาตรฐานดังกล่าวใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ขวดละ 0, 0.05, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, และ 0.35 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรในแต่ละขวดเท่ากับ 10 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ขวดที่มีปริมาณกรดแกลลิกเท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80, 90, 100 และ 120 ไมโครกรัมตามลำดับ

นำขวดรูปชมพู่ทั้งหมดมาเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ขวดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 10 % ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที (กรณีที่สารละลายขุ่นให้นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออก) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวกับปริมาณกรดแกลลิกเป็นไมโครกรัม

3.2.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลในตัวอย่างสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้ม

บีบอัดสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มที่ได้จากข้อ 3.2.3 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 9.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที (กรณีที่สารละลายขุ่นให้นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออก) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโน-เมตร โดยใช้เอทานอล 95% 0.5 มิลลิลิตรแทนตัวอย่างสารสกัดสำหรับเตรียม blank

3.2.5 ศึกษาสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้ม

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.2.3 มาระเหยเอาเอทานอลออกให้หมดด้วยถ้วยกระเบื้องโดยใช้ความร้อนจากไอน้ำซึ่งได้จากอ่างน้ำเดือด จากนั้นชั่งสารสกัดที่ได้มา 0.1 กรัม ละลายในเอทานอล 95% โดยปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร จะได้สารละลายของสารสกัดสำหรับใช้ตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

เตรียมสารละลายปฏิกิริยาโดยบีบเปิดสารละลายต่างๆต่อไปนี้ใส่หลอดทดลองพลาสติก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Eppendrope tube) สารละลาย ABTS 100 ไมโครลิตร, สารละลาย metmyoglobin 180 ไมโครลิตร, สารละลาย PBS 775 ไมโครลิตร และสารละลายของสารสกัดจากเมล็ดส้ม 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย H_2O_2 120 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer พร้อมกับจับเวลาทันที ถ่ายสารละลายปฏิกิริยาใส่คิวเวต (cuvette) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อ่านผลทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 10-15 นาที นำข้อมูลผลการทดลองที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรกับเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

สำหรับปฏิกิริยาควบคุม (Control) จะใช้เอทานอล 95% 25 ไมโครลิตรแทนสารละลายตัวอย่างสารสกัด และหลอดที่เป็น Blank จะเตรียมเหมือนปฏิกิริยาควบคุมแต่เติม PBS 120 ไมโครลิตรแทนสารละลาย H_2O_2

ในกรณีของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐาน ซึ่งได้แก่ วิตามินซี และโพรพิลแกลเลต (propyl gallate) จะเตรียมให้มีความเข้มข้นเดียวกันกับตัวอย่างสารสกัดคือ 0.1 กรัม/10 มิลลิลิตร โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำไปตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเช่นเดียวกับกับกรณีของตัวอย่างสารสกัดทุกประการ

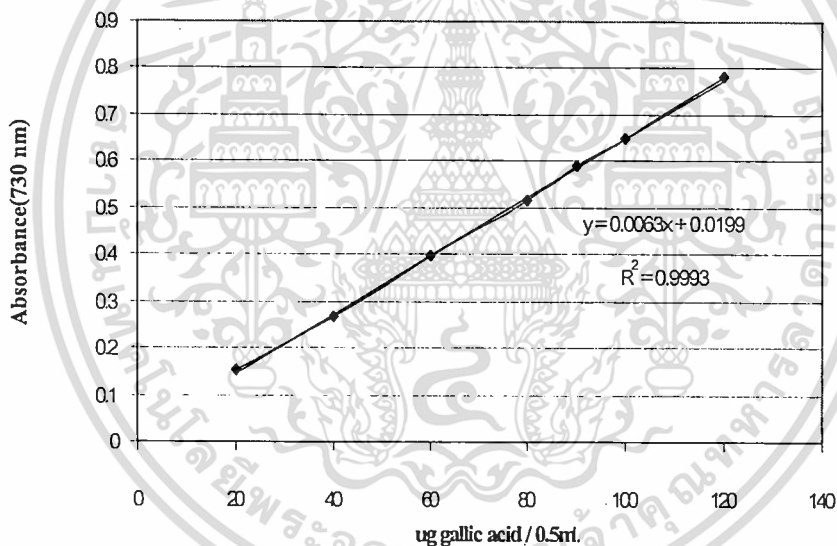
สำหรับวิธีการเตรียมสารละลายต่างๆที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สามารถดูได้จาก ภาคผนวกที่ ค

บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิจารณ์

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในเมล็ดพืชตระกูลส้ม

จากการเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ซึ่งใช้เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดที่ได้จากเมล็ดพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ ได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงที่มีสมการเส้นตรงคือ $y = 0.0063X + 0.0199$ โดยมีค่า $R^2 = 0.9993$ ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด

จากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในเมล็ดพืชตระกูลส้ม 7 ชนิด คือ เมล็ดส้มเขียวหวาน, เมล็ดส้มฟรุ้งมอต์, เมล็ดส้มสายน้ำผึ้ง, เมล็ดส้มโชกุน, เมล็ดมะนาว, เมล็ดส้มโอขาว-น้ำผึ้ง, เมล็ดส้มโอทองดี โดยให้สารประกอบโพลีฟีนอลทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ciocalteu และติดตามสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลมาตรฐาน ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในเมล็ดพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ

เมล็ดพืชตระกูลส้ม	ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด* (ไมโครกรัมของกรดแกลลิก/กรัมเมล็ดแห้ง)
ส้มเขียวหวาน	1,703±45.60
ส้มฟริมองต์	1,573±7.33
ส้มโชกุน	1,305±19.83
ส้มสายน้ำผึ้ง	1,231±33.65
ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	1,126±20.82
ส้มโอทองดี	1,081±25.86
มะนาว	1,013±21.14

* ตัวเลข±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ

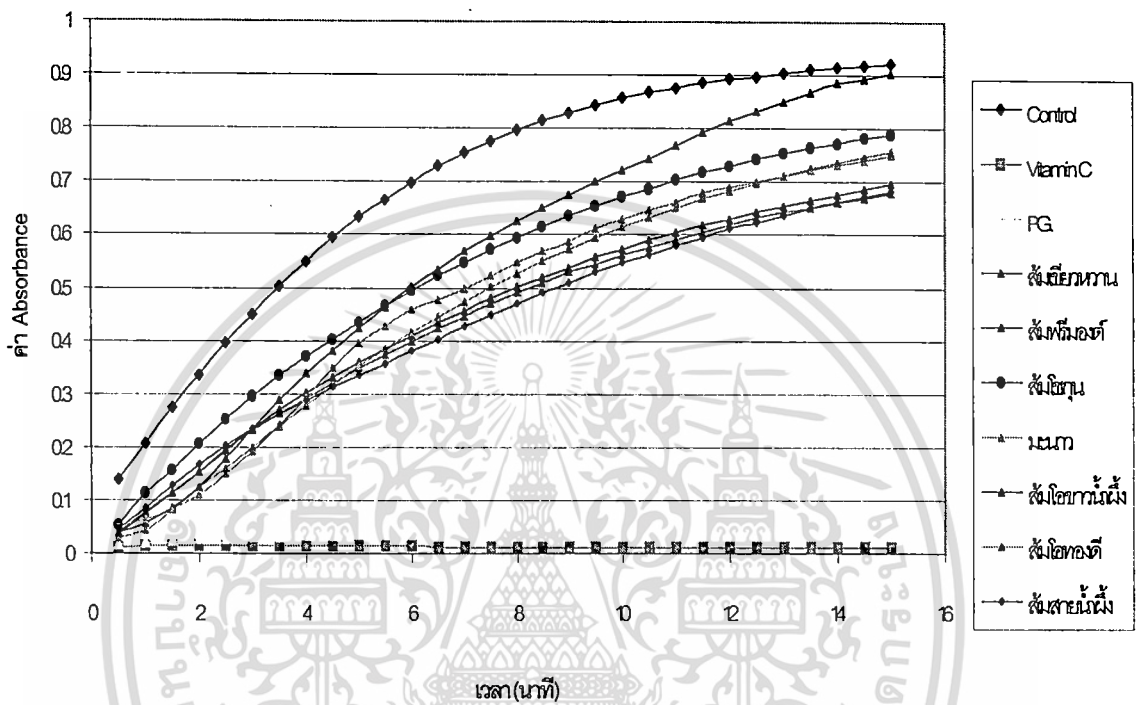
จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่า เมล็ดพืชตระกูลส้มแต่ละชนิดจะมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลแตกต่างกันไป โดยพบว่าส้มเขียวหวานจะมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดสูงที่สุด และมะนาวจะมีปริมาณต่ำที่สุด ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองของ Bocco และคณะ (1998) ซึ่งรายงานไว้ว่า เมล็ดพืชตระกูลส้มสายพันธุ์ต่างกันจะมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดแตกต่างกัน จากการสังเกตลักษณะของเมล็ดพืชตระกูลส้มแต่ละชนิดพบว่า เมล็ดส้มบางชนิดจะมีเนื้อเมล็ดมากและเปลือกหุ้มเมล็ดบาง แต่บางชนิดจะมีเนื้อเมล็ดน้อยและเปลือกหุ้มเมล็ดหนา ความแตกต่างดังกล่าวอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้เมล็ดพืชตระกูลส้มแต่ละชนิดมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลแตกต่างกันตามธรรมชาติ และความแตกต่างของปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลดังกล่าว อาจมีผลต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่แตกต่างกันด้วย

4.2 การศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้ม

จากการทดลองศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ ในปริมาณเท่ากันคือ 250 ไมโครกรัมเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐาน 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดคือ วิตามินซี และโพรพิลแกลเลต โดยตรวจวัดความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของ ABTS ด้วยการติดตามอัตราการเกิดสีน้ำเงินแกมเขียวที่ลดลง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ของสารละลายปฏิกิริยาในการตรวจวัดสมบัตินการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ

จากกราฟในรูปที่ 4.2 เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาควบคุม(control) จะเห็นว่าเมื่อเวลาในการเกิดปฏิกิริยานานขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรจะมีค่าสูงขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง และตามทฤษฎีปฏิกิริยาควบคุมจะมีปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดขึ้นสมบูรณ์ที่สุด เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาที่มีการเติมสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ จะเห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จะมีอัตราการเพิ่มขึ้นช้ากว่ากรณีของปฏิกิริยาควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มทุกชนิดมีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

เพื่อให้การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มทั้ง 7 ชนิด เป็นไปได้ง่ายและชัดเจนยิ่งขึ้น จึงใช้ข้อมูลในกราฟรูปที่ 4.2 ในการเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพันธ์ ซึ่งทำได้ 2 วิธีคือ

วิธีที่ 1 จะกำหนดให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของปฏิกิริยาควบคุม ณ เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 8 นาที คิดเป็น 100% จากนั้นคำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของปฏิกิริยาที่มีการเติมสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ ณ เวลาในการเกิดปฏิกิริยาเท่ากันคือ 8 นาที คิดเป็นร้อยละเท่าไรของปฏิกิริยาควบคุม ดังนั้น ตัวอย่างใดที่มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพันธ์ต่ำแสดงว่าตัวอย่างสารสกัดนั้นมีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพันธ์ของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 8 นาที

ตัวอย่าง	อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพันธ์ (%)*
ปฏิกิริยาควบคุม	100
ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	80.24±5.76
ส้มโชกุน	76.23±7.19
มะนาว	70.02±2.84
ส้มโอทองดี	67.45±2.21
ส้มฟริมองต์	64.15±4.31
ส้มเขียวหวาน	62.77±1.82
ส้มสายผึ้ง	60.19±0.66
PG	6.79±0.02
Vitamin C	1.48±0.13

* ตัวเลข±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 2 ซ้ำ

วิธีที่ 2 จะเปรียบเทียบเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 ดังนั้นตัวอย่างใดที่ใช้เวลานานในการทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเป็น 0.6 แสดงว่าตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างสารสกัดดังกล่าวมีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6

ตัวอย่าง	เวลาที่ทำให้ค่า ดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.6 (นาที)
ปฏิกิริยาควบคุม	4.42
ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	7.36
ส้มโชกุน	8.04
มะนาว	9.06
ส้มโอทองดี	9.57
ส้มฟริมองต์	10.43
ส้มเขียวหวาน	11.06
ส้มสายน้ำผึ้ง	11.53
โพรพิลแกลเลต	>15
วิตามินซี	>15

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 และ 4.3 จะเห็นว่าการเปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ทั้งสองวิธีให้ผลที่สอดคล้องกัน กล่าวคือ สารสกัดจากเมล็ดส้มสายน้ำผึ้งจะแสดงสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงที่สุด รองลงมาคือ ส้มเขียวหวาน, ส้มฟริมองต์, ส้มโอทองดี, มะนาว, ส้มโชกุน และส้มโอขาวน้ำผึ้งตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆดังกล่าวกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐาน วิตามินซี และโพรพิลแกลเลตที่ปริมาณเท่ากัน จะเห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มทุกชนิดมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ไม่ดีเท่า วิตามินซีและโพรพิลแกลเลต ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มอยู่ในรูปของสารผสม ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบมากมาย ทั้งชนิดที่มีและไม่มีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนว่าสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มมีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี

เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบ โพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มแต่ละชนิด(ตารางที่ 4.1) กับสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน(ตารางที่ 4.2 และ 4.3) พบเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ว่าไม่สามารถสร้างความสัมพันธ์ที่ชัดเจน ตัวอย่างเช่น สารสกัดจากเมล็ดมะนาว ซึ่งมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดต่ำสุด แต่มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงกว่าสารสกัดจากเมล็ดส้มโชกุน และเมล็ดส้มโอขาวน้ำผึ้ง ซึ่งมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลสูงกว่า เป็นต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างขององค์ประกอบ, ปริมาณ และชนิดของสารประกอบโพลีฟีนอลที่มีอยู่ในเมล็ดพืชตระกูลส้มแต่ละชนิด ในเมล็ดพืชตระกูลส้มส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยสารประกอบโพลีฟีนอลจำพวกฟลาโวนอยด์ 4 กลุ่ม คือ ฟลาโวน , ฟลาโวนอน, ฟลาโวนอลและแอนโทไซยานิน ซึ่งสารประกอบทั้ง 4 กลุ่มดังกล่าวมีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแตกต่างกัน ซึ่งสารประกอบโพลีฟีนอลชนิดที่มีปริมาณน้อยอาจแสดงสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าชนิดที่มีปริมาณมากก็ได้ นอกจากนี้อัตราส่วนของสารประกอบโพลีฟีนอลเหล่านี้ในเมล็ดพืชตระกูลส้มแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน จึงส่งผลทำให้สมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแตกต่างกันออกไปด้วย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดเมล็ดพืชตระกูลส้ม พบว่า ตัวอย่างเมล็ดพืชตระกูลส้มทั้ง 7 ชนิด มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดแตกต่างกัน ในช่วง $1,013 \pm 21.14$ ถึง $1,702.96 \pm 45.60$ ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมเมล็ดแห้ง โดยที่เมล็ดส้มเขียวหวานมีปริมาณของสารประกอบโพลีฟีนอลสูงที่สุด รองลงมาคือ ส้มฟรุ้งมอต์ , ส้มโชกุน, ส้มสายน้ำผึ้ง, ส้มโอขาวน้ำผึ้ง, ส้มโอทองดี และมะนาวตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดดังกล่าว ไม่มีความสัมพันธ์เด่นชัดกับความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มทั้ง 7 ชนิด โดยที่สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มทั้ง 7 ชนิดเรียงลำดับจากมากไปหาน้อย คือ ส้มสายน้ำผึ้ง, ส้มเขียวหวาน, ส้มฟรุ้งมอต์, ส้มฟรุ้งมอต์, ส้มโอทองดี, มะนาว, ส้มโชกุน และส้มโอขาวน้ำผึ้ง เมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐาน วิตามินซี และโพรพิลแกลเลต ที่ปริมาณเท่ากัน สารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มทุกชนิดจะมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำกว่าสารต้านปฏิกิริยามาตรฐานทั้ง 2 ชนิด อย่างไรก็ตามผลการทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนว่า สารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มทุกชนิดมีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี

5.2 ข้อเสนอแนะ

1.) ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้ม และผลในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน รวมทั้งการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในการสกัด นอกจากนี้ ควรทดลองศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยใช้วิธีทดสอบแบบอื่นๆ เช่น DPPH assay, hydroxyl radical assay

2.) ควรมีการทดลองนำสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้ม ไปประยุกต์ใช้ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น นำไปใช้เป็นสารกันหืนธรรมชาติ เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- ไกรสิทธิ์ ตันติศิรินทร์ และคณะ. 2538. โภชนาการและการส่งเสริมสุขภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1: สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- เปรมปรี ฌ สงขลา. 2532. ทำสวนส้มอย่างมืออาชีพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: เจริญรัตน์การพิมพ์.
- ไมตรี สุทธิจิตต์ และคณะ. 2543. ความสามารถของสารสำคัญในการต่อต้านออกซิเดชันในสมุนไพรไทย. เชียงใหม่ : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ลลิตา ชีระสิริ. 2543. ผักพื้นบ้านต้านโรค. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์รวมทรงศน์.
- วัฒนา สวรรยาธิบัติ. 2538. ส้ม. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม : ศูนย์ส่งเสริมการฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- Beecher, G.R. 1999. Flavonoids in foods. In L. Parker, M. Hiramatsu, T. Yoshikawa(eds.), Antioxidant food supplements in human health, pp. 269-281. USA: Academic press.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Narin, F.R., Ortuno, A., Del Rio, J.A. 1997. Uses and Properties of citrus flavonoids. *J. Agric.Food Chem.* 45: 4505 p.
- Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H. Berset, C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J. Agric. Food Chem.* 49(9): 2123-2127
- Braddock, R.J., Catwallader, K.R. 1995. By-products of Citrus fruit. *Food Technol.* 49:74-77
- Burda, S.,Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids.*J.Agric. Food Chem.*49: 2774-2779
- Burns, J., Gardner, P. T.; O'Neil, J.; Crawford, S.; Morecroft, I.; McPhai, D. B. 2000. Relationship among Antioxidant Activity, Vasodilation Capacity, and Phenolic Content of Red Wines. *J. Agric.Food Chem.* 48: 2, 220-230
- Gorinstein, S., Belloso, O.M., Park, Y.S., Haruenkit, R., Lojek, A., Ciz, M., Caspi, A., Libman, I., Trakhtenberg, S. 2001 Compariso of some biochemical characteristics of different citrus Fruits. *J. Food Chem.*74: 309-315
- Kawaii, S., Tomono, Y.,Katase, E.,Ogawa, K., Yano, M. 1999 Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J.Agric.Food Chem.*47: 3565-3571
- Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G. and Teissedre, P.L. 2001. Antioxidant capacities and phenolic levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3341-3345

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Montanari, A., Widmer, W. and Nagy, S. 1997. Health promoting phytochemicals in citrus fruit and juice products. In *Functionality of food phytochemicals*, Johns, A. and Romeo, B., eds. New York: Plenum Press.
- Rice-Evan, C. 1999. Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity. In L. Packer, M. Hiramatsu., T.Yoshikawa (eds.), *Antioxidant food supplements in human health*, pp 239-253. USA: Academic press.
- Sponos, G.A., Wrolstad, R.E., and Heatherbell, D.A. 1990 Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. *J.Agric. Food Chem.* 38:1572-1579
- Yildirim A., Mavi A., and Kara A.A.2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activity of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agr. Food Chem.* 49:4083-4089



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

วิธีทดลอง

- 1.) อบบีกเกอร์ไขมันจนแห้งสนิท ทิ้งให้เย็นใน desiccator นำไปชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน
- 2.) ชั่งตัวอย่างที่อบแห้งแล้ว 10 กรัม ใส่ลงใน thimble ปิดด้านบนด้วยสีหรือกระดาษกรอง ป้องกันการฟุ้งกระจายของตัวอย่าง
- 3.) บรรจุ thimble ลงในชุดสกัดไขมัน soxhlet โดยให้ thimble อยู่ใน extraction tube ซึ่งด้านบนต่อกับ condenser ด้านล่างต่อกับ round bottom flask ชนิด 2 หรือ 3 คอ
- 4.) ตวง petroleum ether 170 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ไขมัน เปิดน้ำเย็นให้ไหลผ่าน condenser เปิด สวิตซ์เตา heating mantle ปรับระดับความร้อนให้เหมาะสม เพื่อให้ไอของ petroleum ether ควบแน่นลงบนตัวอย่างต่อเนื่อง นาน 3 ชั่วโมง
- 5.) แยก petroleum ether ออกโดยนำไประเหยในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 C 1 ชั่วโมง ระเหยจนหมด นำไปทำให้เย็นใน desiccator ก่อนนำไปชั่งหาน้ำหนักของ crude fat
- 6.)
$$\text{คำนวณปริมาณไขมัน} = \frac{\text{น.น. บีกเกอร์และไขมัน} - \text{น.น. บีกเกอร์} \times 100}{\text{น.น. ตัวอย่างแห้ง}}$$

ภาคผนวก ข

การคำนวณหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในเมล็ดพืชตระกูลส้ม 7 ชนิด

จากสมการกราฟมาตรฐาน $y = 0.0063X + 0.0199$; $R^2 = 0.9993$ สามารถคำนวณหาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดได้ โดยแทนค่าค่าการดูดกลืนแสงเป็นตัวแปร y ในสมการแล้วคำนวณหาค่า x ซึ่งจะได้เป็นปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (มิลลิกรัมของกรดแกลลิก 0.5 มิลลิลิตร) แสดงผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

พันธุ์	ครั้งที่	Absorbance	ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (มิลลิกรัมของกรดแกลลิก/0.5มิลลิลิตร)
ส้มเขียวหวาน	1	0.54	82.56
	2	0.567	86.84
	3	0.562	86.05
ส้มปรีมองต์	1	0.518	79.06
	2	0.514	78.43
	3	0.514	78.43
ส้มสายน้ำผึ้ง	1	0.398	60.02
	2	0.406	61.29
	3	0.419	63.35
ส้มโชกุน	1	0.424	64.14
	2	0.436	66.05
	3	0.433	65.57
มะนาว	1	0.345	51.60
	2	0.332	49.54
	3	0.34	50.81
ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	1	0.371	55.73
	2	0.384	57.79
	3	0.369	55.41
ส้มโอทองดี	1	0.368	55.25
	2	0.356	53.35
	3	0.357	53.51

ตัวอย่างการคำนวณ

ส้มเขียวหวาน

ครั้งที่ 1

ปริมาณสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวาน 0.5 มิลลิลิตร มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด 82.56 ไมโครกรัม

ปริมาณสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวาน 100 ml มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด เท่ากับ

$$\frac{82.56 \times 100}{0.5} = 16,512 \text{ ไมโครกรัม}$$

0.5

เมล็ดส้ม 10 มิลลิกรัมมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด 16,512 ไมโครกรัม

เมล็ดส้ม 1 มิลลิกรัมมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด $16,512/10 = 1,651.20$ ไมโครกรัม

ครั้งที่ 2

ปริมาณสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวาน 0.5 มิลลิลิตร มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด 86.84 ไมโครกรัม

ปริมาณสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวาน 100 ml มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด เท่ากับ

$$\frac{86.84 \times 100}{0.5} = 17,368 \text{ ไมโครกรัม}$$

0.5

เมล็ดส้ม 10 มิลลิกรัมมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด 17,368 ไมโครกรัม

เมล็ดส้ม 1 มิลลิกรัมมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด $17,368/10 = 1,736.80$ ไมโครกรัม

ครั้งที่ 3

ปริมาณสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวาน 0.5 มิลลิลิตร มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด 86.05 ไมโครกรัม

ปริมาณสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวาน 100 ml มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด เท่ากับ 86.05

$$\frac{86.05 \times 100}{0.5} = 17,210 \text{ ไมโครกรัม}$$

0.5

เมล็ดส้ม 10 มิลลิกรัมมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด 17,210 ไมโครกรัม

เมล็ดส้ม 1 มิลลิกรัมมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด $17,210/10 = 1,721.00$ ไมโครกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สารละลาย 10 mM hydrogenperoxide (H_2O_2)

ต้องการเตรียมสารละลาย H_2O_2 ที่มีความเข้มข้น 10 mM ดังนั้น ต้องชั่ง H_2O_2 มา 0.34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตร

เนื่องจากสารละลาย H_2O_2 เริ่มต้นมีความเข้มข้น 30 % ดังนั้น H_2O_2 100% เท่ากับ 34 กรัม

ถ้าต้องการ 30% H_2O_2 ต้องใช้ $0.34 \times 30/100 = 0.102$ กรัม/ลิตร

$$\text{จาก } D = M/V \rightarrow V = M/D$$

เมื่อ

D คือ ความหนาแน่นของสารละลาย

M คือ น้ำหนักสาร

V คือ ปริมาตรของสารละลาย

ดังนั้น $0.102/1.12 = 0.091$ มิลลิลิตร/ลิตร

เทสารละลาย 30% H_2O_2 มา 0.091 มิลลิลิตร เทลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตร เก็บไว้ในตู้เย็น โดยเตรียมทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลองในแต่ละวัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีในการทดลองหาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ด พืชตระกูลส้ม

การเตรียมสารเคมี

1. Phosphate buffer saline (PBS)

1.1 เตรียม stock solution 100 mM PBS

ชั่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ มา 26.81 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ มา 13.80 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

นำสารละลายทั้งสองมาผสมกันจนได้สารละลายผสมที่มี pH 7.4 เติมน้ำกลั่น NaCl 87.66 กรัม คนให้ละลาย ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ขวดวัดปริมาตร เทใส่ขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น

1.2 เตรียม 10 mM PBS (Working solution)

นำสารละลาย stock solution ในข้อ 1.1 มาเจือจาง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลาย 2.5 mM 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazolinesulfonate) (ABTS)

ชั่ง ABTS มา 0.0137 กรัม ละลายในสารละลาย 10 mM PBS 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ABTS ใน PBS เข้มข้น 2.5 mM เก็บไว้ในตู้เย็น โดยเตรียมทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลองในแต่ละวัน

3. Metmyoglobin (MetMG)

3.1 ชั่ง myoglobin มา 18.8 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย 10 mM PBS 10 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตร

3.2 ชั่ง potassium ferricyanide $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ มา 12.2 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย 10 mM PBS 200 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตร

3.3 นำสารละลายในข้อ 3.1 และ 3.2 มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เก็บไว้ในตู้เย็น โดยเตรียมทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลองในแต่ละวัน

ภาคผนวก ง

การคำนวณอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์

การคำนวณอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ ณ เวลาในการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 8 นาที กำหนดให้ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 nM ของปฏิกิริยาควบคุมที่เวลา 8 นาทีเป็น 100% จากนั้นคำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nM ของปฏิกิริยาที่มีการเติมสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มแต่ละชนิดที่เวลา 8 นาที ว่าคิดเป็นร้อยละเท่าไรของปฏิกิริยาควบคุม

ตัวอย่าง ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเมล็ดส้มสายน้ำผึ้งความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/10 มิลลิลิตร

ครั้งที่ 1

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nM ที่เวลา 8 นาที ของปฏิกิริยาควบคุมเท่ากับ 0.797 คิดเป็น 100%

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nM ที่เวลา 8 นาที ของสารสกัดจากเมล็ดส้มสายน้ำผึ้งเท่ากับ 0.476 คิดเป็น $\frac{100 \times 0.476}{0.797} = 59.72 \%$

ครั้งที่ 2

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nM ที่เวลา 8 นาที ของปฏิกิริยาควบคุมเท่ากับ 0.765 คิดเป็น 100%

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nM ที่เวลา 8 นาที ของสารสกัดจากเมล็ดส้มสายน้ำผึ้งเท่ากับ 0.464 คิดเป็น $\frac{100 \times 0.464}{0.765} = 60.65 \%$

ดังนั้นสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์เฉลี่ย(%) ของสารสกัดจากเมล็ดส้มสายน้ำผึ้ง ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/10 มิลลิลิตร เท่ากับ $(59.72 + 60.65)/2 = 60.19\%$

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของสารสกัดจากเมล็ดส้มพันธุ์ต่างๆ เทียบกับสารมาตรฐาน วิตามินซีและกรดแอสคอร์บิกโดยวัดทุกๆ 30 วินาที

Time (min)	Control	Control	เฉลี่ย	V.C	V.C	เฉลี่ย	PG	PG	เฉลี่ย
0.5	0.138	0.116	0.127	0.011	0.012	0.0115	0.018	0.015	0.0165
1	0.206	0.195	0.2005	0.013	0.013	0.013	0.023	0.021	0.022
1.5	0.273	0.262	0.2675	0.013	0.014	0.0135	0.026	0.023	0.0245
2	0.335	0.327	0.331	0.013	0.014	0.0135	0.029	0.026	0.0275
2.5	0.395	0.384	0.3895	0.013	0.014	0.0135	0.031	0.029	0.03
3	0.449	0.436	0.4425	0.013	0.013	0.013	0.033	0.03	0.0315
3.5	0.501	0.483	0.492	0.012	0.013	0.0125	0.035	0.032	0.0335
4	0.549	0.529	0.539	0.012	0.013	0.0125	0.036	0.034	0.035
4.5	0.593	0.572	0.5825	0.012	0.013	0.0125	0.038	0.036	0.037
5	0.632	0.607	0.6195	0.012	0.013	0.0125	0.04	0.038	0.039
5.5	0.667	0.64	0.6535	0.012	0.013	0.0125	0.042	0.04	0.041
6	0.699	0.673	0.686	0.012	0.013	0.0125	0.044	0.042	0.043
6.5	0.728	0.701	0.7145	0.012	0.012	0.012	0.046	0.044	0.045
7	0.754	0.727	0.7405	0.011	0.012	0.0115	0.049	0.047	0.048
7.5	0.777	0.747	0.762	0.011	0.012	0.0115	0.051	0.049	0.05
8	0.797	0.765	0.781	0.011	0.012	0.0115	0.054	0.052	0.053
8.5	0.815	0.785	0.8	0.011	0.012	0.0115	0.057	0.055	0.056
9	0.83	0.802	0.816	0.011	0.012	0.0115	0.06	0.058	0.059
9.5	0.845	0.813	0.829	0.011	0.012	0.0115	0.063	0.061	0.062
10	0.856	0.829	0.8425	0.011	0.012	0.0115	0.066	0.061	0.0635
10.5	0.867	0.842	0.8545	0.011	0.012	0.0115	0.069	0.067	0.068
11	0.876	0.856	0.866	0.011	0.012	0.0115	0.071	0.07	0.0705
11.5	0.885	0.865	0.875	0.011	0.012	0.0115	0.073	0.073	0.073
12	0.892	0.872	0.882	0.011	0.012	0.0115	0.075	0.076	0.0755
12.5	0.898	0.881	0.8895	0.011	0.012	0.0115	0.076	0.079	0.0775
13	0.905	0.887	0.896	0.011	0.012	0.0115	0.078	0.082	0.08
13.5	0.91	0.891	0.9005	0.011	0.012	0.0115	0.08	0.083	0.0815
14	0.914	0.897	0.9055	0.011	0.012	0.0115	0.081	0.085	0.083
14.5	0.919	0.903	0.911	0.011	0.012	0.0115	0.081	0.086	0.0835
15	0.922	0.908	0.915	0.011	0.012	0.0115	0.081	0.086	0.0835

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ลงนามไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานานาชาติ ไม่ควรนำข้อมูลนี้ไปใช้ประโยชน์ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Time (min)	สัม เขี้ยวหวาน	สัม เขี้ยวหวาน	เฉลี่ย	สัม พริมอင့်	สัม พริมอင့်	เฉลี่ย	สัม สายน้ำผึ้ง	สัม สายน้ำผึ้ง	เฉลี่ย
0.5	0.045	0.025	0.035	0.036	0.042	0.039	0.047	0.043	0.045
1	0.085	0.062	0.0735	0.074	0.08	0.077	0.091	0.078	0.0845
1.5	0.125	0.1	0.1125	0.111	0.118	0.1145	0.137	0.121	0.129
2	0.166	0.14	0.153	0.15	0.159	0.1545	0.175	0.161	0.168
2.5	0.206	0.181	0.1935	0.191	0.2	0.1955	0.211	0.198	0.2045
3	0.243	0.219	0.231	0.228	0.24	0.234	0.242	0.231	0.2365
3.5	0.275	0.253	0.264	0.263	0.276	0.2695	0.27	0.259	0.2645
4	0.303	0.284	0.2935	0.295	0.308	0.3015	0.295	0.283	0.289
4.5	0.329	0.313	0.321	0.323	0.338	0.3305	0.319	0.306	0.3125
5	0.355	0.341	0.348	0.35	0.366	0.358	0.342	0.328	0.335
5.5	0.379	0.366	0.3725	0.376	0.394	0.385	0.365	0.35	0.3575
6	0.403	0.393	0.398	0.4	0.42	0.41	0.388	0.372	0.38
6.5	0.427	0.419	0.423	0.423	0.446	0.4345	0.411	0.396	0.4035
7	0.449	0.444	0.4465	0.445	0.469	0.457	0.434	0.419	0.4265
7.5	0.47	0.467	0.4685	0.466	0.492	0.479	0.455	0.442	0.4485
8	0.49	0.49	0.49	0.487	0.514	0.5005	0.476	0.464	0.47
8.5	0.509	0.511	0.51	0.506	0.535	0.5205	0.496	0.486	0.491
9	0.526	0.531	0.5285	0.524	0.554	0.539	0.515	0.506	0.5105
9.5	0.543	0.549	0.546	0.541	0.573	0.557	0.532	0.526	0.529
10	0.558	0.567	0.5625	0.557	0.59	0.5735	0.55	0.545	0.5475
10.5	0.573	0.583	0.578	0.572	0.607	0.5895	0.566	0.562	0.564
11	0.586	0.599	0.5925	0.586	0.623	0.6045	0.582	0.579	0.5805
11.5	0.599	0.614	0.6065	0.599	0.638	0.6185	0.596	0.595	0.5955
12	0.611	0.628	0.6195	0.611	0.651	0.631	0.611	0.61	0.6105
12.5	0.622	0.643	0.6325	0.623	0.665	0.644	0.624	0.624	0.624
13	0.634	0.654	0.644	0.634	0.678	0.656	0.639	0.638	0.6385
13.5	0.642	0.663	0.6525	0.644	0.69	0.667	0.65	0.651	0.6505
14	0.651	0.673	0.662	0.653	0.701	0.677	0.661	0.663	0.662
14.5	0.659	0.681	0.67	0.662	0.712	0.687	0.673	0.675	0.674
15	0.667	0.69	0.6785	0.67	0.722	0.696	0.684	0.686	0.685

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Time (min)	สัมฤทธิ์ ผล	สัมฤทธิ์ ผล	เฉลี่ย	มะนาว	มะนาว	เฉลี่ย	ส้มโอ ขาวน้ำผึ้ง	ส้มโอ ขาวน้ำผึ้ง	เฉลี่ย
0.5	0.048	0.058	0.053	0.029	0.027	0.028	0.04	0.039	0.0395
1	0.111	0.114	0.1125	0.044	0.042	0.043	0.057	0.058	0.0575
1.5	0.149	0.164	0.1565	0.086	0.081	0.0835	0.082	0.086	0.084
2	0.193	0.218	0.2055	0.123	0.125	0.124	0.121	0.128	0.1245
2.5	0.237	0.267	0.252	0.164	0.157	0.1605	0.174	0.184	0.179
3	0.277	0.313	0.295	0.203	0.196	0.1995	0.228	0.241	0.2345
3.5	0.314	0.353	0.3335	0.238	0.249	0.2435	0.28	0.296	0.288
4	0.347	0.391	0.369	0.287	0.295	0.291	0.327	0.346	0.3365
4.5	0.379	0.426	0.4025	0.342	0.356	0.349	0.37	0.392	0.381
5	0.41	0.458	0.434	0.389	0.402	0.3955	0.411	0.437	0.424
5.5	0.44	0.49	0.465	0.418	0.436	0.427	0.45	0.478	0.464
6	0.468	0.52	0.494	0.452	0.465	0.4585	0.486	0.516	0.501
6.5	0.495	0.548	0.5215	0.474	0.481	0.4775	0.519	0.552	0.5355
7	0.521	0.575	0.548	0.496	0.503	0.4995	0.55	0.587	0.5685
7.5	0.545	0.599	0.572	0.518	0.526	0.522	0.58	0.616	0.598
8	0.567	0.622	0.5945	0.542	0.551	0.5465	0.607	0.645	0.626
8.5	0.588	0.644	0.616	0.565	0.572	0.5685	0.632	0.672	0.652
9	0.608	0.664	0.636	0.583	0.591	0.587	0.656	0.695	0.6755
9.5	0.627	0.683	0.655	0.608	0.619	0.6135	0.678	0.721	0.6995
10	0.644	0.7	0.672	0.625	0.634	0.6295	0.699	0.744	0.7215
10.5	0.66	0.716	0.688	0.642	0.651	0.6465	0.723	0.765	0.744
11	0.676	0.731	0.7035	0.659	0.667	0.663	0.745	0.789	0.767
11.5	0.69	0.746	0.718	0.675	0.681	0.678	0.771	0.814	0.7925
12	0.703	0.758	0.7305	0.687	0.693	0.69	0.794	0.835	0.8145
12.5	0.716	0.77	0.743	0.698	0.704	0.701	0.813	0.854	0.8335
13	0.727	0.782	0.7545	0.707	0.716	0.7115	0.83	0.87	0.85
13.5	0.738	0.79	0.764	0.718	0.727	0.7225	0.849	0.887	0.868
14	0.748	0.8	0.774	0.729	0.736	0.7325	0.866	0.903	0.8845
14.5	0.757	0.809	0.783	0.738	0.745	0.7415	0.882	0.907	0.8945
15	0.765	0.817	0.791	0.748	0.752	0.75	0.898	0.912	0.905

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Time (min)	ส้มโอ ทองดี	ส้มโอ ทองดี	เฉลี่ย
0.5	0.047	0.053	0.05
1	0.06	0.065	0.0625
1.5	0.082	0.082	0.082
2	0.113	0.107	0.11
2.5	0.158	0.141	0.1495
3	0.204	0.182	0.193
3.5	0.25	0.225	0.2375
4	0.294	0.264	0.279
4.5	0.335	0.301	0.318
5	0.371	0.335	0.353
5.5	0.404	0.366	0.385
6	0.438	0.395	0.4165
6.5	0.468	0.424	0.446
7	0.497	0.451	0.474
7.5	0.524	0.478	0.501
8	0.55	0.504	0.527
8.5	0.573	0.528	0.5505
9	0.595	0.551	0.573
9.5	0.616	0.572	0.594
10	0.636	0.593	0.6145
10.5	0.655	0.613	0.634
11	0.672	0.631	0.6515
11.5	0.688	0.649	0.6685
12	0.703	0.665	0.684
12.5	0.716	0.681	0.6985
13	0.729	0.696	0.7125
13.5	0.741	0.71	0.7255
14	0.752	0.723	0.7375
14.5	0.762	0.736	0.749
15	0.771	0.748	0.7595

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้