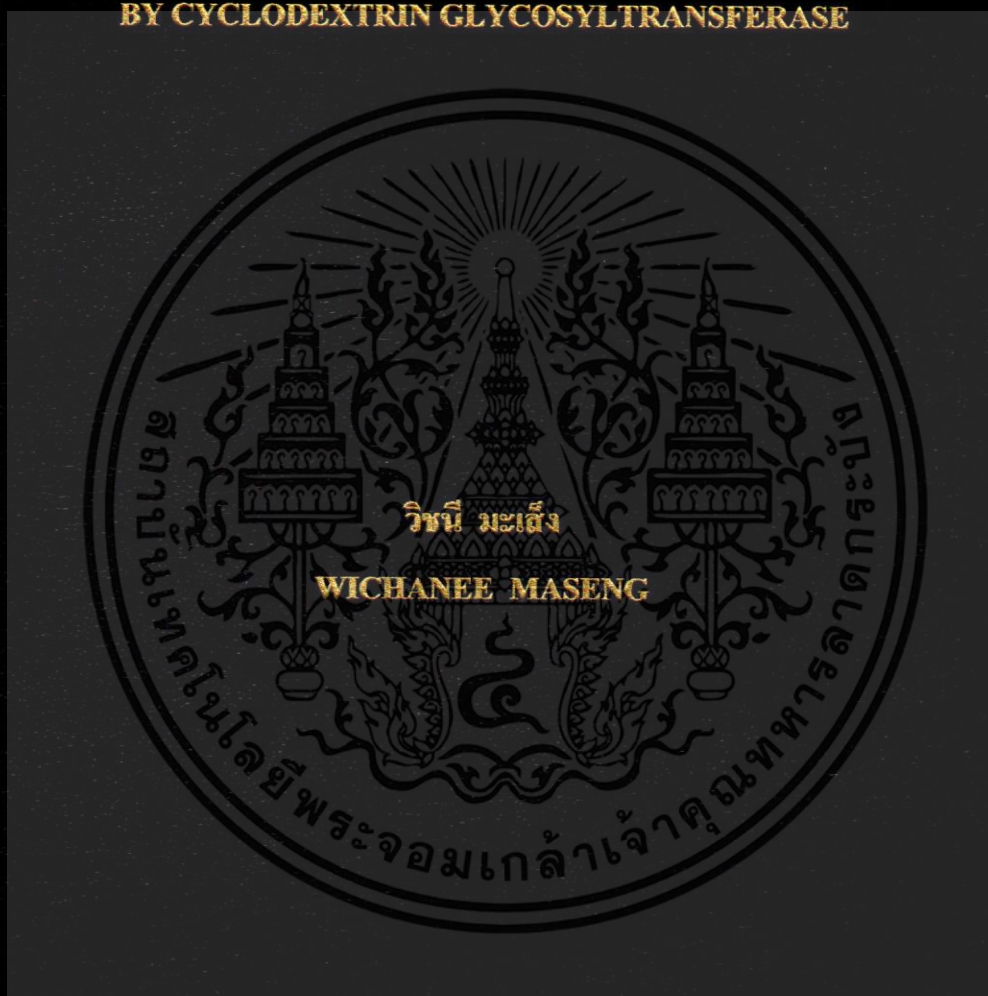


การดัดแปรสารแอนโทไซยานินไกลโคไซด์ในสารสกัดกระเจียนแดงโดยเอนไซม์
ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส

MODIFICATION OF ANTHOCYANIN GLYCOSIDES IN ROSELLE EXTRACT
BY CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-AI-M-053-258

การดัดแปรสารแอนโทไซยานินไกลโคไซด์ในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงโดยเอนไซม์

ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส

Modification of anthocyanin glycosides in Roselle extract by

cyclodextrin glycosyltransferase



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-AI-M-053-258

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Modification of anthocyanin glycosides in Roselle extract by
cyclodextrin glycosyltransferase**

WICHANEE MASENG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE**

FACULTY OF AGRO – INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2016

KMITL-2016-AI-M-053-258

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2016

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การดัดแปรสารแอนโทไซยานินไกลโคไซด์ในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงโดย
 เอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส
 MODIFICATION OF ANTHOCYANIN GLYCOSIDES IN ROSELLE EXTRACT
 BY CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE

ชื่อนักศึกษา นางสาววิหณี มะเส็ง
รหัสประจำตัว 56608004
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา วิทยาศาสตรการอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม	
ผศ.ดร.ยุพร พิษกมฺุร	
ผศ.ดร.ธงชัย พุดทองศิริ	
รศ.เขวาลักษณ์ สุรพันธ์พิสิษฐ์	

วัน / เดือน / ปีที่สอบ 25 กรกฎาคม 2559 เวลา 13.30 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 303 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ ๒๕ เดือน กค. พ.ศ. ๒๕๕๙

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การดัดแปรสารแอนโธไซยานินไกลโคไซด์ในสารสกัด กระเจี๊ยบแดงโดยเอนไซม์ไซโคลเด็คซ์ทรินไกลโคซิล ทรานซ์เฟอเรส
นักศึกษา	นางสาววิชนี มะเส็ง
รหัสประจำตัว	56608004
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การอาหาร
พ. ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม

บทคัดย่อ

การดัดแปรโครงสร้างโมเลกุลแอนโธไซยานินโดยวิธีทรานซ์ไกลโคซิเลชันสามารถช่วยปรับปรุงความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปรสารแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงโดยใช้เอนไซม์ไซโคลเด็คซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอเรส (CGTase) พบว่ามอลโตซิลบีตา ไซโคลเด็คซ์เป็นสารให้หมู่ไกลโคซิลที่ดี จากการทำปฏิกิริยาได้สภาวะที่เหมาะสมคือ เอนไซม์ไซโคลเด็คซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอเรส 80 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นมอลโตซิลบีตา ไซโคลเด็คซ์ทริน 1.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอะซิเตดบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบาง พบว่ามีจุดของผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น 3 จุด และเมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่ามีพีคที่สัมพันธ์กับสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น 3 พีค โดยมี R_t เท่ากับ 12.28, 13.48 และ 13.75 นาที โดยมีผลิตภัณฑ์รวมเท่ากับ 2.65%, 7.29% และ 5.74 % ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก ความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS ของสารละลายปฏิกิริยา พบว่าจะมีค่าเท่ากับ 86.68%, 0.21 มิลลิกรัมTrolox ต่อ มิลลิลิตร และ 74.04% ตามลำดับ โดยจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุมซึ่งมีค่าเท่ากับ 60.47%, 0.14 มิลลิกรัมTrolox ต่อ มิลลิลิตร และ 51.77% ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าปฏิกิริยา ทรานซ์ไกลโคไลเซชันของแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดง สามารถเพิ่มความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอนโธไซยานินไกลโคไซด์ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Modification of anthocyanin glycosides in Roselle extract by cyclodextrin glycosyltransferase
Student	Miss. Wichanee Maseng
Student ID.	56608004
Degree	Master of Science
Program	Food Science
Year	2016
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Praphan Pinsirodom

ABSTRACT

Modification of anthocyanin by transglycosylation can improve the antioxidant properties of the transglycosylated products. Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) was investigated. The maltosyl- β -cyclodextrin exhibited a good glycosyl donor. The optimum reaction was 80 Unit/ml of the enzyme in acetate buffer pH 5.0, 1.8% (w/v) of maltosyl- β -cyclodextrin and 0.5% (w/v) of roselle extract incubated at 45°C for 16h. The anthocyanin glycoside products appeared on TLC with 3 different R_f values were observed. The corresponded products were detected by high performance liquid chromatography (HPLC) with 3 peaks on chromatogram with R_t of 12.28, 13.48 and 13.75 min. The peak area was calculated to give product yield of 2.65%, 7.29% and 5.74 % respectively. The reaction mixture was analyzed for antioxidant capacities by DPPH radical scavenging ability, Ferric Reducing Antioxidant Power and ABTS radical cation decolorization assay. It was found that the antioxidant activities increased from 60.47%, 0.14 mgTE/ml and 51.77% to 86.68%, 0.21 mgTE/ml and 74.04%, respectively. The result indicated that transglycosylation of anthocyanin in roselle extract can improve its antioxidant ability.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จขึ้นได้ด้วยความกรุณาของท่านอาจารย์คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านโดยเฉพาะอย่างยิ่ง รศ. ดร. ประพันธ์ ปิ่นศิริโรดม และ ดร. สรุชัย ไหญ่เย็น ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการแก้ไขปัญหามาจนกระทั่งการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จเป็นรูปเล่มสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณท่านกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.ยุพร พิชฌมูท ผศ.ดร.ธงชัย พุฒทองศิริ และ รศ.เยาวลักษณ์ สุรพันธ์พิสิทธิ์ ที่ช่วยให้คำแนะนำ ตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร. เปี่ยมสุข พงศ์สวัสดิ์ ที่อนุเคราะห์ห้วเชื้อริคอมบิแนนท์ *Paenibacillus* sp. ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ช่างเทคนิค และเจ้าหน้าที่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่ได้ช่วยเหลืองานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณรุ่นพี่ ขอขอบคุณเพื่อน และรุ่นน้องทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ แนะนำและเป็นกำลังใจทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะเป็นประโยชน์แก่นิสิต นักศึกษา และผู้สนใจอ่านทั่วไป และหากมีข้อความใดหรือเนื้อหาตอนหนึ่งตอนใดผิดพลาดไปเนื่องจากการพิมพ์หรือด้วยเหตุใดก็ตาม ผู้จัดทำยินดีรับการติชมจากผู้อ่านด้วยใจจริง

วิชนิ มะเส็ง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	IV
สารบัญ	V
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญภาพ.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 กระเจียบแดง.....	4
2.2 แอนโรโซยานิน.....	6
2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของแอนโรโซยานิน.....	9
2.2.2 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแอนโรโซยานิน.....	14
2.3 ไซโคเลเด็กซ์ทริน.....	16
2.4 ปฏิกริยาทรานส์ไกลโคไซเลชั่น.....	17
2.5 ไซโคเลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรส.....	20
2.5.1 กิจกรรมการทำงานและและควมคงตัวของเอนไซม์	
ไซโคเลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรส.....	22
2.6 การดัดแปรโครงสร้างของสารด้วยวิธีทางชีวภาพ	
โดยใช้เอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา.....	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง.....	28
3.1 วัตถุดิบ และ เครื่องมืออุปกรณ์การทดลอง.....	28
3.1.1 วัตถุดิบ.....	28
3.1.2 เครื่องมือ.....	28
3.1.3 สารเคมี	29
3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	30
3.2 วิธีการทดลอง.....	30
3.2.1 การเตรียมสารสกัดกระเจียบแดง.....	30
3.2.2 การเตรียมเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรส และการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์.....	32
3.2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อตัดแปรโครงสร้าง แอนโรไซยานินไกลโคไซด์.....	33
3.2.3.1 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชัน.....	33
3.2.3.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชัน.....	33
3.2.3.3 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชัน.....	34
3.2.3.4 ศึกษาสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งของน้ำตาลที่เหมาะสมในการทำ ปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชัน.....	34
3.2.3.5 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ทรานส์ไกลโคไซเลชัน.....	35
3.2.4 ศึกษาผลผลิตและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแอนโรไซยานินไกลโคไซด์ ที่เตรียมได้โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม.....	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	37
4.1 ผลการศึกษาสมบัติทางเคมีของสารสกัดกระเจียบแดง.....	37
4.2 ผลการศึกษาเอนไซม์ไฮโดรไลติกซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรสที่เตรียมได้.....	38
4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อคัดแปร โครงสร้าง	
แอนโฆซานินไกลโคไซด์.....	38
4.3.1 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	
ทรานซ์ไกลโคไซด์.....	38
4.3.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	
ทรานซ์ไกลโคไซด์.....	43
4.3.3 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	
ทรานซ์ไกลโคไซด์.....	48
4.3.4 ผลการศึกษารดตั้งต้นที่เป็นแหล่งของน้ำตาลที่เหมาะสมในการทำ	
ปฏิกิริยาทรานซ์ไกลโคไซด์.....	53
4.3.5 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำ	
ปฏิกิริยาทรานซ์ไกลโคไซด์.....	58
4.4 ผลการศึกษาผลผลิตและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแอนโฆซานิน	
ไกลโคไซด์ที่เตรียมได้โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม.....	64
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	71
ข้อเสนอแนะ.....	71
บรรณานุกรม.....	72
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด	
และปริมาณแอนโฆซานินทั้งหมด.....	77
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี Dextrinizing activity.....	81
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน.....	83
ประวัติผู้เขียน.....	88

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

2.1 องค์ประกอบทางเคมีกายภาพของกลีบเลี้ยงดอกกระเจี๊ยบแดงสด.....	5
2.2 การแทนที่ของแอนโธไซยานิน.....	8
4.1 ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโธไซยานินทั้งหมด และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้ง.....	37
4.2 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารละลายปฏิกิริยาระหว่าง แอนโธไซยานินในกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน เมื่อเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น.....	41
4.3 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายปฏิกิริยาระหว่าง แอนโธไซยานินในกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน เมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น.....	46
4.4 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารละลายปฏิกิริยาระหว่าง แอนโธไซยานินในกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน เมื่อพีเอชในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น.....	51
4.5 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารละลายปฏิกิริยาระหว่าง แอนโธไซยานินในกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน เมื่อสารให้หมู่ไกลโคไซด์ต่างกัน.....	57
4.6 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายปฏิกิริยาระหว่าง แอนโธไซยานินในกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน เมื่อความเข้มข้นเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่างกัน.....	62
4.7 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายปฏิกิริยา ระหว่างเซลฟินีดิน-3-แอมโมไบโอไซด์ กับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน และแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดง กับมอลโตซิลบีตา ไซโคลเด็กซ์ทริน.....	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่

หน้า

2.1 โครงสร้างแอนโรไซยานิน.....	6
2.2 โครงสร้างแอนโรไซยานินที่พบมากในพืช.....	7
2.3 แอนโรไซยานินที่พบมากในกระเจี๊ยบแดง.....	9
2.4 ผลของโครงสร้างแอนโรไซยานินต่อสีแอนโรไซยานิน.....	10
2.5 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโรไซยานิน.....	12
2.6 กลไกของไซยานิดินเมื่อทำปฏิกิริยากับโลหะ.....	16
2.7 โครงสร้างของ α -, β -, และ γ -ไซโคลเด็คซ์ทริน	17
2.8 ตัวอย่างการเกิดปฏิกิริยาทรานซ์ไกลโคซิเลชันโดย.....	18
2.9 การเพิ่มการละลายของสารตั้งต้นด้วยวิธีการคัดแปรทางชีวภาพ.....	19
2.10 การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซโคลเด็คซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรส.....	21
4.1 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง ที่เกิดจากปฏิกิริยา ทรานซ์ไกลโคซิเลชัน ของแอนโรไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิล ปีตาไซโคลเด็คซ์ทริน ที่เวลาในการทำปฏิกิริยาต่างกัน.....	39
4.2 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายปฏิกิริยาระหว่าง แอนโรไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิลปีตาไซโคลเด็คซ์ทริน ที่เวลาในการทำปฏิกิริยาต่างกัน.....	42
4.3 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานซ์ไกลโคซิเลชันของ แอนโรไซยานินในกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิลปีตาไซโคลเด็คซ์ทรินด้วย โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางที่อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาต่างกัน.....	44
4.4 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายปฏิกิริยาระหว่าง แอนโรไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิลปีตาไซโคลเด็คซ์ทริน ที่อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาต่างกัน.....	47

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่

หน้า

4.5 ผลการวิเคราะห์ผลผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบางที่เกิดจากปฏิกิริยา ทรานส์ไกลโคไลเซชันของแอนโธไซยานินในกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิลบีตา ไซโคลเด็กซ์ทรินที่พีเอชในการทำปฏิกิริยาต่างกัน.....	49
4.6 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายปฏิกิริยาระหว่าง แอนโธไซนินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน ที่พีเอชในการทำปฏิกิริยาต่างกัน.....	52
4.7 ผลการวิเคราะห์ผลผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบางที่เกิดจากปฏิกิริยา ทรานส์ไกลโคไลเซชันของแอนโธไซยานินในกระเจี๊ยบแดงกับสารให้ หมู่ไกลโคซิลชนิดต่างกัน.....	54
4.8 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายปฏิกิริยาระหว่าง แอนโธไซนินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับสารให้หมู่ไกลโคซิลชนิดต่างกัน.....	58
4.9 ผลการวิเคราะห์ผลผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบางที่เกิดจากปฏิกิริยา ทรานส์ไกลโคไลเซชันของแอนโธไซยานินในกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิล บีตาไซโคลเด็กซ์ทรินเมื่อทำปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นเอนไซม์ต่างกัน.....	60
4.10 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายปฏิกิริยาระหว่าง แอนโธไซนินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ต่างกัน.....	63
4.11 ผลการวิเคราะห์ผลผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบางที่เกิดจากปฏิกิริยา ทรานส์ไกลโคไลเซชันของแอนโธไซยานินในกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิล บีตาไซโคลเด็กซ์ทริน.....	65

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 4.12 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบางที่เกิดจากปฏิกิริยา
 ทรานส์ไกลโคไลเซชันของเซลฟิโนดิน-3-แซมบูไบโอไซด์กับมอลโตซิล
 บิตาไซโคเค็กซ์ทริน.....65
- 4.13 โครมาโตแกรมโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเมื่อทำปฏิกิริยา
 ทรานส์ไกลโคไลเซชันที่สภาวะที่เหมาะสมของแอนโรไซยานินในกระเจียบแดง.....69



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) มีสรรพคุณช่วยลดไขมันในเส้นเลือด ความดันโลหิต และต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น โดยกลีบรองดอกของกระเจี๊ยบแดงนั้นจะมีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิก และกรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) กรดซิตริก (citric acid) กรดมาลิก (malic acid) และ กรดทาร์ทาริก (tartaric acid) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีแอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ให้สีแดง ซึ่งแอนโทไซยานินที่เป็นองค์ประกอบหลักในกระเจี๊ยบแดงคือเดลฟินิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์ (delphinidin-3-sambubioside) สารแอนโทไซยานินนี้สามารถทำหน้าที่ป้องกันการเกิดกระบวนการออกซิเดชันที่เป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (Da-Costa-Rocha และคณะ, 2014) หรือเรียกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินจะมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระโดยการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ขั้นเริ่มต้น (chain initiation) และทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ขั้นเพิ่มจำนวนอนุมูลอิสระ (chain propagation) (วัลลภ และ ปรานิต, 2547) โดยปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานิน คือ อุณหภูมิ แสง ความชื้น กรดต่าง ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โลหะ น้ำตาลและออกซิเจน

การคัดแปรโครงสร้างของสารสามารถทำได้โดยวิธี ทางเคมี กายภาพและชีวภาพ โดยการคัดแปรโครงสร้างของสารด้วยวิธีทางชีวภาพนั้นสามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งจะมีความจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาสูง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีสมบัติทางเคมีกายภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น การละลายและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีขึ้น (Li และคณะ, 2016) ปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน (transglycosylation) เป็นปฏิกิริยาที่ใช้ในการสังเคราะห์ โอลิโกแซคคาไรด์ โพลีแซคคาไรด์ หรือ อนุพันธ์แซคคาไรด์ (Lu และ Xai, 2014) โดยการถ่ายโอนโมเลกุลน้ำตาลจากอนุพันธ์ของนิวคลีโอไซด์ฟอสเฟตซึ่งเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล ไปยังสารรับหมู่ไกลโคซิลที่เหมาะสมด้วยการสร้างพันธะไกลโคซิดิก (พองาม, 2555) อีกทั้ง

ยังใช้ในการปรับปรุงสมบัติทางเคมีกายภาพของสารตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เช่น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การละลายน้ำ ความคงทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน แสง และอุณหภูมิ ตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์แอสทรากลิน (เคมเฟอรอล-3-O- β -D-กลูโคไพราไซด์) กลูโคไซด์ โดยใช้เด็กซ์ทรานซ์ซูเลสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมีแอสทรากลินเป็นตัวรับหมู่ไกลโคซิล พบว่าแอสทรากลิน กลูโคไซด์ที่ได้สามารถต้านอนุมูลอิสระได้เพิ่มขึ้น 18.8-20.3% และเพิ่มกิจกรรมการยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินได้เพิ่มขึ้น 3.8-18.8% เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (Kim และคณะ, 2011)

งานวิจัยนี้จึงได้ทดลองเตรียมสกัดแอนโธไซยานินจากกระเจี๊ยบแดง นำมาทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน ซึ่งเป็นการย้ายโมเลกุลของน้ำตาลไปยังแอนโธไซยานินที่สกัดได้ ซึ่งมีเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยใช้โมเลกุลของน้ำตาลคือ กลูโคส มอลโตส ปีตาไซโคลเด็กซ์ทรินและ มอลโตซิลปีตาไซโคลเด็กซ์ทริน เป็นสารให้หมู่ไกลโคซิลของปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน เพื่อให้ได้แอนโธไซยานินที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปรโครงสร้างของแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดง โดยใช้เอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรส
2. ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแอนโธไซยานินไกลโคไซด์ที่ได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการดัดแปรโครงสร้างแอนโธไซยานินไกลโคไซด์ในสารสกัดกระเจี๊ยบแดง โดยใช้ปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันของเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรส และใช้ไซโคลเด็กซ์ทรินชนิดต่างๆ ได้แก่ มอลโตซิลปีตาไซโคลเด็กซ์ทริน ปีตาไซโคลเด็กซ์ทริน มอลโตส และกลูโคสเป็นสารตั้งต้น ศึกษาระยะเวลา อุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา จากนั้นศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่าง ๆ คือ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ความสามารถ

ในการรีดิวซ์เฟอร์ริก และความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS ตรวจสอบเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอนโธไซยานิน ไกลโคไซด์ที่ได้ด้วย โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography) และ โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography)

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. สภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปรโครงสร้างของแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดง โดยปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันด้วยเอนไซม์ไซโคลเด็คซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอรัเรส
2. แอนโธไซยานินที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระเจี๊ยบแดง

กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชล้มลุกพื้นเมืองของเอเชียและแอฟริกา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa* Linn. เป็นพืชในวงศ์ Malvaceae มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Roselle, Rosella หรือ Red sorrel, Jamaica sorrel และในประเทศไทยมีชื่อท้องถิ่นเรียกแตกต่างกันออกไป เช่น กระเจี๊ยบเปรี้ยว ผักแก้งแก้ง ส้มแก้งแก้ง ส้มตะเลงเครง เป็นต้น กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชใบแสง สามารถปลูกได้ทั่วไป ชอบอากาศร้อนโดยจะเป็นพุ่มไม้ขนาดเล็ก ลำต้นมีสีแดงอมม่วง ใบเดี่ยวรูปฝ่ามือ ดอกเดี่ยว ดอกจะมีสีชมพูหรือสีเหลือง ตรงกลางดอกมีสีเข้มมากกว่าขอบนอกของกลีบ ดอกที่ได้รับการผสมแล้วกลีบดอกจะร่วงกลีบรองดอกและกลีบเลี้ยงก็จะเจริญเติบโตขึ้นอีกเกิดเป็นสีม่วงแดงหุ้มเมล็ดเอาไว้ภายในกลีบเลี้ยง (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร, 2557)

คุณค่าทางโภชนาการของกลีบเลี้ยงดอกกระเจี๊ยบแดงสดนั้นแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ สิ่งแวดล้อมและสภาวะในการเก็บเกี่ยว องค์ประกอบทางเคมีของกระเจี๊ยบแดงสดจะประกอบด้วย ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ไฟเบอร์ วิตามินซี บีตา-แคโรทีน แคลเซียมและธาตุเหล็ก เป็นต้น (Da-Costa-Rocha และคณะ, 2014) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีกายภาพของกลีบเลี้ยงดอกกระเจี๊ยบแดงสด

องค์ประกอบ	ปริมาณต่อ 100 กรัมตัวอย่าง
ความชื้น	9.2 กรัม
โปรตีน	1.145 กรัม
ไขมัน	2.61 กรัม
ไฟเบอร์	12.0 กรัม
แคลเซียม	6.90 กรัม
ฟอสฟอรัส	12.63 มิลลิกรัม
เหล็ก	273.2 มิลลิกรัม
เกลือ	8.98 มิลลิกรัม
แคโรทีน	0.029 มิลลิกรัม
ไทเอมีน	0.117 มิลลิกรัม
ไรโบฟลาวิน	0.277 มิลลิกรัม
ไนอะซิน	3.765 มิลลิกรัม
กรดแอสคอร์บิก	6.7 มิลลิกรัม

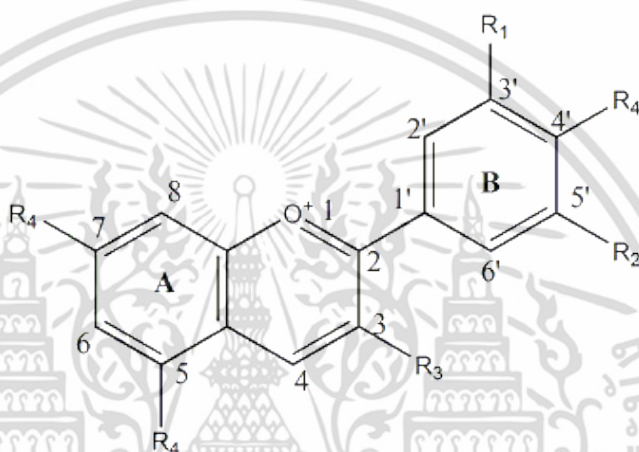
ที่มา: Mahadevan และคณะ (2009)

สารสกัดกระเจี๊ยบแดงจะอุดมไปด้วยกรดอินทรีย์ในปริมาณสูงซึ่งประกอบด้วย กรดซิตริก กรดไฮดรอกซีซิตริก กรดฮิบิกัส กรดมาลิก และกรดทาร์ทาริกเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนกรดออกซาลิก กรดแอสคอร์บิกเป็นองค์ประกอบรอง (Da-Costa-Rocha และคณะ, 2014)

แอนโทไซยานินในกลีบเลี้ยงดอกกระเจี๊ยบแดงประกอบด้วย เคลฟิโนดิน-3-แซมบูไบโอไซด์ เคลฟิโนดิน-3-กลูโคไซด์ และไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ โดยเคลฟิโนดิน-3-แซมบูไบโอไซด์เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งจะพบในกลีบเลี้ยงดอกกระเจี๊ยบแดงประมาณ 1.5 กรัม ต่อ 100 กรัมแห้ง และนอกจากนั้นในดอกกระเจี๊ยบแดงจะประกอบไปด้วย ไซยานิดิน-5-ไดกลูโคไซด์ และ ไซยานิดิน-3-(2-กลูโคซิลรูทีโนไซด์)

2.2 แอนโทไซยานิน (Anthocyanin)

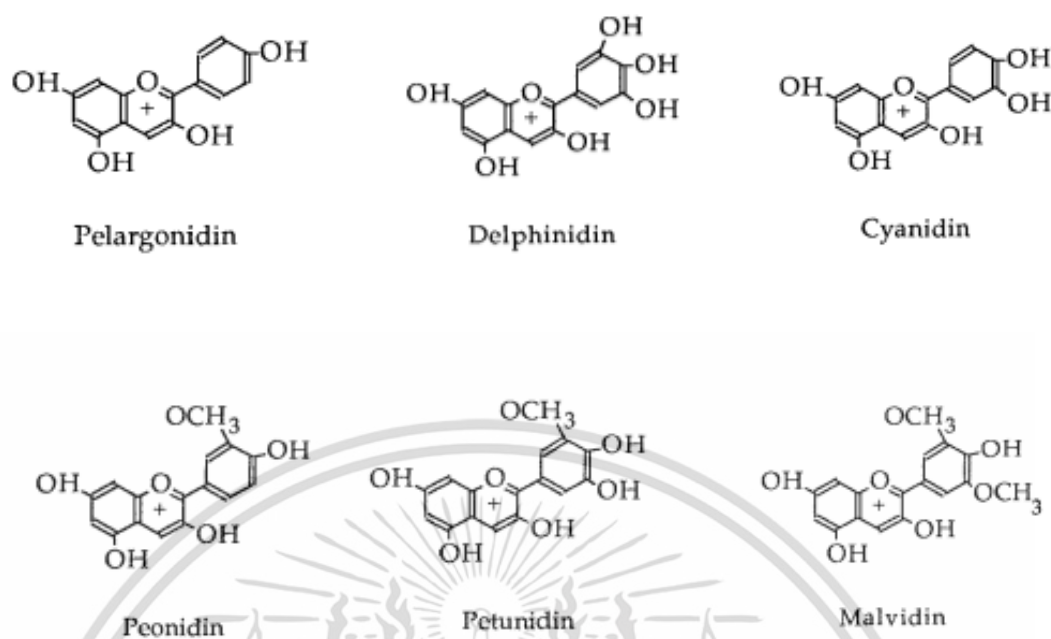
แอนโทไซยานินเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นสารให้สีตามธรรมชาติ โครงสร้างของแอนโทไซยานินประกอบด้วยวงอะโรมาติก 3 วงต่อกัน โดยที่ 1 วงหรือมากกว่านั้นจะต่อกับโมเลกุลน้ำตาลหรือหมู่เอซิลที่ต่อกับโมเลกุลน้ำตาล แอนโทไซยานินพบได้หลายชนิดแต่ทุกชนิดจะมีโครงสร้างหลักชนิดเดียวกันที่เรียกว่า แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) (Tompson, 1990) ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างแอนโทไซยานิดิน

ที่มา: Mazza และ Miniati (2000)

แอนโทไซยานิดินที่พบในธรรมชาติมีประมาณ 20 ชนิด แต่มีอยู่ 6 ชนิดที่สามารถพบมากในพืชคือ เพลาร์โกนิดิน (pelargonidin) ไซยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) พีโอนิดิน (peonidin) เพทูนิดิน (petunidin) มัลวิดิดิน (malvidin) ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างแอนโทไซยานินที่พบมากในพืช

ที่มา : Tompson (1990)

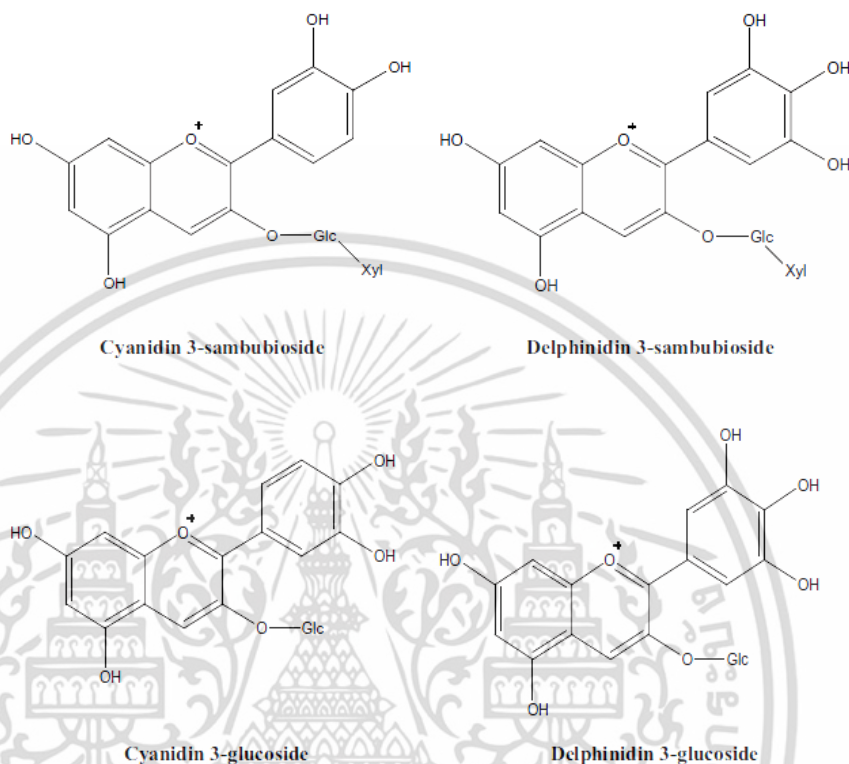
ความแตกต่างของแอนโทไซยานินแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับ จำนวนของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group), ระดับของเมทิลเลชัน (degree of methylation) ของหมู่ไฮดรอกซิล ชนิด จำนวน และตำแหน่งของน้ำตาลที่ต่อกับโมเลกุลของแอนโทไซยานิน ซึ่งจะทำให้แอนโทไซยานินแต่ละชนิดมีสีแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การแทนที่ของแอนโรไซยานินดิน

ชื่อ	รูปแบบการแทนที่							สี
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigeninidin (Ap)	H	OH	H	OH	H	OH	H	Orange
Aurantininidin (Au)	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Orange
Capensininidin (Cp)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Bluish-red
Cyanidin (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
Delphinidin (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Bluish-red
Europininidin (Eu)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Bluish-red
Hirsutidin (Hs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Bluish-red
6-Hydroxycyanidin (6 OHCy)	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	Red
Luteolinidin (Lt)	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange
Malvidin (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	OMe	Bluish-red
5-Methylcyanidin (5-Mcy)	OH	OMe	H	OH	OH	H	-	Orange-red
Pelargonidin (Pg)	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Orange
Peonidin (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Orange-red
Petundin (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Bluish-red
Pulchellidin (Pl)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Bluish-red
Rosininidin (Rs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Red
Tricetinidin (Tr)	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Red

ที่มา : Mazza และ Miniati (2000)

แอนโธไซยานินที่พบมากในกระเจี๊ยบแดง คือ เดลฟิnidin -3- แซมบูไบโอไซด์, เดลฟิnidin -3- กลูโคไซด์, ไซยานิดิน -3- กลูโคไซด์ และไซยานิดิน -3- แซมบูไบโอไซด์ (Da-costa-Rocha, 2014) ดังแสดงภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 แอนโธไซยานินที่พบมากในกระเจี๊ยบแดง

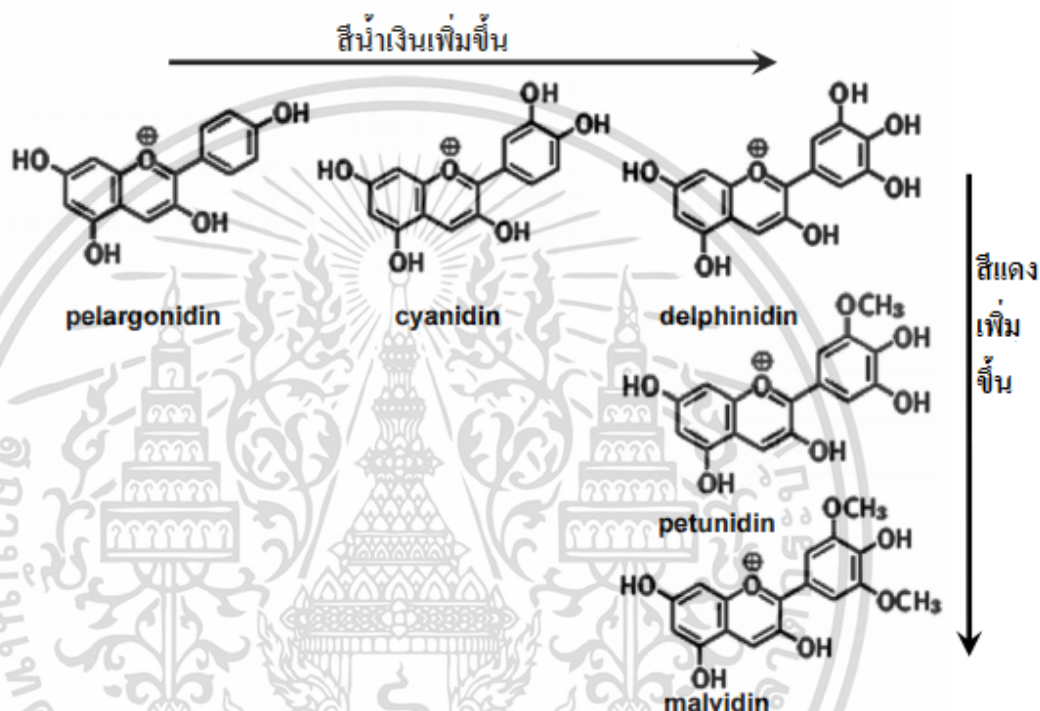
ที่มา: Sindi และคณะ (2014)

2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อสีและความเสถียรของแอนโธไซยานิน

ปัจจัยทางเคมีกายภาพที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของแอนโธไซยานินและมีผลต่อความเสถียรของแอนโธไซยานินมากที่สุด ได้แก่ อุณหภูมิ แสง ความเป็นกรดด่าง ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โลหะ น้ำตาล และออกซิเจน รวมทั้งความเข้มข้น โครงสร้างทางเคมีและองค์ประกอบของแอนโธไซยานิน ซึ่งเป็นปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อความเสถียร (Socaciu, 2008)

1) โครงสร้าง (Structure)

ความเสถียรและสีของแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับธรรมชาติและจำนวนของน้ำตาลที่ใกล้กับฟลavylium ไอออน (flavylium ion) และจำนวนของกรดที่เชื่อมกับหมู่ไกลโคซิลิก รวมทั้งเกี่ยวข้องกับจำนวนและตำแหน่งในการแทนที่ของฟลavylium ไอออน ของไฮดรอกซิลและเมทอกซิล โดยเมื่อเมทอกซิลเพิ่มขึ้นจะมีผลต่อสีของแอนโทไซยานิน ดังแสดงในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 ผลของโครงสร้างแอนโทไซยานินต่อสีแอนโทไซยานิน

ที่มา: ยูพาพร (2547)

ตัวอย่างเช่น 3-ดีท็อกซี แอนโทไซยานิน ที่มีสีเหลืองเนื่องจากเกิดการดีไฮดรอกซิเลชัน (dehydroxylation) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ทำให้มีความเสถียรมากกว่า 3-ไฮดรอกซี แอนโทไซยานิน ที่มีสีแดงและมีความเสถียรต่ำกว่ามาก นอกจากนี้ยังพบแอนโทไซยานินที่ประกอบด้วยหมู่อะโรมาติกเอซิล (aromatic acyl group) มีความเสถียรมากกว่าโครงสร้างที่ไม่ได้เชื่อมต่อกับหมู่เอซิล (unacylated pigment) อาจเนื่องมาจากความเร็วในการเปลี่ยนสีจากการไฮเดรชัน (hydration) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ในแอนโทไซยานินนิวเคลียส (anthocyanin nucleus) (Socaciu, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิทธิพลของโครงสร้างแบบทรานส์-ซิส (*trans-cis* configuration) ของกรดที่เชื่อมต่อกับ glycosylic moieties ของแอนโธไซยานินมีผลต่อสีและความเสถียรของแอนโธไซยานิน การเปลี่ยนจากทรานส์ ไปเป็นซิสไอโซเมอร์ของหมู่ควมาริลใน มาลวิดิน 3-[6-(4-p-ควมาริล)- α -L-แรมโนไพราโนซิล- β -D-กลูโคไพราโนไซด์]-5-(β -D-กลูโคไพราโนไซด์) และ เคลฟินิดิน 3-[6-(p-ควมาริล)- β -D-กลูโคไพราโนไซด์]-5-[6-(มาโลนิล)- β -D-กลูโคไพราโนไซด์] จะมีความเข้มของสีเพิ่มขึ้นและความเสถียรของ รงควัตถุ (pigment) เนื่องจากการบิดตัวโครงสร้าง (intramolecular copigmentation) ในโครงสร้างแบบซิส (*cis* configuration) ระยะทางของหมู่เอซิล (acyl residue) ไปยังโครโมฟอร์ (chromophore) จะสั้นกว่า เพื่อป้องกันผลกระทบของไฮเดรชัน (hydration) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2

ปีตากอนฟิควเรชัน (β configuration) ของ 3-D-กลูโคไซด์ของ มาลวิดิน ไชยานิดิน และ เคลฟินิดิน จะมีความเสถียรมากกว่าแอลฟาคอนฟิควเรชัน (α configuration) โครงสร้างรงควัตถุ (pigment) ของแอนโธไซยานินกับโลหะ และสารชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะโพลิฟีนอล ทำให้โครงสร้างมีความเสถียร (Socaciu, 2008)

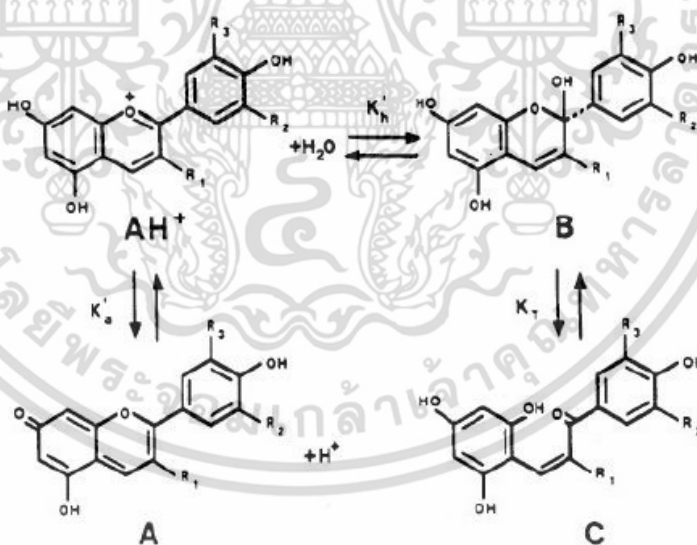
2) อุณหภูมิ (Temperature)

ความร้อนมีผลในการทำลายแอนโธไซยานิน โดยเมื่ออุณหภูมิเพิ่ม ความเสถียรของแอนโธไซยานินและรงควัตถุต่างๆในอาหารจะลดลง ตัวอย่างเช่น ไชยานิดิน 3-กลูโคไซด์ และ ไชยานิดิน 3-รูทีโนไซด์ จะสลายตัวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในสารละลายกรดอ่อน (พีเอช 1-4) ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

จลนพลศาสตร์ของโฟโตเคมีคัล (photochemical) และการทำลายด้วยความร้อน (thermal degradation) ของฟิลาโรโกนิดิน เคลฟินิดิน มาลวิดิน และ ไชยานิดิน จะมีรูปแบบการย่อยสลายที่เหมือนกันเนื่องจากการกระตุ้น (excitation) ของเฟลวิลีเยมไอออน ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ 2,4,6-ไตร-ไฮดรอกซีเบนซาลดีไฮด์ จากวง A นอกจากนี้ยังมี 3,4,5-ไฮดรอกซีเบนโซอิก แอซิด จาก เคลฟินิดิน 4-ไฮดรอกซีเบนซิล-3,5-ไดเมททอกซีเบนโซอิก แอซิด จาก มาลวิดิน 3,4-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก แอซิด จาก ไชยานิดิน และ 4-ไฮดรอกซีเบนโซอิก แอซิด จากฟิลาโรโกนิดิน ซึ่งทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์จากวง B การเกิดกลูโคซิเลชัน (Glucosylation) ของหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 จะเพิ่มผลผลิตควอนตัม (quantum yield) ของปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัล (photochemical reaction) (Socaciu, 2008)

3) ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ในสารละลายที่มีสมบัติเป็นกรด เป็นกลาง และเป็นเบส โครงสร้างของแอนโทไซยานิน จะมีการเปลี่ยนแปลงได้ 4 รูปแบบ โครงสร้างที่อยู่ในสภาวะสมดุลคือ red flavylium cation (AH^+) blue quinonoidal base หรือ red quinonoidal base (A) colorless carbinol pseudobase (B) และ colorless chalcone (C) ดังแสดงในภาพที่ 2.5 ในสภาวะที่เป็นกรดและพีเอชต่ำกว่า 2 จะมี AH^+ เป็นโครงสร้างเด่น เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น AH^+ จะเกิดการสูญเสียโปรตรอนเกิดเป็นสารละลาย blue quinonoidal base หรือ red quinonoidal base (A) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เกิดเป็นปกติ แต่การเกิดปฏิกิริยาไฮเดรชัน (hydration) ของ AH^+ จะให้เกิด colorless carbinol pseudobase (B) ซึ่งเกี่ยวข้องกับความแตกต่างกันของพีเอช และโครงสร้างของแอนโทไซยานินจึงทำให้เกิดปริมาณของ AH^+ , A, B และ C ที่สภาวะสมดุลมีความแตกต่างกัน เช่น โครงสร้างของ 3-ไกลโคไซด์ิก และ 3,5-ไดไกลโคไซด์ิก จะเกิดขึ้นเมื่อพีเอช เพิ่มขึ้นมากกว่า 3 ซึ่งจะเกิดเป็น colorless carbinol pseudobase (B) (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553)



ภาพที่ 2.5 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานิน

ที่มา: Mazza และ Brouillard (1987)

4) กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)

กรดแอสคอร์บิกมีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานิน โดยกรดแอสคอร์บิกสามารถทำปฏิกิริยาคอนเดนเซชัน (condensation) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของแอนโทไซยานิน การสลายตัวของกรดแอสคอร์บิกมีผลให้เกิดการสลายตัวของแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น เนื่องจากกลไกของกรดแอสคอร์บิกมีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานิน คือ กรดแอสคอร์บิกเป็นสาเหตุทำให้เกิดการแตกตัวแบบออกซิเดทีฟ (oxidative cleavage) ที่วงแหวนไพริเลียม (pyrilium ring) จากการกระทำของอนุมูลอิสระ กรดแอสคอร์บิกทำหน้าที่เป็นโมเลกุลออกซิเจนแอคทีเวเตอร์ (molecular oxygen activator) ในการสร้างอนุมูลอิสระออกมาทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของแอนโทไซยานิน การเติมกรดแอสคอร์บิกปริมาณ 330 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลายที่มีมาลวิดิน 3-กลูโคไซด์ มาลวิดิน 3,5-ไดกลูโคไซด์ และเกลือเฟลเวียม (flavylum salt) จะเกิดการแทนที่ที่ต่างกันในการบอนด์คอมที่ตำแหน่ง 4 ที่พีเอช 2 โดยโครงสร้างของแอนโทไซยานินในรูปเกลือเฟลเวียม มีบทบาทสำคัญต่อความเสถียรของแอนโทไซยานิน ซึ่งไดกลูโคไซด์จะทำให้สีของแอนโทไซยานิน จางช้าลงกว่าโมโนกลูโคไซด์ ทั้งนี้ชนิดของเฟลเวียมแคทไอออน (flavylum cation) ไม่มีผลต่ออัตราการสลายตัวของกรดแอสคอร์บิก (Socaciu, 2008)

5) น้ำตาล (Sugars)

การเติมน้ำตาลมีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานิน ซึ่งขึ้นอยู่กับโครงสร้างความเข้มข้นของแอนโทไซยานินและชนิดของน้ำตาล โดยความเสถียรทางความร้อนของแอนโทไซยานิน (anthocyanin thermastability) จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของซูโครส (concentration of sucrose) เพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 20 % ขณะที่ความเข้มข้นที่ 40 % จะมีผลต่อความเสถียรของรงควัตถุ (Socaciu, 2008)

6) การรวมตัวกับสารอื่น (Co-pigment)

การเกิดปฏิกิริยาของแอนโทไซยานินกับสารประกอบอื่นซึ่งไม่มีสี ส่งผลให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น โดยสามารถเกิดได้ 4 รูปแบบ คือ การเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนโทไซยานินกับสารอื่น (intermolecular copigmentation) เช่น ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ นิวคลีโอไทด์ และโพลีแซคคาไรด์ โดยพันธะเคมีที่เกิดขึ้นเป็นพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) การเกิดปฏิกิริยาขึ้นภายในโมเลกุลของแอนโทไซยานิน (intramolecular copigmentation) ระหว่างส่วนที่เป็นแอนโทไซยานินติดกับกรดอินทรีย์ โดยพันธะโควาเลนต์ การ

เกิดปฏิกิริยาของแอนโทไซยานินกับไอออนของโลหะ (metal copigmentation) และการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดปฏิกิริยาของแอนโรไซยานินด้วยกันในสถานะที่มีความเข้มข้นของแอนโรไซยานินสูง (self association) ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของแอนโรไซยานินที่อยู่ในรูปของเฟลวีเลียมแคทไอออน และเพิ่มความคงตัวของเฟลวีเลียมแคทไอออน ให้มีสีแดงเข้มขึ้น (สุโณทัย, 2557)

7) แสง

การสลายตัวของแอนโรไซยานินจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการสัมผัสกับแสง โดยกลไกการสลายตัวของแอนโรไซยานินจะเกิดขึ้นจากเมื่อแอนโรไซยานินสัมผัสกับแสงทำให้ไอออนเข้าไปแทนที่หมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ในโมเลกุลแอนโรไซยานินทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโรไซยานิน และเป็นตัวเร่งให้เกิดการสลายตัวของสารแอนโรไซยานินจากความร้อน (สุโณทัย, 2557)

8) ปัจจัยอื่น

แอนโรไซยานินจะมีสีจางที่พีเอช 3 โดยการเติมโซเดียมซัลไฟด์ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ในส่วนโครโมฟอร์ (chromophore) ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดเร็วที่สภาวะความเป็นกรด (acidification) ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ EDTA และส่วนผสมระหว่างซัลเฟอร์ไดออกไซด์และ EDTA มีผลต่อการสูญเสียแอนโรไซยานินในน้ำผลไม้สดอบอร์รี่น้อยมากเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 10 สัปดาห์ ในทางกลับกันการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการสูญเสียแอนโรไซยานิน (Socaciu, 2008)

2.2.2 สมบัติด้านออกซิเดชันของแอนโรไซยานิน

แอนโรไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง (Da-Costa-Rocha และคณะ, 2014) โดยอนุมูลอิสระคืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่มีคู่อยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุด โดยอาจมีจำนวนอิเล็กตรอนอิสระจำนวน 1 ตัว หรือมากกว่านั้น ทำให้ไม่เสถียร มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ซึ่งทำให้ตัวมันเสถียรมากขึ้น ในขณะที่เดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนไปนั้นมียอดอิเล็กตรอนที่ไม่ครบคู่และเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายมีหลายชนิด เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical, O_2^-) อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical, $OH^\cdot$) อนุมูลไนตริกออกไซด์ (nitric oxide radical, $NO^\cdot$) อนุมูลเพอร์ออกไซด์ (peroxyl radical, $ROO^\cdot$) อนุมูลไฮโดรเพอร์ออกไซด์ (hydroperoxyl radical, $HOO^\cdot$) เป็นต้น สำหรับความสามารถในการต้านออกซิเดชันของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

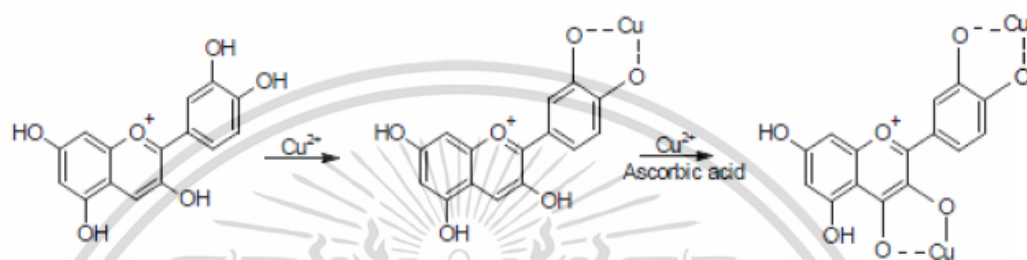
แอนโทไซยานินสามารถตรวจวิเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น การวัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลเพอร์รอกซิด ได้แก่ ORAC (oxygen radical absorbance capacity) การวัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสารอินทรีย์ ได้แก่ DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) การวัดความสามารถในการรีดิวซ์โลหะ ได้แก่ FRAP (ferric reducing antioxidant potential) เป็นต้น (สุโสนีย์, 2557)

Tsai และคณะ (2002) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของแอนโทไซยานินกับความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง โดยความสัมพันธ์ของแอนโทไซยานินกับความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันนั้น จะอธิบายด้วยการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยวิเคราะห์ด้วยวิธีการวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) พบว่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น ซึ่งแอนโทไซยานินนั้นจะเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญของกระเจี๊ยบแดง

Mohd-Esa และคณะ (2010) ได้ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่าง ๆ ของกระเจี๊ยบแดง ได้แก่ เมล็ด กลีบเลี้ยง ใบ และก้าน จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าเมล็ดของกระเจี๊ยบแดงนั้นจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด คือ 78.70% รองลงมาคือกลีบเลี้ยงดอกกระเจี๊ยบแดงซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ คือ 61.5%

Pacôme และคณะ (2014) ได้ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ของกระเจี๊ยบแดงสด พบว่าในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงจะพบ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน แทนนิน ซาโปนิน สเตอรอยด์ และสเตอรอล โดยจะพบแอนโทไซยานินในปริมาณมากที่สุด ซึ่งแอนโทไซยานินที่พบมากที่สุดคือ เดลฟิnidin -3- แซมบูไบโอไซด์และ ไซยานิดิน -3- แซมบูไบโอไซด์ เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงนั้นจะมีค่า IC_{50} 0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่กรดแอสคอร์บิกที่ใช้เป็นสารอ้างอิงจะมีค่า IC_{50} 0.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติที่มีศักยภาพ

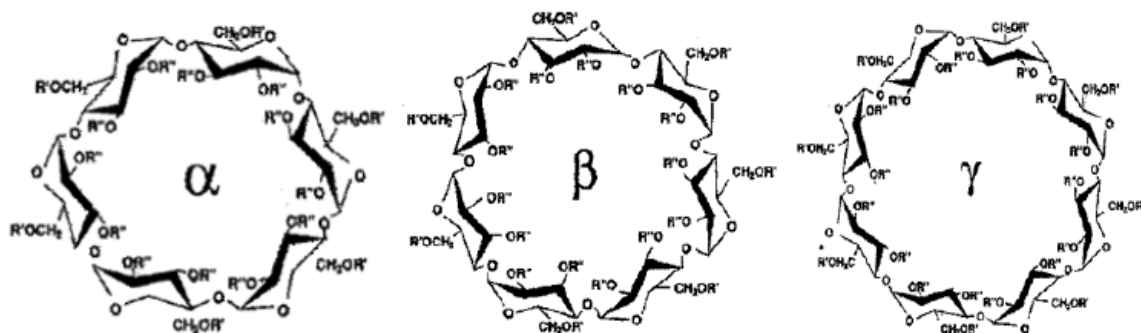
ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับโครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานิน และสัมพันธ์กับจำนวนและตำแหน่งของไฮดรอกซิล เมทอกซิล ที่อยู่รอบวงแหวน รวมถึงหมู่น้ำตาล และฟิเอช เช่น แอนโทไซยานินที่มีไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3' และ 4' (3', 4'-dihydroxy group) สามารถทำปฏิกิริยากับโลหะให้อยู่ในรูปที่เสถียรได้รวดเร็ว และที่มีฟิเอช 2-4 ซึ่งแอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปของเฟลวีเลียมแคทไอออน สามารถทำปฏิกิริยากับโลหะ เช่นเดียวกัน (สุไสินัย, 2557) ดังแสดงในภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 กลไกของไซยานิดินเมื่อทำปฏิกิริยากับโลหะ
ที่มา: สุไสินัย (2557)

2.3 ไซโคลเด็กซ์ทริน (Cyclodextrins: CD)

ไซโคลเด็กซ์ทรินมีโครงสร้างเป็นรูปวงแหวนประกอบด้วยกลูโคไพราโนส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1, 4 ไกลโคซิดิก เป็นอนุพันธ์ของมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งไซโคลเด็กซ์ทรินสามารถผลิตได้จากแป้งโดยเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส จะย่อยแป้งเป็นโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ แล้วเชื่อมปลายทั้งสองข้างเกิดเป็นโมเลกุลวงแหวน ไซโคลเด็กซ์ทรินมีความแตกต่างกัน 3 ประเภท คือ แอลฟา-ไซโคลเด็กซ์ทริน บีตา-ไซโคลเด็กซ์ทริน แกมมา-ไซโคลเด็กซ์ทริน ซึ่งแต่ละประเภทประกอบด้วย 6, 7 และ 8 โมเลกุลของกลูโคส ตามลำดับ ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 2.7



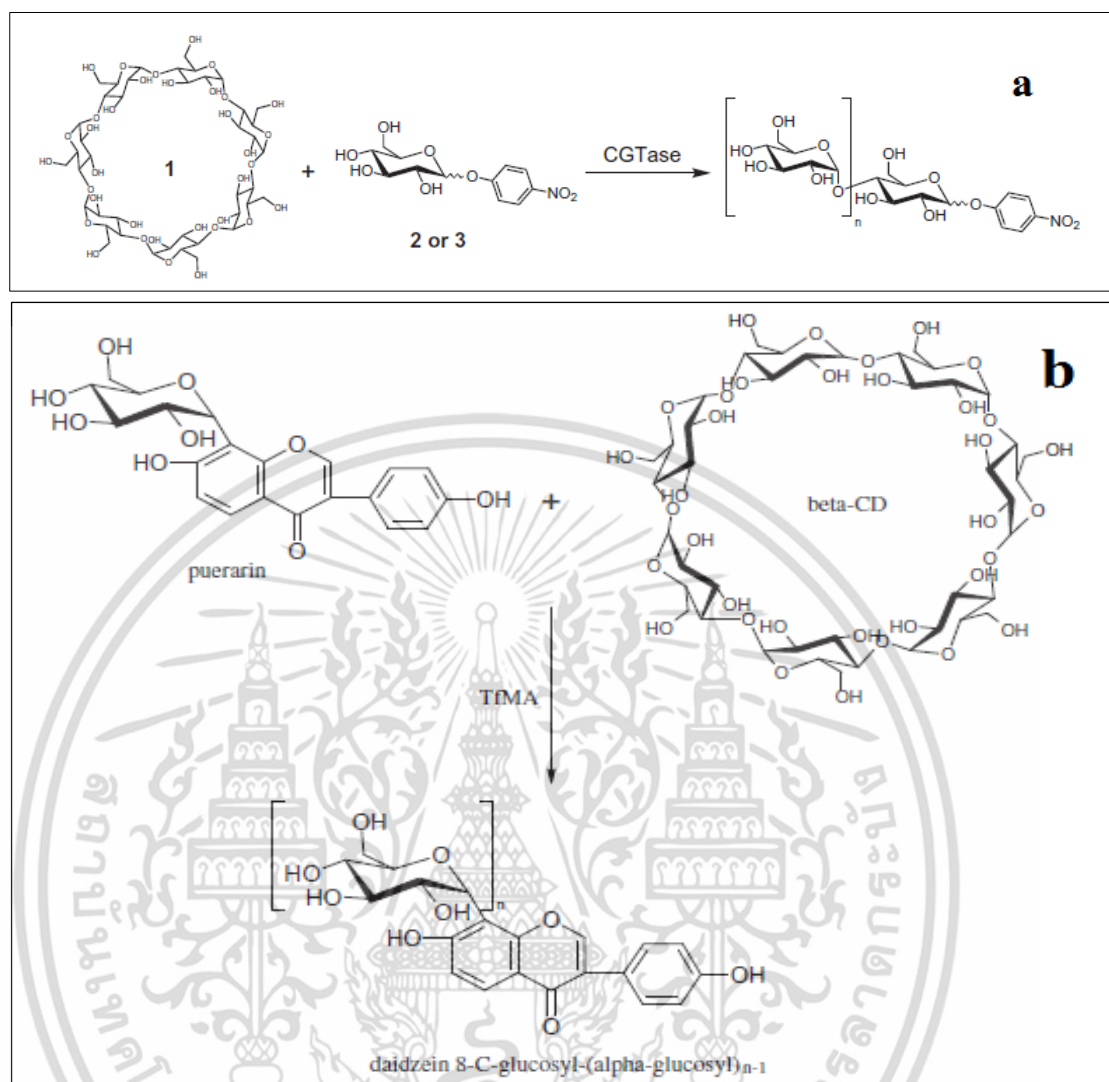
ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของ α -, β -, และ γ -ไซโคลเด็กซ์ทริน

ที่มา: Caligur, (2008)

บีตา-ไซโคลเด็กซ์ทรินมีการนำมาใช้มากที่สุดเนื่องจากมีราคาถูกและมีประโยชน์ในการใช้มากที่สุด สำหรับรูปร่างของไซโคลเด็กซ์ทริน มีโครงสร้างซึ่งอยู่รอบนอกของวงแหวนเป็นส่วนของน้ำ (hydroxyl groups) ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำได้ ส่วนโครงสร้างภายในวงแหวนเป็นส่วนใหญ่ที่ไม่ชอบน้ำ (CH groups) ซึ่งเป็นโครงสร้างวงแหวนแบบปิดเหมาะสำหรับการรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนอินคลูชัน (inclusion complex) กับโมเลกุลของสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์อื่น ๆ (Mamata และคณะ, 2002)

2.4 ปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชัน (transglycosylation reaction)

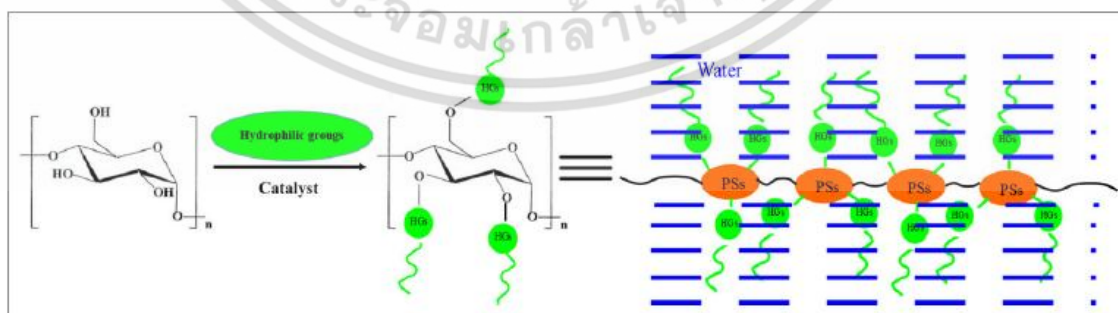
ปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชันเป็นปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดั้วพันธะไกลโคซิดิก โดยโมเลกุลไกลโคซิดซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวให้หมู่ไกลโคซิด ไปยังหมู่ไฮดรอกซิลของโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับหมู่ไกลโคซิด ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลูโคไซด์ที่ยาวขึ้น (Jung และคณะ, 2009) ดังแสดงในภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 ตัวอย่างการเกิดปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ชันโดย (a) การเกิดปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ชันของ *p*-ไนโตรฟีนิล-กลูโคไพราโนไซด์ และ (b) การเกิดปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ชันของพูเอราริน ไกลโคไซด์ (puerarin glucoside)

ที่มา: Strompen และคณะ (2015) และ Li และคณะ (2011)

การดัดแปรโครงสร้างของสารสามารถดัดแปรได้โดยวิธี ทางเคมี กายภาพและชีวภาพ ซึ่งการดัดแปรโดยวิธีทางเคมีนั้นเป็นวิธีทั่วไปที่นิยมใช้ในการดัดแปรโครงสร้างสาร ด้วยปฏิกิริยาการแทนที่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีสมบัติทางชีวภาพดีขึ้น วิธีการดัดแปลงทางเคมี ได้แก่ ซัลเฟชัน (sulfation) อัลคิเลชัน (alkylation) คาร์บอกซิเมทิลเลชัน (carboxymethylation) ฟอสโฟริเลชัน (phosphorylation) ซิเลไนเซชัน (selenization) อะซิทิลเลชัน (acetylation) เป็นต้น ส่วนการดัดแปรด้วยวิธีทางกายภาพนั้นเป็นการตัดโมเลกุลเดิมทำให้ได้โมเลกุลใหม่ที่มีขนาดเล็กลง ซึ่งวิธีทางกายภาพนี้จะไม่เพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพแต่เป็นเพียงแค่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเท่านั้น วิธีการดัดแปรทางกายภาพที่นิยมใช้ ได้แก่ Ultrasonic disruption, radiation-induced reaction และ microwave exposure เป็นต้น และการดัดแปรโครงสร้างของสารด้วยวิธีทางชีวภาพนั้นจะเป็นการดัดแปรโดยใช้เอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาซึ่งจะมีความจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาสูง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีสมบัติทางเคมีกายภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น การละลายดีขึ้น และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 2.9 (Li และคณะ, 2016) ตัวอย่างเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเช่น มอลโตจินิก อะไมเลส (maltogenic amylase) จาก *Bacillus stearothermophilus* (BSMA) and *Thermus* sp. (ThMA) ใช้ในการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน โดยตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้แก่ นารินจิน ไกลโคไซด์ (narin glycoside) กลูโคซิล แอสคอร์บิก แอซิด (glucosyl ascorbic acid) และ พูเออราริน ไกลโคไซด์ (purearin glycoside) และไซโคลเด็กซ์ทริน ไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส (cyclodextrin glycosyltransferase; CGTase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้ในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน (Jung และคณะ, 2009)



ภาพที่ 2.9 การเพิ่มการละลายของสารตั้งต้นด้วยวิธีการดัดแปรทางชีวภาพ

ที่มา: Li และคณะ (2016)

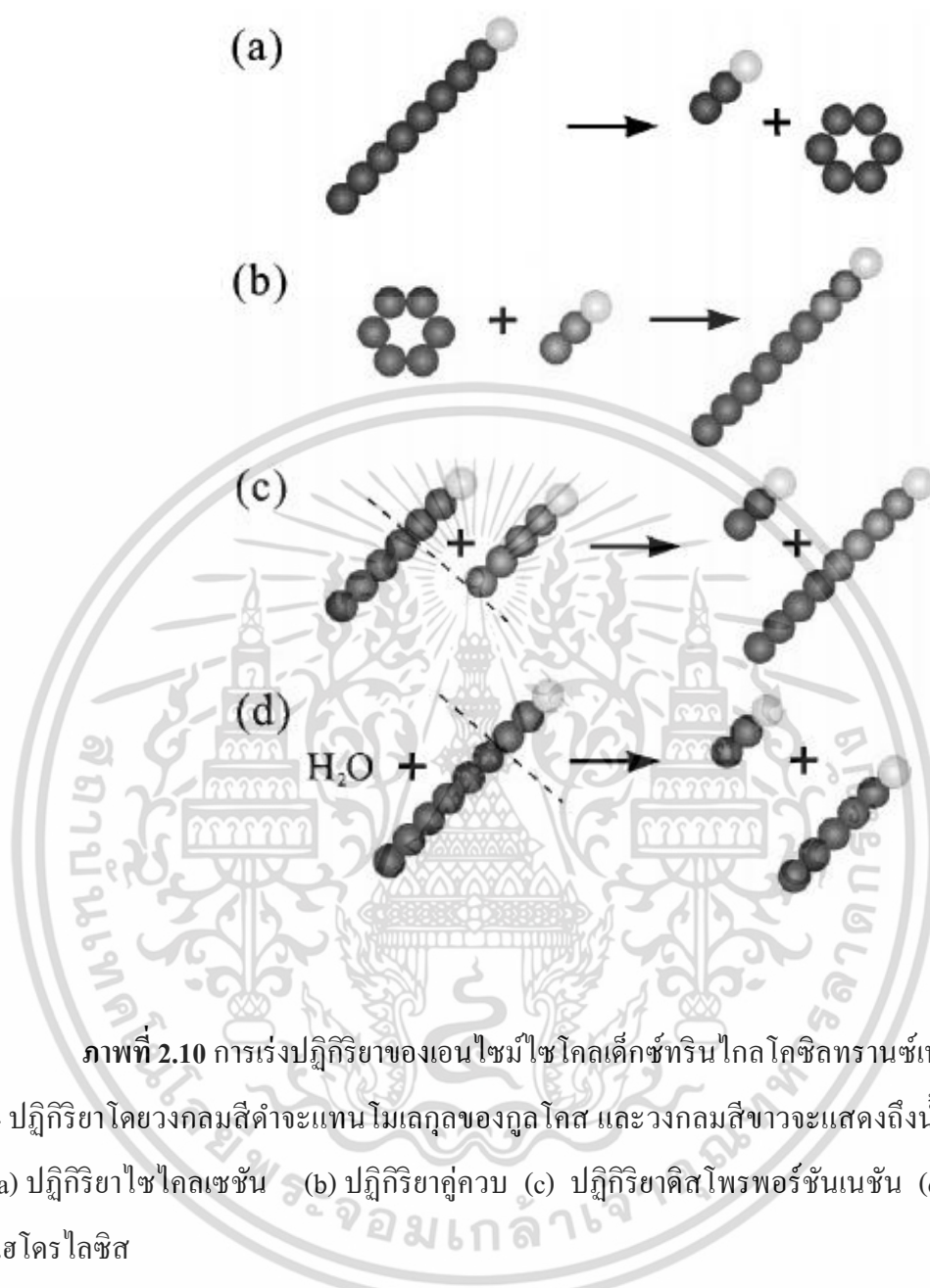
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ไซโคลเด็กซ์ทริน ไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส (Cyclodextrin glycosyltransferase)

ไซโคลเด็กซ์ทริน ไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส หรือไซโคลเด็กซ์ทรินกลูโคทรานส์เฟอเรส (CGTase, 1, 4- α -D-glucan: 1, 4- α -D-glucopyranosyltransferase, EC 2.4.1.19) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มของแอลฟาอะไมเลส (α -amylase) ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาการย้ายหมู่ไกลโคซิลของพันธะ α -(1, 4) และ α -(1, 6) ไกลโคซิดิก (strompen และคณะ, 2015) โดยเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทริน ไกลโคซิลทรานส์เฟอเรสจะเป็นเอนไซม์ที่ผลิตไซโคลเด็กซ์ทรินซึ่งเป็นสารประกอบประเภทโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยแป้งและเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1, 4) - ไกลโคซิดิก ซึ่งเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรสจะเร่งปฏิกิริยา 4 ประเภท คือ (พรพรรณ, 2550)

- 1) ปฏิกิริยาไซโคลเซชัน (cyclization reaction) จะใช้ในอุตสาหกรรมสำหรับการสังเคราะห์โครงสร้างวงไซคลิกที่ประกอบด้วยกลูโคส 6, 7, 8 โมเลกุลเชื่อมต่อกัน ซึ่งเรียกว่าแอลฟา- บีตา- และแกมมา-ไซโคลเด็กซ์ทริน ตามลำดับ
- 2) ปฏิกิริยาคู่ควบ (coupling reaction) เช่น การเปิดวงไซโคลเด็กซ์ทรินและถ่ายโอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอน
- 3) ปฏิกิริยาคิสโพรพอร์ชันเนชัน (disproportionation) เป็นปฏิกิริยาที่สารสองโมเลกุลแตกตัวและรวมตัวในเวลาเดียวกัน แล้วได้สารใหม่สองโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่และเล็กกว่าเดิม
- 4) ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis reaction) เป็นปฏิกิริยาในการใช้น้ำสลายสารโมเลกุลให้กลายเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลง ดังแสดงในภาพที่ 2.10

เอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคทรานส์เฟอเรสสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bacillus* *Klebsiella* *Pseudomonas* *Brevibacterium* *Thermoanaerobacterium* *Corynebacterium* *Micrococcus* และ *Clostridium* (พรพรรณ, 2550)



ภาพที่ 2.10 การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรไลติกส์ที่ทรินไกลิโคซิลทรานซ์เฟอร์เรสของ 4 ปฏิกิริยาโดยวงกลมสีดำจะแทนโมเลกุลของกลูโคส และวงกลมสีขาวจะแสดงถึงน้ำตาลรีดิวซ์ (a) ปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน (b) ปฏิกิริยาควบ (c) ปฏิกิริยาดิสโพรพอร์ชันเนชัน (d) ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

ที่มา : van der Veen และคณะ (2000)

2.5.1 กิจกรรมการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรส

1) พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรส

พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เป็นสภาวะที่เอนไซม์สามารถทำงานในการเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้มากที่สุดในเวลาที่น้อยที่สุด โดยเอนไซม์จะมีสภาวะการทำงานที่แตกต่างกันขึ้นกับคุณสมบัติของเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรสที่ผลิตจากจุลินทรีย์แต่ละชนิด ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. 227 สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.0 ถึง 9.0 และอุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส โดยจะมีกิจกรรมการทำงานสูงสุดที่พีเอช 8.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์ที่ผลิตจากเชื้อ *Paenibacillus* sp. ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 7.0-8.0 และอุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส โดยจะมีกิจกรรมการทำงานสูงสุดที่พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (นิสารัตน์, 2540)

2) ความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชและอุณหภูมิต่างๆ

ความคงตัวของเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรส ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. 227 มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0 ถึง 10.0 และหากเก็บเอนไซม์ในบัฟเฟอร์พีเอช 8.5 เอนไซม์จะมีความคงตัวสูงที่สุดถึงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วนเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรสที่ผลิตจากเชื้อ *Paenibacillus* sp. ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-8.0 และมีความคงตัวสูงจนถึงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว (นิสารัตน์, 2540)

2.6 การดัดแปรโครงสร้างของสาร โดยใช้เอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา

Bae และคณะ (2002) ได้ดัดแปรกรดแอสคอร์บิกด้วยปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน โดยใช้เอนไซม์มอลโตจินิก อะไมเลส (maltogenic amylase) จาก *Bacillus stearothermophilus* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมอลโตไตรโอสเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล ซึ่งจะทำการปฏิกิริยาโดยการถ่ายโอนโมโน- และได-ไกลโคซิล ไปยังกรดแอสคอร์บิกซึ่งเป็นสารรับหมู่ไกลโคซิล และเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1,6)-ไกลโคซิดิก ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางพบว่า จะเกิดผลิตภัณฑ์ขึ้น 2 จุด จากนั้นเมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพบว่า จะเกิดพีคของผลิตภัณฑ์ขึ้น 2 พีค และเมื่อวิเคราะห์ความเสถียรของผลิตภัณฑ์ต่อการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Cu^{2+} ไอออน พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีค่าความเสถียรดีขึ้น 70% เมื่อทำปฏิกิริยานาน 24 ชั่วโมง

Chang และคณะ (2008) ศึกษาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันและฤทธิ์ลดระดับโคเลสเตอรอลของพูเออราริน (puerarins) ไกลโคไซด์ในเซลล์ HepG2 ของหนู โดยได้ทำการปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันของพูเออราริน ไกลโคไซด์ โดยใช้เอนไซม์มอลโตจินิก อะไมเลส จาก *B. stearothermophilus* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมอลโตไตรโอสเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล เมื่อทำการปฏิกิริยาแล้ววิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์ ด้วยการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล และ LDL ออกซิเดชัน พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน 71.7% 45.3% ตามลำดับ และสามารถป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ได้สูงถึง 42 เท่า

Chotipanang และคณะ (2011) ได้สังเคราะห์อัลคิล ไกลโคไซด์จากไซโคลเด็กซ์ทริน โดยใช้เอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอรัสจาก *Paenibacillus* sp. RB01 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและแอลกอฮอล์ (เมทานอล, เอทานอล, 1-โพรพานอล, 2-โพรพานอล, 1-บิวทานอล และ 2-บิวทานอล) เป็นสารรับหมู่ไกลโคซิล และบีตาไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นตัวให้หมู่ไกลโคซิล ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางพบว่าเมื่อทำการปฏิกิริยาโดยใช้เมทานอลเป็นสารรับหมู่ไกลโคซิลจะเกิดผลิตภัณฑ์ขึ้น 3 จุด และเมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพบว่า จะเกิดพีคของผลิตภัณฑ์ขึ้น 3 พีค โดยมี R_t เท่ากับ 4.7, 5.9 และ 7.6 นาที ผลิตภัณฑ์รวมคือ 30% ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เมทิลไกลโคไซด์คือ บีตาไซโคลเด็กซ์ทริน 1.2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไซโคลเด็กซ์

ทรินไกลโคทรานส์เฟอเรส 240 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ เมทานอล 30% โดยทำการปฏิกิริยาที่พีเอช 6.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเมทิลไกลโคไซด์ที่ได้นั้นจะเป็นโมเลกุลของเมธานอลต่ออยู่กับโมโนแซคคาไรด์ 3 ยูนิต

Li และคณะ (2011) ได้ทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ของพูเออราริน โดยมีเอนไซม์มอลโตจีนิค อะไมเลส จาก archaeon *Thermophilum pendens* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาก็คือ บ่มเอนไซม์ 0.2 ยูนิตต่อมิลลิกรัม กับพูเออราริน 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และปีตา ไฮโคลเด็กซ์ทริน 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์พีเอช 5.5 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ตรวจสอบพูเออราริน ไกลโคไซด์ที่ได้ด้วย HPLC-UV-MS จากนั้นวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าพูเออราริน ไกลโคไซด์ที่ได้จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเป็น 47.7% และเมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการละลายพบว่ามีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น

Chen และคณะ (2011) ได้ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของโพลิแซคคาไรด์ ซึ่งตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้สังเคราะห์โดย $H_3PW_{12}O_{40}$ (HPW) ตรึงบน chloromethylated polystyrene bead (PSC) จะได้ตัวเร่งปฏิกิริยา 4 ชนิด คือ PS-EDA-HPW, PS-DETA-HPW, PS-TETA-HPW และ PS-(AST-HPW)_n เมื่อทำปฏิกิริยาแล้วพบว่าตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมคือ PS-(AST-HPW)_n ซึ่งทำให้เกิดอนุพันธ์ฟอสไฟไรเลท 4 ชนิด คือ POP1-p1, POP1-p2, POP1-p3 และ POP1-p4 ซึ่งจะแตกต่างกันที่ระดับการดัดแปร (degree of substitution; DS_p) เมื่อศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และความสามารถในการยับยั้งโลหะหนัก พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น โดย POP1-p4 จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดคือ 44.3%, 51.4%, 75.2% และ 36.1% ตามลำดับ

Aramsangtiemchai และคณะ (2011) ได้สังเคราะห์เอพิแคเทชินไกลโคไซด์ โดยปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ((+) แคเทชิน, (-) เอพิแคเทชิน, (-) เอพิแกลโลแคเทชิน) เป็นสารรับหมู่ไกลโคซิล และมีปีตาไฮโคลเด็กซ์ทรินเป็นตัวให้หมู่ไกลโคซิล โดยมีเอนไซม์ไฮโคลเด็กซ์ทรินไกลโคทรานส์เฟอรัสจาก *Peanibacillus* sp. RB01 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์กลูโคไซด์โดยมีเอพิแคเทชินเป็นตัวรับ

คือการบ่มเอนไซม์ 80 ยูนิตต่อมิลลิลิตร กับ ปีตาไฮโคลเด็กซ์ทริน 1.0% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

และ แอปิแคเทซิน 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใน อะซีเตตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบาง พบว่าจะเกิดจุดของผลิตภัณฑ์ขึ้น 3 จุด วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วย โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าจะเกิดพีคของผลิตภัณฑ์ขึ้น 4 พีค โดยมี Rt เท่ากับ 27, 30, 45 และ 48 นาทีตามลำดับคิดเป็น 1.44%, 3.39%, 4.18% และ 8.33% ผลิตภัณฑ์รวมที่เกิดขึ้นคิดเป็น 18.10 % ของสารตั้งต้นที่ใช้ทั้งหมด โดยเมื่อศึกษาผลิตภัณฑ์เอพิเคเทซิน ไกลโคไซด์ที่ได้พบว่ามันจะมีความสามารถในการละลายน้ำ ความคงตัวต่อแสงจะเพิ่มสูงขึ้นกว่าเอพิเคเทซิน และเมื่อศึกษาสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์พบว่า ค่าความเข้มข้นของ (-)-EC-3-O- α -D-กลูโคไพราโนไซด์ ที่ทำให้การดูดกลืนแสงของ DPPH ลดลงครึ่งหนึ่ง (IC₅₀) มีค่าเท่ากับ 115 ไมโครโมลาร์

Kim และคณะ (2012) ได้สังเคราะห์แอสทรากลิน (เคมเฟอรอล-3-O- β -D-กลูโคไพราโนไซด์) กลูโคไซด์โดยใช้เด็กซ์ทรานซูเคสที่ผลิตโดย *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM กับแอสทรากลินเป็นตัวรับหมู่ไกลโคซิล และน้ำตาลซูโครสเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล บ่มแอสทรากลิน 10 มิลลิโมลาร์ ซูโครส 200 มิลลิโมลาร์ และ เด็กซ์ทรานซูเคส 1.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.2 และ ไดมethyl ซัลฟอกไซด์ 10% ที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง พบว่าจะเกิดจุดของผลิตภัณฑ์ขึ้น 2 จุด และเมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแอสทรากลิน กลูโคไซด์ที่ได้ พบว่าแอสทรากลิน กลูโคไซด์สามารถต้านอนุมูลอิสระได้เพิ่มขึ้น 18.8-20.3% และเพิ่มกิจกรรมการยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินได้เพิ่มขึ้น 3.8-18.8% เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม ซึ่งจะขึ้นอยู่กับจำนวนของกลูโคไซด์ที่ต่อกับแอสทรากลิน

Mathew และคณะ (2012) ได้สังเคราะห์พีเซียด (piceid)ไกลโคไซด์ (3,4'-5-ไตรไฮดรอกซีสตีลบิน 3-O- β -D-กลูโคไซด์) โดยปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันโดยใช้เอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินกลูโคโนทรานส์เฟอร์เรส จาก *Bacillus macerans* ซึ่งมีพีเซียดเป็นสารรับหมู่ไกลโคซิล และกลูโคส, มอลโตส, ซูโครส, มอลโตไตรโอส, ไซโคลเด็กซ์ทริน (α -cyclodextrin) และมอลโตเด็กซ์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล สภาวะที่ทำการปฏิกิริยาคือบ่มพีเซียด 2.56 มิลลิโมลาร์ (0.1% น้ำหนักต่อปริมาตร) และตัวให้หมู่ไกลโคซิล (5% น้ำหนักต่อปริมาตร) ในไนเตรทบัฟเฟอร์

0.02 โมลาร์ พีเอช 6.0 ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าเมื่อสารให้หมู่ไกลโคซิลเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นแอลฟา ไซโคลเด็กซ์ทริน (α -cyclodextrin) จะให้ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนมากที่สุดคือ 78.9% และมอลโตเด็กซ์ทรินจะให้ผลิตภัณฑ์ในการถ่ายโอน 72.1%

Park (2012) ได้ทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชันของไอโซฟลาโวนและพูเออราริน โดยใช้เอนไซม์ มอลโตจีนิค อะไมเลสจาก *Bacillus Stearothermophilus* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งมีมอลโตส มอลโตไตรโอส และมอลโตเฮกซะโอสเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล ซึ่งจะทำปฏิกิริยาโดยการถ่ายโมเลกุลไกลโคซิล ไปยังไอโซฟลาโวนและพูเออราริน ซึ่งเป็นสารรับหมู่ไกลโคซิล และเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1, 6)-ไกลโคซิดิก เมื่อทำปฏิกิริยาแล้วพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความสามารถในการละลายน้ำและความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันดีขึ้น

Lu และ Xia (2014) ได้ศึกษาความจำเพาะของสารให้หมู่ไกลโคซิล ในปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชันของสตีวียอไซด์ โดยมีเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินกลูโคโนทรานส์เฟอเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งมี กลูโคส มอลโตส มอลโตไตรโอส มอลโตเด็กซ์ทริน แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง แอลฟา บีตา และแกมมาไซโคลเด็กซ์ทริน เป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าโมโนและไดแซคคาไรด์นั้นไม่สามารถทำหน้าที่เป็นสารให้หมู่ไกลโคซิลที่มีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยากับสตีวียอไซด์ ด้วยไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส ส่วนแป้งและมอลโตเด็กซ์ทรินนั้นจะให้ผลผลิต 80% เมื่อทำปฏิกิริยานาน 5 ชั่วโมง จะเกิดทรานส์ไกลโคไซเลชันร่วมกับไฮโดรไลซิสของแป้ง ส่วนแอลฟา- บีตา- ไซโคลเด็กซ์ทรินนั้นจะเกิดทรานส์ไกลโคไซเลชันผ่านปฏิกิริยาคู่ควบ ซึ่งเป็นการเปิดวงไซโคลเด็กซ์ทรินหลังจากนั้นเกิดปฏิกิริยาคิสโทรพอร์ชันเนชัน กับสตีวียอไซด์

Strompen และคณะ (2015) ได้ศึกษาผลของสารรับหมู่ไกลโคซิลต่อการเปลี่ยนแปลงรีจิโอซีเลกทิวิตี (regioselectivity) ของ *p*-ไนโตรฟีนิล- กลูโคไพราโนไซด์ ในปฏิกิริยาไกลโคไซเลชัน โดยมีไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งในปฏิกิริยานี้ได้ใช้แอลฟาและบีตา อะโนเมอร์ (anomers) ของ *p*-ไนโตรฟีนิล-*D*-กลูโคไพราโนไซด์เป็นตัวรับหมู่ไกลโคซิล และบีตาไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นตัวให้หมู่ไกลโคซิล โดยมีเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรสที่ผลิตจาก *Bacillus macerans* และ *Thermoanaerobacter* sp. เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เมื่อใช้ *p*-ไนโตรฟีนิล-แอลฟา-*D*-กลูโคไพราโนไซด์ เป็นสารรับหมู่ไกลโคซิล และมีเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรสที่ผลิตได้จาก *B. macerans* เป็นสารเร่งปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ *p*-ไนโตรฟีนิล-แอลฟา-*D*-กลูโคไพราโนซิล-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-แอลฟา-*D*-กลูโคไพราโนไซด์ เมื่อเปลี่ยนสารรับหมู่ไกลโคซิล เป็น *p*-ไนโตรฟีนิล-บีตา-*D*-กลูโคไพราโนไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเกิด แอลฟา(1→4) แอลฟา (1→3) แอลฟา(1→6)-ไกลโคซิเลชัน และหากเปลี่ยนเอนไซม์
ไฮโดรไลติกทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรสที่ผลิตจาก *B. macerans* เป็น *Thermoanaerobactor* sp.
และมีปิตาไฮโดรไลติกทริน เป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล พบว่าจะเกิด แอลฟา(1→4)- แอลฟา
(1→3)- แอลฟา(1→6)-ไกลโคซิเลชันเช่นกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและเครื่องมืออุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 วัตถุดิบ

- | | |
|----------------------------------|--|
| - กระเจี๊ยบแดงแห้ง ตราดอยคำ | ดอยคำผลิตภัณฑ์อาหาร |
| - <i>PeaniBacillus sp.</i> RB 01 | Prof. Dr. Piamsook Pongsawasdi
Chulalongkorn University |

- | | |
|----------------------------------|----------------|
| - β - cyclodextrin | Sigma, Germany |
| -Maltosyl β - cyclodextrin | Sigma, Germany |
| -Maltoses | Sigma, Germany |
| -Glucose | MERCK, Germany |

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- | | |
|--|-----------------------------------|
| - เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) | BUNCHI R-144,
Switzerland |
| - เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer) | SHIMADZU UV 1601,
Japan |
| - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) | Memmert, Germany |
| - ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Shaking incubator) | N-BIOTEK NB-205 VL |
| - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge) | Thermo Scientific
Legend RT1 |
| - เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) | Tomy SS-325, Japan |
| - เครื่องวัดพีเอช (pH meter) | Mettler Toledo, delta 320,
USA |
| - โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography) | MERCK, Germany |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

Water, England

3.1.3 สารเคมี

- 95% ethanol	องค์การสุรา, Thailand
- 2, 2-diphenyl-1-(2, 4, 6-trinitrophenyl) hydrazyl (DPPH)	Sigma, Germany
- 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)	Sigma, Germany
- 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)	Sigma, Germany
- Potassium chloride	Merck, Germany
- Sodium acetate	Merck, Germany
- Hydrochloric acid	Carloerba, Italy
- Folin-Ciocalteu	Fluka, Spain
- Gallic acid	Fluka, Spain
- Potassium iodide	J.T Baker, USA
- Iodine	Carloerba, Italy
-Dibasic sodium phosphate	Carloerba, Italy
-Monobasic sodium phosphate	Carloerba, Italy
-Phenolphthalein	Merck, Germany
-Sodium carbonate	Merck, Germany
- Sulfuric acid	Sigma, Germany
- Sodium Chloride	Carloerba, Italy
- Isopropyl thiogalactoside	Merck, Germany
- <i>n</i> - butanol	Carloerba, Italy
- 2- propanol	Carloerba, Italy
- N- (1- naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride	TCI, Japan
- Ampicilin	Merck, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

-Yeast extract powder

Titan Biotech, India

- Peptone

Merck, Germany

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมสารสกัดกระเจียบแดง

นำกระเจียบแดงแห้งมาคั่วให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบดผสม (blender) จากนั้นทำการสกัดกระเจียบแดงโดยใช้เอทานอล (อัตราส่วนของกระเจียบแดงต่อตัวทำละลาย 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) สกัดโดยวิธีแช่ที่ 150 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นำสารสกัดกระเจียบแดงที่ได้มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

1) การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total polyphenol contents)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด จะใช้วิธีรายงาน โดย Veliloglu และคณะ (1998) โดยที่สารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 720 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลมาตรฐาน เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดแกลลิกในหน่วยไมโครกรัม รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงดังภาคผนวก ก

2) ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanin content)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินทั้งหมด จะใช้วิธี pH-different ที่รายงานโดย Xiaowei และคณะ (2014) โดยแอนโทไซยานินมีการเปลี่ยนฟอร์มของโครงสร้างเมื่อพีเอชเปลี่ยนแปลง มีผลทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorbance spectra) เปลี่ยนไป ซึ่งฟอร์มของ ออกโซเนียม (oxonium) จะให้ค่าพีเอช 1.0 และจะไม่มีสีเมื่ออยู่ในฟอร์มของเฮมิเคทอล (hemiketal) ที่ พีเอช 4.5 และสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด ($\lambda_{vis-max}$) ของตัวอย่างสารละลายของสารสกัดกระเจียบแดง รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงดังภาคผนวก ก

3) วิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง

3.1) ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ จะวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH ตามวิธีที่รายงานโดย Abe และคณะ (2009) โดยมีหลักการคือ เมื่ออนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน จะมีผลให้อนุมูลอิสระ DPPH เปลี่ยนเป็นโมเลกุล DPPH เนื่องจากได้รับไฮโดรเจนอะตอมจากสารที่มีสมบัติที่มีสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (แสดงดังสมการ) และจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีม่วงแดง เป็นไม่มีสีหรือมีสีจางลง ตรวจวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรที่ลดลง รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงดังภาคผนวก ค



3.2) ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP)

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก จะใช้วิธีที่รายงานโดย Benzie และ Strain (1996) โดยมีหลักการคือภายใต้สภาวะที่เป็นกรด สารที่มีสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe (III) TPTZ) ให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของเกลือเฟอร์รัส (Fe (II) TPTZ) เกิดการเปลี่ยนแปลงให้เป็นสารมีน้ำเงิน ซึ่งสามารถติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงดังภาคผนวก ค

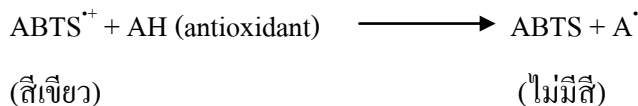


3.3) ความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radical cation decolorization assay)

การวิเคราะห์ความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS จะใช้วิธีที่รายงานโดย Gulcin และคณะ (2010) เป็นการทดสอบโดย ABTS (2, 2 -Azino-bis-(3- ethylbenzothia

zoline-6-sulfonic acid diammonium salt) จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวกด้วยการเติม
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือนำไปใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปแตสเซียมเปอร์ซัลเฟต เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นไม่มีสี ซึ่งสามารถติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงดังภาคผนวก ก



3.2.2 การเตรียมเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรสและการวิเคราะห์

กิจกรรมของเอนไซม์

1.) การเตรียมเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรส

การเตรียมเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรสจะใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก พรพรรณ (2550) โดยนำหัวเชื้อ ริกอมบิแนนท์ *Paenibacillus* sp. 0.5% (ร้อยละโดยปริมาตร) เดิมลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วเติม 1% (ร้อยละโดยปริมาตร) ของ 1 โมลาร์ ไอโซโพรพิล ไธโอไกลเลคโตไซด์ (IPTG) จากนั้นเขย่าต่อจนครบ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

2.) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จะใช้วิธี Dextrinizing activity ตามวิธีที่รายงานโดยพรพรรณ และคณะ (2550) โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ความเข้มข้นน้ำเงินของ starch-iodine complex ลดลง 10% ต่อนาที รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงดังภาคผนวก ข

3.2.3 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมเพื่อตัดแปรโครงสร้างแอนโฆซานินไกลโคไซด์

ในการตัดแปรโครงสร้างแอนโฆซานินไกลโคไซด์จะศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาดังนี้

3.2.3.1 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชัน

การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชันได้กำหนดให้

อุณหภูมิ พีเอชและความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาครั้งที่ สารละลายปฏิกิริยาเอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลลาร์ พีเอช 6.0 เข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยมีสารให้หมู่ไกลโคซิลที่ใช้คือมอลโตซิลปีตาไซโคลเด็กซ์ทริน 1.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารสกัดกระเจียบแดงซึ่งมีแอนโธไซยานินเป็นสารรับหมู่ไกลโคซิล 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอย่างควบคุมคือแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดง ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆมาวิเคราะห์ ดังนี้

1.) โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

ติดตามผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นโดยใช้ซิลิกาเจล 60 ซึ่งระบบตัวทำละลายคือ n-บิวทานอล: 2- โพรพานอล: น้ำ (12:3:4 โดยปริมาตร) ตรวจหาตำแหน่งของสารที่เกิดขึ้น โดยการพ่น 5% กรดซัลฟิวริกในเอทานอลและ 6.5 มิลลิโมลลาร์ N- (1-แนฟทิล) เอทิลีนไดเอมีน ไดไฮโดรคลอไรด์ ตามด้วยอบให้ความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.) วิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดง

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะใช้วิธีวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 3.2.1

3.2.3.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชัน

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชันได้กำหนดให้เวลา พีเอชและความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตามที่ โดยสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลลาร์ พีเอช 6.0 เข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยสารให้หมู่ไกลโคซิลที่ใช้คือมอลโตซิลปีตาไซโคลเด็กซ์ทริน 1.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารสกัดกระเจียบแดงซึ่งมีแอนโธไซยานินเป็นสารรับหมู่ไกลโคซิล 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.3.1 โดยตัวอย่างควบคุมคือแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิต่างๆมาวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 3.2.3.1

3.2.3.3 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชัน

การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชันได้กำหนดให้เวลา อุณหภูมิและความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตามที่ โดยสารละลาย

ปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรสในอะซิเตตเอกสารนี้เป็นเอกสารทูลงงานวิจัยสำหรับการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลลาร์ พีเอช 4.0 ถึง 6.0 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลลาร์ พีเอช 6.0 ถึง 7.0 และ Tris-HCl 10 มิลลิโมลลาร์ พีเอช 7.0 ถึง 8.0 เข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยสารให้หมู่ไกลโคซิลที่ใช้คือ มอลโตซิลบิตาไซโคลเด็กซ์ทริน 1.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารสกัดกระเจียบแดง ซึ่งมีแอนโธไซยานินเป็นสารรับหมู่ไกลโคซิล 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มที่เวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.3.1 และ 3.2.3.2 โดยตัวอย่างควบคุมคือแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงในน้ำ เก็บตัวอย่างที่พีเอชต่าง ๆ มาวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 3.2.3.1

3.2.3.4 ศึกษาสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งของน้ำตาลที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน

การศึกษารวบรวมสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งของน้ำตาลที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันได้กำหนดให้เวลา อุณหภูมิ พีเอชและความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาครั้งที่ โดยสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอแรส ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลลาร์ พีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.3.3 เข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยสารให้หมู่ไกลโคซิลที่ใช้คือ มอลโตซิลบิตาไซโคลเด็กซ์ทริน บิตาไซโคลเด็กซ์ทริน มอลโตส และกลูโคส 1.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารสกัดกระเจียบแดง ซึ่งมีแอนโธไซยานินเป็นสารรับหมู่ไกลโคซิล 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มที่เวลาและ อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.3.1 และ 3.2.3.2 ตามลำดับ โดยตัวอย่างควบคุมคือแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงในอะซิเตตบัฟเฟอร์ เก็บตัวอย่างที่ต่างกันของสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งน้ำตาล มาวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 3.2.3.1

3.2.3.5 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน

การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันได้กำหนดให้เวลา อุณหภูมิ พีเอชที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาครั้งที่ โดยสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอแรสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.3.3 เข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100, 120 และ 150 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารให้หมู่ไกลโคซิลที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.3.4 ปริมาตร 1.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารสกัดกระเจียบแดง ซึ่งมีแอนโธไซยานินเป็นสารรับหมู่ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มที่เวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.3.1 และ

3.2.3.2 ตามลำดับโดยตัวอย่างควบคุมคือแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในอะซีเตตบัพเฟอร์ เก็บตัวอย่างที่ต่างกันของความเข้มข้นของแอนโธไซม์ มาวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 3.2.3.1

3.2.4 ศึกษาผลผลิตและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแอนโธไซยานินไกลโคไซด์ที่เตรียมได้โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม

ทดลองคัดแปรโครงสร้างแอนโธไซยานินโดยนำแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและ Delphinidin-3-sambubioside มาทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันตามสภาวะที่เหมาะสม ที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมข้างต้น นำแอนโธไซยานินไกลโคไซด์ที่ได้มาวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพดังนี้

3.2.4.1 โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

ติดตามผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธี โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography: TLC) ตามวิธีในข้อ 3.2.3.1

3.2.4.2 โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography: HPLC)

วิเคราะห์แอนโธไซยานินไกลโคไซด์ที่ได้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography: HPLC) โดยคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ Novapak C18 (3.9 x 150 mm) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ กรดฟอร์มิกเข้มข้น 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นสารละลาย A และ อะซิโตนไตรท์ เป็นสารละลาย B อัตราการไหลคือ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยตัวตรวจวัดที่ใช้คือ photodiode array detector

เวลา (นาที)	สารละลาย A (%)	สารละลาย B (%)
0	95	5
2	95	5
8	90	10
10	80	20
15	95	5
20	95	5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยแอนโรโซยานินไกลโคไซด์ที่ได้ สามารถคำนวณได้จากพื้นที่ใต้กราฟของผลิตภัณฑ์ต่อพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มข้นเริ่มต้นของตัวรับหมู่ไกลโคซิล

$$\text{Product yield (\%)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟ ผลิตภัณฑ์}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของสารรับหมู่ไกลโคซิลเริ่มต้น}} \times 100$$

3.2.4.3 วิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอนโรโซยานินไกลโคไซด์

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอนโรโซยานินนั้นวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 3.2.3.1



ผลการทดลองและการวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาสมบัติทางเคมีของสารสกัดกระเจียบแดง

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดในสารสกัดกระเจียบแดงที่เตรียมได้ ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโธไซยานินทั้งหมดและความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงแห้ง

สมบัติทางเคมี	ค่าที่วิเคราะห์ได้
สารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด	303.22±0.30 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ในรูปของกรดแกลลิก
แอนโธไซยานินทั้งหมด	4.87±0.12 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม
ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH	64.58±2.71 เปอร์เซ็นต์
ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก	0.14±0.03 มิลลิกรัม Trolox ต่อ มิลลิลิตร
ค่าร้อยละของความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS	48.75±0.93 เปอร์เซ็นต์

จากตารางที่ 4.1 สารสกัดกระเจียบแดงมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโธไซยานินทั้งหมด 303.22 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมในรูปของกรดแกลลิก และ 4.87 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ในรูปของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ตามลำดับ โดยประพันธ์ (2551) รายงานว่าสารสกัดกระเจียบแดงที่สกัดด้วยวิธีเดียวกันนี้ มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด 207.87 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมในรูปของกรดแกลลิก และปริมาณของแอนโธไซยานินทั้งหมด 4.35 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ในรูปของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ซึ่งพบว่าปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลและแอนโธไซยานินที่ได้มีปริมาณใกล้เคียงกัน และเมื่อนำสารสกัดกระเจียบแดงที่ได้มาศึกษาความสามารถใน

การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก และความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS พบว่ามีค่าเท่ากับ 64.58%, 0.137 มิลลิกรัมTroloxต่อมิลลิลิตร และ 48.75 % ตามลำดับ

4.2 ผลการวิเคราะห์แอกติวิตีเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทริน ไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรสที่เตรียมได้

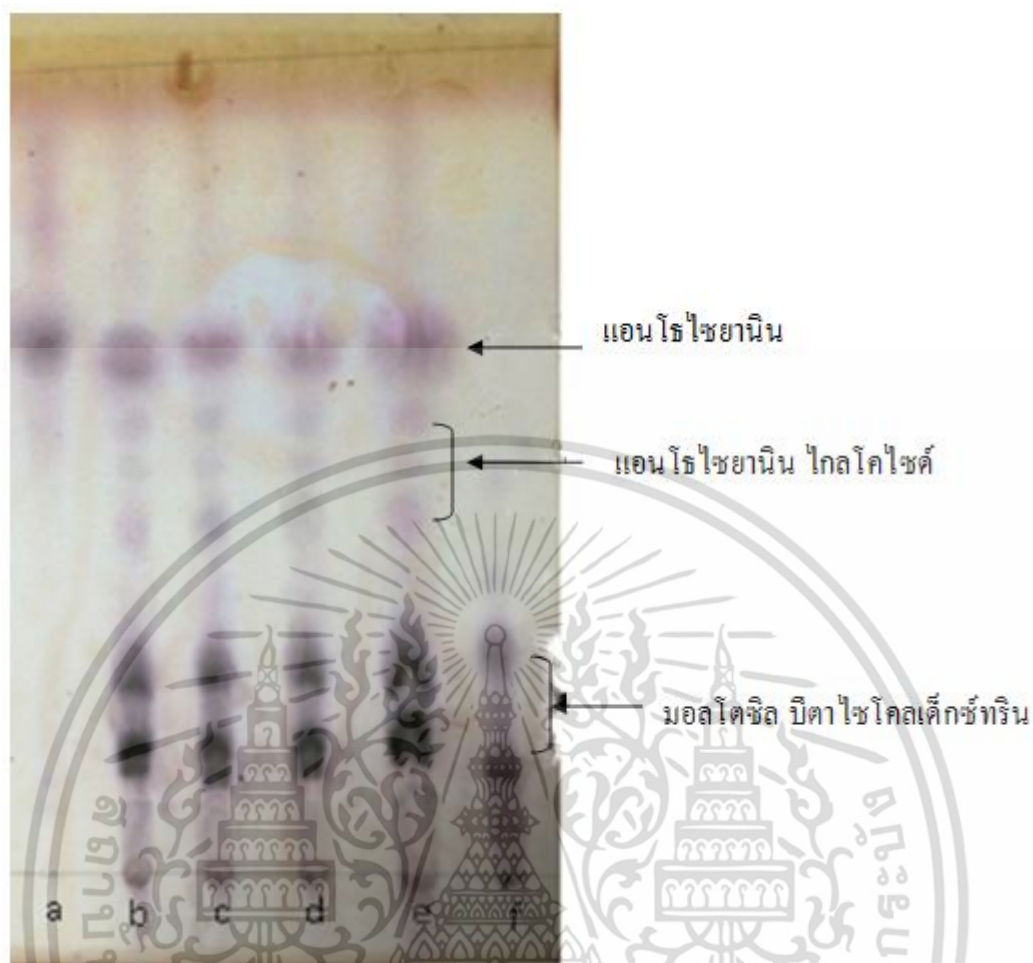
การเตรียมเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทริน ไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรสจาก *Paenibacillus sp.* โดยนำ *Paenibacillus* มาเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนำเซลล์ออก โดยการเซนติฟิวเพื่อแยกเชื้อจากน้ำเลี้ยงที่มีเอนไซม์ หลังจากนั้นทดสอบแอกติวิตีของสารละลายเอนไซม์ที่ได้ พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีแอกติวิตีเท่ากับ 379.30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยจากงานวิจัยของพรพรรณ (2550) ได้เตรียมเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรสและวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ด้วยวิธี Dextrinizing activity พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้มีแอกติวิตีเท่ากับ 171.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์แอกติวิตีเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจะมีแอกติวิตีเท่ากับ 2507.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการเตรียมเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรสโดยที่ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีแอกติวิตีที่มากเมื่อเทียบกับงานวิจัยของพรพรรณ อีกทั้งเอนไซม์ที่เตรียมได้นั้นมีแอกติวิตีมากพอที่จะนำไปทำปฏิกิริยาต่อไป

4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อดัดแปรโครงสร้างแอนโฆไซยานินไกลโคไซด์

4.3.1 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานซ์ไกลโคไซเลชัน

จากการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานซ์ไกลโคไซเลชันของแอนโฆไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงโดยบ่มกับเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรสและมอลโตซิลปีตา ไซโคลเด็กซ์ทริน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง ติดตามผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบาง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างควบคุมซึ่งได้แก่สารละลายแอนโฆไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีจุดเกิดขึ้นบนโครมาโตแกรมเพียง 1 จุด ในขณะที่สารละลายปฏิกิริยามีจุดปรากฏบนโครมาโตแกรม 3 จุด ซึ่งมีค่า R_f ประมาณ 0.43, 0.51 และ 0.56 แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์แอนโฆไซยานินไกลโค

ไซค์ที่เกิดขึ้นมีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชันของแอนโรไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงนั้นจะเกิดผ่านปฏิกิริยาคู่ควบ (coupling reaction) โดยจะเกิดการเปิดวงไซโคลเด็กซ์ทรินและหลังจากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาดิสโพรพอร์ชันเนชันร่วมด้วยซึ่งเป็นการตัดโมเลกุลสายยาว และถ่ายโอนโมเลกุลน้ำตาลไปยังแอนโรไซยานินซึ่งเป็นสารรับหมู่ไกลโคซิล โดยน้ำตาลสามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ที่ตำแหน่งต่างกัน อีกทั้งเมื่อเกิดการถ่ายโอนแล้วขนาดโมเลกุลของน้ำตาลที่เข้าทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Aramsangtienchai และคณะ (2011) ที่สังเคราะห์เอพิกาทะชิน กลูโคไซด์ด้วยปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซเลชันโดยใช้เอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส และมีปีตาไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นตัวให้หมู่ไกลโคซิล พบว่าโครมาโตกราฟีแผ่นบางแสดงผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น 3 จุด ซึ่งมีโมเลกุลของน้ำตาลแตกต่างกันและอาจเนื่องมาจากตำแหน่งที่เข้าทำปฏิกิริยาต่างกัน โดยจากงานวิจัย Strompen และคณะ (2015) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงรีจิโอซีเลกทิวิตี (regioselectivity) ของ *P*-โนโตรฟีนิล-กลูโคไพราไซด์ ในปฏิกิริยาไกลโคไซเลชัน โดยมีไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าตำแหน่งที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้คือ แอลฟา (1→4) แอลฟา (1→3) และ แอลฟา (1→6)-



ภาพที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน ของแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงกับ มอลโตซิลบิตาไซโคลเด็กซ์ทริน เมื่อเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่างกันโดย

- (a) แอนโรไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดง (ตัวอย่างควบคุม)
- (b) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันนาน 12 ชั่วโมง
- (c) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันนาน 16 ชั่วโมง
- (d) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันนาน 20 ชั่วโมง
- (e) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันนาน 24 ชั่วโมง
- (f) มอลโตซิลบิตาไซโคลเด็กซ์ทริน

เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารละลายปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น โดยจะมีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดคือ 79.18% เมื่อทำปฏิกิริยานาน 16 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.2a ซึ่งจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุมมีค่าเท่ากับ 67.02% เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก พบว่าที่เวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกจะเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยจะมีค่าสูงสุดคือ 0.30 มิลลิกรัม ไทรอล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำปฏิกิริยานาน 16 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.2b ซึ่งจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.14 มิลลิกรัม ไทรอล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าค่าร้อยละของความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยจะมีค่าร้อยละความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุดคือ 72.69% เมื่อทำปฏิกิริยานาน 16 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.2a ซึ่งจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุมมีค่าเท่ากับ 61.81%

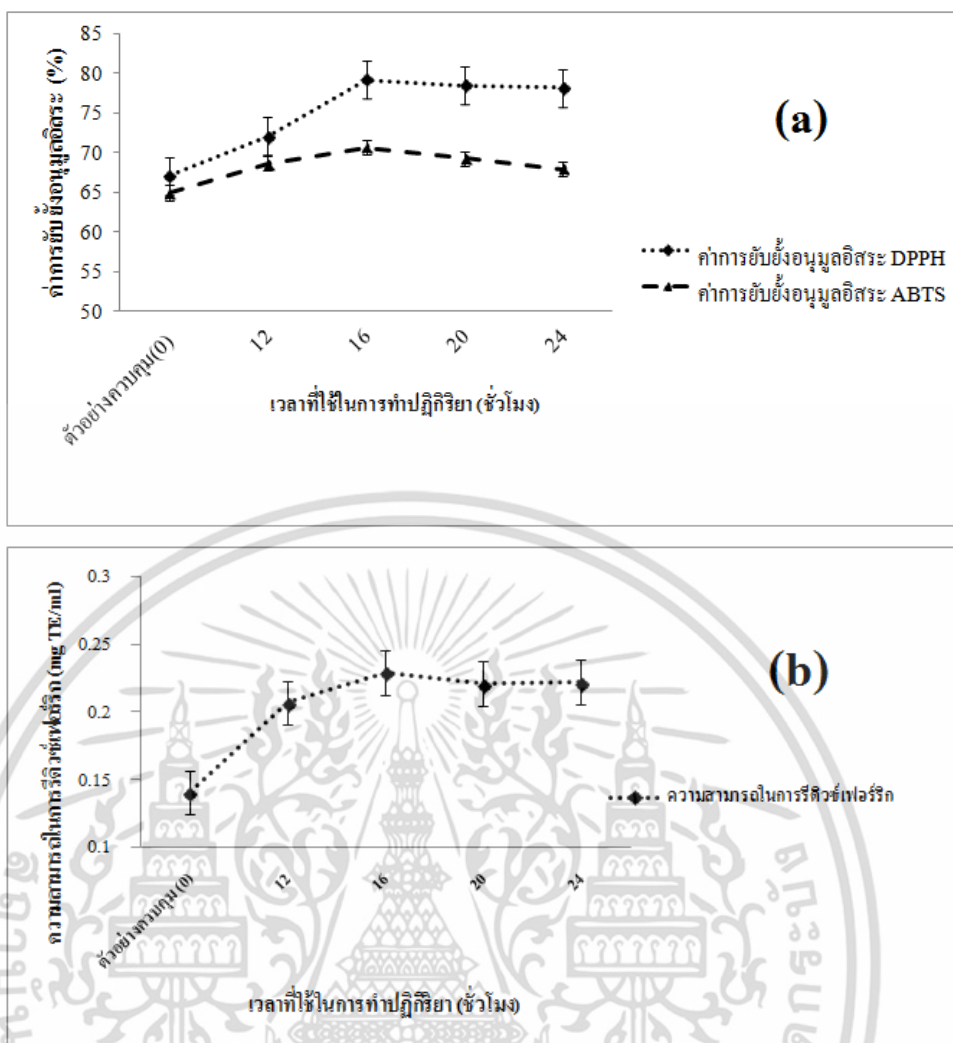
จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของตัวอย่างสารละลายปฏิกิริยา พบว่าที่เวลาเพิ่มขึ้นค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันทุกวิธีการศึกษาเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดเมื่อทำปฏิกิริยานาน 16 ชั่วโมงหลังจากนั้นจึงเริ่มคงที่ จากงานวิจัยของ Chung และคณะ (2006) ได้สังเคราะห์จินีสทิน (Genistin) ไกลโคไซด์ โดยใช้ 4-แอลฟากลูโคโนทรานซ์เฟอร์เรส พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยานาน 24 ชั่วโมงจะเกิดผลิตภัณฑ์สูงสุด โดยเมื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส พบว่าจินีสทิน ไกลโคไซด์ที่ได้จะมีค่าสูงขึ้นเป็น 65% และจากงานวิจัยพบว่าทั้งจินีสทินและจินีสทินไกลโคไซด์จะมีสมบัติในการทำลายอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล และ Iwakiri และคณะ (2013) ได้ทำปฏิกิริยากลูลูโคไซด์ของไฮดรอกซีฟลาโวน โดยใช้กลูโคซิลทรานซ์เฟอร์เรส จาก *Phytolacca Americana* และทำปฏิกิริยาที่ 2, 6, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นจะเกิดปริมาณผลิตภัณฑ์ 6-ไฮดรอกซีฟลาโวน โมโนกลูโคไซด์เพิ่มขึ้น และจะเกิดขึ้นสูงสุดเมื่อทำปฏิกิริยานาน 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารละลายปฏิกิริยาระหว่างแอนโทไซยานินในกระเจียบแดงกับมอลโตซิลปีตาไซโคลเด็กซ์ทริน เมื่อเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น

เวลาที่ใช้ในการทำ ปฏิกิริยา (h.)	ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน		
	การยับยั้งอนุมูลอิสระ	ความสามารถในการ	ความสามารถในการ
	DPPH (%)	รีดิวซ์เฟอริก (mg TE/ml)	ฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS (%)
ตัวอย่างควบคุม	67.34 ^c ±1.92	0.14 ^c ±0.01	61.81 ^c ±0.87
12	72.03 ^b ±1.36	0.21 ^b ±0.01	68.32 ^b ±0.76
16	79.18 ^a ±2.51	0.23 ^a ±0.02	70.61 ^a ±0.97
20	78.46 ^a ±2.80	0.22 ^{ab} ±0.01	70.20 ^{ab} ±0.70
24	78.14 ^a ±0.96	0.22 ^{ab} ±0.01	69.29 ^{ab} ±0.80

หมายเหตุ : ^{a-c} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

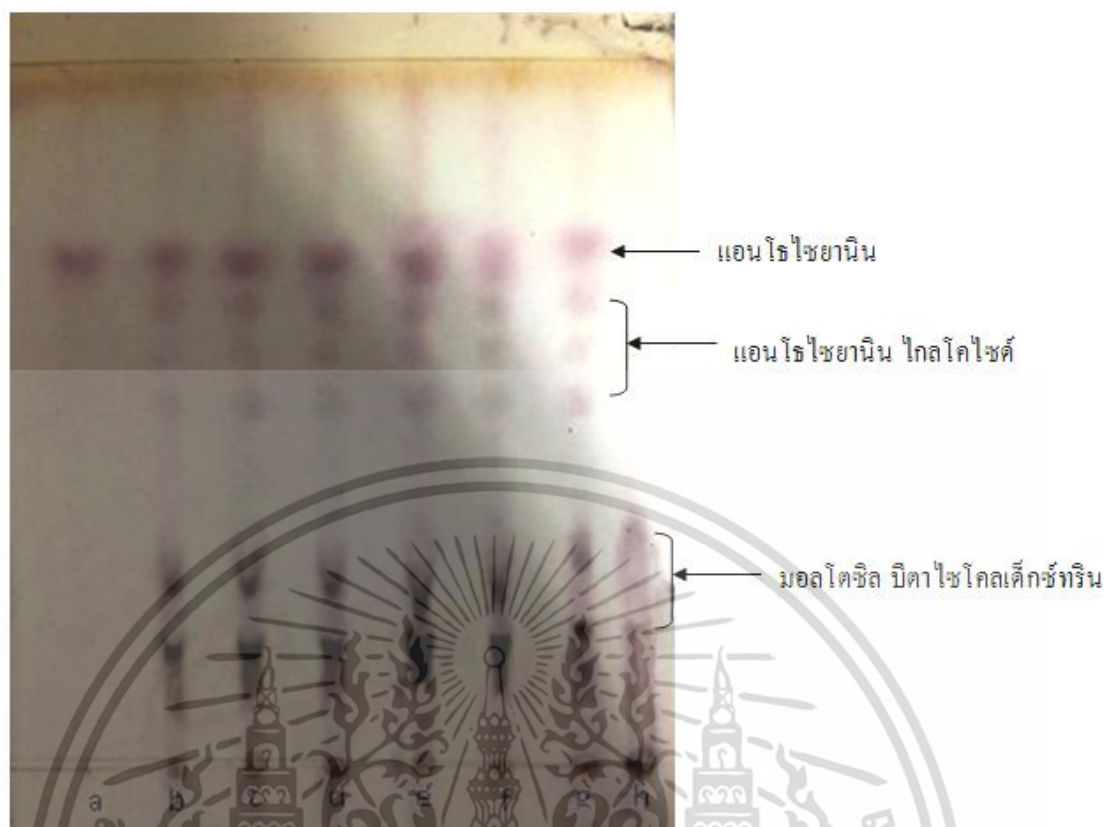
ตัวอย่างควบคุม คือสารละลายเหมือนสารละลายปฏิกิริยา แต่ไม่มีแอนโทไซยานินและมอลโตซิลปีตาไซโคลเด็กซ์ทริน



ภาพที่ 4.2 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายปฏิกิริยาระหว่างแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน โดย (a) ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS และ (b) ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก เมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน

4.3.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเซชัน

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเซชัน ของแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงโดยบ่มกับเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรส และมอลโตซิลปีตา ไซโคลเด็กซ์ทริน ที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นติดตามผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบางบาง ผลการทดลองดังแสดงภาพที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างควบคุมซึ่งได้แก่สารละลายแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงจะมีจุดเกิดขึ้นบนโครมาโตแกรมเพียง 1 จุด ในขณะที่สารละลายปฏิกิริยามีจุดปรากฏขึ้นบนโครมาโตแกรม 3 จุด ซึ่งมีค่า R_f ประมาณ 0.43, 0.51 และ 0.56 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bae และคณะ (2002) ได้ดัดแปรโครงสร้างของกรดแอสคอร์บิก ด้วยปฏิกิริยา ทรานส์ไกลโคไลเซชันโดยใช้เอนไซม์มอลโตจินิกอะไมเลส และมีมอลโตไทรโอสเป็นตัวให้หมู่ไกลโคซิล จากการทำปฏิกิริยาพบว่าโครมาโตกราฟีแผ่นบางแสดงผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น 2 จุด ซึ่งทั้ง 2 จุดที่เกิดขึ้นนั้นแสดงถึงขนาดโมเลกุลของน้ำตาลที่จับต่างกัน



ภาพที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน ของแอนโธไซยานินในกระเจียบแดงกับมอลโตซิลบิตาไซโคลเด็กซ์ทรินด้วย เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่างกันโดย

- (a) แอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดง (ตัวอย่างควบคุม)
- (b) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันที่ 30 องศาเซลเซียส
- (c) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันที่ 35 องศาเซลเซียส
- (d) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันที่ 40 องศาเซลเซียส
- (e) เมื่อทำปฏิกิริยา ทรานส์ไกลโคซิเลชันที่ 45 องศาเซลเซียส
- (f) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันที่ 50 องศาเซลเซียส
- (g) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันที่ 60 องศาเซลเซียส
- (h) มอลโตซิลบิตาไซโคลเด็กซ์ทริน

เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก และความสามารถในการฟอกสี อนุมูลอิสระ ABTS พบว่าเมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันทั้ง 3 วิธี จะมีค่าเพิ่มขึ้น โดยมีค่าสูงสุดเมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจะมีค่าเท่ากับ 84.82%, 0.25 มิลลิกรัม ไทรอล็อกซ์ ต่อ มิลลิลิตร และ 71.81 % ตามลำดับ ซึ่งจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดง ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุมมีค่าเท่ากับ 66.71 %, 0.14 มิลลิกรัม ไทรอล็อกซ์ ต่อ มิลลิลิตร และ 63.75 % ตามลำดับ จากนั้นความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะมีแนวโน้มลดลง เมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาสูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และภาพที่ 3 a-b

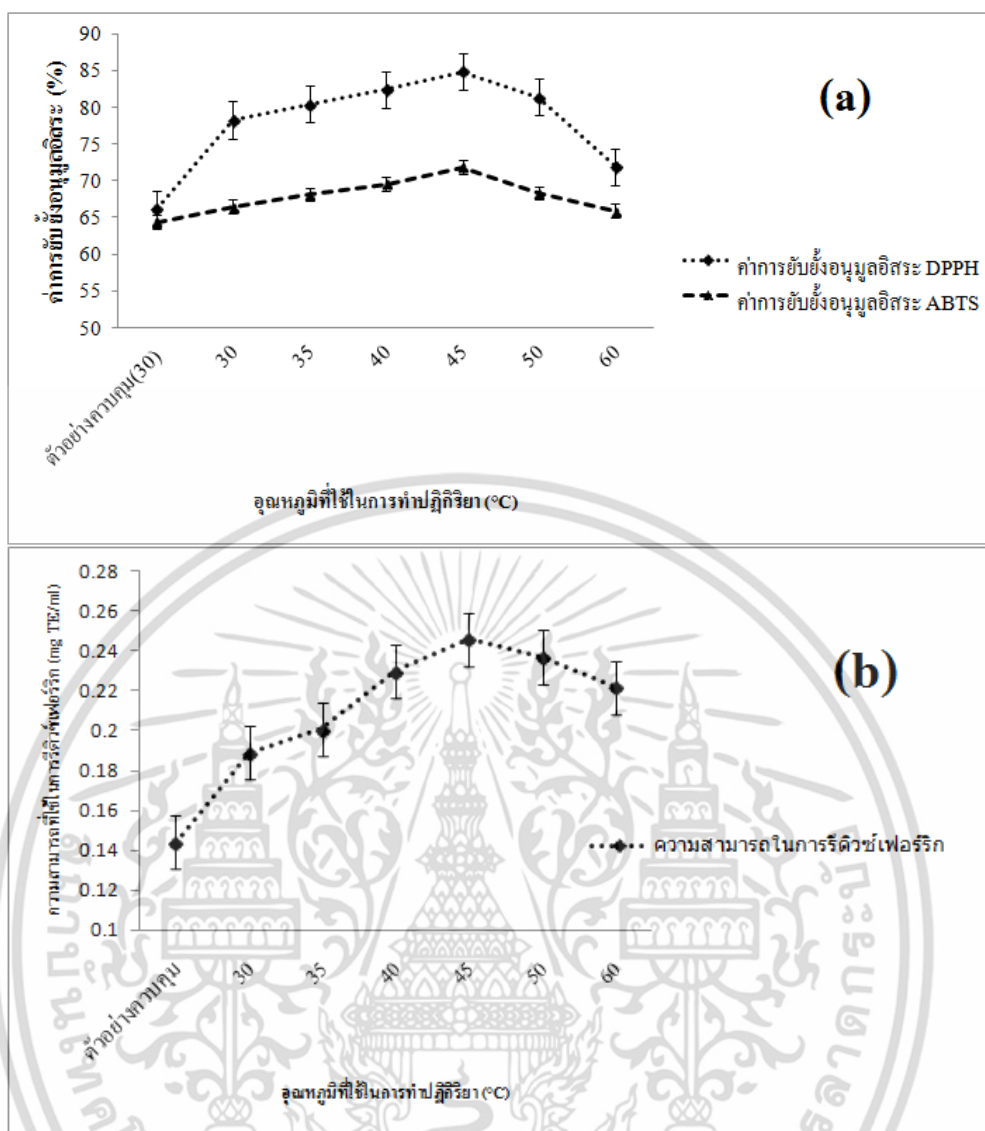
จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นตัวอย่างสารละลายปฏิกิริยามีค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงขึ้น ซึ่งจะมีค่าสูงสุดเมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากเอนไซม์ไซโคลเด็คซ์ทรินไกลโคซิลทรานเฟอร์เรสจะมีความคงตัวในการทำงานในช่วงที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความคงตัวของเอนไซม์จะลดลง ดังนั้นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา เนื่องจากเมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจะให้ค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงสุด โดยจากงานวิจัยของ Li และคณะ (2011) ได้ทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันของพูเออราริน (puerarins) โดยใช้เอนไซม์มอลโตจินิก อะไมเลสซึ่งมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด 47.70% และ Tai และคณะ (2013) ได้ศึกษาประสิทธิภาพและความจำเพาะในการสังเคราะห์อีริทอร์บิก (erythorbic) ไกลโคไซด์ โดยใช้เอนไซม์ไซโคลเด็คซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรส จากการศึกษาพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณสูงสุดเมื่อทำปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นปริมาณผลิตภัณฑ์มีค่าลดลง เนื่องจากเกิดอิมเมอร์ไรเซชัน ซึ่งเมื่ออุณหภูมิสูงจะเกิดอิมเมอร์ไรเซชันเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ที่อุณหภูมิสูงทำให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารละลายปฏิกิริยาระหว่างแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น

อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (°C)	ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน		
	การยับยั้งอนุมูลอิสระ	ความสามารถในการ	ความสามารถในการ
	DPPH (%)	รีดิวซ์เฟอร์ริก (mg TE/ml)	ฟลอกสีอนุมูลอิสระ ABTS (%)
ตัวอย่างควบคุม	66.17 ^c ±2.70	0.14 ^d ±0.02	63.75 ^c ±0.45
30	78.26 ^c ±0.88	0.19 ^c ±0.01	66.46 ^d ±0.77
35	80.37 ^{bc} ±1.04	0.20 ^b ±0.01	68.15 ^{bc} ±0.53
40	82.42 ^{ab} ±1.01	0.23 ^a ±0.01	69.52 ^b ±0.64
45	84.82 ^a ±1.13	0.25 ^{ab} ±0.01	71.81 ^a ±0.77
50	81.37 ^b ±1.33	0.22 ^b ±0.03	68.33 ^{bc} ±0.51
60	71.88 ^d ±2.02	0.18 ^c ±0.01	65.86 ^d ±0.49

หมายเหตุ : ^{a-c} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

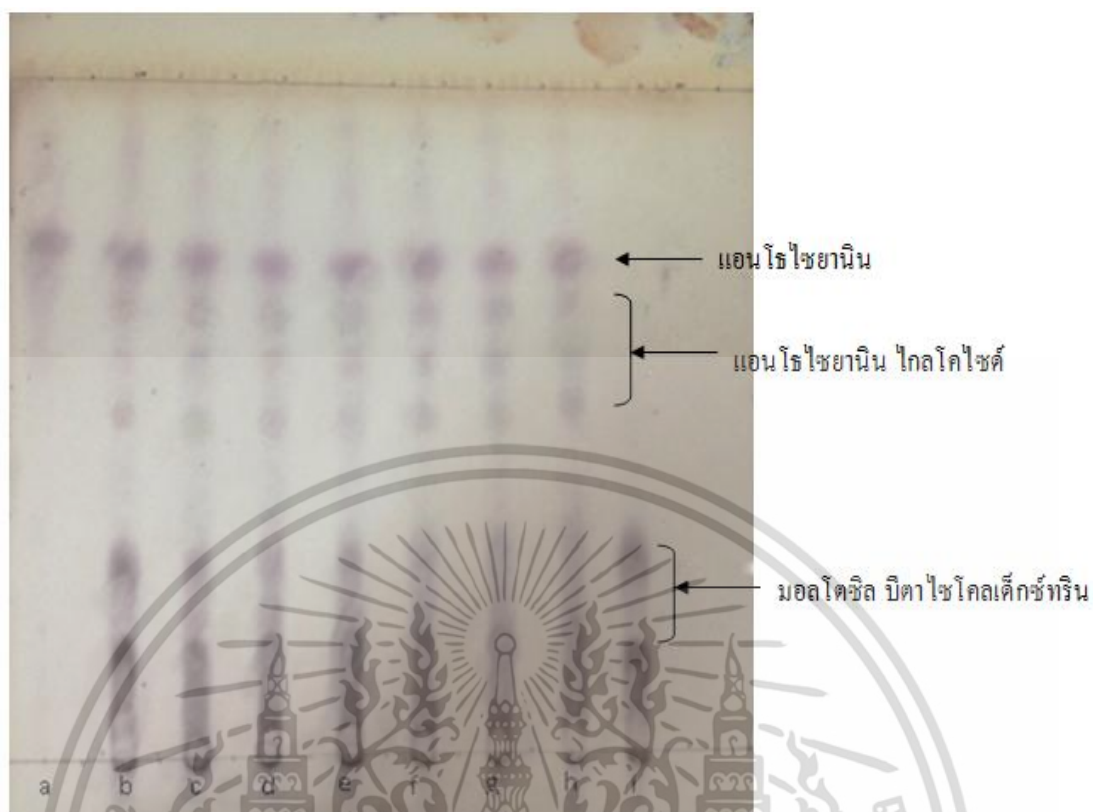
ตัวอย่างควบคุม คือสารละลายเหมือนสารละลายปฏิกิริยา แต่ไม่มีแอนโทไซยานินและมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน



ภาพที่ 4.4 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายปฏิกิริยาระหว่างแอนโทไซนินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน โดย (a) ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS เมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และ (b) ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน

4.4.3 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลซิส

จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลซิสของแอนโธไซยานินจากกระเจี๊ยบแดงโดยบ่มกับแอนโธไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรสและมอลโตซิลปีตาไซโคลเด็กซ์ทรินในอะซีเตต บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.0, 5.0 และ 6.0 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 และ 7.0 และ Tris-HCl บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 และ 8.0 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ติดตามผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบาง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างควบคุมซึ่งได้แก่สารละลายแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงจะมีจุดเกิดขึ้นบนโครมาโตแกรมเพียง 1 จุด ในขณะที่สารละลายปฏิกิริยาทุกตัวอย่างมีจุดปรากฏขึ้นบนโครมาโตแกรม 3 จุด ซึ่งมีค่า R_f ประมาณ 0.42, 0.50 และ 0.56



ภาพที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบางที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ของแอนโรไซยานินในกระเจียบแดงกับมอลโตซิลบิตาไซโคลเด็กซ์ทรินเมื่อพีเอชที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่างกันโดย

- (a) แอนโรไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดง (ตัวอย่างควบคุม)
- (b)-(d) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ในอะซิเตดบัฟเฟอร์พีเอช 4.0, 5.0 และ 6.0
- (e)-(f) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 และ 7.0
- (g)-(h) เมื่อทำปฏิกิริยา ทรานส์ไกลโคไซด์ Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.0 และ 8.0
- (i) มอลโตซิลบิตาไซโคลเด็กซ์ทริน

เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก และความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าเมื่อเพิ่มพีเอชในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันทั้ง 3 วิธี จะมีค่าเพิ่มขึ้น โดยมีค่าสูงสุดเมื่อทำปฏิกิริยาในอะซิเตท บัฟเฟอร์พีเอช 5.0 ซึ่งมีค่า 83.84 %, 0.25 มิลลิกรัม ไตรล็อกซ์ ต่อ มิลลิลิตร และ 73.31 % ตามลำดับ โดยจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงที่ละลายในน้ำ และไม่ได้ทำปฏิกิริยาซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุมจะมีค่าเท่ากับ 64.65 % 0.14 มิลลิกรัม ไตรล็อกซ์ ต่อ มิลลิลิตร และ 48.85 % ตามลำดับ จากนั้นความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะมีแนวโน้มลดลง เมื่อพีเอชในการทำปฏิกิริยาสูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.6 a-c

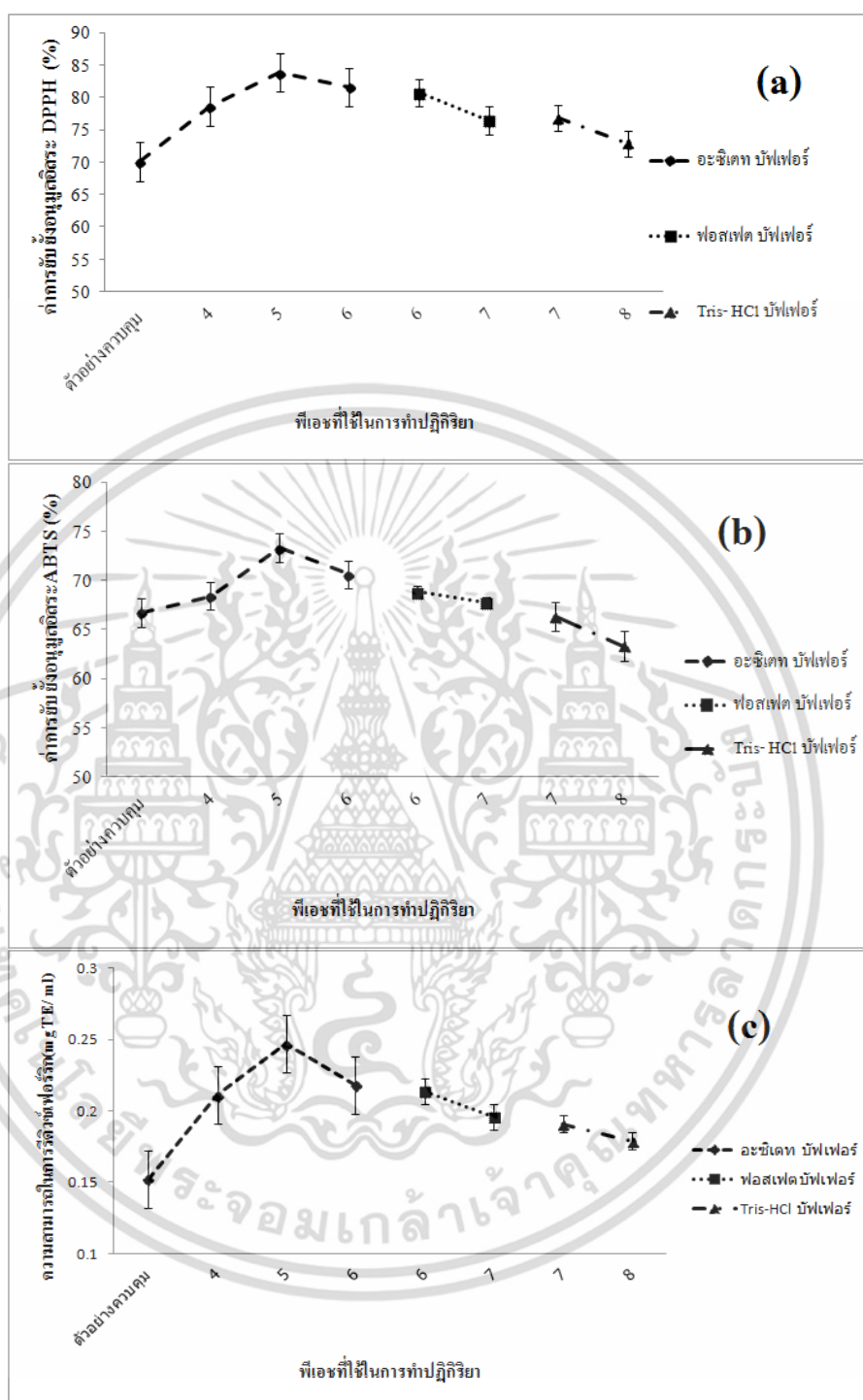
จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน พบว่าที่พีเอชสูงขึ้น ตัวอย่างสารละลายปฏิกิริยาจะมีค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงขึ้น โดยจะมีค่าสูงสุดเมื่อทำปฏิกิริยาในอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 และค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะลดลงเมื่อพีเอชมากกว่า 5.0 โดยจากงานวิจัยของ Kim และคณะ (2012) ได้สังเคราะห์แอสทรากาลิน กลูโคไซด์โดยใช้เด็กซ์ทรานซูเคส และน้ำตาลซูโครสเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล พบว่าเมื่อบ่มในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5.2 พบว่าจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด 21.20% และ Mathew และคณะ (2012) ได้สังเคราะห์พิเซียด (piceid) กลูโคไซด์ โดยปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน ใช้เอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทริน กลูโคโนทรานส์เฟอร์เรส จาก *Bacillus macerans* และได้ศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน พบว่าเมื่อเพิ่มพีเอชในการทำปฏิกิริยาประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันจะสูงขึ้น และจะสูงสุดเมื่อทำปฏิกิริยาที่ พีเอช 6.0 จากนั้นประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาจะมีแนวโน้มลดลง

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารละลายปฏิกิริยาระหว่างแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน เมื่อพีเอชที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่างกัน

พีเอช	ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน		
	การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (%)	ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก (mg TE/ml)	ความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS (%)
ตัวอย่างควบคุม	64.65 ^f ±1.03	0.14 ^c ±0.02	48.85 ^d ±0.67
4.0	78.56 ^{cd} ±1.40	0.21 ^b ±0.01	64.30 ^{cd} ±0.60
5.0	83.84 ^a ±0.59	0.25 ^a ±0.01	72.04 ^a ±0.27
6.0	81.57 ^{ab} ±1.13	0.20 ^{bc} ±0.02	67.87 ^b ±0.34
6.0	80.59 ^{bc} ±0.91	0.20 ^{bc} ±0.01	65.31 ^c ±0.24
7.0	77.93 ^d ±0.89	0.19 ^{bc} ±0.01	63.61 ^d ±0.50
7.0	76.72 ^d ±1.29	0.19 ^{cd} ±0.01	62.20 ^e ±0.29
8.0	67.60 ^e ±1.16	0.18 ^d ±0.01	57.99 ^f ±1.35

หมายเหตุ : ^{a-f} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตัวอย่างควบคุม คือแอนโทไซยานินละลายในน้ำ แต่ไม่มีเอนไซม์และมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน



ภาพที่ 4.6 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายปฏิกิริยาระหว่างแอนโคโนนในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน โดย (a) ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (b) ความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS เมื่อเพิ่มพีเอชที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และ (c) ความสามารถในการรีดิวซ์ฟอรัค เมื่อพีเอชที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.4 ผลการศึกษาชนิดของสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งของสารให้หมู่ไกลโคซิลที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเซชัน

จากการศึกษาชนิดสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งของสารให้หมู่ไกลโคซิลที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเซชันของแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดง โดยบ่มกับแอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรส และสารตั้งต้นต่างกัน 4 ชนิดคือ มอลโตซิล บิตาไซโคลเด็กซ์ทริน บิตาไซโคลเด็กซ์ทริน มอลโตส และกลูโคส ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นติดตามผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบาง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.7 พบว่าสารละลายแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงซึ่งเป็นสารละลายควบคุมจะเกิดจุดบนโครมาโตกราฟีแผ่นบางเพียง 1 จุด (เลน a) ในขณะที่เมื่อทำปฏิกิริยาโดยมีมอลโตซิลบิตาไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล จะเกิดจุดที่สัมพันธ์กับผลิตภัณฑ์แอนโธไซยานิน ไกลโคไซด์ที่ปรากฏบนโครมาโตกราฟีแผ่นบาง มี 3 จุด โดยมีค่า R_f ประมาณ 0.41, 0.51 และ 0.56 (เลน b) จากนั้นเมื่อทำปฏิกิริยาโดยมีบิตาไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล จะมีจุดที่สัมพันธ์กับผลิตภัณฑ์แอนโธไซยานิน ไกลโคไซด์ที่ปรากฏบนโครมาโตกราฟีแผ่นบาง มี 2 จุด โดยมีค่า R_f ประมาณ 0.51 และ 0.56 (เลน d) เมื่อทำปฏิกิริยาโดยมีมอลโตส เป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล จะมีจุดที่สัมพันธ์กับผลิตภัณฑ์แอนโธไซยานิน ไกลโคไซด์ที่ปรากฏบนโครมาโตกราฟีแผ่นบาง มี 4 จุด โดยมีค่า R_f ประมาณ 0.38, 0.41, 0.51 และ 0.56 (เลน f) และเมื่อทำปฏิกิริยาโดยมีกลูโคสเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล จะไม่เกิดจุดที่สัมพันธ์กับผลิตภัณฑ์แอนโธไซยานินไกลโคไซด์ (เลน h) ดังแสดงในภาพที่ 4.7 ทั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mathew และคณะ (2012) ที่รายงานว่าโมเลกุลกลูโคสที่สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างน้อยต้องมี 2 โมเลกุลขึ้นไปแสดงให้เห็นว่าแอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรส ไม่จำเพาะต่อการเคลื่อนย้ายโมเลกุลของกลูโคสให้กับสารรับหมู่ไกลโคซิล



- ภาพที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบางที่เกิดจากปฏิกิริยา
 ทรานส์ไกลโคไลเซชันของแอนโรโซยานินในกระเจียบแดงกับสารให้หมู่ไกลโคซิลชนิดต่างกัน
 โดย (a) แอนโรโซยานินในสารสกัดกระเจียบแดง (ตัวอย่างควบคุม)
 (b) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเซชันโดยมีมอลโตซิลบีตาไซโคเด็กซ์ทริน
 เป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล
 (c) มอลโตซิลบีตาไซโคเด็กซ์ทริน
 (d) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเซชันโดยมีบีตาไซโคเด็กซ์ทริน
 เป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล
 (e) บีตาไซโคเด็กซ์ทริน
 (f) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเซชันโดยมีมอลโตสเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล
 (g) มอลโตส
 (h) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเซชันโดยมีกลูโคสเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล
 (i) กลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก และความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าเมื่อสารให้หมู่ไกลโคซิลต่างกันมีผลให้ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายปฏิกิริยาต่างกัน โดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS จะมีค่าสูงสุดเมื่อใช้มอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทรินจะมีค่าเท่ากับ 87.25% และ 74.36 % ตามลำดับ และบีตาไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิลโดยมีค่าเท่ากับ 85.66% และ 72.08% ตามลำดับ โดยจะแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ซึ่งจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุมจะมีค่าเท่ากับ 61.64 % และ 50.82 % ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และ ภาพที่ 4.8 a และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกจะมีค่าสูงสุดเมื่อใช้มอลโตสเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิลซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.17 มิลลิกรัมโทรลล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงไม่ได้ทำปฏิกิริยาซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.14 มิลลิกรัมโทรลล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.8 b

จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน พบว่าเมื่อใช้สารให้หมู่ไกลโคซิลต่างกันสารละลายปฏิกิริยาที่ได้มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่างกัน โดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS มีค่าสูงสุดเมื่อมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทรินและบีตาไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล ซึ่งการเพิ่มโมเลกุลน้ำตาลจะป้องกันการสลายตัวของแอนโธไซยานินได้ (Castaneda-Ovando และคณะ, 2009) และแอนโธไซยานินนั้นจะมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระโดยยับยั้งปฏิกิริยาถูกออกซิเจนเริ่มต้นและทำลายปฏิกิริยาขึ้นเพิ่มจำนวนอนุมูลอิสระโดยการรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระ (วัลลภ และ ประณีต, 2547) ดังนั้นการเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสามารถทำได้โดยการเพิ่มตัวรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระ ซึ่งการเพิ่มโมเลกุลของน้ำตาลจะเป็นการเพิ่มตัวรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระ โดยจากงานวิจัยของ Lu และ Xia (2014) ได้ศึกษาความจำเพาะของสารให้หมู่ไกลโคซิลต่อปฏิกิริยาทรานซ์ไกลโคไซเลชัน ของสตีวียโอไซด์โดยมีไซโคลเด็กซ์ทริน กลูโคโนทรานซ์เฟอร์เรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งสารให้หมู่ไกลโคซิลที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ กลูโคส มอลโตส มอลโตไตรโอส แอลฟา- บีตา- และ แกมมา-ไซโคลเด็กซ์ทริน มอลโตเด็กซ์ทริน แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง เมื่อทำปฏิกิริยาแล้วพบว่าโมโนและไดแซคคาไรด์ไม่สามารถทำหน้าที่เป็นสารให้หมู่ไกลโคซิลที่มีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยากับสตีวียโอไซด์ ด้วยไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรส ส่วนแป้งและมอลโตเด็กซ์ทรินจะให้ผลผลิต 80 % เมื่อทำ

ปฏิกิริยานาน 5 ชั่วโมง จะเกิดทรานส์ไกลโคไซด์ขึ้นร่วมกับไฮโดรไลซิสของแป้ง ส่วนแอลฟา-บีตาไซโคลเดกซ์ทรินนั้นจะเกิดทรานส์ไกลโคไซด์ขึ้นผ่านปฏิกิริยาควบ ซึ่งเป็นการเปิดวงไซโคลเดกซ์ทริน หลังจากนั้นเกิดปฏิกิริยาดิสโพรพอร์ชันเนชัน กับสติวิโอไซด์ และจากงานวิจัยของ Mathew และคณะ(2012) ได้สังเคราะห์พีเซอิด (piceid) ไกลโคไซด์ โดยปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ขึ้นโดยใช้เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอแรส พบว่าโมเลกุลกลูโคสที่สามารถทำปฏิกิริยาได้น้อยที่สุดคือ โมเลกุลที่มีกลูโคสต่อกันอย่างน้อย 2 โมเลกุล โดยเมื่อทำปฏิกิริยาโดยใช้แอลฟาไซโคลเดกซ์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิลนั้นจะเกิดประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยามากที่สุดคือ 78.9 % ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ PicG2, PicG3, PicG4, PicG5, PicG6, PicG7, PicG8, PicG9, PicG10, PicG11, PicG12, PicG13 และ PicG14 และเมื่อทำปฏิกิริยาโดยใช้มอลโตสเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิลจะเกิดประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาน้อยที่สุดคือ 17.8 % ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ PicG2, PicG3, PicG4, PicG5, PicG6, PicG7, PicG8, PicG9 และ PicG10

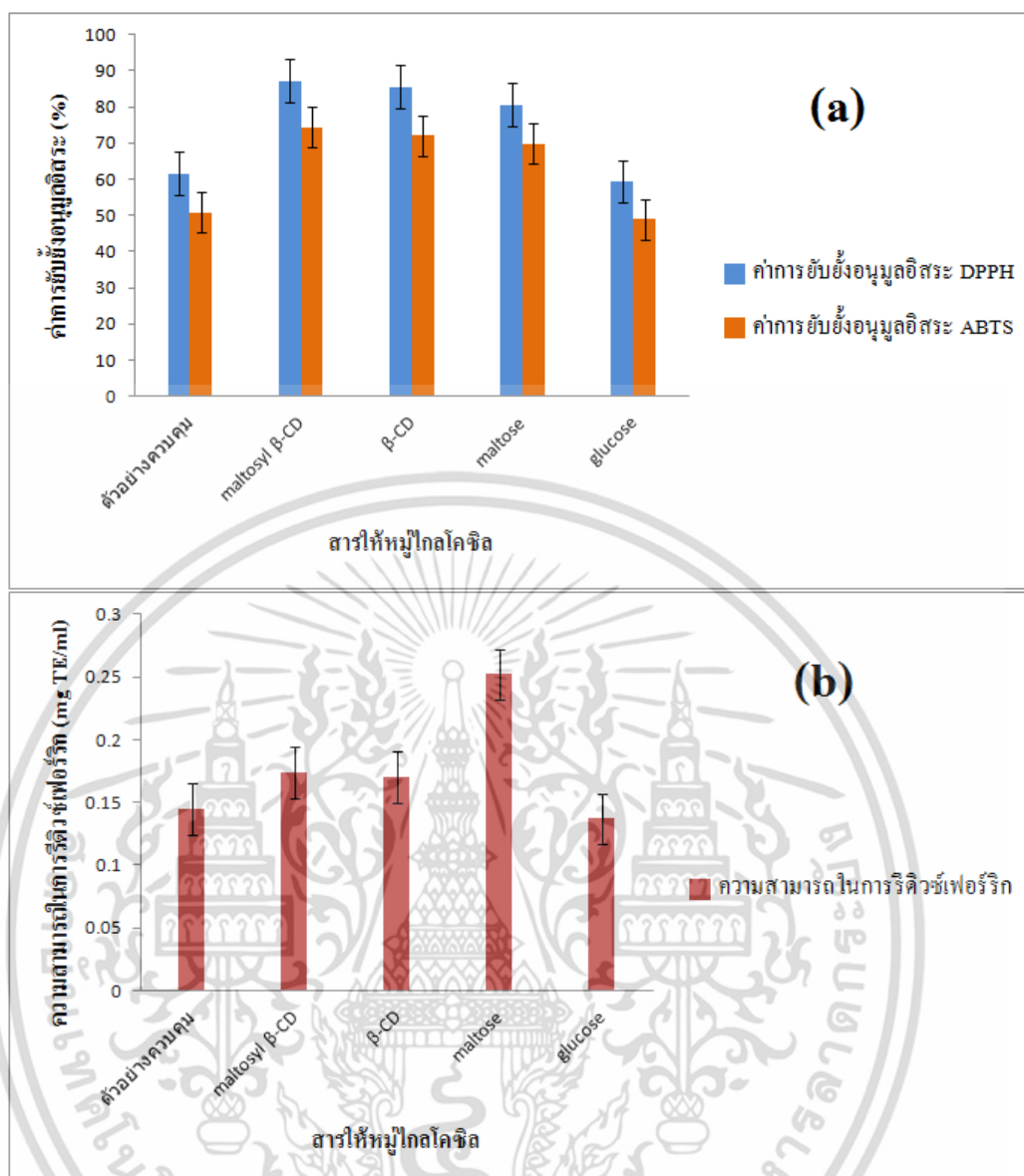
แต่อย่างไรก็ตามมอลโตซิลบีตาไซโคลเดกซ์ทรินสามารถเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิลได้ดีเนื่องจากมอลโตซิลบีตาไซโคลเดกซ์ทรินเมื่อทำปฏิกิริยาแล้วจะให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุด ถึงแม้ว่ามอลโตสจะมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกสูงกว่า แต่จะมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งเมื่อทำปฏิกิริยามอลโตซิลบีตาไซโคลเดกซ์ทรินสามารถละลายได้ดีกว่าบีตาไซโคลเดกซ์ทริน ดังนั้นมอลโตซิลบีตาไซโคลเดกซ์ทรินจึงเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิลในการทำปฏิกิริยาได้ดี

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารละลายปฏิกิริยาระหว่างแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับชนิดของสารให้หมู่ไกลโคซิลที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่างกัน

สารให้หมู่ไกลโคซิล	ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน		
	การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (%)	ความสามารถในการ รีดิวซ์เฟอริก (mg TE/ml)	ความสามารถในการ ฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS (%)
ตัวอย่างควบคุม	61.64±1.55	0.14±0.01	50.82±0.60
มอลโตซิลปีตา	87.25 ^a ±0.41	0.18 ^a ±0.02	74.36 ^a ±0.54
ไซโคลเด็กซ์ทริน			
ปีตา ไซโคลเด็กซ์ทริน	85.66 ^a ±1.00	0.17 ^a ±0.01	72.08 ^{ab} ±0.39
มอลโตส	80.66 ^b ±0.85	0.25 ^a ±0.02	69.88 ^b ±1.71
กลูโคส	49.76 ^c ±2.94	0.13 ^b ±0.01	39.92 ^c ±1.82

หมายเหตุ : ^{a-c} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

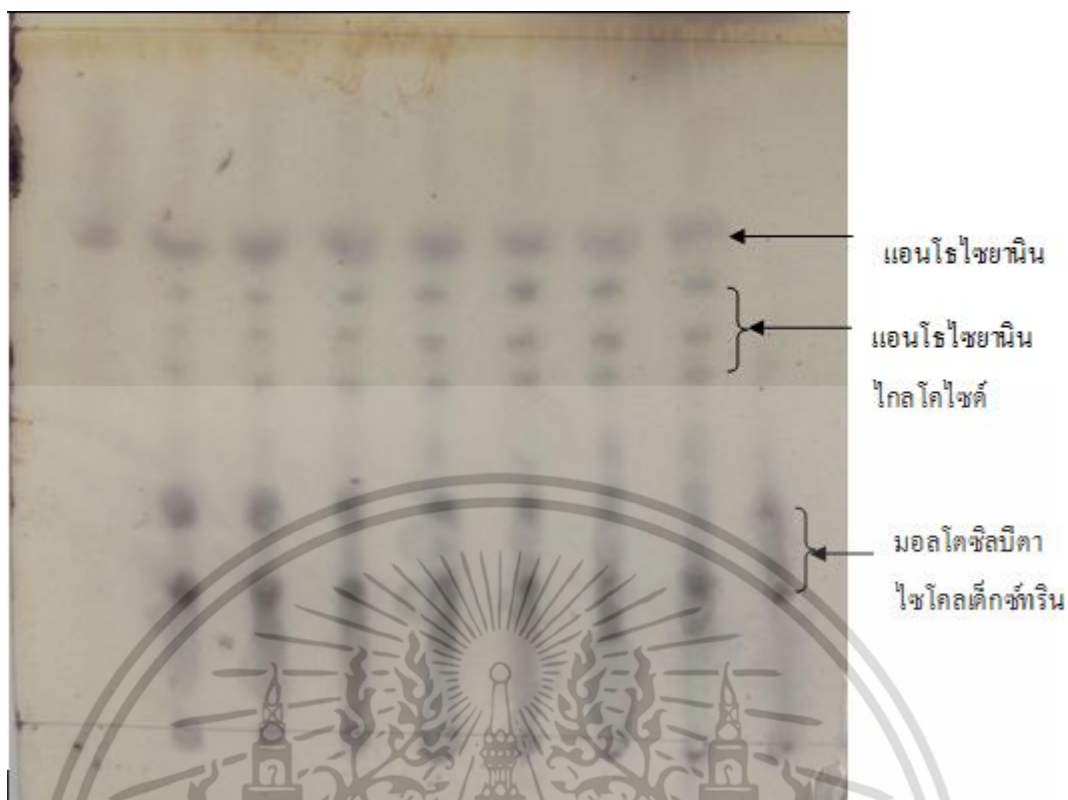
ตัวอย่างควบคุม คือสารละลายเหมือนสารละลายปฏิกิริยา แต่ไม่มีเอนซ์และสารให้หมู่ไกลโคซิล



ภาพที่ 4.8 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายปฏิกิริยาระหว่างแอนโทไซนินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับสารให้หมู่ไกลโคซิลชนิดต่างกัน โดย (a) ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (b) ความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS และ (c) ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก

4.4.5 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเซชัน

จากการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเซชันของแอนโรโซยานินจากกระเจี๊ยบแดงโดยบ่มกับเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน และมอลโตซิลบีตา ไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล ในอะซิเตด บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ติดตามผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบาง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างควบคุมซึ่งได้แก่สารละลายแอนโรโซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดง จะมีจุดโครมาโตแกรมเพียง 1 จุด ในขณะที่สารละลายปฏิกิริยาทุกตัวอย่างมีจุดปรากฏขึ้นบนโครมาโตแกรม พบว่าสารละลายแอนโรโซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงจะเกิดจุดบนโครมาโตกราฟีแผ่นบางเพียง 1 จุด ในขณะที่สารละลายปฏิกิริยาทุกตัวอย่างมีจุดปรากฏบนโครมาโตแกรม 3 จุด ซึ่งมีค่า R_f ประมาณ 0.41, 0.50 และ 0.56



ภาพที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบางที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันของแอนโรโซยานินในกระเจียบแดงกับมอลโตซิลบีตา ไชโคเลตต์กซ์ทริน เมื่อทำปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นเอนไซม์ต่างกัน โดย

- (a) แอนโรโซยานินในสารสกัดกระเจียบแดง (ตัวอย่างควบคุม)
- (b)-(h) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันมีมอลโตซิลบีตา ไชโคเลตต์กซ์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล และทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 ยูนิตต่อมิลลิลิตร
- (i) มอลโตซิลบีตา ไชโคเลตต์กซ์ทริน

เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก และความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าเมื่อเวลาและปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันทั้ง 3 วิธี จะมีค่าเพิ่มขึ้น โดยมีค่าสูงสุดเมื่อปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเป็น 80 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อทำปฏิกิริยาโดยมีมอลโตซิลบีตาไฮโคลเด็กซ์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคไล ค่าความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมีค่า 86.68%, 0.21 มิลลิกรัม ไทรอล็อกซ์ ต่อ มิลลิลิตร และ 74.04% ตามลำดับ ซึ่งจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยา 60.47% 0.14 มิลลิกรัม ไทรอล็อกซ์ ต่อ มิลลิลิตร และ 51.77% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.11 a-b

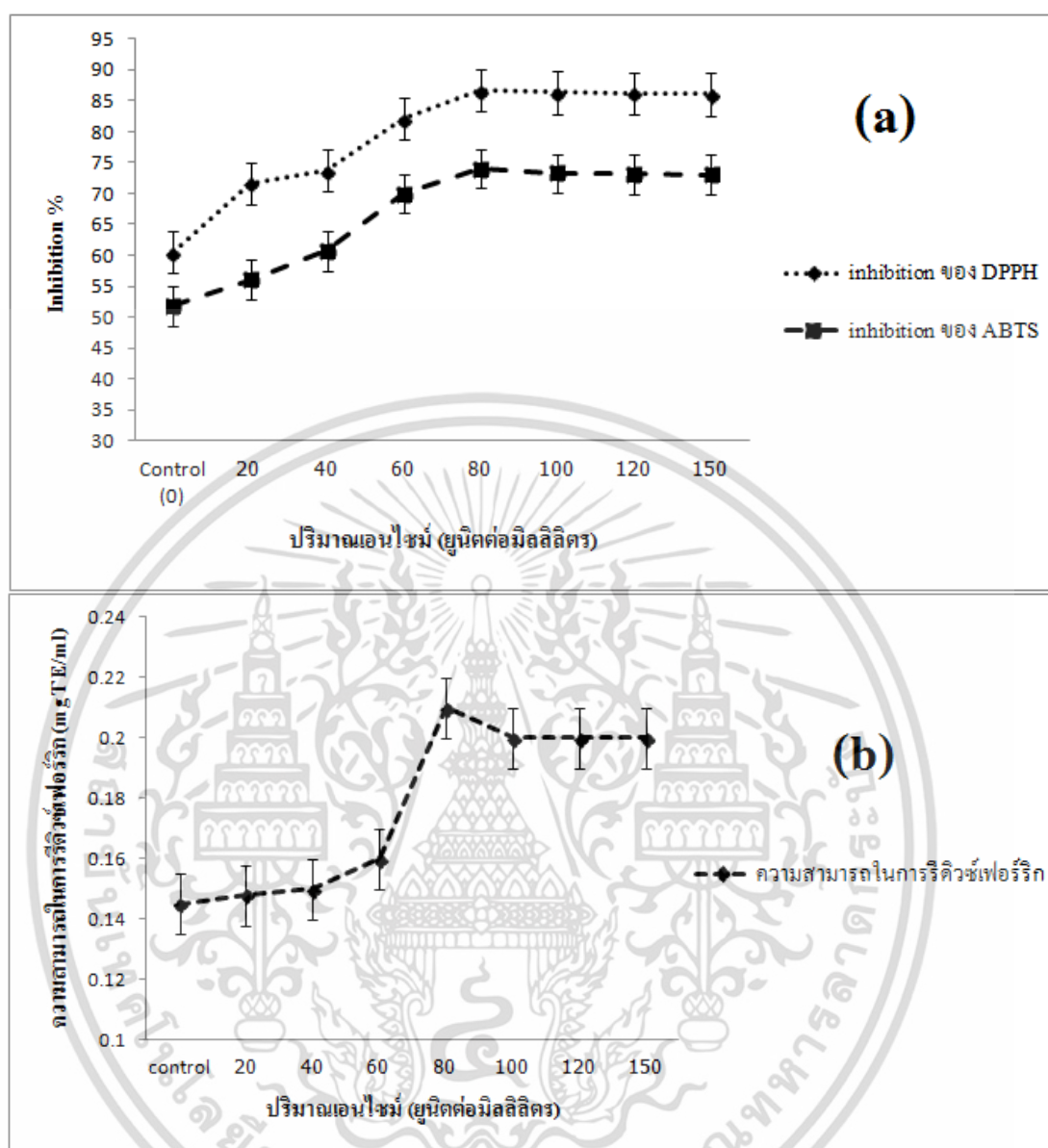
จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน พบว่าเมื่อความเข้มข้นเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาสูงขึ้นความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะสูงขึ้น โดยจะมีค่าสูงสุดเมื่อความเข้มข้นเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 80 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะคงที่เมื่อความเข้มข้นเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น โดยจากงานวิจัยของพรพรรณ (2550) ได้สังเคราะห์แอฟิคาเทซินไกลโคไซด์โดยปฏิกิริยาย้ายหมู่ไกลซิลที่จำเพาะของไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรส และพบว่าได้ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้นมีผลทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น โดยจะมีผลิตภัณฑ์สูงสุดเมื่อปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 80 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นผลิตภัณฑ์จะมีแนวโน้มคงที่ เมื่อปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาสูงขึ้น

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารละลายปฏิกิริยาระหว่างแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงกับมอลโตซิลปีตาไซโคลเด็กซ์ทริน เมื่อความเข้มข้นแอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่างกัน

ความเข้มข้นแอนไซม์ ที่เหมาะสม(ยูนิิตต่อ มิลลิลิตร)	ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน		
	การยับยั้งอนุมูลอิสระ	ความสามารถในการ	ความสามารถในการ
	DPPH (%)	รีดิวซ์เฟอร์ริก (mg TE/ml)	ฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS (%)
ตัวอย่างควบคุม	60.47 ^c ±0.97	0.14 ^d ±0.01	51.77 ^c ±0.53
20	71.63 ^d ±1.15	0.13 ^c ±0.01	56.06 ^d ±0.39
40	73.7 ^c ±0.38	0.15 ^c ±0.01	60.70 ^c ±1.69
60	82.09 ^b ±2.15	0.16 ^b ±0.02	69.93 ^b ±1.16
80	86.68 ^a ±0.48	0.21 ^a ±0.01	74.04 ^a ±1.32
100	86.34 ^a ±0.55	0.20 ^a ±0.02	73.25 ^a ±1.46
120	86.08 ^a ±1.01	0.20 ^a ±0.01	73.14 ^a ±0.64
150	85.95 ^a ±0.84	0.20 ^a ±0.01	73.03 ^a ±1.35

หมายเหตุ : ^{a-f} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตัวอย่างควบคุม คือสารละลายเหมือนสารละลายปฏิกิริยา แต่ไม่มีเอนไซม์และมอลโตซิลปีตาไซโคลเด็กซ์ทริน



ภาพที่ 4.10 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารละลายปฏิกิริยาระหว่างแอนโธไซนินในสารสกัดกระเจียบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน โดย (a) ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (b) ความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ และ (c) ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ต่างกัน

4.4.6 ศึกษาผลผลิตและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแอนโธไซยานินไกลโคไซด์ที่เตรียมได้โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม

จากการทดลองดัดแปรโครงสร้างแอนโธไซยานินโดยนำแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและเคลฟินิดิน-3-แชนมูไบโอไซด์ โดยทำปฏิกิริยา ทรานส์ไกลโคไซด์ชันตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองทั้งหมด คือทำปฏิกิริยาในอะซิเตดบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ติดตามผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบาง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.11 โดยพบว่าสารละลายควบคุมซึ่งได้แก่สารละลายแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและเคลฟินิดิน-3-แชนมูไบโอไซด์จะเกิดจุดบนโครมาโตแกรมเพียง 1 จุด ในขณะที่สารละลายปฏิกิริยาเมื่อใช้แอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเป็นสารรับหมู่ไกลโคซิลจะเกิดจุดขึ้นใหม่ ที่สัมพันธ์กับผลิตภัณฑ์แอนโธไซยานินไกลโคไซด์ที่ปรากฏบนโครมาโตแกรม มี 4 จุด โดยมีค่า R_f ประมาณ 0.36 , 0.42, 0.50 และ 0.56 ตามลำดับ และเมื่อทำปฏิกิริยาโดยใช้เคลฟินิดิน-3-แชนมูไบโอไซด์ เป็นสารรับหมู่ไกลโคซิลจะเห็นว่าจุดของเคลฟินิดิน-3-แชนมูไบโอไซด์หายไปเมื่อเทียบกับเคลฟินิดิน-3-แชนมูไบโอไซด์ก่อนทำปฏิกิริยา ดังภาพที่ 4.12 ดังนั้นเคลฟินิดิน-3-แชนมูไบโอไซด์เกิดการสลายตัวเนื่องจากเคลฟินิดิน-3-แชนมูไบโอไซด์จะสลายตัวจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิมากกว่า 40 องศาเซลเซียส (Polyphenols, 2016)



ภาพที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบางที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเลชันของแอนโรไซยานินในกระเจียบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน

(a) แอนโรไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดง(ตัวอย่างควบคุม)

(b) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเลชันของแอนโรไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงมีมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล

(c) มอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน

เมื่อทำปฏิกิริยา ทรานส์ไกลโคไลเลชันของแอนโรไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงโดยมีมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล พบว่าค่าความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมีค่าเท่ากับ 86.68%, 0.21 มิลลิกรัม โทรล็อกซ์ ต่อ มิลลิลิตร และ 74.04% ตามลำดับ ซึ่งจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับแอนโรไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยามีค่าเท่ากับ 60.47% 0.14 มิลลิกรัม โทรล็อกซ์ ต่อ มิลลิลิตร และ 51.77% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7



ภาพที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีแผ่นบางที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ของเซลล์ฟีนิดิน-3-แชนบูไบโอไซด์กับมอลโตซิลปีตาไซโคลเด็กซ์ทริน โดย

(a) เซลล์ฟีนิดิน-3-แชนบูไบโอไซด์

(b) เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ของเซลล์ฟีนิดิน-3-แชนบูไบโอไซด์กับมอลโตซิลปีตาไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล

(c) มอลโตซิลปีตาไซโคลเด็กซ์ทริน

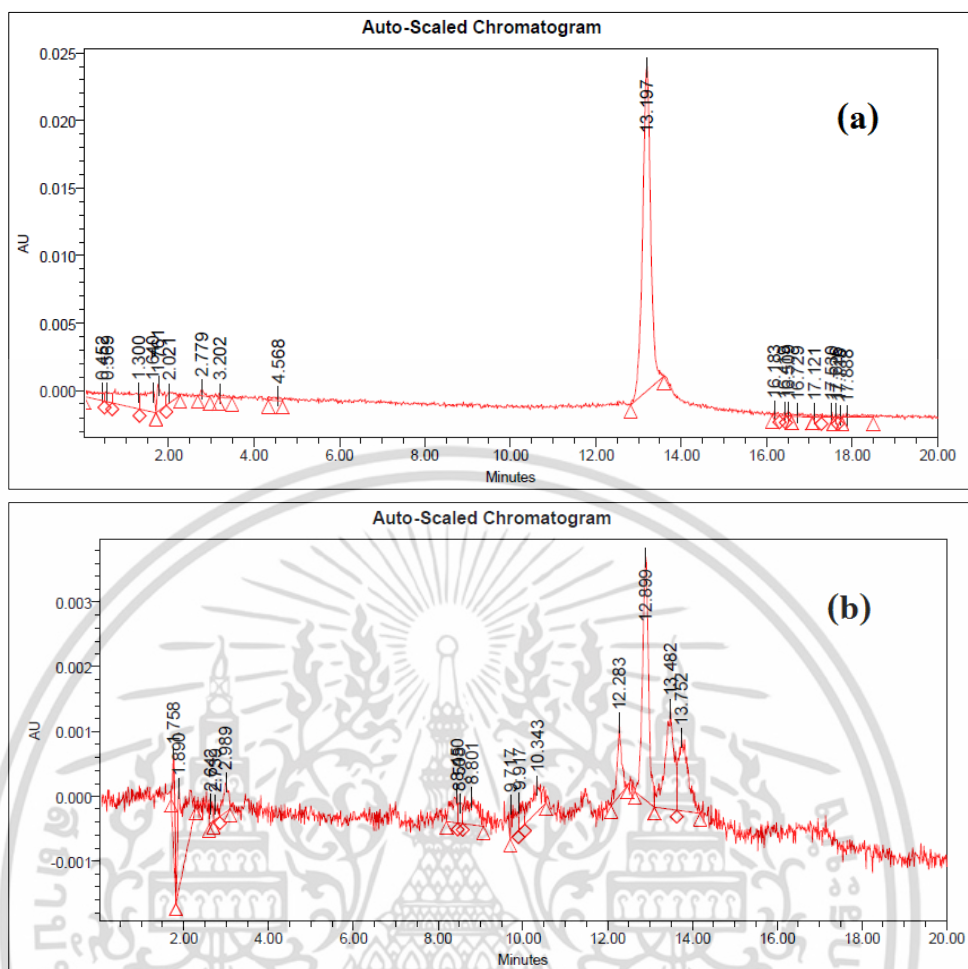
เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก และความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ของเซลล์ฟีนิดิน-3-แชนบูไบโอไซด์โดยมีมอลโตซิลปีตาไซโคลเด็กซ์ทรินแล้วจะมีค่าความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเท่ากับ 43.61%, 0.02 มิลลิกรัม โทรลิกซ์ ต่อ มิลลิลิตร และ 25.49% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ฟีนิดิน-3-แชนบูไบโอไซด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุมจะมีค่าความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเท่ากับ 63.12%, 0.15 มิลลิกรัม โทรลิกซ์ ต่อ มิลลิลิตร และ 53.50% ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารละลายปฏิกิริยาระหว่างเซลฟินีดิน-3-แชนมูไบโอไซด์ กับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน และ แอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน

	ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน		
	การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (%)	ความสามารถในการ รีดิวซ์เฟอร์ริก (mg TE/ml)	ความสามารถในการ ฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS (%)
เซลฟินีดิน-3-แชนมูไบโอไซด์ในอะซีเตตบัพเฟอร์	63.12±0.56	0.15 ±0.02	53.50±1.23
แอนโธไซยานิน ในสารสกัดกระเจียบแดงในอะซีเตตบัพเฟอร์	60.47±0.87	0.14 ±0.01	51.77±0.96
แอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงกับมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน	86.68±1.56	0.21 ±0.01	74.04±0.53
เซลฟินีดิน-3-แชนมูไบโอไซด์โดยมีมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทริน	43.61±1.12	0.02 ±0.01	25.49±0.45

จากนั้นเมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยคอลัมน์ที่ใช้คือ C-18 ซึ่งเป็น Reverse phase โดยเฟสคงที่จะมีขั้วน้อยกว่าเฟสเคลื่อนที่ ทำให้สารที่มีขั้วมากจะออกมาก่อนสารที่มีขั้วน้อย จากการวิเคราะห์พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเซชันของแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงโดยมีมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิลจะเกิดผลิตภัณฑ์ขึ้น 3 ชนิด โดยจะสอดคล้องกับผลของโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่ R_f 12.28, 13.48 และ 13.75 ดังแสดงในภาพที่ 4.13 และจะมีปริมาณผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคำนวณได้เท่ากับ 2.65 %, 7.29% และ 5.74% ตามลำดับ และผลผลิตรวมเท่ากับ 15.68 % โดยจากงานวิจัยของพรพรรณ (2550) ได้สังเคราะห์แอฟิคาเทชินไกลโคไซด์โดยปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเซชัน และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพบว่าจะได้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 1.44%, 3.39%, 4.18% และ 8.33% ซึ่งจะมีผลผลิตทั้งหมดเท่ากับ 18.10 %

จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่าผลผลิตของปฏิกิริยา 15.68 % นั้นอยู่ในช่วงที่ไม่ต่างจากที่มีการรายงานไว้ในกรณีของแอฟิคาเทชินไกลโคไซด์มาก นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ได้ใช้สารรับหมู่ไกลโคซิลเป็นแอนโธไซยานินในรูปของสารสกัดกระเจียบแดงซึ่งเป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) จึงน่าจะมีโอกาสพัฒนาปฏิกิริยาให้มีผลผลิตได้มากขึ้นถ้ามีขั้นตอนการทำบริสุทธิ์สารแอนโธไซยานิน



ภาพที่ 4.13 โครมาโตแกรมที่ได้เมื่อวิเคราะห์โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดย (a) แอนโรไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดง (b) เมื่อทำปฏิกิริยาปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ชันของแอนโรไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงโดยมีมอลโตซิลบีตาไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทำปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไลเซชันของแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดง โดยการทำปฏิกิริยากับแอนโธไซโคเลตส์ทรินไกลโคทรานส์เฟอร์เรสและใช้โมลโตซิลบิตาไซโคเลตส์ทรินเป็นสารให้หมู่ไกลโคซิล พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ บ่มแอนโธไซโคเลตส์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรส 80 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของโมลโตซิลบิตาไซโคเลตส์ทริน 1.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารสกัดกระเจียบแดง 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง และเมื่อศึกษาหาชนิดของสารให้หมู่ไกลโคซิลที่เหมาะสม พบว่าโมลโตซิลบิตาไซโคเลตส์ทรินสามารถทำหน้าที่เป็นสารให้หมู่ไกลโคซิลในการทำปฏิกิริยาได้ดี เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแล้วยังให้ค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูง จากนั้นเมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบางพบว่าเกิดจุดของผลิตภัณฑ์ขึ้น 3 จุด และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าจะเกิดผลิตภัณฑ์ที่ Rt 12.283, 13.482 และ 13.752 ตามลำดับ และจะมีผลิตภัณฑ์รวมเท่ากับ 2.65%, 7.29% และ 5.74% เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก ความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS ของสารละลายปฏิกิริยา พบว่ามีค่า 86.68%, 0.21 มิลลิกรัม ไทรอล็อกซ์ ต่อ มิลลิลิตร และ 74.04% ตามลำดับ ซึ่งจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับแอนโธไซยานินในสารสกัดกระเจียบแดงที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาซึ่งมีค่า 60.47%, 0.14 มิลลิกรัม ไทรอล็อกซ์ ต่อ มิลลิลิตร และ 51.77% ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่า การคัดแปรแอนโธไซยานินไกลโคไซด์ โดยใช้แอนโธไซโคเลตส์ทรินไกลโคซิลทรานส์เฟอร์เรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยทำปฏิกิริยาที่สภาวะที่เหมาะสมจะได้แอนโธไซยานินไกลโคไซด์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเพิ่มขึ้น จึงควรทำการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นแอนโธไซยานินและโมลโตซิลบิตาไซโคเลตส์ทรินที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา รวมทั้งควรวิเคราะห์หาความเสถียรของแอนโธไซยานินไกลโคไซด์ที่ได้ นอกจากนี้ควรทำการทดลองกับแอนโธไซยานินที่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นกว่าสารสกัดหยาบของกระเจียบแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- นิสารัตน์ คำเนียร. 2540. สมบัติของเอนไซม์ไฮโดรไลติกส์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรสที่ผลิตจากแบคทีเรียทนด่าง *Bacillus* sp. PS304 และสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ประพันธ์ ปิ่นศิริโรตม. 2551. สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงและผลของน้ำตาลชนิดต่างๆต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงและหมูแผ่น. รายงานการวิจัยคณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- พรพรรณ อร่ามแสงเทียนชัย. 2550. การสังเคราะห์แอฟลิทาซินไกลโคไซด์โดยปฏิกิริยาการโยกย้ายหมู่ไกลโคซิลที่จำเพาะของไฮโดรไลติกส์ทรินไกลโคซิลทรานซ์เฟอร์เรส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พองาม ประเสริฐ. 2555. การวิเคราะห์โครงสร้างของเอนไซม์ BGLU1 E176Q ที่จับน้ำตาลและ การวิเคราะห์ โครงสร้างผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากทรานส์ไกลโคไลเซชันของเอนไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ยุพาพร ผลาขจรศักดิ์. 2547. การสกัดและความคงตัวของแอนโไซยานินที่สกัดได้จากเปลือกมังคุด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- วัลลภ วีชะรังสรรค์ และ ปราณีต โอปนะโสภิต. 2547. ภาพรวมของอนุมูลอิสระและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชในหลอดทดลอง. *SWU J Pharm Sci*. 9:73-80.
- สุไธณี เบญจเหม. 2557. ผลร่วมของคลื่นความถี่สูงและความร้อนต่อคุณภาพน้ำสกัดจากข้าวเหนียวดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2553. ประมวลเอกสารพร้อมใช้แอนโไซยานิน. กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.
- สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. 2557. กระเจียบแดง : เข้าถึงได้จาก <http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/index.asp?%A1%C3%D0%E0%A8%D5%EA%C2%BA%E1%B4%A7> (วันที่ค้นข้อมูล: 3 ธันวาคม 2557)
- Abe, N., Nemoto, A., Tsuchiya, Y., Hojo, H., and Hirota, A. 2000. Studies on 1,1- diphenyl-2 – picrylhydrazyl radical scavenging mechanism of a 2- pyrone compound. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 64:306-313.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Aramsangtienchai, P., Chavasiri, W., Ito, C., and Pongsawasdi, P. 2011. Synthesis of epicatechin glucosides by β -cyclodextrin Glycosyltransferase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 73:27-34.
- Bae, H. Lee, S., Park, C., Shim, J., Lee, H., Kim, M., Baek, J., Roh, H., Choi, J., Choe, E., Anh, D., and Park, K. 2002. Modification of ascorbic acid using transglycosylation activity of *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase of enhance its oxidative stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:3309-3316.
- Benzie, F.F., and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of Antioxidant Power: The Frap Assay. *Analytical Biochemistry*. 239: 70-76.
- Caligur, V. 2008. Cyclodextrins. Available:<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cyclodextrins.html> (วันที่ค้นข้อมูล: 20 ธันวาคม 2557)
- Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, D., Paez-Hernandez, E., Rodriguez, J., and Galan-Vidal, C. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 113: 859–871.
- Chang, M., Sung, N., Park, C., Kweon, D., Mantovani, A., Moon T., Lee, S., and Park, K. 2008. Antioxidant and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and C57 BL/6J mice. *European Journal of Pharmacology*. 578:159-170.
- Chen, S., Xing, X., Huang, J., and Xu, M. 2011. Enzyme-assisted extraction of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves: Improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by *penicillium decumbens* cellulase. *Enzyme and Microbial Technology*. 48: 100-105.
- Chotipanang, K., Bhunthumnavin, W., and Prousoontorn, M. 2011. Synthesis of alkyl glycosides from cyclodextrin using cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. RB01. *Macrocyclic Chemistry*. 70:359-368.

- Chung, M., Kang, A., Kang, K., Oh, E., Jun, H., Kim, S., Auh, J., Moon, T., Lee, S., and Park, K. 2006. Water-Soluble Genistin Glycoside Isoflavones Up-Regulate Antioxidant Metallothionein Expression and Scavenge Free Radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:3819-3826.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., and Heinrich, M. 2014. Hibiscus sabdariffa L. – A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*. 165:424-443.
- Gulcin, I., Huyut, Z., Elmastas, M., and Aboul-Enein, H. 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*. 3:43–53
- Jung, J., Seo, D., Ha, S., Song, M., Cha, J., Yoo, S., Kim, T., Baek, N., Baik, M., and Park, C. 2009. Enzymatic synthesis of salicin glycosides through transglycosylation catalyzed by amylosucrases from *Ceinococcus geothermalis* and *Neisseria polysaccharea*. *Carbohydrate Research*. 344:1612-1619.
- Iwakiri, T., Mase, S., Murakami, T., Matsumoto, M., Hamada, H., Nayakama, T., and Ozaki, S. 2013. Glucosylation of hydroxyflavones by glucosyltransferases from *Phytolacca americana*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 90:61-65.
- Kim, G., Kang, H., Seo, E., Jung, S., Park, J., Kim, D., Kim, D., Ahn, S., Sunwoo, C., and Kim, D. 2012. Glucosylation of the flavonoid, astragalin by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextranase acceptor reactions and characterization of the products. *Enzyme and Microbial Technology*. 50:50-56.
- Li, S., Xiong, Q., Lai, X., Li, X., Wan, M., Zhang, J., Yan, Y., Cao, M., Lu, L., Guan, J., Zhang, D., and Lin, Y. 2016. Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15:237-250
- Li, X., Li, D., Park, S., Gao, C., Park, K., and Gu L. 2011. Identification and antioxidant properties of transglycosylated puerarins synthesized by an archaeal maltogenic amylase. *Food Chemistry*. 124:603-608.
- Lu, T., and Xia, Y., 2014. Transglycosylation specificity of glycosyl donor in transglycosylation of stevioside catalysed by cyclodextrin glucanotransferase. *Food Chemistry*. 150:151-156.

- Mahadevan, N., kamboj, S., and kamboj, P. 2009. Hibiscus sabdariffa Linn.- An overview. *Natural Product Radiance*. 8:77-83.
- Mamata, S., Sharma, R., and Banerjee, U.C. 2002. Biotechnological application of cyclodextrin. *Biotechnology advances*. 20:341-359
- Mathew, S., Hedstrom, M., and Adleercentz, P. 2012. Enzymatic synthesis of piceid glycosides by cyclodextrin gluconotransferase. *Process Biochemistry*. 47: 528-532
- Mazza, G.J., and Brouillard, R. 1987. Color stability and structural transformations of cyanidin 3,5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35, 422-426.
- Mazza, G., and Miniati E. 2000. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains: Type of anthocyanin. Boca Raton: CRC Press.
- Mohd-Esa, M., Hern, F., Ismail, A., and Yee, C. 2010. Antioxidant activity in different parts of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chemistry*. 122: 1055-1060.
- Pacôme, O., Bernard, D., Sékou, D., Joseph, D., David, J., Mongomaké, k., and Hilaire, T. 2014. Phytochemical and Antioxidant Activity of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Petal Extracts. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 5:1453-1465
- Park, DC., Kim, T.K., and Lee, Y.H. 1998. Characteristics of transglycosylation reaction of cyclodextrin gluconotransferase in the heterogeneous enzyme reaction system using extrusion starch as a glucosyl donor. *Enzyme and Microbial Technology*. 22:217-222.
- Park, K. 2012. Biotechnological modification of bioactive natural compounds for food industry. *Journal of Food and Drug Analysis*. 20:189-193.
- Polyphenols. Delphinidin 3-sambubioside. Available
<http://polyphenols.com/delphinidin-products/delphinidin-3-sambubioside-article153-182.html>
 (วันที่ค้นข้อมูล: 20 มิถุนายน 2559)
- Sindi, H. Marshall, L., and Morgan, M. 2014. Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of Hibiscus Sabdariffa. *Food Chemistry*. 164:23-29.

- Singh, M. Sharama, R., and Banerjee, U.C. 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advance*. 20: 341-359.
- Socaciu, C. 2008. Food colorants chemical and functional properties: Factor affecting of anthocyanin. Boca Raton: CRC Press.
- Strompen, S. Miranda-Molina, A. Lopez-Munguia, A. Castillo, E., and Saab-Rincon, G. 2015. Acceptor-induced modification of regioselectivity in CGTase-catalyzed glycosylations of p-nitrophenyl- glucopyranosides. *Carbohydrate Research*. 404:46-54.
- Tai, A. Iwaoka, Y., and Ito, H. 2013. Highly efficient and regioselective production of an erythorbic acid glucoside using cyclodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter* sp. and amyloglucosidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 92:19-23.
- Thompson, S. 1990. Chemtrek: Natural products chemistry: anthocyanins as food dyes. Perrotta Lorraine, Prentice hall. 472-473.
- Tsai, P., McIntosh, J., Pearce, P., Camden, B., and Jordan, B. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. *Food Research International*. 35:351-356.
- Van der veen, B., Uitdehaag, J., Penninga, D., Alebeek, G., Smith, L., Dijkstra, B., and Dijkhuizen, L. 2000. Rotational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α -cyclodextrin production. *Journal of Molecular Biology*. 296:1027-1038.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B., 1998. Antioxidant activity and total phenolic in selected fruits, vegetable and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:4113-4117.
- Xiaowei, H., Xiaobo, Z., Jiewen, Z., Jiyong, S., Xiaolei, Z., and Holmes, M. 2014. Measurement of total anthocyanins content in flowering tea using near infrared spectroscopy combined with ant colony optimization models. *Food Chemistry*. 164:536-543.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (Velioğlu และคณะ, 1998)

1.1 สารเคมี

- 1.1.1 Folin-Ciocalteu
- 1.1.2 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
- 1.1.3 สารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

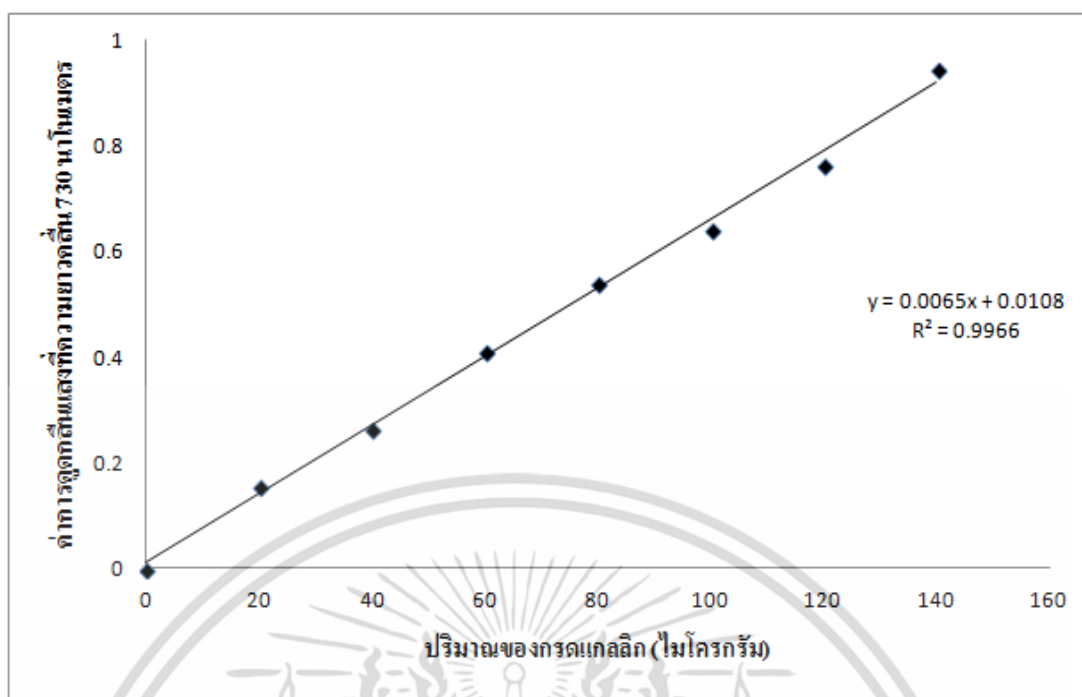
- 1.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้นเริ่มต้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย
- 1.2.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานดังกล่าวใส่หลอดทดลอง หลอดละ 0, 0.05, 0.15, 0.20, 0.30 และ 0.35 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 10 มิลลิลิตร
- 1.2.3 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
- 1.2.4 เติมสารละลาย โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกันให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
- 1.2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร
- 1.2.6 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาตรกรดแกลลิกในหน่วย ไมโครกรัม

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลในตัวอย่างสารสกัด

- 1.3.1 ปิเปตตัวอย่างสารละลายสารสกัดที่เจือจางให้มีความเหมาะสม 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 เปอร์เซ็นต์

เป็น blank

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานของกรดแกแลคติกในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด(Xiaowei และคณะ, 2014)

2.1 สารเคมี

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

2.2 วิธีวิเคราะห์

- 2.2.1 สแกนหาความยาวคลื่นสูงสุด ($\lambda_{\text{vis-max}}$) ของตัวอย่างสารละลายของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง โดยการเจือจางสารสกัดด้วยด้วยโพแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์พีเอช 1.0 ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ในระดับปริมาตรของสารสกัดไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรรวมของสารละลายเจือจางและสามารถคำนวณค่า dilution factor (DF) ได้เพื่อรักษาภาวะของ buffer capacity และมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.1-0.9A
- 2.2.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละชุดตัวอย่างสารสกัดที่ความยาวคลื่นสูงสุดและที่ 700 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานิน ดังสูตร

$$A = (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{\lambda_{700}})_{\text{pH1.0}} - (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{\lambda_{700}})_{\text{pH4.5}}$$

$$\text{Total anthocyanin} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

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

DF = dilution factor (สำหรับตัวอย่าง เช่นตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร

เจือจางได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 10 มิลลิลิตร, DF=10)

ϵ = molar absorptivity ของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (26,900)

l = ความกว้างของคิวเวต เท่ากับ 1 เซนติเมตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Dextrinizing activity

1.1 สารเคมี

- 1.1.1 Soluble potato starch 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 เข้มข้น 0.2 โมลาร์
- 1.1.2 กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.2 โมลาร์
- 1.1.3 ไอโอดีน รีเอเจนต์ เตรียมโดยละลายไอโอดีน 0.02 กรัมในสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.2 วิธีวิเคราะห์

- 1.2.1 ปิเปตตัวอย่างเอนไซม์ 10-100 ไมโครลิตร ผสมกับกับน้ำแข็ง 0.3 มิลลิลิตร
- 1.2.2 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที
- 1.2.3 เติมกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.2 โมลาร์ 4 มิลลิลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยา
- 1.2.4 เติมไอโอดีน รีเอเจนต์ 0.5 มิลลิลิตร
- 1.2.5 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม และปรับปริมาตรรวมให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
- 1.2.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
- 1.2.7 คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ความเข้มข้นน้ำเงินของ starch-iodine complex ลดลง 10% ต่อนาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Abe และคณะ,2009)

1.1 สารเคมี

- 1.1.1 สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่ง DPPH 0.0158 กรัม ละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร
- 1.1.2 สารละลายเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

1.2 วิธีวิเคราะห์

- 1.2.1 ปิเปตตัวอย่างสารสกัดและสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดทดลอง โดยให้ปริมาตรรวมของตัวอย่างสารสกัด และเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ในหลอดทดลองให้เป็น 5.4 มิลลิลิตร
- 1.2.2 ปิเปตสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ 0.6 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งปริมาตรของสารละลายที่ทำปฏิกิริยารวมทั้งหมดในหลอดทดลองเป็น 6 มิลลิลิตร
- 1.2.3 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที
- 1.2.4 ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank และในหลอดควบคุมจะใช้ตัวทำละลายแทนตัวอย่างสารสกัดในข้อ 1.2.1 ในปริมาณที่เท่ากัน
- 1.2.5 คำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ได้จากสมการ

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

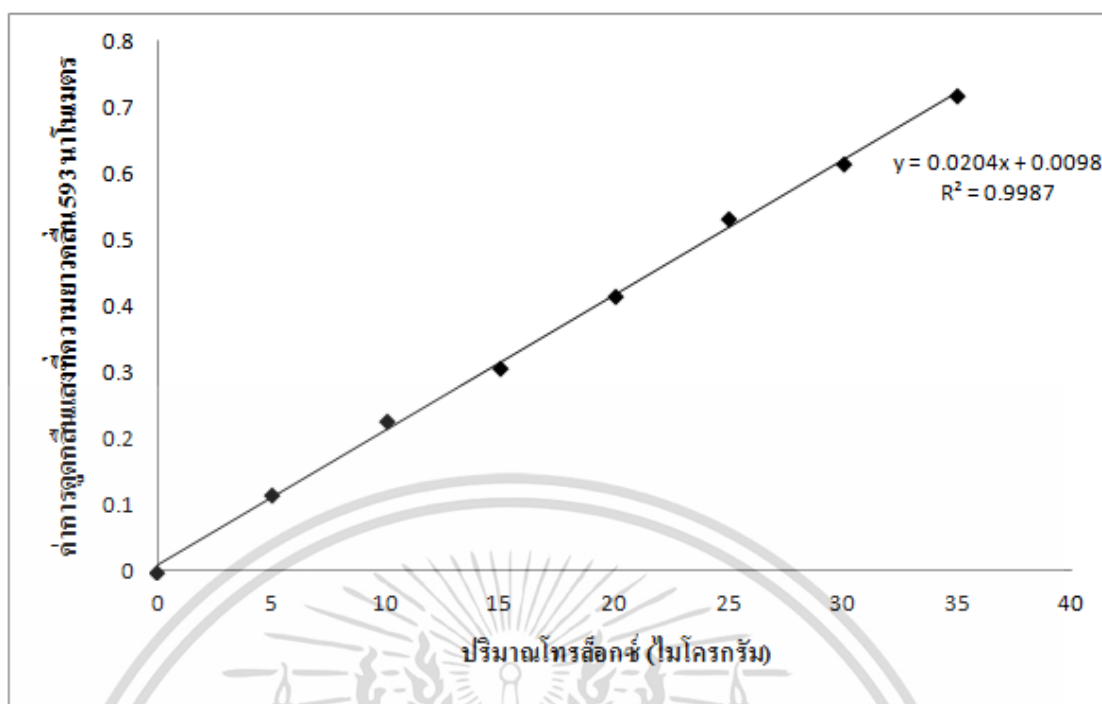
2. การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก(Ferrice Reducing Antioxidant Power,FRAP) (Benzie และ Strain (1996)

2.1 สารเคมี

- 2.1.1 อะซิเตท บัฟเฟอร์ พีเอช 3.6 เข้มข้น 0.1 โมลาร์
- 2.1.2 สารละลาย TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ใน HCl ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่ง TPTZ 0.1562 กรัม ละลายใน HCl ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร
- 2.1.3 ละลาย Iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่ง $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2703 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร
- 2.1.4 FRAP รีเอเจนต์
เตรียมโดยผสมสารละลายที่เตรียมไว้ทั้งหมดดังข้อ 2.1.1, 2.1.2 และ 2.1.3 โดยให้มีอัตราส่วนของ อะซิเตท บัฟเฟอร์: สารละลาย TPTZ: สารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ เป็น 10:1:1 โดยปริมาตร ตามลำดับโดยเตรียมใหม่ทุกครั้ง

2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์

- 2.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ความเข้มข้นเริ่มต้น 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- 2.2.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานดังกล่าวใส่หลอดทดลอง หลอดละ 0, 0.025, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 และ 0.12 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 0.2 มิลลิลิตร
- 2.2.3 เติมสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 6 มิลลิลิตร
- 2.2.4 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม วางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 8 นาที
- 2.2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank
- 2.2.6 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณโทรล็อกซ์ในหน่วย ไมโครกรัม



ภาพที่ ข1 กราฟมาตรฐาน Trolox ในการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก

2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกในตัวอย่างสารสกัด

2.3.1 ปิเปตตัวอย่างสารสกัดลงในหลอดทดลอง และปรับปริมาตรด้วยเอธานอล 70

เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 0.2 มิลลิลิตร

2.3.2 เติมน้ำละลาย FRAP reagent 6 มิลลิลิตร

2.3.3 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม วางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 8 นาที

2.3.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดย blank ให้ใช้ตัวทำละลายแทนตัวอย่างสารสกัดในข้อ 2.3.1 ในปริมาณที่เท่ากัน

2.3.5 คำนวณความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกในตัวอย่างสารสกัด

3. ความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radical cation decolorization assay)

(Gulcin และคณะ, 2010)

3.1 สารเคมี

3.1.1 สารละลาย $K_2S_2O_8$ 88 ไมโครลิตร

3.1.2 ABTS (2, 2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt) รีเอเจนต์

เตรียมสารละลาย $ABTS^{+}$ โดยการผสม ABTS เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิโมลาร์ กับสารละลาย $K_2S_2O_8$ 88 ไมโครโมลาร์ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เก็บไว้ในที่มืด แล้วปรับปริมาตรให้ 25 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลาย $ABTS^{+}$ ให้ค่าดูดกลืนแสงในช่วง 0.7 ± 0.05 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

3.2 วิธีวิเคราะห์

3.2.1 ปิเปตสารละลาย ABTS รีเอเจนต์ 3.50 มิลลิลิตร กับสารละลายตัวอย่างและปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 4 มิลลิลิตร

3.2.2 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม วางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

3.2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank

3.2.4 คำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ได้จากสมการ

$$ABTS \text{ scavenging effect (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

ประวัติผู้เขียน

- ชื่อ-สกุล** : นางสาว วิชนี มะเส็ง
- วัน/เดือน/ปี เกิด** : 23 ตุลาคม 2534
- ที่อยู่** : 62 อ่อนนุช56 เขต/แขวง สวนหลวง ถนนอ่อนนุช
จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10250
- E-mail** : wichanee.m23@gmail.com
- ประวัติการศึกษา** :
- สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาปลายสายวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนเทพศิรินทร์ร่มเกล้า จังหวัดกรุงเทพมหานคร ปีการศึกษา 2551
 - สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ) สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปีการศึกษา 2555
 - ศึกษาต่อวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2556 และสำเร็จการศึกษาในปี 2559
- การนำเสนอผลงาน** :
- ประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 6 ในวันที่ 11-12 กรกฎาคม 2559 ณ ศูนย์สันสกฤตศึกษา เขต ทวีวัฒนา กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้