

สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงและ
ผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ
สารสกัดกระเจียบแดงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF ROSELLE (*HIBICUS SABDARIFFA* LINN.)
EXTRACT AND ITS ANTIOXIDANT EFFICIENCY IN MEAT PRODUCTS AS
AFFECTED BY SUCROSE CONTENTS

ศุภามาศ มุสิกะ
SUPAMACH MUSIKA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

KMITL-2007-AI-M-053-051

สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและ
ผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ
สารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF ROSELLE (*HIBICUS SABDARIFFA* LINN.)
EXTRACT AND ITS ANTIOXIDANT EFFICIENCY IN MEAT PRODUCTS AS
AFFECTED BY SUCROSE CONTENTS

สุภามาศ มุสิกะ

SUPAMACH MUSIKA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2550

KMITL-2007-AI-M-053-051

**ANTIOXIDANT PROPERTIES OF ROSELLE (*HIBICUS SABDARIFFA* LINN.)
EXTRACT AND ITS ANTIOXIDANT EFFICIENCY IN MEAT PRODUCTS AS
AFFECTED BY SUCROSE CONTENTS**

SUPAMACH MUSIKA

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2007

KMITL-2007-AI-M-053-051

COPYRIGHT 2007

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์

สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัด
กระเจี๊ยบแดงและผลของน้ำตาลซูโครสต่อ
ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ
สารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

นักศึกษา

นางสาว สุภามาส มุสิกะ

รหัสประจำตัว

47063210

ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

พ.ศ.

2550

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสเปรียบเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ต่อประสิทธิภาพของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ 2 ชนิด คือ กุนเชียงและหมูแผ่น จากการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมด 21.39 และ 218.13 มิลลิกรัม/กรัม ในรูปของกรดแกลลิกและไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ และการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกโดยวิธี FTC ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ การต้านอนุมูลอิสระ DPPH การทำลาย H_2O_2 และการต้านอนุมูลอิสระ $^{\circ}OH$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินซีและโทรลอกซ์ พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ได้ใกล้เคียงกับโทรลอกซ์ แต่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH การทำลาย H_2O_2 และการต้านอนุมูลอิสระ $^{\circ}OH$ น้อยกว่าวิตามินซีและโทรลอกซ์

จากการศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในกุนเชียงและหมูแผ่นดิบ โดยเติมน้ำตาลซูโครสในกุนเชียงและหมูแผ่น ที่ระดับความเข้มข้น 0, 7, 13, 16 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากนั้นวิเคราะห์ค่า TBARS ของกุนเชียงและหมูแผ่นดิบในระหว่างการเก็บรักษาโดยบรรจุแบบสุญญากาศในถุงพลาสติกชนิด nylon/LLDPE ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 เซลเซียส) เป็นเวลา 28 วัน พบว่า การเติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงลงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหรือหมูแผ่นในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครส จะทำให้ประสิทธิภาพการ

ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลง กล่าวคือ ระดับของน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาสูงขึ้นมากกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมน้ำตาลซูโครส เมื่อเปรียบเทียบผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียง โดยเติมสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเติมน้ำตาลต่างชนิดกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลไซลิทอล ที่ระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน คือ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่า น้ำตาลซูโครสมีผลทำให้ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงลดลงมากที่สุด รองลงมาคือ กลูโคส ในขณะที่ไซลิทอล ซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ไม่มีผลต่อการลดประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียง

Thesis Title	Antioxidant properties of roselle (<i>Hibiscus sabdariffa</i> Linn.) extract and its antioxidant efficiency in meat products as affected by sucrose contents
Student	Miss Supamach Musika
Student ID	47063210
Degree	Master of Science
Program	Food Science
Year	2007
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Praphan Pinsirodom

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate antioxidant properties of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract and its antioxidant efficiency in raw Chinese sausages and pork chips as affected by sucrose contents compared to other sugars. Total polyphenol and total anthocyanin contents in roselle extract were analyzed. The total contents of polyphenols and anthocyanins in the extract were 21.39 and 218.13 mg/g extract expressed as gallic acid and cyanidin-3-glucoside, respectively. The roselle extract was then evaluated for its antiradical and antioxidant properties using different approaches; including DPPH free radical scavenging activity, $^{\circ}\text{OH}$ and H_2O_2 scavenging activity as well as inhibition of linoleic acid oxidation by ferric thiocyanate colorimetric method (FTC). Results showed that, the extract exhibited the highest capacity in inhibition of linoleic acid oxidation, following by DPPH free radical, H_2O_2 and $^{\circ}\text{OH}$ scavenging activity, respectively. Comparing to vitamin C and trolox, a capacity of the roselle extract to inhibit linoleic acid oxidation was similar to that of trolox, while all other antioxidant activities evaluated were relatively lower than those of both vitamin C and trolox.

Antioxidant efficiency of the roselle extract in raw Chinese sausages and pork chips as affected by sucrose contents at the concentration of 0, 7, 13, 16 and 20 %w/w were investigated by measuring changes in TBARS values during storage. The raw Chinese sausages and pork chips were vacuum-packed in laminate nylon/LLDPE bags and stored at room temperature (30 ± 3 °C). During 28-day storage, a decreased antioxidant efficiency of the roselle extract in the two products towards an increase of sucrose contents was observed. The increased TBARS values

of the Chinese sausage and pork chip samples were found to correlate with high concentration of sucrose contents. Effects of different sugars; glucose, sucrose and xylitol, added to the raw Chinese sausages on the antioxidant capacity of the roselle extract were studied. Comparing to glucose, addition of sucrose in the products resulted in grater reduction in antioxidant efficiency; whereas xylitol exhibited no influence on the antioxidant property of the roselle extract.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ ดร. ยุพร พิษกมุท และ ผศ. เขวถักษณ์ สุรพันธ์พิศิษฐ์ อาจารย์กรรมการสอบ หัวข้อวิทยานิพนธ์และ โครงร่างวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร. ประภาศรี เทพรักษา ผู้ทรงคุณวุฒิ ภายนอก จากภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ผู้ซึ่งให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณพี่ เพื่อน และ น้องนักศึกษาปริญญาโท และพี่ปริญญาเอก สาขาวิทยาศาสตร์การอาหารที่มีน้ำใจ ให้ความช่วยเหลืออย่างคิมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และขอขอบคุณ พี่น้อง ๆ และน้อง ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สุภามาศ มุสิกะ

สารบัญ

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

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ สารสกัดกระเจียบแดง.....	26
4.3 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ สารสกัดกระเจียบแดง.....	31
4.4 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารสกัดกระเจียบแดงในกุนเชียงและหมูแผ่น.....	33
4.5 ผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารสกัดกระเจียบแดงในกุนเชียง.....	37
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	39
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	39
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	40
บรรณานุกรม.....	41
ภาคผนวก.....	45
ภาคผนวก ก. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol contents) และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (total anthocyanin contents).....	46
ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol contents) และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (total anthocyanin contents).....	52
ภาคผนวก ค. การวิเคราะห์ค่า TBARS.....	63
ประวัติผู้เขียน.....	66

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 โครงสร้างหลักของแอนโรไซยานิน.....	9
3.1 ส่วนผสมสำหรับกุนเชียง.....	21
3.2 ส่วนผสมสำหรับหมูแผ่น.....	22
4.1 ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโรไซยานินทั้งหมดในสารสกัด กระเจี๊ยบแดงและกระเจี๊ยบแดงแห้ง.....	25
4.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ °OH ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับ ความเข้มข้นต่างกัน.....	27
4.3 ความสามารถในการทำลาย H ₂ O ₂ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้น ต่างกัน.....	29
4.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบ ต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง.....	30

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างฟลาวิลียม แคทไอออน (flavylium cation).....	9
2.2 โครงสร้างของเคลฟีนิดิน-3-แชนมูไบโอไซด์และไซยานิดิน-3-แชนมูไบโอไซด์ ที่พบในกระเจี๊ยบแดง.....	10
2.3 โครงสร้างของเคลฟีนิดิน-3-กลูโคไซด์และไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ที่พบใน กระเจี๊ยบแดง.....	10
2.4 โครงสร้างของไฮบิซซีทินและไฮบิซซีทริน.....	11
2.5 โครงสร้างของกรดโปรโตแคทีชีวอิค.....	11
2.6 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่ออัตราการสลายตัวของเพลาร์โกนินิดิน-3- กลูโคไซด์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส	12
4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ของสารละลายปฏิกิริยากับ เวลาในการเกิดปฏิกิริยาในการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด กระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน.....	26
4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร กับเวลาใน การเกิดปฏิกิริยาของสารละลายปฏิกิริยาในการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยา ออกซิเดชันโดยวิธี FTC ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน.....	28
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร กับเวลาใน การเกิดปฏิกิริยาของสารละลายปฏิกิริยาในการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยา ออกซิเดชันโดยวิธี FTC ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล ซูโครสต่าง ๆ กัน.....	32
4.4 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาทุเรียนที่เติมสารสกัด จากกระเจี๊ยบแดง 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ต่างกัน.....	33
4.5 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาทุเรียนที่เติมสารสกัด จากกระเจี๊ยบแดง 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ต่างกัน.....	34
4.6 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาทุเรียนที่เติมน้ำตาลซูโครส ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยไม่มีการเติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดง.	36

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาขุนเชิงคิบบที่เติมสารสกัดจาก กระเจี๊ยบแดง 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในสภาพที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน.....	37
ก 1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด.....	49
ก 2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานินเมื่อพีเอชในสารละลายเปลี่ยนไป.....	49
ข 1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย DPPH.....	54
ข 2 ปริมาณ DPPH ที่เหลือ เมื่อใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	55
ข 3 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $^{\circ}\text{OH}$ เมื่อใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดง ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน.....	57
ข 4 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี FTC ของ สารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน.....	60
ข 5 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลาย H_2O_2 เมื่อใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับ ความเข้มข้นต่างกัน.....	62

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

อาหารเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญในการดูแลสุขภาพ ปัจจุบันพบว่าการบริโภคพืชผักผลไม้ต่าง ๆ เป็นประจำมีส่วนช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น (Yeum *et al.*, 2003) สาเหตุเบื้องต้นสำคัญของการเกิดโรคร้ายแรงต่าง ๆ นั้นส่วนหนึ่งมีสาเหตุมาจากภาวะถูกออกซิไดซ์จนเกินสมดุล หรือ “oxidative stress” ซึ่งเป็นภาวะที่เกิดความไม่สมดุลขึ้นระหว่างการเกิดอนุมูลอิสระและกระบวนการป้องกันโดยเอนไซม์และสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์หรือร่างกาย (Prenesti *et al.*, 2007) โดยเกิดมีอนุมูลอิสระและสารเกี่ยวข้องที่เป็นผลผลิตของอนุมูลอิสระที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาในปริมาณที่สูงเกินกว่าที่กระบวนการป้องกันจะกำจัดได้ทัน ส่งผลให้สมบัติของชีวโมเลกุลเปลี่ยนไป

อาหารประเภทผักและผลไม้ นอกจากจะมีเส้นใยอาหารสูงแล้วยังเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมี (phytochemical) หลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ หรือต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี สารต้านอนุมูลอิสระที่พบเป็นส่วนใหญ่ในผักผลไม้ ได้แก่ กลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ที่มีมากมายหลายชนิด (Rhodes, 1996) โดยฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มใหญ่ที่กำลังได้รับความสนใจมาก ตัวอย่างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ฟลาโวน (flavone) ฟลาวานอล (flavanol) และแอนโทไซยานิน (anthocyanidins) เป็นต้น องค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืชหรือแม้แต่วิธีการเพาะปลูกของพืชนั้น ๆ

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

โดยทั่วไปสารที่ถือว่ามีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันควรมีสมบัติขจัดอนุมูลอิสระหรือหลายข้อต่อไปนี้ ได้แก่ สมบัติในการทำลายอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity)

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

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

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งประเด็นการศึกษาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกุนเชียงและหมูแผ่น รวมทั้งเปรียบเทียบผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในกุนเชียง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดกระเจี๊ยบแดง
2. วิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง
3. ศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงและหมูแผ่น
4. เปรียบเทียบผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด รวมถึงวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันและการต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง และศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงและหมูแผ่น รวมทั้งเปรียบเทียบผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกุนเชียง ข้อมูลที่ได้จากการทดลองทำให้ทราบถึงประโยชน์ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงต่อสุขภาพ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและ/หรือออกซิเดชันของกระเจี๊ยบแดง รวมถึงประสิทธิภาพของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ภายใต้สภาวะที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในส่วนผสม

บทที่ 2

ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระเจี๊ยบแดง

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

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

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

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

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

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

2.2 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ กลุ่มของสารที่มีอิเล็กตรอนวงนอกที่ยังไม่ได้จับคู่มากกว่าหรือเท่ากับหนึ่งอิเล็กตรอน (Halliwell *et al.*, 1995) ดังนั้นจึงมีความว่องไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย โดยทั่วไปภายในเซลล์อนุมูลอิสระส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของออกซิเจนไปยังโมเลกุลของน้ำ เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า reactive oxygen species (ROS) ซึ่งสารกลุ่มนี้ได้แก่ อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical, $^{\circ}\text{OH}$) ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, $^{\circ}\text{O}_2$) อนุพันธ์ของออกซิเจนบางตัว ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) ไฮโปคลอไรต์ (hypochlorous, HOCl) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มของสารที่เรียกว่า reactive nitrogen species (RNS) ที่สำคัญ ได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO°) และ เปอร์ออกซีไนไตรต์ (peroxynitrite, ONOO°) เป็นต้น (Kalyanaraman and Gutterman, 2003) ทั้งกลุ่มของ ROS และ RNS จัดเป็นแหล่งของอนุมูลอิสระที่สำคัญของร่างกาย

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

2.3 สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidants)

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

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

3. สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกลุ่มของแร่ธาตุ เช่น ซีลีเนียม และสังกะสี เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน
4. สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในกลุ่มของสารเคมีจากพืช (phytochemicals) เป็นสารเคมีจากพืชที่ไม่ใช่วิตามินและสารอาหาร เช่น แคโรทีน ไกลโคปีน แทนนิน และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น

2.4 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

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

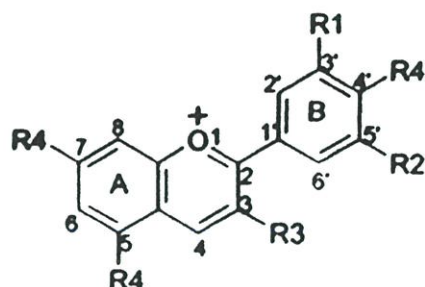
สารประกอบฟีนอลิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งสามารถพบได้โดยทั่วไปและมีความสำคัญประกอบด้วยฟีนอล (phenol, C_6) กรดฟีนอลิก (phenolic acids, C_6 - C_1) ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid, C_6 - C_3) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่กำลังได้รับความสนใจมากที่สุดในขณะนี้ จัดเป็นกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกพบมากที่สุดในบรรดาสารประกอบจากพืชทั้งหมด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

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

2.5 สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่พบในกระเจี๊ยบแดง

2.5.1 แอนโทไซยานิน (anthocyanins)

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



รูปที่ 2.1 โครงสร้างฟลาวิลียม แคทไอออน (flavylium cation) โดย R1 และ R2 คือ H, OH หรือ OCH₃; R3 คือ ไกลโคซิล (glycosyl) หรือ H; และ R4 คือ OH หรือ ไกลโคซิล (glycosyl)

ที่มา : Kong และคณะ (2003)

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

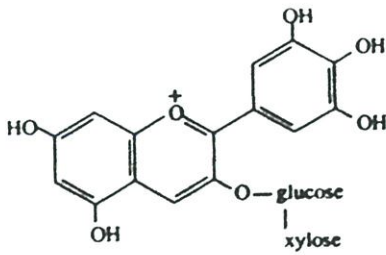
ตารางที่ 2.1 โครงสร้างหลักของแอนโทไซยานิน

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

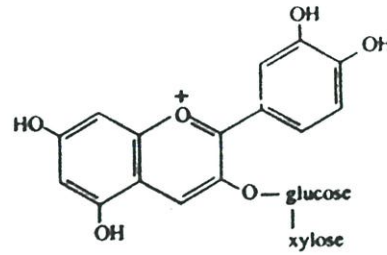
ที่มา : Julie และคณะ (2005)

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

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



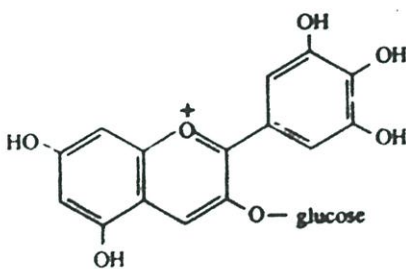
เดลฟิnidin-3-แซมบูไบโอไซด์
(delphinidin-3-sambubioside)



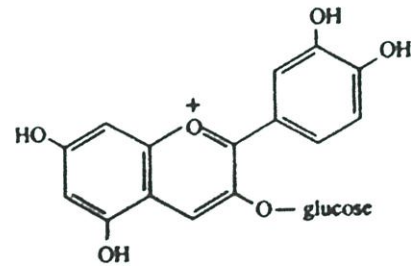
ไซยานิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์
(cyanidin-3-sambubioside)

รูปที่ 2.2 โครงสร้างของเดลฟิnidin-3-แซมบูไบโอไซด์และไซยานิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์ที่พบในกระเจี๊ยบแดง

ที่มา : Mishra และคณะ (1999)



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



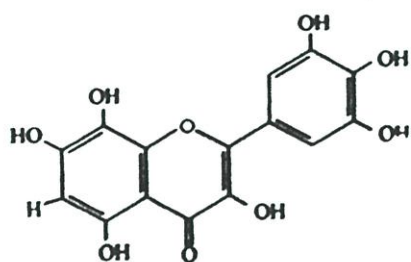
ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์
(cyanidin-3-glucoside)

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

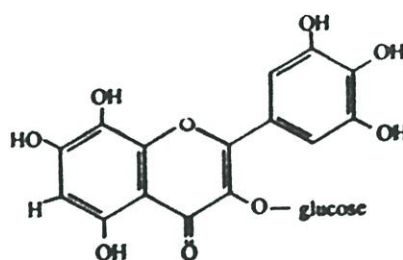
ที่มา : Mishra และคณะ (1999)

2.5.2 ไฮบิซซีทิน (hibiscetin) และไฮบิซซีทริน (hibiscitrin)

ไฮบิซซีทิน ($C_{15}H_{10}O_9$) และไฮบิซซีทริน ($C_{27}H_{30}O_{19}$) เป็นสารประกอบที่อยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์พบในกระเจี๊ยบแดงมีปริมาณน้อย แต่ก็มีสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ เช่นเดียวกับแอนโทไซยานิน โครงสร้างของสารประกอบทั้งสองชนิดแสดงดังรูปที่ 2.4



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



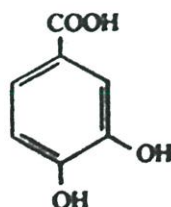
ไฮบิสซีทริน ($C_{27}H_{30}O_{19}$)
(hibiscitrin)

รูปที่ 2.4 โครงสร้างของไฮบิสซีทินและไฮบิสซีทริน

ที่มา : Mishra และคณะ (1999)

2.5.3 กรดโปรโตแคทีชีวอิก (Protocatechuric acid)

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



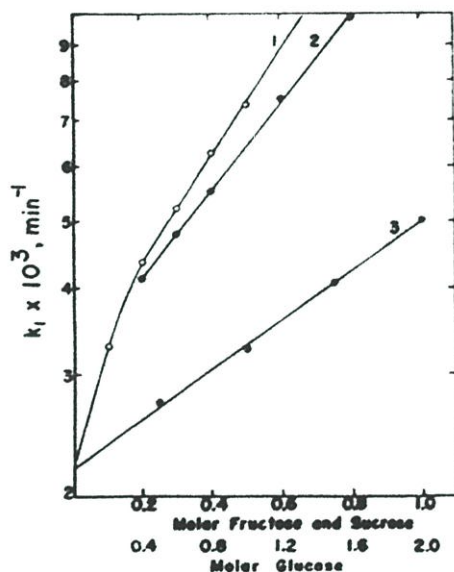
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของกรดโปรโตแคทีชีวอิก

ที่มา : Lee และคณะ (2002)

2.6 ผลของน้ำตาลต่อแอนโธไซยานิน

Tinley และ Bokian (1959) ศึกษาผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่ออัตราการสลายตัว (breakdown) ของเพลาร์โกนิน-3-กลูโคไซด์ (pelargonidin-3-glucoside) โดยทดสอบในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากัน

น้ำตาลฟรุกโตสมีผลทำให้เพลาร์โกนิติน-3-กลูโคไซด์ เกิดการสลายตัวมากที่สุด รองลงมาคือ ซูโครสและกลูโคส ตามลำดับ ส่วนซอบิทอลซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sugar alcohol) และกรด กลูโคนิกซึ่งเป็นน้ำตาลกรด (sugar acid) จะทำให้แอนโทไซยานินเกิดการสลายตัวช้าที่สุด และเมื่อ ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตส ซูโครส และกลูโคสเพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้เกิดการสลายตัว ของเพลาร์โกนิติน-3-กลูโคไซด์ ได้เร็วขึ้น โดยสังเกตจากค่าคงที่ของการสลายตัว (k_1) ดังรูปที่ 2.6



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

ที่มา : Tinley และ Bokian (1959)

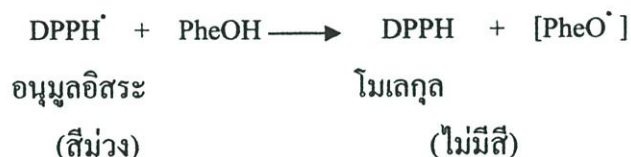
นอกจากนี้งานวิจัยของ Meschter (1953) ซึ่งอ้างถึงโดย Tinley และ Bokian (1959) ได้กล่าวว่า รงควัตถุที่มีอยู่ในสคอเบอร์รี่เกิดการสลายตัวได้ในสภาวะที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส โดยพบว่าน้ำตาลที่มีความเสถียรต่อความร้อนต่ำ (heat labile) เช่น น้ำตาลอะราบิโนส (arabinose) ลิวูโลส (levulose) และซอร์โบส (sorbose) จะเกิดการแตกตัวให้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ของ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล (5-hydroxymethylfurfural) และเฟอร์ฟิวรอล (furfural) ซึ่งจะมีผลทำให้รงควัตถุแอนโทไซยานินเกิดการสลายตัวได้มากกว่าน้ำตาลที่มีความคงตัวสูงกว่า ได้แก่ น้ำตาลมอลโตสและซอโรบิทอลซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ และเมื่อน้ำตาลเกิดการแตกตัวให้ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล และเฟอร์ฟิวรอล เป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นก็จะเร่งให้รงควัตถุในสคอเบอร์รี่เกิดการสลายตัวเร็วขึ้น

2.7 วิธีวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของตัวอย่าง

ในการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของตัวอย่างสารสกัดจากพืชจะมีปัจจัยหลายประการที่มีอิทธิพลต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่วิเคราะห์ได้ เช่น ความสามารถในการกระจายตัวในเฟสของน้ำมันและน้ำของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สภาพการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและสภาวะทางกายภาพของสารตั้งต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นต้น จากอิทธิพลของพารามิเตอร์เหล่านี้ ทำให้ไม่สามารถใช้วิธีใดเพียงวิธีหนึ่งในการตรวจสอบสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารใด ๆ วิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของอาหารหรือสารประกอบต่าง ๆ มีหลายวิธี สำหรับวิธีที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ มี 3 วิธี ดังนี้

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

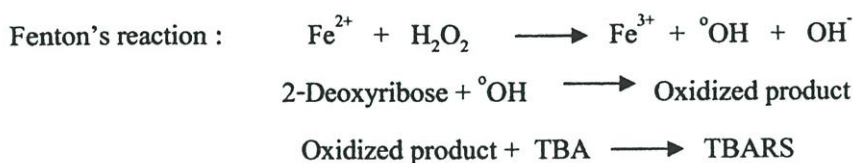
การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่นิยมใช้ทั่วไปในการประเมินประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัดจากพืช เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีสมบัติต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมได้ อนุมูลอิสระ DPPH จะถูกรีดิวซ์ไปเป็นโมเลกุล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



จากสมการปฏิกิริยาจะเห็นได้ว่าสารตัวอย่างที่มีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีจะทำให้สีม่วงจางหายไปมากขึ้น

2. The deoxyribose assay

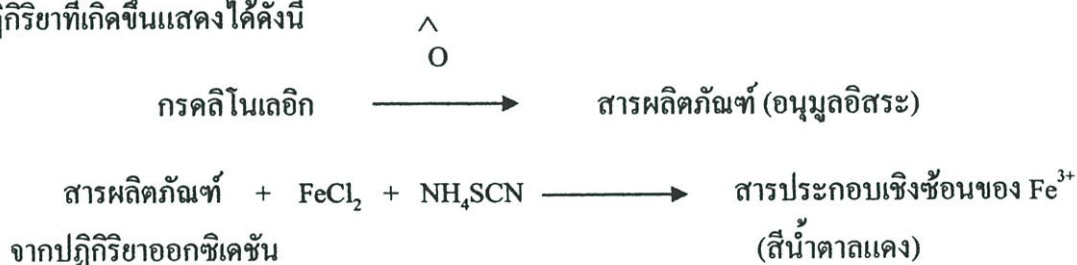
การติดตามความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH^{\cdot}) จะใช้วิธีวิเคราะห์การติดตามการสลายตัวของดีออกซีไรโบส (deoxyribose) โดยมีหลักการคือ Fe^{2+} จะทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ทำให้เกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล เนื่องจากปฏิกิริยา Fenton จากนั้นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลจะทำปฏิกิริยากับดีออกซีไรโบสทำให้เกิดการสลายตัวของดีออกซีไรโบสและเกิดสารผลิตภัณฑ์ที่ทำให้สารละลายปฏิกิริยามีสีชมพู ซึ่งดูดกลืนแสงได้ที่ 532 นาโนเมตร ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังนี้ (Aruoma, 1994)



จากสมการข้างต้นถ้ามีปริมาณอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเกิดขึ้นมาก จะทำให้คือออกซิไรโบสไรโบสสลายตัวมากขึ้น สารละลายปฏิกิริยาจึงมีสีชมพูเข้มขึ้น ดังนั้นถ้าตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดี จะทำให้สีชมพูจางลงได้มากกว่าตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระได้น้อย

3. Ferric thiocyanate colorimetric method (FTC)

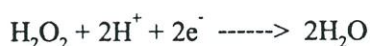
การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี FTC นิยมใช้ในการประเมินความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในอาหาร (antilipoperoxidant) โดยวัดความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังนี้



กรดไขมันไม่อิ่มตัวเมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเกิดสารผลิตภัณฑ์ เช่น RO^{\cdot} , ROO^{\cdot} เป็นต้น สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเหล่านี้ เมื่อทำปฏิกิริยากับเฟอร์รัสคลอไรด์ (FeCl_2) โดยไปรีดิวซ์ Fe^{2+} ให้เป็น Fe^{3+} และในสถานะที่มีแอมโมเนียมไซโอไซยาเนต (NH_4SCN) จะเกิดสารเชิงซ้อนที่มีสีน้ำตาลแดงของ Fe^{3+} ขึ้น สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร (Larrauri *et al.*, 1997) จากสมการปฏิกิริยาข้างต้น จะเห็นได้ว่าถ้าในระบบของสารละลายปฏิกิริยามีสารตัวอย่างที่มีสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ดี สารประกอบเชิงซ้อนน้ำตาลแดงจะเกิดน้อย

4. Hydrogen peroxide assay

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ H_2O_2 สามารถใช้ในการประเมินความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันอันเนื่องมาจาก อนุพันธ์ของออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (ROS) จะใช้วิธีที่รายงานโดย Yen และ Chen (1995) โดยวัดปริมาณ H_2O_2 ที่เหลืออยู่ ซึ่งดูดกลืนแสงได้ที่ 230 นาโนเมตร ดังสมการ



ในกรณีสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการทำลาย H_2O_2 ได้ดี จะทำให้เกิดการสลายตัวของ H_2O_2 มาก

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธีที่ใช้ในการทดลองนั้น จะใช้ค่า EC_{50} ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือทำลายอนุมูลอิสระลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ใดที่ให้ค่า EC_{50} ต่ำ แสดงว่า สารตัวอย่างนั้นมีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระหรือด้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในวิธีวิเคราะห์นั้น ๆ ได้ดี

2.8 ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์กึ่งแห้ง (intermediate moisture meat)

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

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

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

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

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

Pinsirodom และคณะ (2004) ศึกษาการใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดง เติมลงในส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ 2 ชนิดคือ หมูแผ่นและกุนเชียง โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับสารบีเอชเอ พบว่าการใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับ 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เติมลงในส่วนผสมของหมูแผ่นจะมีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม แต่การใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงเติมลงในส่วนผสมของกุนเชียงกลับมีผลในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในกุนเชียง ซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นผลมาจากน้ำตาลซูโครสซึ่งในส่วนผสมของกุนเชียงมีปริมาณสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหมูแผ่น

อย่างไรก็ตามการเติมสารสกัดในระดับดังกล่าวยังคงมีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำกว่าการใช้บีเอชที 0.01 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก

Hirunpanich และคณะ (2005) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในการลดภาวะไขมันในเลือดสูง (hypolipidemic property) และสมบัติในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของ LDL ในหนูทดลอง เมื่อหนูทดลองได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงร่วมกับสารสกัดกระเจี๊ยบแดง พบว่าระดับของโคเลสเตอรอล (serum cholesterol) ระดับไตรกลีเซอไรด์ (serum triglycerides) และระดับของ LDL (serum LDL) ลดลง นอกจากนี้สารสกัดดอกกระเจี๊ยบยังสามารถช่วยให้การเกิด thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) ลดลงอีกด้วย ดังนั้น สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชันของ LDL และการเกิดภาวะโคเลสเตอรอลสูงในหนูทดลองได้ดี

Liu และคณะ (2006) ศึกษาผลของการใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงในการป้องกันการอักเสบของเซลล์ตับในหนูทดลอง จากการถูกทำลายด้วยสารคาร์บอนเตตระคลอไรด์ พบว่า เมื่อหนูทดลองได้รับอาหารร่วมกับสารสกัดกระเจี๊ยบแดง สามารถลดการอักเสบของเซลล์ตับจากการถูกทำลายด้วยสารคาร์บอนเตตระคลอไรด์ โดยลดการสะสมของไขมันในเซลล์ตับ (steatosis) และลดการเหนียวแน่นทำให้เกิดพังผืดภายในเซลล์ตับ (fibrosis) ซึ่งมีผลทำให้การทำงานของตับเสื่อมลงจนเกิดภาวะตับวาย นอกจากนี้ยังพบว่าหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดกระเจี๊ยบแดงสามารถลดการทำงานของแอสพาร์เทต อะมิโนทรานเฟอเรส (aspartate aminotransferase, AST) และอะลานิน อะมิโนทรานเฟอเรส (alanine aminotransferase, ALT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการผิดปกติของตับ ขณะเดียวกันยังช่วยลดปริมาณเอนไซม์กลูตาไธโอนและยับยั้งการเกิดภาวะถูกออกซิไดซ์จนเกินสมดุล (oxidative stress) ที่ทำให้เกิด lipid peroxidative ในเซลล์ตับในสภาวะที่มีคาร์บอนเตตระคลอไรด์

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุคืบในการเตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบ

กระเจี๊ยบแดงแห้ง พันธุ์เกษตร ตราแพะภูเขา ชื่อจากเทศโก้โลดัส

3.1.2 วัสดุคืบในการเตรียมผลิตภัณฑ์กุนเชียง

- | | |
|-----------------------|-----------|
| - เนื้อหมูบริเวณสะโพก | - ผงพะโล้ |
| - มันแข็ง | - ผงเพรก |
| - น้ำตาลทราย | - ผงชูรส |
| - ซีอิ๊วขาว | - เกลือ |

3.1.3 เครื่องมือ

3.1.3.1 เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ทางเคมี

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

3.1.3.2 เครื่องมือที่ใช้เตรียมกุนเชียง

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

3.1.4 สารเคมี

- เอทานอล 95เปอร์เซ็นต์ (ethanol)	องค์การสุรา	ไทย
- 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)	Sigma	เยอรมัน
- โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	Merck	เยอรมัน
- Folin-Ciocalteu	BHD	อังกฤษ
- กรดแกลลิก (gallic acid)	Sigma	เยอรมัน
- กรดลิโนเลอิก (linoleic acid)	Aldrich	เยอรมัน
- เฟอรัสคลอไรด์ (iron (II) chloride)	Merck	เยอรมัน
- แอมโมเนียมไทโอไซยาเนต (ammonium thiocyanate)	Sigma	อเมริกา
- ซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide)	Merck	เยอรมัน
- กรดไทโอบาร์บิวทริก (TBA)	BHD	อังกฤษ
- กรดอะซิติก (acetic acid)	Lab scan analytical science	ไทย

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 ศึกษาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดจากกระเจียบแดง

3.2.1.1 การเตรียมสารสกัดจากกระเจียบแดง

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

3.2.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol contents)

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

3.2.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (total anthocyanin contents)

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

3.2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง

วิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ อนุพันธ์ของออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยาต่าง ๆ และการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนี้

- 1) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ตามวิธีที่รายงานโดย Murakami และคณะ (2004) รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงใน ภาคผนวก ข
- 2) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ($^{\circ}\text{OH}$) ตามวิธีที่รายงานโดย Aruoma (1994) รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงใน ภาคผนวก ข
- 3) ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก โดยวิธี Ferric thiocyanate colorimetric method (FTC) ตามวิธีที่รายงานโดย Larrauri และคณะ (1996) รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงใน ภาคผนวก ข
- 4) ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ตามวิธีที่รายงานโดย Yen และ Chen (1995) รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงใน ภาคผนวก ข

3.2.3 ศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate colorimetric method (FTC) ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง

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

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

3.2.4 ศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงและหมูแผ่น

3.2.4.1 สูตรมาตรฐานของกุนเชียง

สูตรมาตรฐานที่ใช้ในการเตรียมกุนเชียง ขั้นตอนการเตรียมจะเหมือนกับที่รายงานโดยสุริญา (2547) โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 3.1

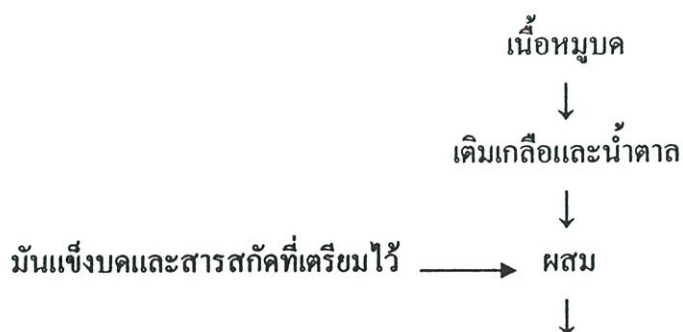
ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมสำหรับกุนเชียง

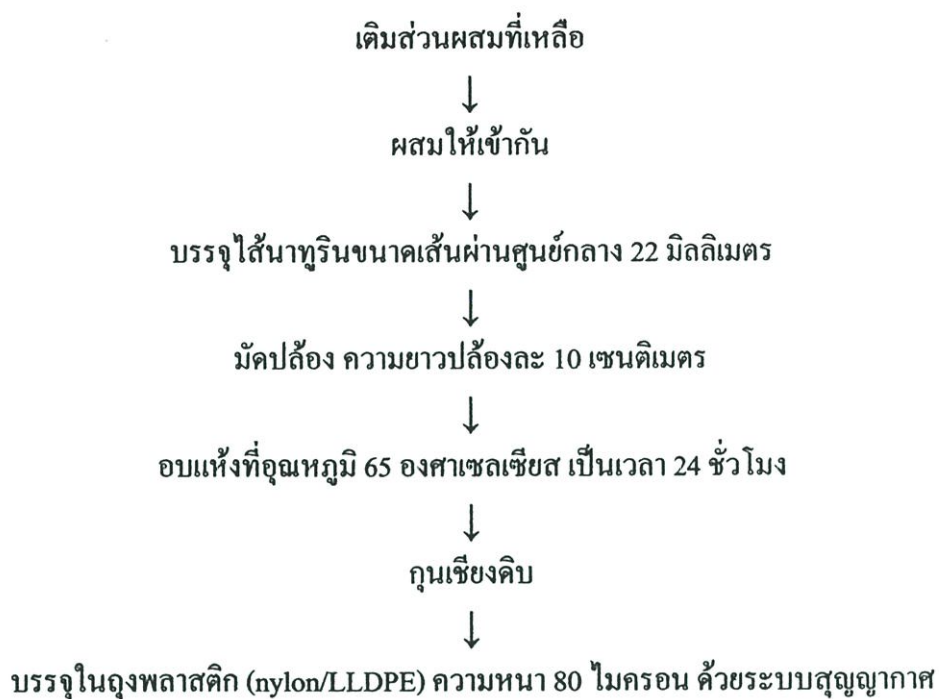
ส่วนผสม	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
เนื้อหมู	65
มันแข็ง	16
ผงเพรก	0.2
ผงพะโล้	0.1
เกลือ	1.8
น้ำตาลทราย	16.6
ผงชูรส	0.3

ที่มา : สุริญา (2547)

3.2.4.2 ขั้นตอนการเตรียมกุนเชียง

การเตรียมกุนเชียงจะใช้เนื้อหมูบริเวณสะโพกที่ตัดแต่งส่วนของไขมันด้านนอกแล้ว นำมาหั่นและบดหยาบผ่านแผ่นแวนที่มีรูตะแกรงขนาด 4 มิลลิเมตร ส่วนมันแข็งนำมาหั่นและบดหยาบผ่านแผ่นแวนที่มีรูตะแกรงขนาดเดียวกัน โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการเตรียมดังนี้





3.2.4.3 สูตรมาตรฐานของหมูแผ่น

สูตรมาตรฐานที่ใช้ในการเตรียมหมูแผ่น ขั้นตอนการเตรียมจะเหมือนกับที่รายงานโดยสุริยญา (2547) โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 3.2

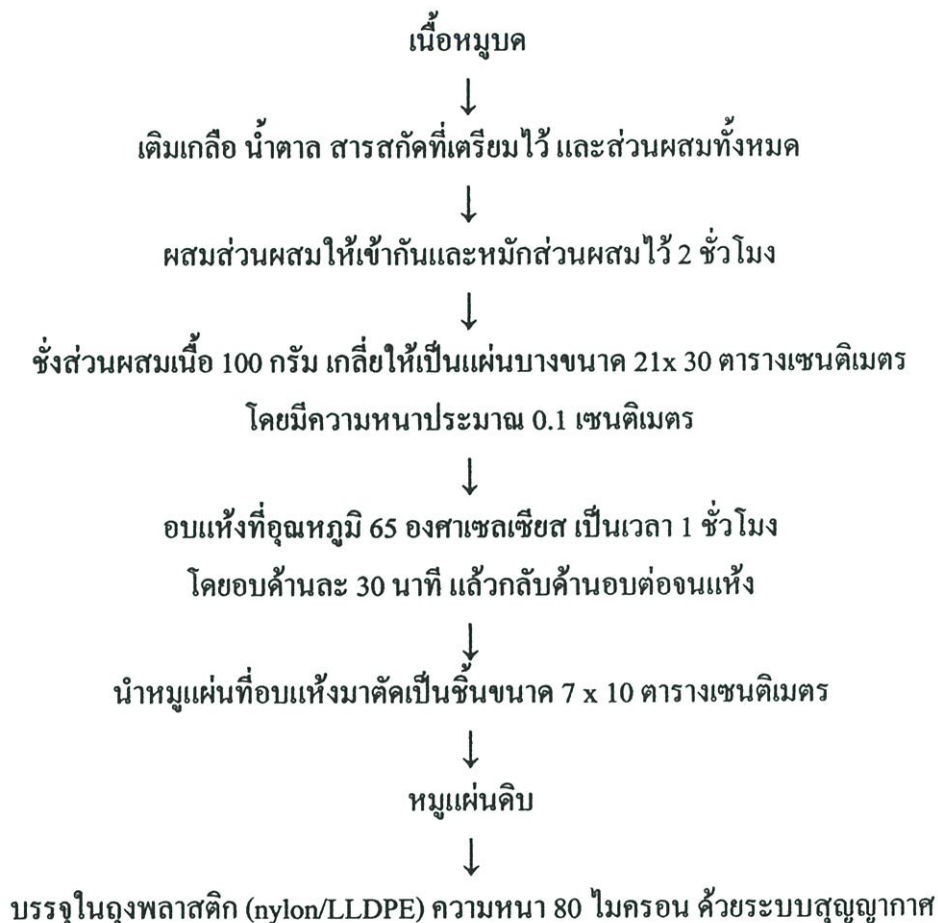
ตารางที่ 3.2 ส่วนผสมสำหรับหมูแผ่น

ส่วนผสม	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
เนื้อหมู	86.83
น้ำตาลทราย	7.23
ซีอิ๊วขาว	4.34
น้ำเปล่า	1.4
ผงเพรก	0.2

ที่มา : สุริยญา (2547)

3.2.4.4 ขั้นตอนการเตรียมหมูแผ่น

การเตรียมหมูแผ่นจะใช้เนื้อหมูบริเวณสะโพกที่ตัดแต่งส่วนของไขมันด้านนอกแล้วนำมาหั่นและบดหยาบผ่านแผ่นแว่นที่มีระแกรงขนาด 4 มิลลิเมตร โดยมีรายละเอียดขั้นตอนดังนี้



3.2.4.5 ศึกษาประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในกุนเชียงและหมูแผ่นที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสต่างกัน

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

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

3.2.5 ผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในกุนเชียง

เติมสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของส่วนผสม และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลไซลิทอล ที่ระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน คือ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของส่วนผสม ในส่วนผสมกุนเชียงและดำเนินการผลิตกุนเชียงตามขั้นตอนในข้อ 3.2.4.2 จนกระทั่งได้กุนเชียงดิบ นำมาบรรจุในถุงพลาสติก (nylon/LLDPE ความหนา 80 ไมครอน) ด้วยระบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) จากนั้นติดตามประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 1, 14 และ 28 ของการเก็บรักษามาวิเคราะห์ค่า thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) ตามวิธีที่รายงานโดย Shahidi และคณะ (1985) ศึกษาละเอียดวิธีการวิเคราะห์ ในภาคผนวก ก

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

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดกระเจียบแดง

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดกระเจียบแดงและในกระเจียบแดงแห้ง ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดกระเจียบแดงและกระเจียบแดงแห้ง

สารประกอบ	ปริมาณในสารสกัดกระเจียบแดง (มิลลิกรัม/กรัม)	ปริมาณในกระเจียบแดงแห้ง (มิลลิกรัม/100 กรัม)
สารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในรูปของกรดแกลลิก	21.39 ± 0.11	207.87 ± 1.02
แอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์	218.13 ± 8.28	$2,120.22 \pm 80.52$

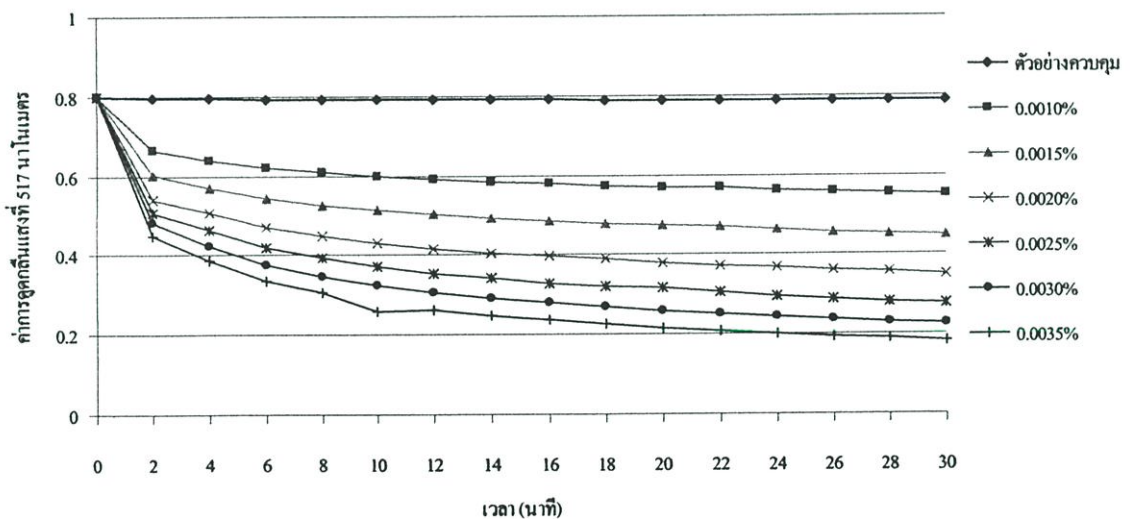
จากตารางที่ 4.1 สารสกัดกระเจียบแดงมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมด 21.39 ± 0.11 และ 218.13 ± 8.28 มิลลิกรัม/กรัม ในรูปของกรดแกลลิกและไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ตามลำดับ เมื่อคำนวณปริมาณของสารประกอบทั้งสองดังกล่าวในกระเจียบแดงแห้ง พบว่ากระเจียบแดงแห้งมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมด 207.87 ± 1.02 และ $2,120.22 \pm 80.52$ มิลลิกรัม/100 กรัม ในรูปของกรดแกลลิกและไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ตามลำดับ โดย Wong และคณะ (2002) รายงานว่า กระเจียบแดงมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมด เท่ากับ 296 และ 2,530 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ในรูปของกรดแกลลิกและเคิลฟิโนดอิน-3-กลูโคไซด์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมดที่ได้จากการทดลองซึ่งใช้กระเจียบแดงแห้งเปรียบเทียบกับที่รายงานโดย Wong และคณะ (2002) ซึ่งใช้กระเจียบแดงสด พบว่า ในกระเจียบแดงแห้งที่ได้จากการทดลองจะมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมดน้อยกว่าในกระเจียบแดงสด อาจเป็นเพราะว่าการนำกระเจียบแดงสดมาทำให้แห้งนั้นอาจทำให้สารสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลงไปได้ และปริมาณสารสำคัญในกระเจียบแดงหรือพืชชนิดอื่น ๆ ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ฤดูกาลเก็บเกี่ยว ระยะเวลาที่เก็บพืช สภาพดิน สภาพอากาศ ปริมาณน้ำ ชนิดและปริมาณสัดส่วนของปุ๋ยและ

อาหารเสริม เป็นต้น แต่ผลดีของการทำพืชสดให้แห้งจะช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีอยู่ในพืชสดนั้น (รัตนา, 2547) นอกจากนี้ Du และ Francis (1973) พบว่า กระเจี๊ยบแดงมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด เท่ากับ 1,500 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ในรูปของ เคลฟินิดิน-3-กลูโคไซด์

4.2 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง

4.2.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 0.0010 - 0.0035 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา ในกรณีตัวอย่างสารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดี จะทำให้สีม่วงแดงของสารละลาย DPPH จางลงได้มาก และเมื่อติดตามสีม่วงแดงของสารละลายปฏิกิริยาที่เปลี่ยนแปลงไป โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ให้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ของสารละลายปฏิกิริยากับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาในการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาควบคุม (control) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ประมาณ 0.8 และคงที่ตลอดระยะเวลาของปฏิกิริยา 30 นาที แต่ในกรณีตัวอย่างสารสกัดกระเจี๊ยบแดง พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่า

การดูดกลืนแสงของสารละลายปฏิกิริยาลดลงมากขึ้น แสดงว่า สารสกัดกระเจียบแดงมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี โดยประสิทธิภาพการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH จะสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดกระเจียบแดงมากขึ้น กล่าวคือ ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 30 นาที เปอร์เซ็นต์ DPPH ลดลงจาก 68.51 เป็น 22.63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดกระเจียบแดงเพิ่มขึ้นจาก 0.0010 เป็น 0.0035 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา

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

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

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

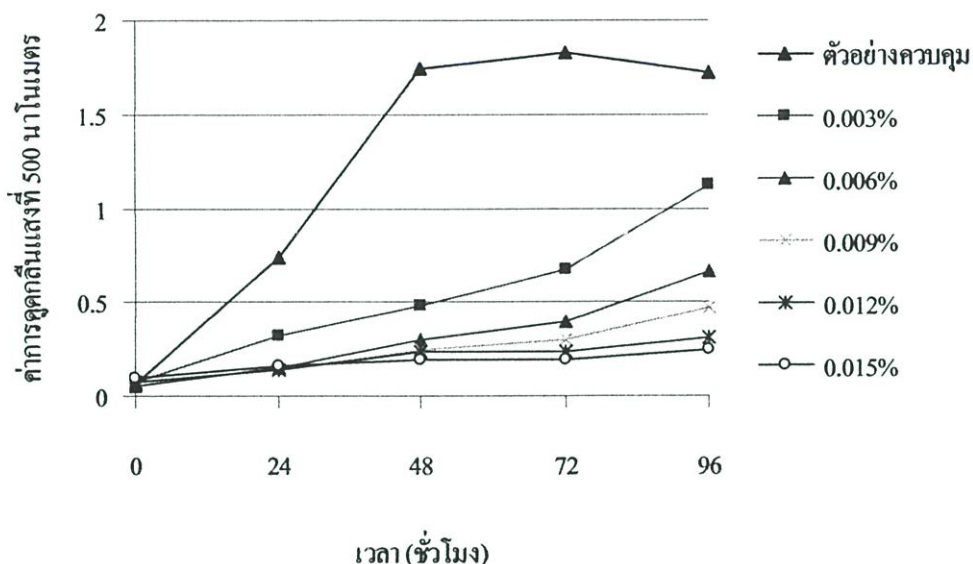
ระดับความเข้มข้น ($\times 10^{-3}$ เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก/ปริมาตรสารละลายปฏิกิริยา)	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $^{\circ}\text{OH}$ ของสารสกัดกระเจียบแดง (เปอร์เซ็นต์)
0.2	44.39 ± 0.07
0.4	46.40 ± 2.11
0.6	48.17 ± 1.35
0.8	49.50 ± 1.39
1.0	51.36 ± 0.17

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

4.2.3 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC

จากการศึกษาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดง ที่ระดับความเข้มข้น 0.003 - 0.015 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา โดยวิธี FTC ซึ่งมีหลักการคือ วัดปริมาณเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในขั้นเริ่มต้น (initiatial stage) ของปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) โดยเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไปออกซิไดซ์ Fe^{2+} ไป

เป็น Fe^{3+} ในสภาวะที่มีแอมโมเนียมไรโอไซยานนท์ Fe^{3+} จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีแดง และสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ 500 นาโนเมตร ดังนั้นถ้ามีปริมาณเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นในปฏิกิริยามาก สีแดงที่เกิดขึ้นก็จะเข้มมากผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของสารละลายปฏิกิริยาในการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิโดยวิธี FTC ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

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

4.2.4 ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการทำลาย H_2O_2 ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 0.025 ถึง 0.125 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตรสารละลายปฏิกิริยา ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการทำลาย H_2O_2 ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

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

เมื่อพิจารณาความสามารถในการทำลาย H_2O_2 ของสกัดกระเจี๊ยบแดง จากผลการทดลองในตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่า เมื่อปริมาณของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเพิ่มขึ้น จาก 0.025 เป็น 0.125 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา ความสามารถในการทำลาย H_2O_2 จะมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 33.92 เป็น 59.64 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการทำลาย H_2O_2 ได้ดี

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธีที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 วิธี จะใช้ค่า EC_{50} โดยคำนวณให้อยู่ในหน่วยของมิลลิกรัมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงต่อมิลลิกรัมของอนุมูลอิสระหรือสารตั้งต้นของปฏิกิริยานั้น ๆ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ใดที่ให้ค่า EC_{50} ต่ำ แสดงว่า ตัวอย่างสารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระหรือด้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในวิธีวิเคราะห์นั้น ๆ ได้ดี ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง

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

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง โดยใช้ EC₅₀ ซึ่งหมายถึงปริมาณของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ต้องการใช้ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันลง 50 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ชัดเจนว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรคลิโนเลอิก (วิธี FTC) ได้ดีที่สุดในแง่ของค่า EC₅₀ ที่ต่ำที่สุดนั่นเอง รองลงมาคือการต้านอนุมูลอิสระ DPPH การทำลาย H₂O₂ และการต้านอนุมูลอิสระ °OH ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับวิตามินซีและโทรลอกซ์ พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ได้ใกล้เคียงกับโทรลอกซ์ แต่กลับพบว่าวิตามินซีมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ค่าที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธีนี้ สารละลายปฏิกิริยาจะอยู่ในรูปของอิมัลชัน ซึ่งถ้าสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมีสมบัติละลายได้ดีในไขมัน (lipophilic) สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะจับอยู่กับน้ำมันที่บริเวณผิวสัมผัส (interface) ระหว่างน้ำมันและน้ำ ซึ่งจะช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี แต่สำหรับวิตามินซีซึ่งเป็นสารที่ละลายได้ดีในน้ำ (hydrophilic) จึงแยกไปอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำมากกว่าที่จะจับอยู่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำมันและน้ำ ดังนั้นประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันจึงต่ำ (Frankel and Meyer, 2000)

เมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง พบว่ามีค่า EC₅₀ มากกว่าวิตามินซีและโทรลอกซ์ ประมาณ 6.8 และ 4.4 เท่า ตามลำดับ สำหรับค่า EC₅₀ ของความสามารถในการทำลาย H₂O₂ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง จะสูงกว่าของวิตามินซีและ

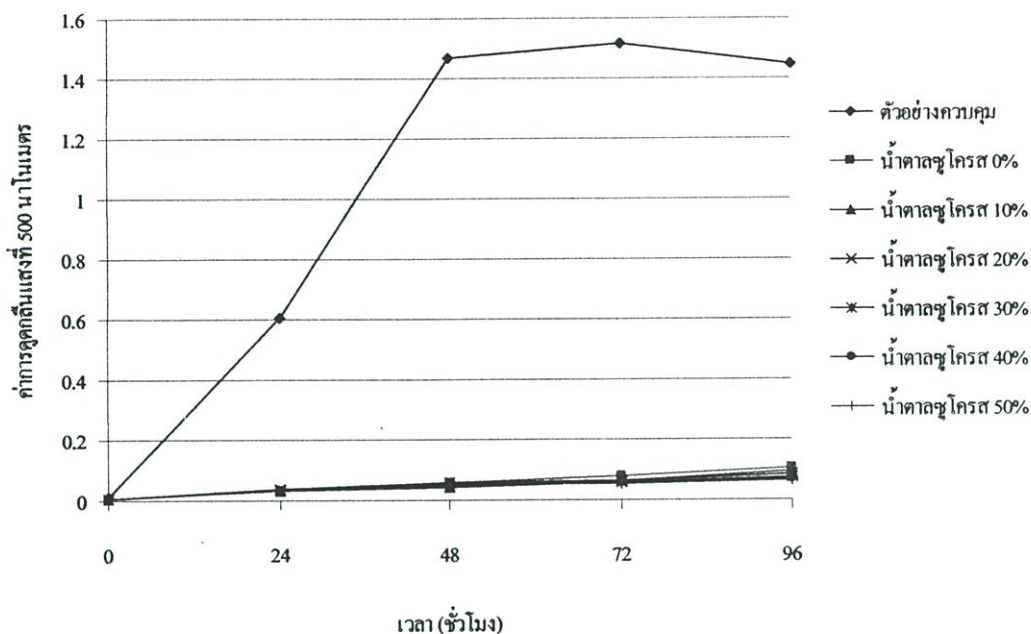
โทรลอกซ์ ประมาณ 2.5 และ 5.5 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ ค่า EC_{50} ในการต้านอนุมูลอิสระ $^{\circ}OH$ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีค่ามากกว่าโทรลอกซ์ประมาณ 1.7 เท่า แต่มีค่าสูงกว่าวิตามินซีมากถึง 178 เท่า แสดงว่าวิตามินซีมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $^{\circ}OH$ ได้ดีกว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงมาก จากข้อมูลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า วิตามินซีและโทรลอกซ์มีประสิทธิภาพในการทำลาย H_2O_2 และการต้านอนุมูลอิสระ $^{\circ}OH$ ได้ดีกว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดง

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงกับวิตามินซีและโทรลอกซ์ ที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 วิธีข้างต้น พบว่า โดยส่วนใหญ่สารสกัดกระเจี๊ยบแดงจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำกว่าวิตามินซีและโทรลอกซ์ เนื่องจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดงจะอยู่ในรูปของสารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งเป็นสารสกัดจากพืชที่นำมาใช้โดยไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ มีองค์ประกอบของสารประกอบหลายชนิด ย่อมมีผลทำให้มีประสิทธิภาพด้อยกว่าวิตามินซีและโทรลอกซ์ซึ่งอยู่ในรูปของสารบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในตารางที่ 4.4 พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ได้ใกล้เคียงกับโทรลอกซ์ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเป็นสารต้านออกซิเดชันธรรมชาติที่ดีและอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป

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

4.3 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง

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

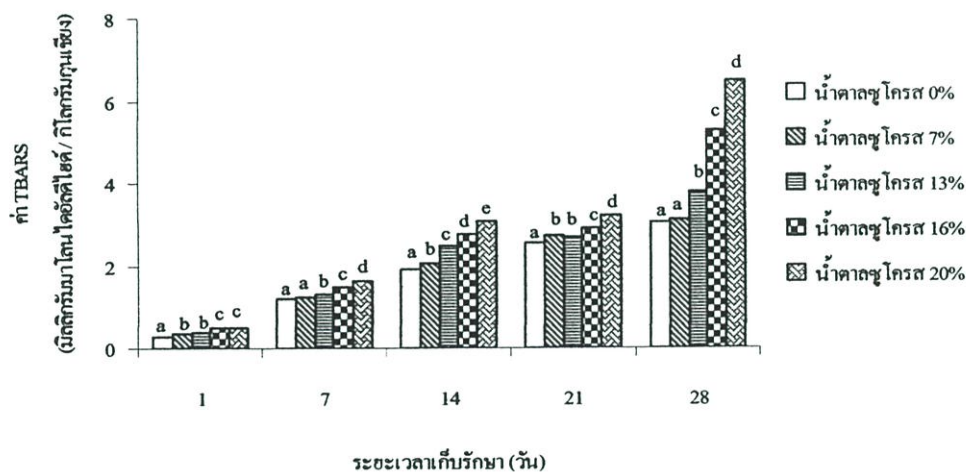


รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของสารละลายปฏิกิริยาในการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ กัน

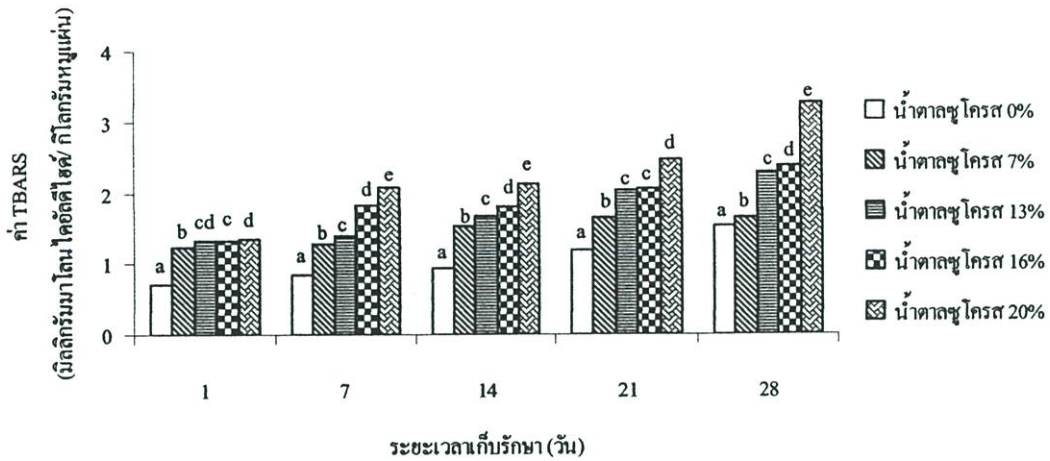
จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสทุกระดับ การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตรของสารละลายปฏิกิริยาที่เวลาต่าง ๆ มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ใกล้เคียงกันที่ทุกระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ดังนั้นสถานะที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่สามารถตรวจพบผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากสถานะในหลอดทดลองมีความเข้มข้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่สูงเกินไป (0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยา) รวมทั้งในกุนเชียงจะมีองค์ประกอบทางเคมีอื่น ๆ ที่แตกต่างจากในหลอดทดลอง จึงทำให้เห็นผลการทดลองแตกต่างกัน และไม่เห็นผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเป็นโปรออกซิแดนซ์ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในหลอดทดลอง

4.4 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจียบแดงในกุนเชียงและหมูแผ่น

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



รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษากุนเชียงดิบที่เติมสารสกัดจากกระเจียบแดง 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่างกัน หมายเหตุ a-e อักษรที่ต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่า TBARS ของตัวอย่างในวันที่เก็บรักษาเดียวกัน



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

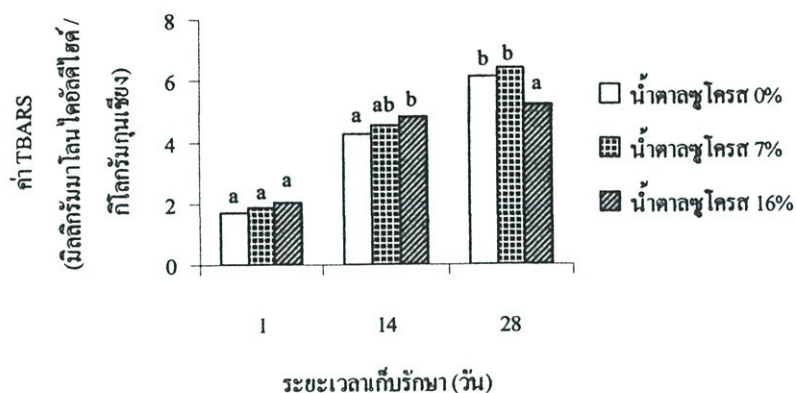
จากรูปที่ 4.4 จะเห็นได้ว่า น้ำตาลซูโครสมีผลต่อค่า TBARS ของกุนเชียงคิปที่เดิมสารสกัดกระเจียบแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยจะเห็นได้ชัดเจนว่าเมื่อระดับของน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ผลิตภัณฑ์มีค่า TBARS เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาและสูงกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำตาลซูโครส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

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

เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ของตัวอย่างหมูแผ่นดังกล่าว เป็นไปในลักษณะเดียวกันกับกรณีของตัวอย่างกุ้งเชียง

จากผลการทดลองข้างต้นเมื่อเปรียบเทียบค่า TBARS ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ทั้ง 2 ชนิด คือ กุ้งเชียงและหมูแผ่นดิบที่เติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่า ที่ระดับ น้ำตาลซูโครสเท่ากัน กุ้งเชียงดิบจะมีค่า TBARS สูงกว่าในหมูแผ่นดิบมาก ตัวอย่างเช่น ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษาตัวอย่างกุ้งเชียงที่เติมน้ำตาลซูโครส 16 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่า TBARS เท่ากับ 5.23 มิลลิกรัมมาโลนไดอัล-ดีไฮด์/กิโลกรัมกุ้งเชียง ในขณะที่ตัวอย่างหมูแผ่นที่เติมน้ำตาลเท่ากันมีค่า TBARS เท่ากับ 2.37 มิลลิกรัมมาโลนไดอัลดีไฮด์/กิโลกรัมหมูแผ่น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าใน กุ้งเชียงจะมีส่วนผสมของไขมัน (มันแข็ง) ปริมาณที่สูงกว่าหมูแผ่นประมาณ 2 เท่า นอกจากนี้ ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการผลิตกุ้งเชียงนั้น ใช้เวลาในการอบแห้งที่นานกว่าหมูแผ่นมาก กล่าวคือ กุ้งเชียงจะใช้เวลาในการอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง ในขณะที่ หมูแผ่นใช้เวลาอบที่อุณหภูมิเดียวกันเพียง 1-2 ชั่วโมง ดังนั้นกุ้งเชียงจึงมีโอกาสเกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชันของไขมัน ได้มากกว่าหมูแผ่น การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS จึงสูงกว่าในหมูแผ่นดิบ

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ชัดเจนว่า กุ้งเชียงและหมูแผ่นดิบที่เติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสจะทำให้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยา ออกซิเดชันลดลง และระดับของน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาสูงขึ้นกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมน้ำตาลซูโครส จากผลการทดลองใน รูปที่ 4.4 อาจเกิดคำถามขึ้นว่าในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสเพียงอย่างเดียว โดยไม่มีการเติมสารสกัด กระเจี๊ยบแดง จะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า TBARS ในตัวอย่างกุ้งเชียงหรือไม่ และเพื่อเป็นการ ยืนยันผลของน้ำตาลซูโครสต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงใน ผลิตภัณฑ์กุ้งเชียง จึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมอีกครั้ง โดยเตรียมกุ้งเชียงดิบที่เติมปริมาณน้ำตาล ซูโครสแตกต่างกัน คือ 0, 7 และ 16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยไม่มีการเติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดง นำมาบรรจุในถุงพลาสติก (nylon/LLDPE ความหนา 80 ไมครอน) ด้วยระบบสุญญากาศ เก็บรักษา ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) จากนั้นเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่า TBARS ทุก 14 วัน เป็น เวลา 28 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษาขุนเชียงดิบที่เติมน้ำตาลชูโครสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยไม่มีการเติมสารสกัดกระเจียบแดง

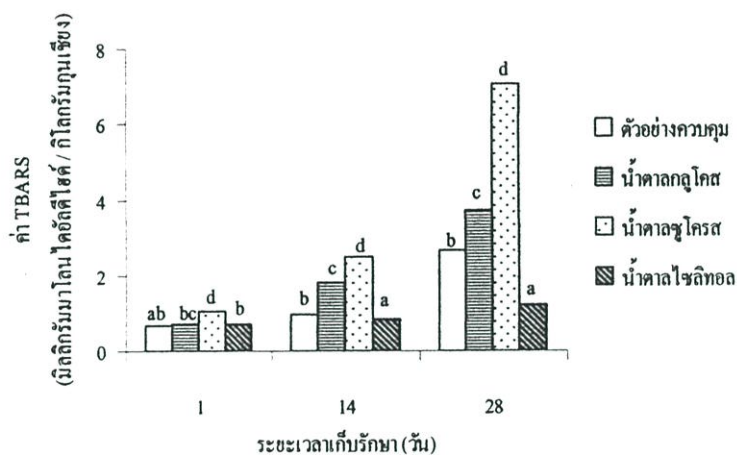
หมายเหตุ a-b อักษรที่ต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่า TBARS ของตัวอย่างในวันที่เก็บรักษาเดียวกัน

จากรูปที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าในสถานะที่ไม่มีสารสกัดกระเจียบแดง ตัวอย่างขุนเชียงที่เติมน้ำตาลชูโครสที่ระดับ 0, 7 และ 16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีค่า TBARS ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษา อยู่ในช่วง 5 – 7 มิลลิกรัมมาโลนไดอัลดีไฮด์/กิโลกรัมขุนเชียง ซึ่งมีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยขุนเชียงที่เติมน้ำตาลชูโครสที่ระดับ 7 และ 16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีค่า TBARS ต่ำกว่าหรือใกล้เคียงกับขุนเชียงที่ไม่มีการเติมน้ำตาลชูโครส จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของค่า TBARS ในตัวอย่างขุนเชียงที่เติมสารสกัดกระเจียบแดงและน้ำตาลชูโครสที่ปริมาณต่าง ๆ กัน ตามผลการทดลองในรูปที่ 4.4 นั้นจึงไม่ใช่เป็นผลของน้ำตาลชูโครสเอง แต่เป็นผลมาจากการสลายตัวของแอนโทไซยานินในสถานะที่มีน้ำตาลชูโครสอยู่นั่นเอง

จากผลการทดลองทั้งหมดข้างต้นสรุปได้ว่าการเติมสารสกัดกระเจียบแดงลงในผลิตภัณฑ์ขุนเชียงและหมูแผ่นในสถานะที่มีน้ำตาลชูโครสจะทำให้แอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุสำคัญในสารสกัดกระเจียบแดงซึ่งทำหน้าที่ด้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดการสลายตัว ทำให้ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลง โดยระดับการสลายตัวของแอนโทไซยานินจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลชูโครสสูงขึ้น สำหรับกรณีของน้ำตาลชูโครสมีผลต่อการเป็นโปรออกซิแดนซ์ของสารสกัดกระเจียบแดงตามที่ Pinsirotom และคณะ (2004) ได้นำเสนอไว้ นั้นยังไม่สามารถยืนยันได้จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.4 นี้ เนื่องจากต้องมีการทดลองที่เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในตัวอย่างขุนเชียงที่เติมสารสกัดกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันและไม่เติมสารสกัดกระเจียบแดง (ตัวอย่างควบคุม) ในสถานะที่มีน้ำตาลชูโครสเท่ากัน ซึ่งควรที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

4.5 ผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในกุนเชียง

จากการทดลองเปรียบเทียบผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียง โดยเติมสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเติมน้ำตาลต่างชนิดกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และไซลิทอล ที่ระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน คือ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ลงในส่วนผสมกุนเชียงและดำเนินการผลิตกุนเชียงตามขั้นตอนจนกระทั่งได้กุนเชียงดิบ นำมาบรรจุในถุงพลาสติก (nylon/LLDPE ความหนา 80 ไมครอน) ด้วยระบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) วิเคราะห์ค่า TBARS ของกุนเชียงทุก 14 วัน เป็นเวลา 28 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในระหว่างการเก็บรักษา กุนเชียงดิบที่เติมสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในสถานะที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน

หมายเหตุ a-d อักษรที่ต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่า TBARS ของตัวอย่างกุนเชียงในวันที่เก็บรักษาเดียวกัน

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

ไซลิทอลมีผลต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานินน้อยเช่นเดียวกับซอร์บิทอล นอกจากนี้ข้อมูลจากผลการทดลองไม่สามารถสรุปได้ว่า การสลายตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในสภาวะที่มีน้ำตาลจะเป็นผลของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) หรือน้ำตาลนอนรีดิวซ์ (non-reducing sugar) เนื่องจากน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลไซลิทอลจัดเป็นน้ำตาลนอนรีดิวซ์เหมือนกัน แต่ให้ผลที่แตกต่างกัน

ข้อมูลงานวิจัยของ Tinley และ Bockian (1959) ข้างต้นจึงสนับสนุนผลการทดลองที่ได้ในรูปที่ 4.7 เป็นอย่างดี กล่าวคือ น้ำตาลซูโครสซึ่งมีผลต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานินสูงกว่าน้ำตาลกลูโคส จึงทำให้ตัวอย่างกุญเชียงที่เติมน้ำตาลซูโครสมีค่า TBARS สูงกว่าตัวอย่างกุญเชียงที่เติมน้ำตาลกลูโคส ในขณะที่ตัวอย่างกุญเชียงที่เติมน้ำตาลไซลิทอลซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์นั้นมีค่า TBARS ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษาต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) สาเหตุที่น้ำตาลไซลิทอลมีผลในการทำให้ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมนี้ ยังไม่ทราบแน่ชัด ซึ่งควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีปริมาณสารประกอบ โพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมด 21.39 ± 0.11 และ 218.13 ± 8.28 มิลลิกรัม/กรัม ในรูปของกรดแกลลิกและไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ตามลำดับ เมื่อคำนวณปริมาณของสารประกอบทั้งสองดังกล่าวในกระเจี๊ยบแดงแห้ง พบว่ากระเจี๊ยบแดงแห้งมีปริมาณสารประกอบ โพลีฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมด 207.87 ± 1.02 และ $2,120.22 \pm 80.52$ กรัม/100 กรัม ในรูปของกรดแกลลิกและไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ และการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ คือ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $^{\circ}\text{OH}$ ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC และความสามารถในการทำลาย H_2O_2 ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรคลิโนเลอิก (วิธี FTC) ได้ดีที่สุด รองลงมาคือการต้านอนุมูลอิสระ DPPH การทำลาย H_2O_2 และการต้านอนุมูลอิสระ $^{\circ}\text{OH}$ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินซีและโทรลอกซ์ พบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC ได้ใกล้เคียงกับโทรลอกซ์ แต่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH การทำลาย H_2O_2 และการต้านอนุมูลอิสระ $^{\circ}\text{OH}$ น้อยกว่าวิตามินซีและโทรลอกซ์

เมื่อศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง โดยวิธี FTC โดยทดสอบในหลอดทดลอง พบว่า ไม่สามารถตรวจพบผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง

การศึกษผลของน้ำตาลซูโครสต่อประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในตัวอย่างกุนเชียงและหมูแผ่น พบว่า การเติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงลงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงหรือหมูแผ่นในสภาวะที่มีน้ำตาลซูโครสจะทำให้ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันลดลง โดยการลดลงของประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเห็นได้ชัดเจนขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูงขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบผลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และไซลิทอล ต่อสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียง พบว่า น้ำตาลซูโครสมีผลทำให้ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ

สารสกัดกระเจี๊ยบแดงลดลงมากที่สุด รองลงมาคือ กลูโคส ในขณะที่ไซลิทอล ซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ไม่มีผลต่อการลดประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียง

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองที่ได้มีเหตุผลสนับสนุนชัดเจนว่า น้ำตาลซูโครสมีผลต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดง ทำให้ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์กุนเชียงลดลง อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าผลที่เกิดขึ้นดังกล่าวเป็นสาเหตุทำให้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงแสดงสมบัติโปรออกซิแดนซ์ตามที่เสนอโดย Pinsirodom และคณะ (2004) ด้วยหรือไม่ ดังนั้นจึงน่าจะมีการทดลองเพื่อหาข้อสรุปเกี่ยวกับผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเป็นโปรออกซิแดนซ์ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในกุนเชียงต่อไป

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

บรรณานุกรม

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

- Chang, Y.C., Huang, H.P., Hsu J.D., Yang, S.F., Wang, C.J., 2004. *Hibiscus* anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205 : 201–212.
- Du, C.T., Francis, F.L. 1973. Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J. Food Sci.* 38 : 810-812.
- Frankel, E.N., Meyer, A.S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 80 : 1925-1941.
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by uv-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*. (Ronald, E.W., Terry, E.A., Haejung, A., Eric, A.D., Michael, H.P., Davis, S.R., Steven, J.S., Charles, F.S., Peter, S. eds.). New York : John Wiley & Sons, Inc.
- Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S., Aruoma, O.I. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35 : 7–20.
- Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N.P., Bunyapraphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A., Suthissang, C. 2006. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *J. Ethnopharmacol.* 103 : 252–260.
- Huang, T.C., Nip, W.K. 2001. Intermediate moisture meat and dehydrated meat. *In Meat science and applications*. (Hui, Y.H., Nip, W.K., Rogers, R.W., Young, O.A. eds). New York : Mercel Dekker.
- Julie, B., Alan, C., Garry, G.D. 2005. Potential health benefits of berries. *Current Nutr. & Food Sci.* 1 : 71-86.
- Kalyanaraman, B., Gutterman, D.D. 2003. Vascular signaling by free radicals prologue: vascular effects of free radical. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285 : 2253–2254.
- Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T., Brouillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem.* 64 : 923-933.
- Larrauri, J.A., Goni, I., Martin-Carron, N., Ruperez, P., Saura-Calixto, F. 1996. Measurement of health-promoting properties in fruit dietary fibers: antioxidant capacity, fermentability and glucose retardation index. *J. Sci. Food Agric.* 71 : 515-519.
- Lawrie, R.A. 1991. The storage and preservation of meat-II. *In Meat science*. 5th ed. Oxford : Pergaman Press.

- Lee, M.J., Chou, F.P., Tseng, T.H., Hsieh, M.H., Lin, M.C., Wang, C.J. 2002. *Hibiscus* protocatechuic acid or esculetin can inhibit oxidative LDL induced by either copper ion or nitric oxide donor. *J. Agric. Food Chem.* 50 : 2130-2136.
- Lui, J.Y., Chen, C.C., Wang, W.H., Hsu, J.D., Yang, M.Y., Wang, C.J. 2005. The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *Food Chem. Toxicol.* 44 : 336-343.
- Mishra, M., Shukla, Y.N., Jain, S.P., Kumar, S. 1999. Chemistry and pharmacology of some *Hibiscus* spp.- a review. *J. Med. Aromatic Plant Sci.* 24 : 1169-1186.
- Morton, J.F. 1987. Roselle. In *Fruits of warm climates*. (Curtis C.F., ed.). Miami : Winterville, N.C. (Online). Available : <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/roselle.html>.
- Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. 2004. Effect of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. *J. Food Sci.* 69 : FCT7-FCT10.
- Pinsirodom, P., Phoditsiri, S., Surapunpid, Y. 2004. Antioxidant and pro-oxidant activities of red sorrel (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract in ethnic meat products. The 10th World Congress on Clinical Nutrition, Nov. 30-Dec. 3, Phuket, Thailand. 167p. (Abstract).
- Prenci, E., Berto, S., Daniele, P.G., Toso S. 2007. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chem.* 100 : 433-438.
- Rhodes, M. J. 1996. Physiologically-active compounds in plant food : an overview. *Proc. Nutr. Soc.*, 55 : 371-384.
- Shahidi, F., Rubin, L.J., Diosady, L.L., Woud, D.F. 1985. Effect of sulphanilamide on the TBA value of cured meats. *J. Food Sci.* 50 : 274-275.
- Tee, P.L., Yusof, S., Mohamed, S. 2002a. Antioxidative properties of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in linoleic acid model system. *Nutr. Food Sci.* 32 : 17-20.
- Tee, P.L., Yusof, S., Mohamed, S., Umar, N.A., Mustapha, N.M. 2002b. Effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) on serum lipids of Sprague Dawley rats. *Nutr. Food Sci.* 32 : 190-196.
- Tinsley, I.J., Bockian, A.H., 1959. Some effects of sugars on the breakdown of peragonidin-3-glucoside in model systems at 90°C. *Food Res.* 25 : 161-173.
- Tsai, P. J., Ou, A.S.M. 1996. Colour degradation of dried roselle during storage. *Food Sci.* 23 : 629-640.

- Varnam, A.H., Sutherland, J.P. 1995. Dried meats, intermediate moisture meats and extracts. *In Meat and meat products : technology, chemistry and microbiology*. London : Chapman and Hall.
- Wong, P.K., Yusof, S., Ghazali, H.M., Che Man, Y.B. 2002. Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutr. Food Sci.* 32 : 68-73.
- Yeum, K.J., Aldini, G., Chung, H.Y., Krinsky, N. I., Russell, R.M. 2003. The activities of antioxidant nutrients in human plasma depend on the localization of attacking radical species. *J. Nutr.* 133 : 2688-2691.
- Yen, G.C., Chen, A.Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43 : 27-37.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

**การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol contents)
และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (total anthocyanin contents)**

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (ประพันธ์ และวันทนีย์, 2545)

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 โดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย

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

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

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

1.2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร

1.2.6 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดแกลลิกในหน่วย ไมโครกรัม

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลในตัวอย่างสารสกัด

1.3.1 ปิเปตตัวอย่างสารละลายสารสกัดที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยใช้เอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเป็น 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 โดยใช้เอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์เป็น blank

1.4 ตัวอย่างการคำนวณ

คำนวณปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมดของตัวอย่างสารสกัดกระเจียบแดง โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวิเคราะห์ในข้อ 1.3 มาแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ดังรูปที่ ก 1 โดยมีตัวอย่างการคำนวณดังนี้

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

ปีเปิดตัวอย่างสารสกัดกระเจียบแดงมา 0.5 มิลลิลิตร มีปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมด 0.107 มิลลิกรัม

ปีเปิดตัวอย่างสารสกัดกระเจียบแดงมา 100 มิลลิลิตร มีปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมด เท่ากับ $(0.107 / 0.5) \times 100$ เท่ากับ 21.386 มิลลิกรัม

โดยที่ตัวอย่างสารสกัด 100 มิลลิลิตรนั้นมีเนื้อของสารสกัดอยู่ 1 กรัม (จากการเตรียมสารสกัดกระเจียบแดง 1 เปอร์เซ็นต์)

ดังนั้นสารสกัด 1.0 กรัม จึงมีปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมด 21.386 มิลลิกรัม

เมื่อสกัดกระเจียบแดงแห้ง 25 กรัม จะได้ปริมาณสารสกัดกระเจียบแดง 2.43 กรัม

ดังนั้นสกัดกระเจียบแดงแห้ง 100 กรัม จะได้ปริมาณสารสกัดกระเจียบแดง $(2.43 / 25) \times 100 =$

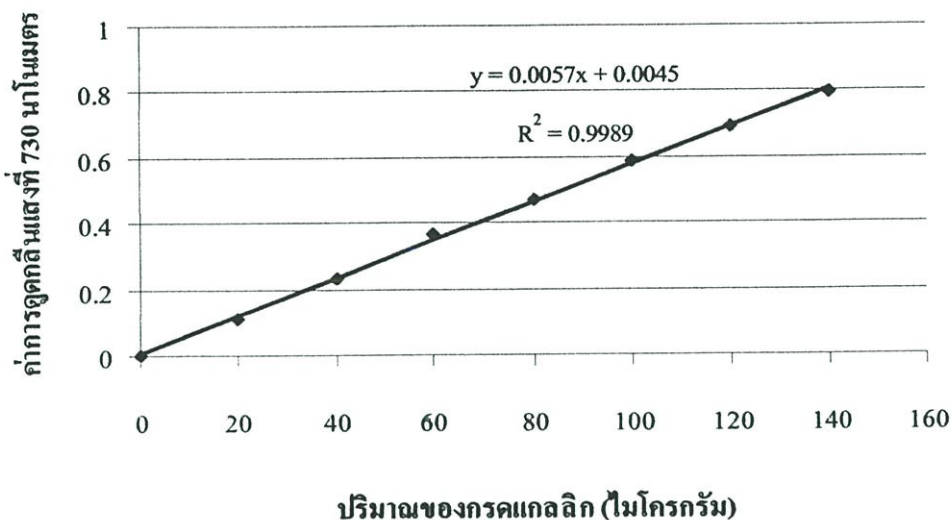
9.72 กรัม

สารสกัดกระเจียบแดง 1.0 กรัม มีปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมด 21.386 มิลลิกรัม

สารสกัดกระเจียบแดง 9.72 กรัม มีปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมด $(21.386 / 1.0) \times 9.72$

$= 207.87$ มิลลิกรัม

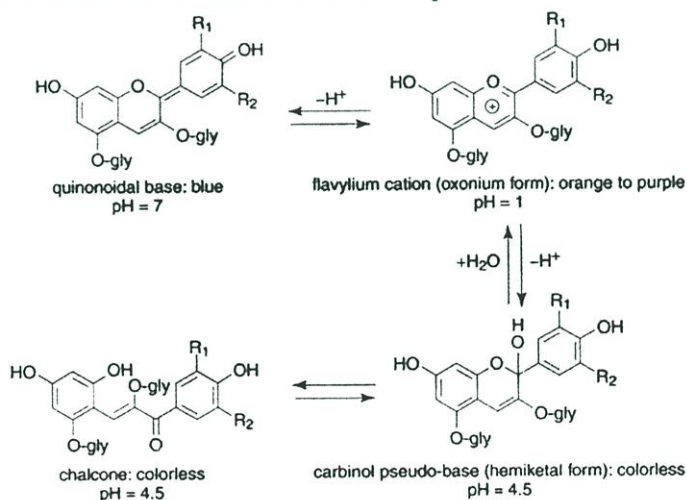
เพราะฉะนั้นกระเจียบแดงแห้ง 100 กรัม จะมีปริมาณ โพลีฟีนอลทั้งหมด 207.87 มิลลิกรัม



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของกรดแกแลคติกในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด

2. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

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



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานินเมื่อพีเอชในสารละลายเปลี่ยนไป

2.1 สารเคมี

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

2.2 วิธีวิเคราะห์

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

2.3 ตัวอย่างการคำนวณ

- 2.3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 1 เปอร์เซ็นต์มา 0.8 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (DF = 5) ด้วยโพแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ พีเอช 1.0 จะได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.443 ที่ความยาวคลื่นสูงสุด เท่ากับ 520 นาโนเมตร
- 2.3.2 คำนวณค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ของสารละลายตัวอย่าง ดังนี้

$$\begin{aligned} A &= (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700})_{\text{pH } 4.5} \\ &= (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4.5} \\ &= (0.443 - 0.156) - (0.309 - 0.222) = 0.2 \end{aligned}$$

2.3.3 นำค่าการดูดกลืนแสง (A) เท่ากับ 0.2 ไปคำนวณความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน
ในตัวอย่าง โดยมีตัวอย่างการคำนวณดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณแอนโทไซยานิน} &= (A \times MW \times DF \times 100) / (\epsilon \times l) \\ &= (0.2 \times 449.2 \times 5 \times 100) / (26900 \times 1) \\ &= 1.670 \text{ มิลลิกรัม} \end{aligned}$$

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

DF = dilution factor (สำหรับตัวอย่าง เช่นตัวอย่าง 0.8 มิลลิตร เจือจางได้
ปริมาตรรวมเท่ากับ 4 มิลลิตร, DF = 5)

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

l = ความกว้างของคิวเวต เท่ากับ 1 เซนติเมตร

ปีเปิดตัวอย่างสารสกัดกระเจี๊ยบแดงมา 0.8 มิลลิตร มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด
1.670 มิลลิกรัม

ปีเปิดตัวอย่างสารสกัดกระเจี๊ยบแดงมา 100 มิลลิตร มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด
(1.670 x 0.8)/100 = 208.74 มิลลิกรัม

โดยที่ตัวอย่างสารสกัด 100 มิลลิตร นั้นมีเนื้อของสารสกัดอยู่ 1 กรัม (จากการเตรียม
สารละลายสารสกัดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์)

ดังนั้นสารสกัด 1 กรัม จึงมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด 208.74 มิลลิกรัม

เมื่อสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้ง 100 กรัม จะได้ปริมาณสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 9.72 กรัม

สารสกัดกระเจี๊ยบแดง 1 กรัม มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด 208.74 มิลลิกรัม

ถ้าสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 9.72 กรัม มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (208.74/1) x 9.72 =
2028.95 มิลลิกรัม หรือ 2.028 กรัม

นั่นคือ กระเจี๊ยบแดงแห้ง 100 กรัม มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในรูปของ
cyanidin-3-glucoside เท่ากับ 2.03 กรัม

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระและการต้านปฏิภริยาออกซิเคชันในรูปแบบต่าง ๆ

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุโมลอิสระและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในรูปแบบต่าง ๆ

1. ความสามารถในการต้านอนุโมลอิสระ DPPH (Murakami *et al.*, 2004)

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุโมลอิสระ DPPH จะใช้วิธีที่รายงานโดย Murakami และคณะ (2004) โดยมีหลักการคือ สารละลายของอนุโมลอิสระ DPPH จะมีสีม่วงแดง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ที่ 517 นาโนเมตร ในกรณีตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ ในการทำลายอนุโมลอิสระได้ดี จะทำให้สีม่วงแดงของสารละลาย DPPH จางลงได้มากกว่าตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการทำลายอนุโมลอิสระได้น้อย

1.1 สารเคมี

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

1.1.2 เอทานอล ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์

1.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ DPPH

1.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน DPPH ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.8 มิลลิโมลาร์

1.2.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานดังกล่าวใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 0.60, 0.53, 0.45, 0.38, 0.30, 0.23, 0.15 และ 0.075 มิลลิลิตร (จะได้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ) ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ให้เป็น 6 มิลลิลิตร

1.2.3 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

1.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

1.2.5 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย DPPH (มิลลิโมลาร์)

1.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุโมลอิสระ DPPH ในตัวอย่างสารสกัด

1.2.1 ปิเปตสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ 0.12 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง

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

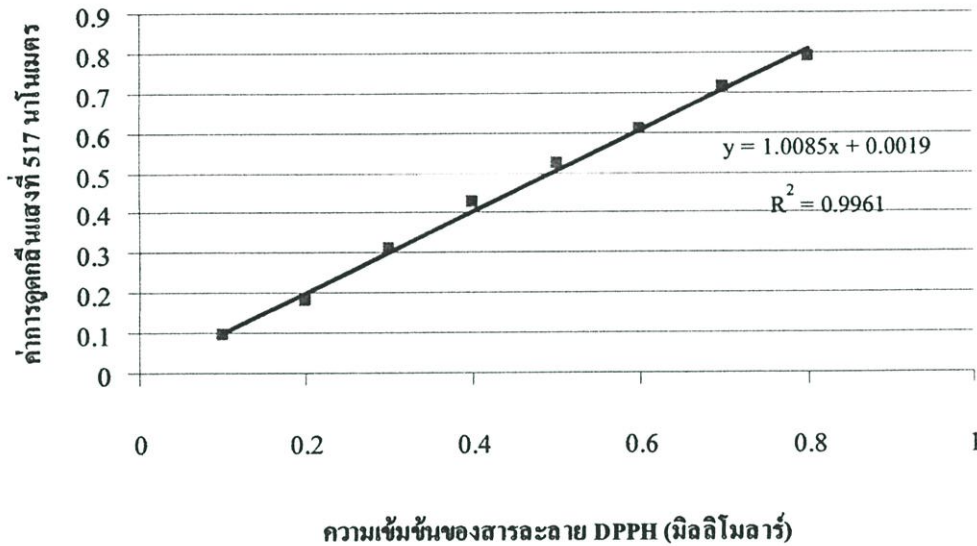
1.2.3 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

1.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์เป็น blank

1.2.5 กำหนดความสามารถในการต้านอนุโมลอิสระ

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

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



รูปที่ ข 1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย DPPH

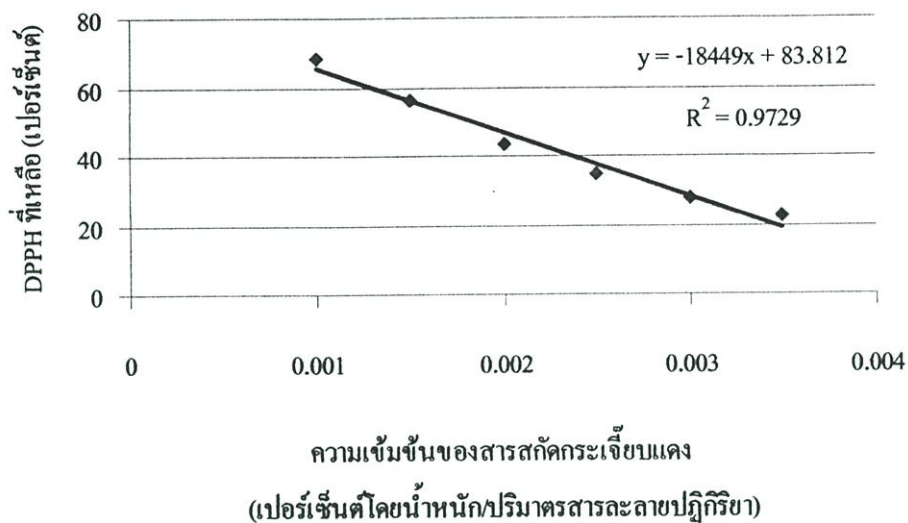
1.3.2 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง แทนค่าในสมการ $y = 1.00856x + 0.0019$ เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารละลาย DPPH ($[DPPH]_T$)

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

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

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

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



รูปที่ ข 2 ปริมาณ DPPH ที่เหลือ เมื่อใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้นต่างกัน

1.3.5 คำนวณหาค่า EC_{50} จากสมการเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟในข้อ 1.3.4 นั่นคือ

$$y = -1852.3x + 84.176 \text{ โดยให้ค่า } y = 50 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

1.3.6 จากนั้นคำนวณค่า EC_{50} ของเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่เหลือจากหน่วยเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตรสารละลายปฏิกิริยาให้เป็นหน่วยของมิลลิกรัมของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง/มิลลิกรัมของอนุโมลอิสระ DPPH

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

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $^{\circ}\text{OH}$ จะใช้วิธีที่รายงานโดย Aruoma (1994) โดยมีหลักการคือ Fe^{2+} จะทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ $^{\circ}\text{OH}$ เนื่องจากปฏิกิริยา Fenton จากนั้นอนุมูลอิสระ $^{\circ}\text{OH}$ จะทำปฏิกิริยากับ deoxyribose ทำให้เกิดการสลายตัวของ deoxyribose และทำให้เกิดสีชมพูซึ่งดูดกลืนแสงได้ที่ 532 นาโนเมตร ดังนั้นถ้ามีอนุมูลอิสระ $^{\circ}\text{OH}$ มาก deoxyribose ก็จะถูกสลายตัวมาก สีชมพูที่เกิดขึ้นจึงเข้ม แต่ถ้าตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดี จะทำให้สีชมพูจางลงได้มากกว่าตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระได้น้อย

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก/ไตรบาบิทอริก (TCA / TBA)

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

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

2.1.2 สารละลาย Deoxyribose-Ascorbic acid

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

2.1.3 สารละลาย EDTA- FeCl_3

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

2.1.4 H_2O_2 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

2.2 วิธีวิเคราะห์

2.2.1 ปิเปตสารละลาย EDTA- FeCl_3 ปริมาตร 60 ไมโครลิตร

2.2.2 เติมสารละลาย Deoxyribose-Ascorbic acid ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

2.2.3 เติม H_2O_2 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร

2.2.4 เติมตัวอย่างสารสกัด ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

2.2.5 เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 945 ไมโครลิตร

2.2.6 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) นำไปบ่มไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

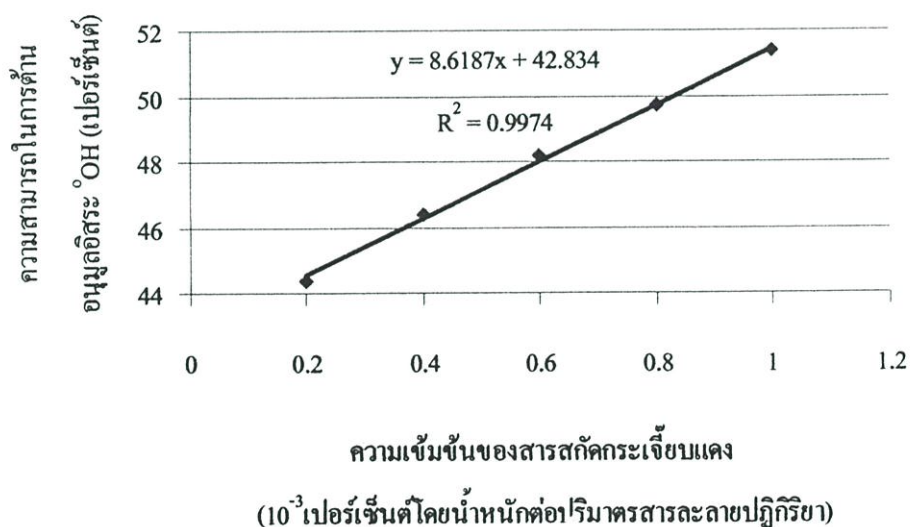
- 2.2.7 เมื่อครบ 1 ชั่วโมง ปิเปตสารละลายปฏิกิริยาข้างต้น 0.6 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย TCA / TBA ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร
- 2.2.8 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) และนำไปบ่มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 2.2.9 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร โดยที่หลอดควบคุม (control) จะใช้ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนตัวอย่าง สำหรับ blank ให้ใช้ HCl ความเข้มข้น 0.25 นอร์มอล แทนสารละลาย TCA / TBA

2.3 ตัวอย่างการคำนวณ

- 2.3.1 กำหนดหาค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ °OH ของตัวอย่างสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 0.0002 ถึง 0.0010 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายปฏิกิริยาโดยแทนค่าในสมการดังนี้

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

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



รูปที่ ข 3 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ °OH เมื่อใช้สารสกัดกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

2.3.3 คำนวณหาค่า EC_{50} จากสมการเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟในข้อ 2.3.2 นั่นคือ

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

2.3.4 จากนั้นคำนวณค่า EC_{50} ของของเปอร์เซนต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ °OH จากหน่วยเปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตรสารละลายปฏิกิริยาให้เป็นหน่วยของมิลลิกรัมของสารสกัดกระเจียบแดง/มิลลิกรัมอนุมูลอิสระ °OH

3. ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี Ferric thiocyanate colorimetric method (FTC)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี FTC จะใช้วิธีที่รายงานโดย Larrauri และคณะ (1996) มีหลักการคือ วัดปริมาณเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในขั้นเริ่มต้น (initial stages) ของปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) โดยให้ทำปฏิกิริยากับ FeCl_2 เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีแดง และสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ 500 นาโนเมตร ดังนั้นถ้ามีปริมาณเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นในปฏิกิริยามากสีแดงที่เกิดขึ้นก็จะเข้มมาก

3.1 สารเคมี

3.1.1 สารละลายกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) 2.51 เปอร์เซ็นต์

ชั่งกรดลิโนเลอิก 2.51 กรัม ละลายใน เอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.1.2 สารละลายแอมโมเนียมไทโอไซยาเนต (ammonium thiocyanate) 30 เปอร์เซ็นต์

3.1.3 สารละลายเฟอร์รัสคลอไรด์ (ferrous chloride) 0.02 โมลาร์

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

3.1.4 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

3.1.5 เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์

3.2 วิธีวิเคราะห์

3.2.1 ปิเปตสารละลายกรดลิโนเลอิก ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

3.2.2 เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.2.3 เติมตัวอย่างสารสกัด ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

3.2.4 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

3.2.5 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) นำไปบ่มไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 40 องศาเซลเซียส ในที่ไม่มีแสงรบกวน

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

3.2.7 เติมเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9.7 มิลลิลิตร

3.2.8 เติมสารละลายแอมโมเนียมไทโอไซยาเนต 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

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

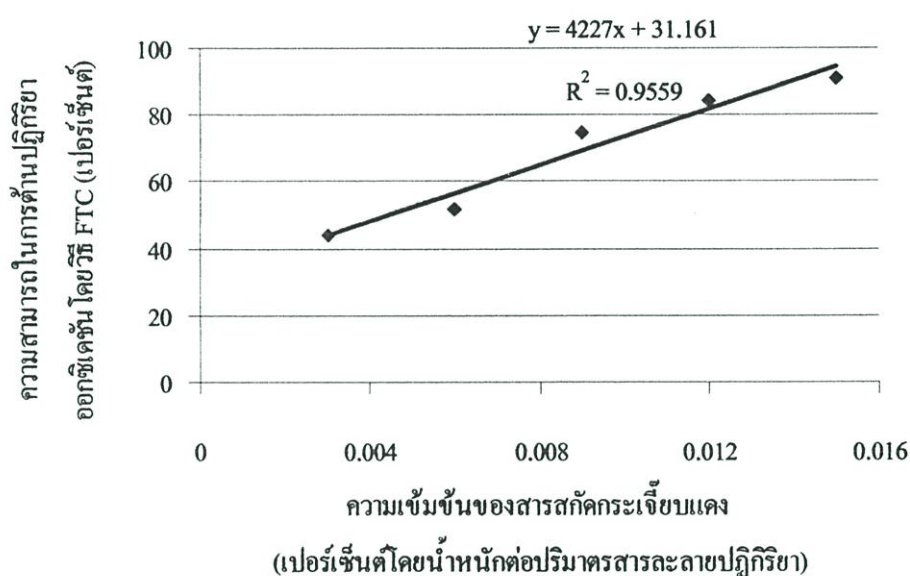
3.2.10 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยที่หลอดควบคุมจะใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง สำหรับ blank ใช้ เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ แทนตัวอย่าง

3.3 ตัวอย่างการคำนวณ

3.3.1 คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านปฏิบัติการออกซิเดชันโดยวิธี FTC ของตัวอย่างสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 0.003 ถึง 0.015 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายปฏิบัติการโดยแทนค่าในสมการดังนี้

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

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



รูปที่ ข 4 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านปฏิบัติการออกซิเดชันโดยวิธี FTC ของสารสกัดกระเจียบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

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

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

4. ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

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

4.1 สารเคมี

4.1.1 H_2O_2 ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์

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

4.1.2 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

4.2 วิธีทดลอง

4.2.1 ปิเปตตัวอย่างสารสกัด ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

4.2.2 เติม H_2O_2 ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร

4.2.3 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

4.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร

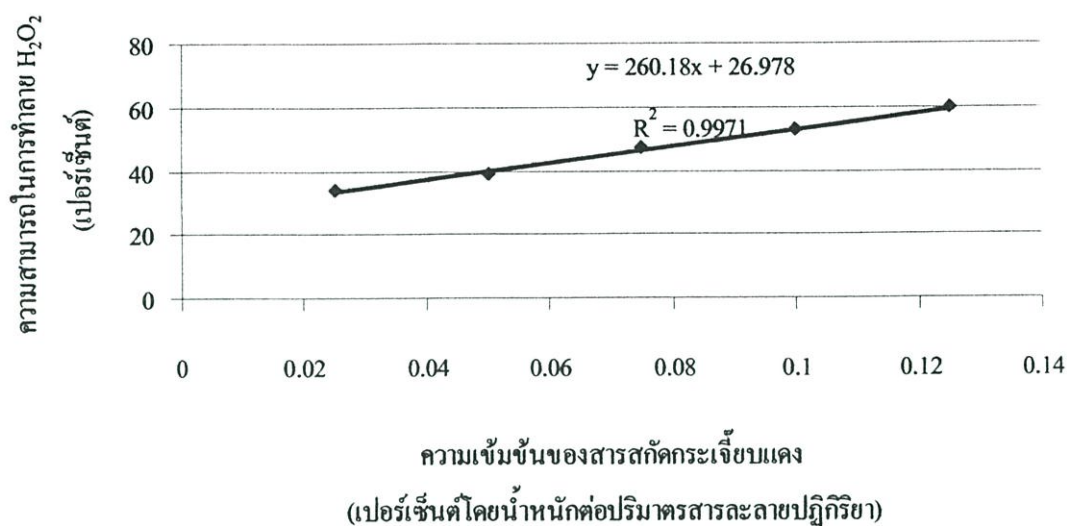
4.2.5 สำหรับ blank ให้ใช้ ตัวอย่างที่วิเคราะห์ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 โดยไม่ต้องมี H_2O_2

4.3 ตัวอย่างการคำนวณ

4.3.1 คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลาย H_2O_2 ของตัวอย่างสารสกัด โดยแทนค่าในสมการดังนี้

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

4.3.2 นำค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลาย H_2O_2 ที่ได้จากการคำนวณในข้อ 4.3.1 มาสร้างกราฟดังรูปที่ ข 5



รูปที่ ๕ เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลาย H₂O₂ เมื่อใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

4.3.3 คำนวณหาค่า EC₅₀ จากสมการเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟในข้อ 4.3.2 นั่นคือ

$y = 260.18x + 26.978$ โดยให้ค่า $y = 50$ เปอร์เซ็นต์

4.4.4 จากนั้นคำนวณค่า EC₅₀ ของเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการทำลาย H₂O₂ จากหน่วยเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตรสารละลายปฏิกิริยาให้เป็นหน่วยของมิลลิกรัมของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง/มิลลิกรัม H₂O₂

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ค่า TBARS

1. การวิเคราะห์ค่า thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)

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

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

1.8 คำนวณค่า TBARS จากสูตร

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

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

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุภามาส มุสิกะ เกิดเมื่อวันที่ 28 พฤษภาคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดยะลา จบการศึกษา ระดับปริญญาตรี สาขาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2547 และศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา สาขา วิทยาศาสตร์การอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง