ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง

Antioxidant properties of red-sorrel flower (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract

โดย

นางสาววัชราภรณ์ ฝาระมี

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 4/4/45 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม)

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

.....

(ผศ.ดร.ระติพร หาเรือนกิจ)

รักษาการคณะบดีโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18394

สมบัติการต้านปฏิกริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง

Antioxidant properties of red-sorrel flower (*Hibiscus Sabdariffa* Linn.) extract

T096793

โดย

นางสาววัชราภรณ์ ฝาระมี รหัสประจำตัว 41044455

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต(อุตสาหกรรมเกษตร)

พ.ศ.2544

ปพ.
วิ385ส
2544

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 96793
วัน.เดือน.ปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัชราภรณ์ ฝาระมี.2545 : สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง
Antioxidant properties of red-sorrel flower (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม

บทคัดย่อ

จากการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol) และตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant activity) ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงโดยวิธีการสกัดร้อน (ที่อุณหภูมิ 76 °C) และการสกัดเย็น (ที่อุณหภูมิ 25 °C) พบว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้จากการสกัดร้อน มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดต่ำกว่าสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดเย็น โดยมีปริมาณ 66.31 mg/g สารสกัด และ 69.60 mg/g สารสกัดตามลำดับ นอกจากนี้การสกัดเย็นยังให้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง ที่มีสมบัติในการทำลายอนุมูลอิสระของ 2,2–azinodi(3-ethylbenzthiazoline sulfonate)หรือABTS สูงกว่าการสกัดร้อนอย่างไรก็ตาม สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 วิธี มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำกว่าวิตามินซีและpropyl gallate(PG) ซึ่งเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐาน

นางสาววัชราภรณ์ ฝาระมี		9/4/45
ลายมือชื่อนักศึกษา	**ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา**	**วัน เดือน ปี**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำปัญหาพิเศษสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาจาก ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม, อาจารย์นิตยา พิระภัทรุ่งสุริยา และผศ.เยาวลักษณ์ สุรพันธ์พิศิษฐ์ ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำตลอดมา ผู้จัดทำขอขอบพระคุณในความอนุเคราะห์ของอาจารย์ทุกท่านด้วยความจริงใจและเคารพอย่างสูง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ผู้ควบคุมดูแลห้องปฏิบัติการ เครื่องมืออุปกรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พี่ไก่ วันทนีย์ ช้างน้อย ที่คอยดูแลและให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ต่างๆ

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ-คุณแม่และน้องๆ ที่คอยเป็นกำลังใจช่วยเหลือด้านทุนทรัพย์และช่วยค้นคว้าหาข้อมูลตลอดมาขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ ขอบคุณค่ะ

วัชราภรณ์ ฝาระมี

1 เมษายน 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
สารบัญภาพ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญตาราง (ต่อ)	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
วัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 วารสารปริทรรศน์	
2.1 ดอกกระเจี๊ยบแดง	2
2.2 ความหมายและชนิดของสารแอนติออกซิแดนท์	3
2.3 การเตรียมตัวอย่างพืช	9
2.4 การสกัดสารสำคัญจากพืช	10
2.5 การเลือกใช้ตัวทำละลาย	11
2.6 การทำสารสกัดให้เข้มข้น	12
2.7 สเปคโตโฟโตมิเตอร์	13
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัตถุดิบ	19
3.2 อุปกรณ์การทดลองที่สำคัญ	19
3.3 สารเคมี	19
3.4 วิธีการทดลอง	20
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด	24
4.2 การศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน	25
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	
5.1 สรุปผล	32
5.2 ข้อเสนอแนะ	32
เอกสารอ้างอิง	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและตัวอย่างการคำนวณ 34

ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน 38

ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ทางสถิติและประวัติผู้เขียน 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ดอกกระเจี๊ยบแดง	2
2.2 โครงสร้างสารสำคัญที่พบในสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง	3
2.3 โครงสร้างสารแอนติออกซิแดนท์ที่ได้จากการสังเคราะห์	5
2.4 โครงสร้างสารแอนติออกซิแดนท์ที่ได้จากธรรมชาติ	7
2.5 ส่วนประกอบของเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator)	12
4.1 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด โดยใช้กรดแกลลิคเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลมาตรฐาน	24
4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของสารละลายปฏิกิริยากับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของ สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้โดยการสกัดเย็น	25
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของสารละลายปฏิกิริยากับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของ สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้โดยการสกัดร้อน	26
4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของสารละลายปฏิกิริยากับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานโพรพิล แกลเลต	27
4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของสารละลายปฏิกิริยากับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานวิตามินซี	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 25

4.2 อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ (%) ของสารละลายปฏิกิริยาที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้ โดยการสกัดเย็นที่ปริมาณต่างๆ 29

4.3 อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ (%) ของสารละลายปฏิกิริยาที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้ โดยการสกัดร้อนที่ปริมาณต่างๆ 29

4.4 อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ (%) ของสารละลายปฏิกิริยาที่เติมสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานโพรพิลแกลเลตที่ปริมาณต่างๆ 30

4.5 อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ (%) ของสารละลายปฏิกิริยาที่เติมสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานวิตามินซีที่ปริมาณต่างๆ 30

ตารางภาคผนวก

ก.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง (สกัดร้อนและสกัดเย็น) เพื่อใช้ในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน 35

ข.1 ผลการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้จากการสกัดร้อนที่ปริมาณต่างๆ โดยวิธี total antioxidant assay 39

ข.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้จากการสกัดเย็นที่ปริมาณต่างๆ โดยวิธี total antioxidant assay 40

ข.3 ผลการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐาน PG ที่ปริมาณต่างๆ โดยวิธี total antioxidant assay 41

ข.4 ผลการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานวิตามินซีที่ปริมาณต่างๆ โดยวิธี total antioxidant assay 42

ค.1 การทดสอบความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ เมื่อเติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้จากการสกัดร้อนในสารละลายปฏิกิริยาที่ปริมาณต่างๆกัน 43

ค.2 การทดสอบความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ เมื่อเติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้จากการสกัดเย็นในสารละลายปฏิกิริยาที่ปริมาณต่างๆกัน 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ค.3 การทดสอบความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ เมื่อเติมสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานโพรพิล แกลเลต ในสารละลายปฏิกิริยาที่ปริมาณต่างๆกัน 44

ค.4 การทดสอบความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ เมื่อเติมสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานวิตามินซีในสารละลายปฏิกิริยาที่ปริมาณต่างๆกัน 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมามีรายงานการวิจัยมากมายเกี่ยวกับสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) หรือสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (antiradical) ของสารสกัดจากพืช โดยเฉพาะผักและผลไม้ที่นิยมบริโภคเป็นอาหาร ทั้งนี้เนื่องจากข้อเท็จจริงที่ว่าผักและผลไม้เป็นแหล่งของสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ที่มีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งสารพฤกษเคมีเหล่านี้จะสามารถป้องกันการเกิดสภาวะ oxidative stress ของร่างกายได้ oxidative stress เป็นสภาวะที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระ ให้อยู่ในระดับปกติที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายได้ และอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นนั้นเป็นสาเหตุเบื้องต้นที่สำคัญในการทำให้เกิดโรคร้ายแรงต่างๆ ได้แก่ โรคมะเร็ง,โรคหัวใจ,โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด เป็นต้น เป็นที่น่าสังเกตว่าผักผลไม้ที่มีสีต่างๆ เช่น แครอท, มะเขือเทศ, องุ่นแดง, ผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ต่างๆ มักมีองค์ประกอบสำคัญของสารพฤกษเคมีที่มีสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ดอกกระเจี๊ยบแดงเป็นพืชที่ปลูกได้ในประเทศไทยและคนไทยนิยมนำมาปรุงเป็นเครื่องดื่ม ซึ่งเชื่อว่ามีสรรพคุณเป็น ยาขับปัสสาวะ,ขับเสมหะ,ขับน้ำดี,ลดไข้, แก้ไอ เป็นต้น (กัญจนา, 2542) มีรายงานว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง มีสมบัติในการยับยั้งการเกิดสภาวะ oxidative stress และการเกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองได้ดี (Tseng *et al.*,1997; Teeng *et al.*,1998; Wang *et al.* ,2000) ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษาสมบัติต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันธรรมชาติและที่ได้จากการสังเคราะห์ชนิดอื่นๆ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบสมบัติการต้านปฏิกริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง ที่ได้จากการสกัดด้วยเอธานอลที่สภาวะต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทรรศน์

2.1 ดอกกระเจี๊ยบแดง

ดอกกระเจี๊ยบแดงมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Hibiscus sabdariffa* Linn. วงศ์ (Family) Malvaceae ชื่อสามัญ Rosell, Red-Sorrel flower ถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย จัดเป็นไม้ล้มลุกสูงประมาณ 1-2 เมตร ลำต้นตรงผิวเรียบสีม่วงอมแดง อาจแตกแขนงเมื่อโตเต็มที่ กิ่งก้านสีม่วงแดง ใบเดี่ยวรูปรีแหลมขอบใบยาวเป็นมัน บางครั้งมีหยักเว้าลึก3-5 หยัก ใบกว้างและยาวใกล้เคียงกัน ออกสลับกันบนลำต้น ดอกเป็นดอกเดี่ยว สีชมพู หรือเหลือง มีสีม่วงแดง ตรงส่วนฐาน กลางดอกเป็นสีแดงเลือดนกเกิดตามมุมใบบนลำต้น ก้านดอกสั้นมีกลีบที่พัฒนามาจากฐานรองดอก 5-10 กลีบ มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกอย่างละ 5 กลีบ ผลของกระเจี๊ยบแดง เป็นผลชนิดแคปซูลเนื้อหนากรอบหักง่าย ห่อหุ้มเมล็ดสีดำเป็นจำนวนมาก

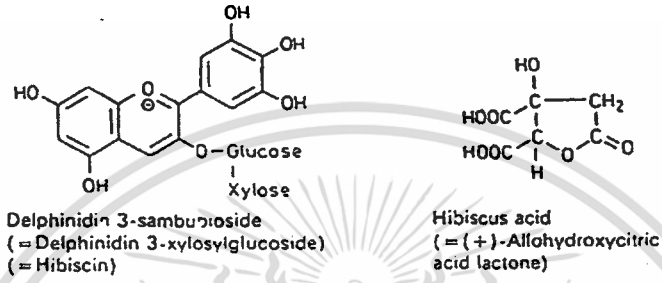
กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชที่ปลูกง่าย สามารถปลูกได้ในประเทศเขตร้อนทั่วไป ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด นิยมนำมาทำน้ำกระเจี๊ยบซึ่งเป็นเครื่องดื่มที่มีวิตามินซีสูง นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในด้านยารักษาโรคได้อีกด้วย และสามารถนำมาแปรรูปเป็นแยม, ไวน์, สีผสมอาหาร และนำมาผสมใบกาแฟหรือใบชา เป็นต้น (นันทวัน, 2535)

ภาพที่ 2.1 ดอกกระเจี๊ยบแดง

ที่มา:นันทวัน, 2535

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาพบว่าในกระเจี๊ยบแดงมีสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ กรด 15-30% ยกตัวอย่างเช่น กรดซิตริก, กรดมาลิค, กรดทาทาริค และ (t) –allohydroxycitric acid lactone (hibiscus acid) 1.5% นอกจากนี้ยังมีสารประกอบในกลุ่ม anthocyans ได้แก่ delphinidin 3-sambubioside, delphinidin, cyanidin 3-sambubioside ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 แสดงโครงสร้างสารสำคัญที่พบในสารสกัดของดอกกระเจี๊ยบแดง

2.2 ความหมายและชนิดของสารแอนติออกซิแดนท์ (สันติ, 2535)

ปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน (oxidation) ในไขมันและน้ำมันส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร ทำให้สูญเสียรสชาติ ลดคุณค่าทางโภชนาการ บางครั้งเกิดเป็นสารพิษหรือสารก่อมะเร็งได้ วิธีป้องกันการเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน เช่น การแช่เย็น รวมถึงวิธีการบรรจุ เช่น บรรจุภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับวิธีการเติมสารกันหืน (antioxidant) ลงในอาหารโดยตรง เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน นอกจากนี้ แสง, อุณหภูมิ, ปริมาณความเข้มข้นของออกซิเจน, โลหะ และเอนไซม์บางชนิดยัง สามารถเร่งปฏิกิริยานี้ได้ด้วย สารกันหืนส่วนใหญ่ที่นิยมใช้จะเป็นพวก phenolic aromatic ซึ่งบางครั้งเรียกว่า phenolic antioxidant มีทั้งในรูปของแข็ง และของเหลว (ของเหลวจากบางแห่งทำได้โดยละลายสารกันหืนในน้ำมันพืช propylene glycol หรือ ethanol)

สารกันหืนแบ่งออกเป็นสารกันหืนสังเคราะห์ (synthetic antioxidant) และสารกันหืนธรรมชาติ (natural antioxidant)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 สารกันหืนสังเคราะห์ ที่นิยมใช้มากได้แก่ บิวทีเลทเตด ไฮดรอกซีอนิโซล (butylated hydroxyanisol หรือ BHA), บิวทีเลทเตดไฮดรอกซีโทลูอีน(butylated hydroxytoluene หรือ BHT), เทอทีอารีบิวทิลไฮโดรควิโนน (tertiary butylhydroquinone หรือ TBHQ) และโพรพิลแกลเลต (propyl gallate หรือ PG) หลายประเทศอนุญาตให้ใช้สารกันหืนเหล่านี้กับไขมันและน้ำมันในปริมาณความเข้มข้นต่างๆ กันเช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาในสหรัฐอเมริกา (FDA) อนุญาตให้ใช้สารกันหืนเหล่านี้ชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกันได้ในระดับความเข้มข้นไม่เกิน 0.02% (200 ppm) ต่อน้ำหนักของไขมันและน้ำมัน (by weight) สำหรับกระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา (USDA) อนุญาตให้ใช้แต่ละชนิดไม่เกิน 0.01% (100 ppm)

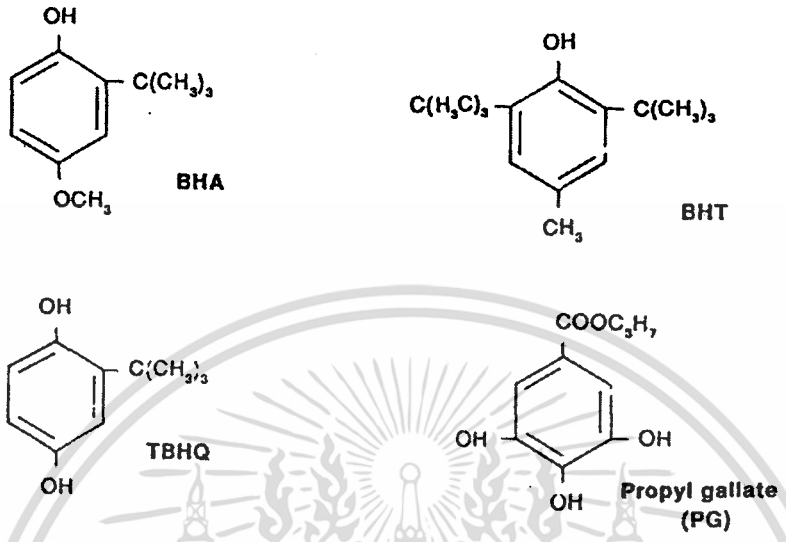
BHA ใช้ได้ดีกับผลิตภัณฑ์อาหารทอดและอบเมื่อใช้สารร่วมกับ BHT, TBHQ หรือ PG ช่วยเสริมให้มีคุณภาพสูงกว่าใช้ชนิดเดียว โดยเฉพาะ BHA ผสมกับ BHT ละลายในน้ำมันพืช ใช้ป้องกันการหืนได้ดีในไขมันสัตว์ ได้มีการทดสอบในสัตว์ทดลองพบว่าถ้าใช้ BHA เกินปริมาณที่ FDA กำหนดอาจมีอันตรายทำให้เกิดสารก่อมะเร็งและเนื้องอก ดังนั้นจึงมีการนิยมใช้ BHT แทน เพราะยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับอันตรายของ BHT พอสรุปได้ว่าสารเคมีทุกชนิดจะเป็นพิษได้ถ้าใช้ปริมาณมากเกินไป

BHT ใช้ได้ดีพอสมควรกับอาหารทอด, อบและสามารถใช้ร่วมกับ BHA, PG หรือ TBHQ

TBHQ ใช้ได้ดีกับผลิตภัณฑ์ที่ทอดแล้วแต่ใช้ไม่ได้ผลกับผลิตภัณฑ์อาหารหลังจากอบแล้ว โดยใช้ผสมกับกรดซิตริกใน propylene glycol ป้องกันการหืนในน้ำมันพืชและอาหารที่ทอดในน้ำมันพืชเช่น มันฝรั่งทอด กฎหมายอนุญาตให้ใช้ร่วมกับ BHA หรือ BHT เท่านั้น ในประเทศแคนาดาไม่อนุญาตให้ใช้สารชนิดนี้ เพราะยังไม่แน่ใจในความปลอดภัยของสารกันหืนชนิดนี้

PG ใช้กับไขมันสัตว์ได้ดี แต่จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะทำให้เกิดเป็นสีดำหรือม่วงเข้มซึ่งจะป้องกันได้โดยเติมสารพวก chelating agent ลงไปเพื่อไปรวมกับไอออนของโลหะเช่น เหล็ก, ทองแดง สารพวกนี้ได้แก่ กรดซิตริก, กรดแอสคอร์บิค และเลซิทิน เมื่อใช้ PG ร่วมกับ BHA และ BHT ให้ผลในการป้องกันการหืนได้ดี แต่ไม่สามารถใช้ร่วมกับ TBHQ ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของสารแอนติออกซิแดนท์ที่ได้จากการสังเคราะห์

ที่มา:สันติ, 2535

2.2.2 **สารกันหืนธรรมชาติ** พบในธรรมชาติทั้งในพืชและสัตว์ และอื่นๆ ซึ่งสามารถแยกตามแหล่งที่พบดังนี้

2.2.2.1 จากแหล่งพืชน้ำมัน

Tocopherols จะพบว่าในน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง ซอสถั่วเหลือง พบในพืชมากกว่าในสัตว์เป็นสารที่ละลายได้ในน้ำมัน ปัจจุบันได้มีการใช้สารกันหืนชนิดนี้อย่างกว้างขวางในวงการ อุตสาหกรรม tocopherols ในธรรมชาติจะมีด้วยกัน 4 รูปคือ α,β,γ,δ tocopherols แต่ละโครงสร้างแตกต่างกันที่ตำแหน่ง ของกลุ่ม methyl ที่ aromatic ring จะมี phenolic hydroxy function ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของการเกิดปฏิกิริยา มีกลไกการป้องกันการเกิดปฏิกิริยา มีกลไกการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเติมออกซิเจนของไขมันเหมือนกับสารกันหืนสังเคราะห์ โดยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของ free radical ให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่ hydroperoxyl radical ซึ่งอนุพันธ์ของ tocopherol radical มีความคงตัวและทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ α- tocopherols จะมีปริมาณสูงในพืชน้ำมัน

Hydroxytyrosol และ *Caffeic acid* ซึ่งสกัดได้จากน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ สารทั้ง 2 ชนิดนี้ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนของน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์สูงกว่า BHT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phytic acid พบมากในพืช เช่นพืชตระกูลถั่ว, พืชน้ำมัน, ธัญพืช ซึ่งสามารถเกิดการฟอร์ม chelate กับเหล็กได้ เป็นการป้องกันไม่ให้เหล็กซึ่งเป็นตัวเร่งการเกิด hydroxy radical เกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนของไขมันและน้ำมันในน้ำที่มีลักษณะเป็นอีมัลชั่น (emulsion) พบว่าใช้ได้ดีกับไก่แช่เย็นป้องกันการเกิดกลิ่นจากสาร malondialrehyde

Ferulate พบมากในน้ำมันรำดิบ ซึ่งใช้ได้ดีกับน้ำมันพืช

2.2.2.2 จากแหล่งเครื่องเทศและสมุนไพร ส่วนมากเป็นพวกที่ให้กลิ่นรส และเป็น สารกันหืนในตัวได้แก่ กานพลู, อบเชย, เสจ (sage), โรสแมรี่ (rosemary), ดอกจันทน์, ออริกาโน (oregano), ลูกจันทน์, ออลสไปซ์ (allspice) ซึ่งแสดงปฏิกริยากันหืนและเสริมสารกันหืนเมื่อใช้ร่วมกับ BHT

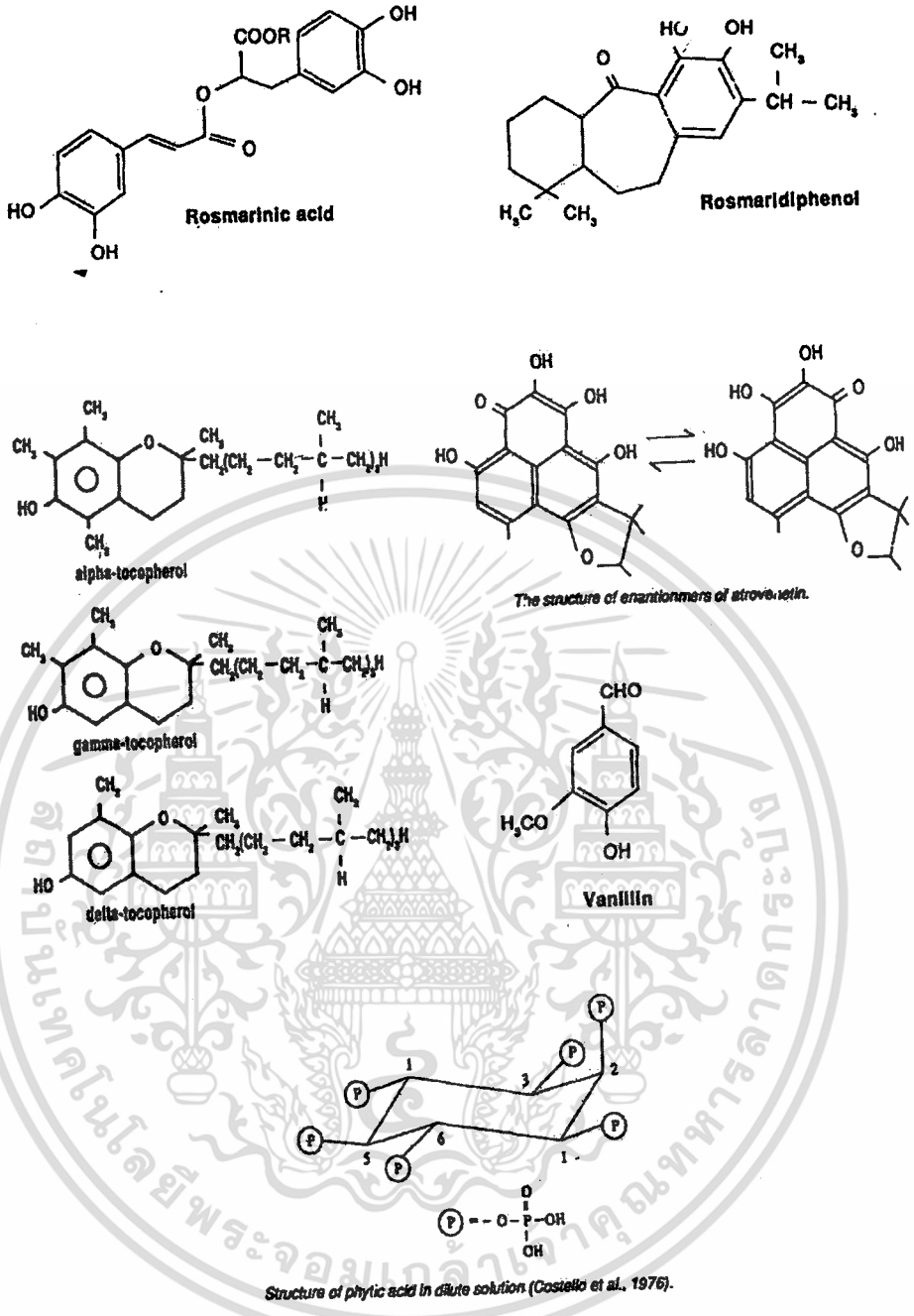
โรสแมรี่ สารสกัดจากพืชนี้เป็นสารกันหืนที่มีคุณภาพสูง ประกอบด้วยสาร rosmanol, rosmaridiphenol, rosmariquinone, rosmarinic acid และcarnosol ซึ่งสามารถป้องกันการหืนเทียบเท่าหรือสูงกว่า BHA และพบว่าเมื่อใช้ร่วมกับ sodium tripolyphosphate จะช่วยป้องกันการหืนของเนื้อที่ใช้ทำสเต็คได้ดี นอกจากนี้บริษัท Kalec ได้สกัดสารจากโรสแมรี่เพื่อเป็นสารกันหืนและป้องกันการสลายตัวของสีในอาหารว่าง, มายองเนส, สลัดเดรสซิง, น้ำมันจากผิวส้ม, เนื้อ, สัตว์ปีกและอาหารทะเล โดยมีสารสกัด 2 แบบคือ ชนิดที่ละลายในน้ำมันและชนิดที่ละลายน้ำ ซึ่งนิยมใช้กันมากในยุโรป

ฟลาวานอย (flavanoids) เช่น quercitin มักพบในพืช ใช้ป้องกันการหืนเนื่องจากสาร ω - 3 polyunsaturated fatty acid ในอาหารทะเลด้วยเหตุที่ปริมาณของฟลาวานอยมีอยู่ในพืชค่อนข้างต่ำ ราคาจึงแพงสารบางชนิดในกลุ่มของฟลาวานอยทำให้เกิดสารพิษและบางชนิดในกลุ่มของฟลาวานอยทำให้เกิดสารพิษและบางชนิดอยู่ในรูปของ glycoside ซึ่งส่วนมากจะละลายน้ำ ไม่ละลายในน้ำมันจึงไม่เป็นที่นิยมเพราะไม่สะดวกในการใช้

วานิลิน (Vanillin) ซึ่งได้จากวนิลา

ชา มีสิทธิบัตรเกี่ยวกับการสกัดสารกันหืนจากชาซึ่งละลายได้ในน้ำมัน, ไม่มีกลิ่น, ไม่มีรส และมีประสิทธิภาพสูงมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของสารแอนติออกซิแดนท์ที่ได้จากธรรมชาติ

ที่มา:สันติ, 2535

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.3 จากแหล่งอื่นๆ

Atrovenetin เป็นสารสกัดได้จากเชื้อราสายพันธุ์ Penicillium sp. ใช้เป็นสารกันหืน และเป็นสารเสริมสารกันหืนของ tocopherol ซึ่งใช้ในน้ำมันหมู (Yen.et.al .2001)

อนุพันธ์ polyphenolic สกัดได้จากกุ้งโดยใช้ตัวทำละลายต่างๆ พบว่าในส่วนของเอธานอล จะมีคุณสมบัติของสารกันหืนดีที่สุด สารในส่วนนี้เป็นอนุพันธ์ polyphenolic ของ aromatic amino acid เมื่อใช้ผสมกับน้ำมันปลาซาลมอน (salmol oil) จะทำให้สีไม่เปลี่ยนและผลิตภัณฑ์นี้เก็บได้นานขึ้น

โดยสารทั่วไปสารกันหืนสังเคราะห์ไม่เป็นที่ยอมรับเพราะต้องตระหนักถึงความปลอดภัย ดังนั้นผู้บริโภคต้องการใช้สารกันหืนจากธรรมชาติมากกว่า เพราะไม่ต้องกังวลถึงปริมาณที่เกินขีดอันตราย สามารถเติมได้ตามความเหมาะสม เช่นสาร tocopherols และสารสกัดจากโรสแมรี่ แต่สารกันหืนธรรมชาติ ราคาค่อนข้างแพง และบางกรณีต้องใช้ในปริมาณมากกว่าสารสังเคราะห์ เช่นน้ำมันพืชจะใช้สารที่สกัดจากโรสแมรี่ในปริมาณสูงกว่า TBHQ อย่างไรก็ตามปริมาณสารกันหืนที่ใช้เติมในอาหารมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับราคาของผลิตภัณฑ์นั้น เป็นการดีที่มีสารกันหืนหลายๆ ชนิดให้เลือกเพราะแต่ละชนิดก็เหมาะกับอาหารแต่ละประเภทแต่ต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของสารกันหืนด้วยว่าต้องไม่มีสีและไม่มีกลิ่นรส ที่จะไปรบกวนต่อผลิตภัณฑ์ ดังนั้นถ้าผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งปิดฉลากว่า สารกันหืนที่ใช้เป็น BHA ส่วนอีกชนิดบอกว่าเติมสารกันหืนธรรมชาติ เช่น tocopherols เครื่องเทศและสมุนไพร ผู้บริโภคย่อมเลือกผลิตภัณฑ์ชนิดหลังอย่างแน่นอน ดังนั้นจึงเป็นแนวโน้มในอนาคตที่จะใช้สารกันหืนจากธรรมชาติมากขึ้น แม้ว่าในปัจจุบันจะยังมีการใช้สารกันหืนจากสารสังเคราะห์กันอย่างกว้างขวาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การเตรียมตัวอย่างพืช (อ้อมบุญ, 2536)

การเตรียมพืชนับเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญซึ่งต้องคำนึงถึง สิ่งที่มีผลต่อความแตกต่างของสารสำคัญในพืช ได้แก่

1. การตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้อง
2. ไม่มีพืชอื่นปน เพราะทำให้ได้สารปลอมปน
3. ไม่มีโรคพืช ถ้าตัวอย่างที่เก็บมามีจุลินทรีย์อันเป็นสาเหตุของโรคพืชจุลินทรีย์อาจให้สารซึ่งถูกสกัดออกมาพร้อมกับสารที่เราต้องการ นอกจากนี้อาจทำให้การเปลี่ยนแปลงของกระบวนการชีวสังเคราะห์ในพืชได้สารที่แตกต่างออกไปจากธรรมชาติ
4. ความแตกต่างของสารสำคัญในพืช (Variation of plant constituents) ในการเก็บพืชแต่ละครั้งเพื่อนำมาสกัดสารสำคัญในพืชอาจแตกต่างกันทั้งปริมาณและชนิด ซึ่งเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น ความแตกต่างเนื่องจากสายพันธุ์ แหล่งที่ปลูก เป็นต้น
5. ผลของการเก็บรักษาและการเตรียมพืช (Effect of preserving and processing process) ในการทำให้พืชแห้งบางครั้งอาจทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหมดไป

2.3.1 การทำสมุนไพรให้แห้ง

โดยทั่วไปแล้วการสกัดจะได้ผลดีเมื่อเราสามารถสกัดสารจากพืชสดโดยการนำเอาพืชสดมาต้มกับแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเอนไซม์เสียก่อน เป็นการป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง จากนั้น จึงนำไปสกัด หรือเก็บพืชสดมาแช่แอลกอฮอล์ระหว่างที่ไม่ได้ทำการสกัด แต่วิธีการเหล่านี้ไม่สะดวกและไม่เหมาะกับอุตสาหกรรมจึงจำเป็นต้องต้องนำเอาตัวอย่างพืชมาทำให้แห้งก่อน วิธีทำให้แห้งโดยคงคุณภาพของสมุนไพร ควรจะทำให้แห้งโดยวิธีที่เร็วและใช้อุณหภูมิต่ำๆ เพราะอุณหภูมิที่สูงจะทำให้สารสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลงได้

การทำให้แห้งอาจทำได้โดย

Air drying ซึ่งเป็นการทำให้แห้งในอากาศ อาจเป็นการทำให้แห้งในที่ร่ม (shade drying) หรือตากแดด (sun drying)

Artificial heat เป็นการทำให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากพลังงานอื่นเช่น ไฟฟ้า ได้แก่การทำให้แห้งโดยตู้อบ ซึ่งมีการควบคุมอากาศที่ผ่านเข้าออกและอุณหภูมิ วิธีนี้ดีกว่าวิธีแรกที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้แน่นอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 **การแตกย่อยเนื้อเยื่อ** (disintegration of tissue)

เป็นขบวนการแตกย่อยเนื้อเยื้อของพืชให้มีขนาดเล็กลง เพื่อทำให้สกัดสารสำคัญจากพืชได้ผลดี อาจทำได้หลายวิธีคือ

Mechanical method เป็นวิธีที่อาศัยหลักการบดด้วยโกร่ง แต่เนื่องจากในทางอุตสาหกรรมต้องใช้บดสารจำนวนมาก จึงจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่เหมาะสม ได้แก่

1.1 *สมุนไพรแห้ง* ทำได้โดยใช้เครื่องมือบดชนิด driven hammer mill เมื่อบดแล้วนำมาร่อนด้วยตะแกรง (sieve) เพื่อให้ได้ขนาดที่ต้องการ

1.2 *สมุนไพรสด* อาจทำได้โดยการหั่น (slicing) โดยใช้มีดหรือบดด้วยเครื่องบดเนื้อ (meat mincer) อาจจำเป็นจะต้องใช้ทรายหรือ alumina ผสม เพื่อให้บดง่ายขึ้น

1.3 *Dilute suspension* ใช้ waring blender, sonic และ suspersonic vibration เขย่ากับทราย หรืออัดกับแก๊ส

Enzymatic disintegration เป็นวิธีย่อยเนื้อเยื่อโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น เอนไซม์ย่อย pectin เป็นต้น

Chemical disintegration เป็นวิธีการย่อยเนื้อเยื่อโดยใช้สารเคมีเช่น ใช้ dimethyl formamide ทำให้เซลล์ chlorella แตก เป็นต้น

2.4 การสกัดสารสำคัญจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชทำได้หลายวิธี ขึ้นกับชนิดของสารที่ทำการสกัด, คุณสมบัติของสารในการทนความร้อน, ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัด วิธีเหล่านี้ได้แก่

Marceration เป็นขบวนการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิดเช่น ขวดรูปชมพู่ ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดจึงค่อยๆ รินเอาสารสกัดออกพยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (marc) ให้มากที่สุด นำสารที่ไปกรอง วิธีนี้ข้อดีคือสารไม่ถูกความร้อนแต่จะสิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

Percolation เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า percolator นำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่งโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆ บรรจุผงยาที่ละชั้นลงใน percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพร (solvent heat) ประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออก โดยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรอย่าให้แห้ง บีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด นำไปกรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Soxhlet extractor เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยตัวทำละลายที่ใช้มีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน flask ระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงใน thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับ จะเกิดการลักน้ำสารสกัดจะไหลกลับลงไปใน flask ด้วยวิธีการลักน้ำ flask นี้ได้รับความร้อนจาก heating mantle หรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไปทิ้งสารสกัดไว้ใน flask ตัวทำละลายเมื่อกระทบ condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วยจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว

Liquid-liquid extraction เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

Extractant lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

Raffinate lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดหนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

การสกัดน้ำมันหอมระเหย (Extraction of volatile oil)

การสกัดน้ำมันพืช การสกัดน้ำมันพืชจากเมล็ดพืชอาจทำได้โดยใช้ความร้อนหรือไม่ใช้ความร้อนก็ได้ การบีบโดยใช้ความร้อนจะได้น้ำมันออกมามากกว่าแต่จะมีความบริสุทธิ์น้อยกว่า โดยกากที่เหลือจากการบีบนี้มักมีน้ำมันตกค้างอยู่ประมาณ 2-4% ในทางอุตสาหกรรมจึงมักนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน อีกครั้งหนึ่ง

Extraction by thermomicrodistillation เป็นการสกัดโดยใช้เครื่องมือThermomicro Analysis and Separation ovens (TAS oven) เป็นการสกัดสารขนาดน้อยมาก โดยนำสารใส่ลงใน cartridge ซึ่งอีกข้างหนึ่ง seal อีกข้างหนึ่งเป็น capillaries เมื่อใส่เข้าไปใน oven ความร้อนจะทำให้สารระเหยหรือระเหิดออกมาทาง capillaries รองรับสารที่ระเหยหรือระเหิดออกมาด้วยแผ่น TLC จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบอีกครั้งหนึ่ง

2.5 การเลือกใช้ตัวทำละลาย

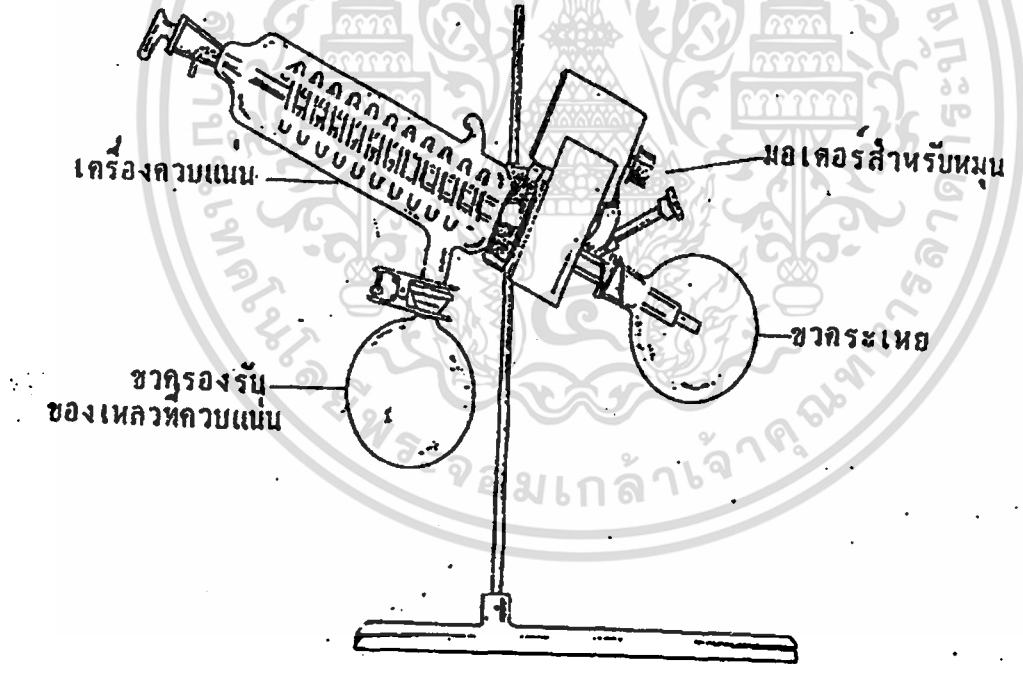
ในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่ อยู่ที่การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่เราต้องการสกัดได้ดีพอ
2. ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป
3. ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราสกัด
4. ไม่เป็นพิษ
5. ราคาไม่แพงจนเกินไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentration) (สมยศ, 2538)

เมื่อสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักจะมีปริมาณมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อน วิธีที่ใช้ในงานวิจัยคือ ทำการระเหยโดยใช้ rotary eveporator ทำโดยการใส่สารละลายที่ต้องการระเหยลงในขวดระเหย (evaporation flask) ที่หมุนได้ด้วยมอเตอร์ การหมุนขวดระเหยจะทำให้สารละลายกระจายออกเป็นแผ่นฟิล์มบางๆเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการระเหยไอของตัวทำละลายที่เกิดขึ้นในขวดระเหยจะผ่านไปยังเครื่องควบแน่น ซึ่งไอจะควบแน่นเป็นของเหลวไหลลงสู่ขวดรองรับ ขณะที่ทำการระเหยอาจให้ความร้อนแก่สารละลายจุ่มขวดระเหยในเครื่องอัง และวิธีนี้เป็นการระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำและลดความดันให้เป็นสุญญากาศ โดยใช้ vacuum pump เครื่องมือระเหยนี้ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ distillation flask, condenser, receiving flask และ distillation flak จะหมุนตลอดเวลาที่ทำงาน ดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 ส่วนประกอบของเครื่อง rotary evaporator

ที่มา:สมยศ, 2538

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) (วิชัยและคณะ, 2526)

2.7.1 ส่วนประกอบที่สำคัญของสเปคโตรโฟโตมิเตอร์มีดังต่อไปนี้

แหล่งกำเนิดรังสี (source)

แหล่งกำเนิดรังสีในสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่นิยมใช้กันแพร่หลาย

(ก) *หลอดไฮโดรเจนและหลอดดิวที่เรียมความดันต่ำ* เป็นแหล่งกำเนิดรังสีต่อเนื่องที่ดีที่สุดตั้งแต่ช่วงความยาวคลื่นประมาณ 160 – 360 nm มีทั้งประเภทใช้ศักดาไฟฟ้าสูง (2,200 – 6,600 โวลต์) และประเภทใช้ศักดาไฟฟ้าต่ำ (ประมาณ 40 โวลต์) หลอดชนิดนี้ให้รังสีที่มีความเข้มสูงจนถึงความยาวคลื่นประมาณ 360 nm หลังจากนั้นความเข้มของรังสีจะลดลงอย่างรวดเร็ว

(ข) *หลอดทังสเตน* ประกอบด้วยลวดทังสเตนอยู่ในหลอดสุญญากาศซึ่งให้รังสีที่มีความยาวคลื่นตั้งแต่ช่วง UV ใกล้ ช่วงแสงที่แลเห็นได้จนถึงช่วง IR ใกล้ หลอดชนิดนี้มีราคาถูกและหาได้ง่ายในท้องตลาด

โมโนโครเมเตอร์ (monochromator)

โมโนโครเมเตอร์ เป็นชิ้นส่วนสำคัญในการกำหนดคุณภาพของสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ทำหน้าที่แยกลำรังสีที่มีความยาวคลื่นต่อเนื่องออกเป็นลำรังสีความยาวคลื่นเดียวในช่วงแสงที่แลเห็นได้อาจใช้ปริซึมแก้ว ส่วนในช่วย UV จำเป็นต้องใช้ปริซึมที่ทำด้วยควอตซ์ สำหรับสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีราคาแพง มักใช้โมโนโครเมเตอร์แบบ diffraction gration ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่มีร่องเป็นจำนวนมากและความกว้างของร่องใกล้เคียงกับความยาวคลื่นของรังสี

อุปกรณ์บันทึกสัญญาณ (recorder)

หลังจากที่ลำรังสีความยาวคลื่นเดียวผ่านสารที่ต้องการวัดการดูดกลืนแล้วจะไปตกที่อุปกรณ์รับสัญญาณซึ่งให้ข้อมูลการดูดกลืนแก่เรา สำหรับสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ราคาถูกข้อมูลนี้จะปรากฏออกมาในรูปการบ่ายเบนของเข็มบนหน้าปัดมิเตอร์ หรือปรากฏเป็นตัวเลขก็ได้ ในกรณีเช่นนี้ต้องบันทึกข้อมูลเหล่านี้สำหรับแต่ละความยาวคลื่นในกระดาษกราฟเส้นที่เชื่อมจุดต่างๆ ก็คือสเปคตรัมนั่นเอง สำหรับสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่สามารถเปลี่ยนความยาวคลื่นได้เองโดยอัตโนมัติ จะมีอุปกรณ์บันทึกสัญญาณอยู่ด้วยทำให้สามารถบันทึกออกมาเป็นสเปคตรัมได้โดยตรง สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดนี้มีราคาแพง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2 ประเภทของสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

เราแบ่งสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ออกเป็นประเภทใหญ่ ๆ ได้ 2 ประเภท ด้วยกัน คือ

1. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์แบบลำรังสีเดี่ยวและไม่มีอุปกรณ์บันทึกสัญญาณ

สเปคโตรโฟโตมิเตอร์แบบ Spectronic 710 ซึ่งเป็นสเปคโตรโฟโตมิเตอร์แบบลำรังสีเดี่ยว และสามารถวัดสเปคตรัมทั้งในช่วง UV และช่วงแสงที่และเห็นได้ จะเห็นได้ว่าลำรังสีออกจากแหล่งกำเนิดรังสี ซึ่งอาจจะเป็นหลอดดิวทีเรียมหรือหลอดทังสเตน แล้วจะผ่านเลนส์กระจกต่อโมโนโครเมเตอร์ที่เป็น grating เลนส์ต่างๆ สารตัวอย่าง แล้วจึงเข้าสู่อุปกรณ์ตรวจสัญญาณ ตลอดเส้นทางของลำรังสีนี้มีลำรังสีเพียงลำเดียว จึงเรียกสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ประเภทนี้ว่าแบบลำแสงเดี่ยว

2. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ประเภทลำรังสีคู่

สเปคโตรโฟโตมิเตอร์แบบ Cary 219 ซึ่งใช้โมโนโครเมเตอร์แบบ double pass ลำรังสีจะผ่านโมโนโครมอเตอร์ 2 ครั้งด้วยกัน ทำให้ได้ลำรังสีความยาวคลื่นเดียวอย่างมีประสิทธิภาพและความละเอียดมากขึ้น เมื่อออกจาก exit slit แล้ว ลำรังสีจะไปสู่อุปกรณ์ตัดลำรังสี (beam chopper) ซึ่งในกรณีนี้เป็นผ่านวงกลมซึ่งครึ่งหนึ่งเป็นโลหะและอีกครึ่งหนึ่งเป็นช่องว่าง อุปกรณ์นี้จะหมุนอยู่ตลอดเวลา เมื่อลำรังสีตกกระทบครึ่งวงกลมที่เป็นโลหะก็จะสะท้อนไปผ่านสารตัวอย่าง ในขณะต่อมาลำรังสีจะผ่านครึ่งวงกลมที่เป็นช่องว่างและทะลุไปผ่านสารอ้างอิง ด้วยวิธีนี้ลำรังสีลำเดี่ยวที่ผ่านโมโนโครเมเตอร์จะถูกอุปกรณ์ตัดลำรังสีแยกออกเป็นลำรังสีสองลำที่มีความเข้มเท่ากันตลอดเวลา เมื่อลำรังสีทั้งสองนี้ไปตกกระทบ phototube ความแตกต่างของความเข้มจะกลายเป็นสัญญาณส่งต่อไปยังอุปกรณ์บันทึกสัญญาณต่อไป

2.4.3 การดูดกลืนรังสี

สารอินทรีย์ทุกชนิดดูดกลืนรังสีในช่วง UV แต่การดูดกลืนรังสีจะเกิดขึ้นได้ต่อเมื่อพลังงานของรังสีที่ได้รับเท่ากับพลังงานที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็คตรอนในโมเลกุลนั้นๆ การดูดกลืนรังสีนี้ เรียกกันว่าการเร้าอิเล็คตรอน (electronic excitation) และทำให้ อิเล็คตรอนตัวหนึ่งไปอยู่ในระดับพลังงานที่สูงกว่าเดิม (higher electronic excited state) ในทางเคมีอินทรีย์ การเร้าอิเล็คตรอนที่สำคัญที่สุดได้แก่การย้ายอิเล็กตรอนออกจากออร์บิตัลของโมเลกุล (molecular orbital) ที่มีพลังงานสูงสุดและมีอิเล็คตรอนอยู่ไปสู่ออร์บิตัล ของโมเลกุลที่ว่างและมีพลังงานต่ำสุด

เนื่องจากโมเลกุลต่างๆ ไม่อยู่นิ่ง แต่อะตอมที่ประกอบเป็นโมเลกุลจะสั่นอยู่ตลอดเวลา และโมเลกุลเองก็หมุนอยู่ตลอดเวลาด้วย ระดับพลังงานที่เกิดจากการสั่นและการหมุน (vibrational and rotational energy levels) นั้นเป็นไปตามทฤษฎีควอนตัม การเปลี่ยนสภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของอิเล็คตรอน (electronic transition) ทุกครั้งจะต้องทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของการสั่นและการหมุนด้วยเสมอไป

เราอาจบรรยายรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าด้วยความถี่ซึ่งเป็นสัญลักษณ์ ν (ในหน่วยรอบ / วินาที) หรือด้วยความยาวคลื่นซึ่งมีสัญลักษณ์ λ หรือด้วยเลขคลื่นซึ่งมีสัญลักษณ์ $\bar{\upsilon}$ ปริมาณเหล่านี้มีความสัมพันธ์กันดังนี้

$$c \text{ (ความเร็วแสง)} = \lambda\nu = 3.0 \times 10^{8} \text{ ม./วินาที} \qquad (2.1)$$

$$\text{และ } \bar{\upsilon} = \frac{1}{\lambda} \qquad (2.2)$$

ในการศึกษาทาง UV สเปคโตรสโคปีมักนิยมใช้หน่วยความยาวคลื่นเป็นนาโนเมตร (nm; 1 mn = 10^{-9} ม.) หรือหน่วยเป็นแองสตรอม (Å; 1 Å = 10^{-10} ม.) ส่วนหน่วยมิลลิไมครอน (mμ) ไม่นิยมใช้กันในปัจจุบัน

2.4.4 การเลือกใช้ตัวทำละลาย เซลล์บรรจุสารตัวอย่าง และข้อควรระมัดระวังในการวัดสเปคตรัม

ตัวทำละลาย ในการวัด UV สเปคตรัมของสาร ส่วนใหญ่จะวัดในสภาวะที่เป็นสารละลาย ตัวทำละลายที่เหมาะสมย่อมขึ้นอยู่กับช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการวัดสเปคตรัม และควรมีสมบัติโดยทั่วไปดังนี้

1. ละลายตัวอย่างได้ดี
2. ไม่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเดียวกับตัวอย่าง
3. ไม่ทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง
4. ไม่ไวไฟหรือเป็นพิษจนเกินไป
5. มีราคาถูกพอสมควร

ตัวทำละลายที่ใช้ได้ดีมีหลายตัวด้วยกันและต่างก็มีสมบัติในการละลายแตกต่างกัน น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสารอนินทรีย์หลายชนิดแต่มักไม่ละลายสารอินทรีย์ โดยปกติแล้วตัวทำละลายที่จัดอยู่ในพวก "spectrograde" มีจำหน่ายอยู่หลายตัวด้วยกัน และฉลากบนขวดจะบอกค่า absorbance ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ไว้ด้วย ตัวทำละลายที่เป็น "spectrograde" แตกต่างจากชนิดที่เป็น "analytical grade" เพราะชนิดหลังนี้แม้ว่าจะบริสุทธิ์สำหรับการวิเคราะห์ต่างๆ แต่ก็อาจมีสิ่งเจือปนที่ดูดกลืนรังสีได้ดี ทำให้ผลการวัดผิดพลาดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์บรรจุสารตัวอย่าง

เนื่องจากแก้วธรรมดาดูดกลืนรังสีในช่วง UV จึงจำเป็นต้องใช้เซลล์ที่ทำด้วยควอตซ์แทนเซลล์ที่นิยมความหนา 1.00 ซม. การรักษาความสะอาดเซลล์เป็นเรื่องสำคัญมาก สำหรับการวัดสเปคตรัมไม่ควรปล่อยให้ทำละลายระเหยไปจนเหลือสารตัวอย่าติดอยู่กับเซลล์ ควรล้างเซลล์ให้สะอาดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์หรือน้ำกลั่นตามความเหมาะสม เช็ดผิดภายนอกเซลล์ด้วยกระดาษเช็ดเซลล์และปล่อยให้แห้งในอากาศก็เป็นการเพียงพอ ให้ใช้กรดโครมิคล้างเซลล์ ควรแยกเซลล์ที่บรรจุสารละลายของสารอินทรย์ออกจาเซลล์ที่ใช้บรรจุพวกสารอนินทรีย์เพื่อให้ง่ายต่อการล้างทำความสะอาด เซลล์ควอตซ์นี้มีราคาแพง จึงควรเก็บรักษาไว้อย่างดีที่สุด

การเตรียมสารละลาย

ไม่ว่าจะใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำรังสีเดี่ยวหรือลำรังสีคู่ก็ตาม จะต้องใช้เซลล์บรรจุตัวทำละลายเป็นเซลล์อ้างอิงเสมอเพื่อป้องกันความผิดพลาด ควรใช้ตัวทำละลายจากขวดเดียวกันในการเตรียมสารละลายและสารอ้างอิง

ข้อควรระวังในการวัดสเปคตรัม

ในกรณีที่จำเป็นต้องวางมือจากการวัดสเปคตรัมชั่วขณะ เมื่อกลับมาทำงานต่อก็ควรตรวจการทำงานเครื่องมือโดยการลองวัดตัวอย่างที่วัดไปแล้วเพื่อเปรียบเทียบว่ายังคงได้ค่า absorbance เท่าเดิมหรือไม่ เมื่อเตรียมสารตัวอย่างเสร็จควรใช้วัดสเปคตรัมทันที ทั้งนี้เพราะสารประกอบหลายชนิดอาจแปรรูปได้เมื่ออยู่ในสารละลายนาน ๆ นอกจากนี้ ผู้ใช้จะต้องศึกษาหนังสือคู่มือของเครื่องมืออย่างละเอียด การใช้เครื่องมือโดยปราศจาก ความเข้าใจที่ถูกต้องย่อมทำให้เครื่องมือชำรุดเสียหายได้หรือได้ผลผิดพลาดได้ การที่กระแสไฟตก,หลอดดิวทีเรียมเสื่อมคุณภาพ, หรือตัวเลขบอกความยาวคลื่นไม่ตรงกับความเป็นจริง ล้วนแต่เป็นปัจจัยที่ต้องใช้เวลาตรวจสอบอย่างสม่ำเสมอ

2.4.5 การดูดกลืนรังสีของสารอินทรีย์

สารประกอบที่ปรากฏเป็นสีต่างๆ เนื่องจากสารนั้นสามารถดูดกลืนรังสีความยาวคลื่นบางช่วง เช่น ในช่วงของแสงที่แลเห็นได้ (λ = 400 – 800 nm) สารที่ปรากฏเป็นสีน้ำเงิน ก็เนื่องจากสารนั้นมีโครงสร้างบางส่วนหรือหลายส่วนที่ดูดกลืนแสงสีเหลืองได้ (λ = 570 – 590 nm) แสงที่ทะลุผ่านสารนั้นจึงปรากฏเป็นสีน้ำเงิน ส่วนของโครงสร้างที่เป็นสาเหตุทำให้มองเห็นเป็นสี จึงเรียกกันว่าโครโมฟอร์ (chromophore มาจาก chrome ซึ่งแปลว่า สี) โครโมฟอร์ส่วนมากจะมีพันธะชนิดไม่อิ่มตัว เช่น C=O , C=C , -N=N- , $-NO_2$ เป็นต้น ส่วนหมู่ฟังค์ชันอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น –OH, -NH_2 , -Ci, -Br ฯลฯ ไม่สามารถทำให้ปรากฏเป็นสีได้ด้วยตัวเอง แต่ก็สามารถช่วยให้อิทธิพลของโครโมฟอร์มีมากขึ้นเราเรียกหมู่เหล่านี้ว่าออกโซโครม (auxochrome)

ในปัจจุบันนี้คำว่าโครโมฟอร์และออกโซโครมมีความหมายกว้างกว่านี้มาก จึงขอให้คำนิยามดังนี้

โครโมฟอร์ ได้แก่หมู่ฟังค์ชันซึ่งอยู่อย่างโดดเดี่ยว (isolated) และสามารถดูดกลืนรังสีตั้งแต่ช่วง 200 – 800 nm

ออกโซโครม ได้แก่หมู่ฟังก์ชันซึ่งไม่สามารถดูดกลืนรังสีที่มีความยาวคลื่นมากกว่า 200 nm แต่เมื่อไปอยู่ในตำแหน่งที่ติดกับโครโมฟอร์แล้ว จะทำให้เกิดการดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่นยาวขึ้นและดูดกลืนรังสีได้มากขึ้นด้วย

ตัวอย่างเช่น เบนซีนดูดกลืนรังสีที่ λ_{max} 3 แห่งด้วยกัน แต่ในช่วงความยาวคลื่นมากกว่า 200 nm มีอยู่เพียง 2 แบนด์ แต่ในฟีนอลซึ่งมี –OH เป็นออกโซโครมอยู่นั้น สามารถดูดกลืนรังสีที่มีความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น และมีความเข้มขึ้นด้วย ในเรื่องนี้มีความอยู่หลายคำซึ่งใช้กันอยู่เสมอ และมีความหมายดังนี้

bathochromic (red) shift ได้แก่การที่สารดูดกลืนรังสีที่มี λ สูงขึ้นกว่าเดิมเพราะอิทธิพลของออกโซโครม

hypsochromic (blue) shift ได้แก่การที่สารดูดกลืนรังสีที่มี λ ลดลงกว่าเดิมเพราะอิทธิพลของออกโซโครม

hyperchromic shift ได้แก่การที่สารดูดกลืนรังสีโดยมีความเข้มสูงกว่าเดิม

hypochromic shift ได้แก่การที่สารดูดกลืนรังสีโดยมีความเข้มลดลงจากเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
96793

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Duh and Yen(1997) ศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากสมุนไพร 3 ชนิดคือ ดอกของ *Chrysanthemum moriforium Romat*, *Hibiscus sabdarifa* Linn. (ดอกกระเจี๊ยบแดง) และเมล็ดของ *Hordeum vulgare* Linn. โดยใช้น้ำเป็นตัวสกัด พบว่าสารสกัดจากพืชทั้ง 3ชนิดแสดงสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

Tseng และคณะ(1997) สกัดสารจากดอกกระเจี๊ยบอบแห้งโดยใช้เอธานอล พบว่าสารสกัดที่ได้สามารถป้องกันการเกิด oxidative stress ในหนูทดลองได้อย่างชัดเจน

Tsengและคณะ(1998) พบว่ากรดฟีนอลิก (protocatethuic acid) ที่ได้จากดอกกระเจี๊ยบแดงมีสมบัติในการยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็งผิวหนังในหนูทดลองได้ดี นอกจากนี้ Tseng และคณะ (2000) ยังรายงานว่ากรดฟีนอลิกดังกล่าวมีแนวโน้มในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์อีกด้วย

Tsengและคณะ(2000) พบว่าสารแอนโธไซยานินที่พบในดอกกระเจี๊ยบแดง มีสมบัติในการทำลายอนุมูลอิสระและยังสามารถป้องกันการเกิด oxidative stress ในหนูทดลองได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ดอกกระเจี๊ยบแดงแห้ง ตลาดหัวตะเข้ แขวง/เขต ลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

3.2 อุปกรณ์การทดลองที่สำคัญ

1. เครื่อง UV – spectrophotometer รุ่น UV-1601 ผลิตโดยบริษัท SHI MADZU
2. Micropipet ขนาด 40-200 µl
3. Pipette ขนาด 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 ml
4. เครื่องบด (blender)
5. เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator)
6. เครื่องเขย่า (rotary shaker)
7. คอนเดนเซอร์ (condenser)
8. เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
9. ขวดก้นกลม (round bottom flask)
10. เตาหลุม (heating mantle)
11. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
12. กระบอกตวง (graduated cylinder)
13. Glass bead

3.3 สารเคมี

1. Diamonium hydrogen phosphate heptahydrate ($Na_2HPO_4.7H_2O$), FW 228.23 , **รหัสสาร** 471767, **ผลิตโดย** Carlo erba Reagent

2. Amonium dihydrogen phosphate monohydrate ($NaH_2PO_4.H_2O$), FW 137.99 , **รหัสสาร** 471687, **ผลิตโดย** Carlo erba Reagent

3. Sodium chloride (NaCl), FW 58.44, **รหัสสาร** K2101, **ผลิตโดย** Labscan Asia Co.,Ltd.

4. 2,2-azinodi (3-ethylbenzthiazoline sulfonate หรือ ABTS) ($C_{18}H_{18}N_4O_6S_4.(NH_3)_2$), FW 548.7, **รหัสสาร** A-1888, **ผลิตโดย** Sigma

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Hydrogen peroxide (H_2O_2) solution 30% m/m, FW 34.015, รหัสสาร 412072005, ผลิตโดย Carlo erba Reagent

6. Myoglobin from Horse heart Minimum 90%(phast gel), รหัสสาร M-1882, ผลิตโดย Sigma Chemical Co.

7. Potassium fericyanide ($K_3Fe(CN)_6$), FW 329.2 , รหัสสาร P-3667, ผลิตโดย Sigma Chemical Co.

8 .L+ Ascorbic acid ($C_6H_8O_6$), FW 176.13 g/ mol, รหัสสาร 572227 028, ผลิตโดย Merck

9. Propyl gallate (PG) ($C_{10}H_{12}O_5$), FW 212.20 , รหัสสาร 48710, ผลิตโดย Fluka Chemical

10. Folin-Ciocalteus phenol reagent , รหัสสาร B0107830, ผลิตโดย MERCK

11. Sodium carbonate (Na_2CO_3), FW 105.99 g/mol, รหัสสาร A313892 142, ผลิตโดย Merck

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำกระเจี๊ยบแดงแห้งมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบด (blender)

3.4.2 ขั้นตอนการสกัด

3.4.2.1 *สกัดร้อน* (อุณหภูมิประมาณ 76 ^{0}C)

- นำกระเจี๊ยบแดงบด 25 g มาสกัดด้วย 95% เอธานอล ปริมาตร 250 ml ที่อุณหภูมิประมาณ 76 ^{0}Cเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้การรีฟลักซ์ (reflux) นำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 จากนั้นระเหยตัวทำละลายโดยใช้ระบบสุญญากาศโดยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 30 ^{0}C จนตัวทำละลาย (เอธานอล) หมดไป
- นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol) ตามวิธีที่รายงานโดย Yildirim et al. (2001) (ตามวิธีในข้อ 3.4.3) และทดสอบสมบัติ การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี total antioxidant assay (ตามวิธีในข้อ 3.4.4)

3.4.2.2 *สกัดเย็น* (อุณหภูมิห้องประมาณ 25 ^{0}C)

- นำกระเจี๊ยบแดงบด 25 g มาสกัดด้วย 95% เอธานอล ปริมาตร 250 ml ในขวดรูปชมพู่ โดยนำเข้าเครื่องเขย่าเป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้ไปกรองด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษกรอง Whatman No.4 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกโดยระบบสุญญากาศ โดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 30 °C จนตัวทำละลาย (เอธานอล) หมดไป

- นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด ตามวิธีที่รายงานโดย Yildirim et al., (2001) (ตามวิธีในข้อ 3.4.3) และทดสอบสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี total antioxidant assay (ตามวิธีในข้อ 3.4.4)

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด จะใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีที่รายงานโดย (Yieldirim et al., 2001) โดยให้สารประกอบโพลีฟีนอลทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu และติดตามสีน้ำเงินที่เกิดขึ้น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 nm ใช้กรดแกลลิค (gallic acid) เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลมาตรฐาน

3.4.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิค (gallic acid)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิค ความเข้มข้น 400 µl /ml โดยละลายกรดแกลลิค 0.02 g ใน 95% เอธานอล ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ในขวดวัดปริมาตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานดังกล่าว ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 ml ขวดละ 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.225, 0.25, 0.3 และ0.35 ml เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรแต่ละขวดเท่ากับ 10 ml จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีกรดแกลลิคเท่ากับ 20, 40, 60, 80, 90, 100, 120, 140 µg ตามลำดับ

นำขวดรูปชมพู่ทั้งหมดมาเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu (เจือจางจากขวด 1:1 โดยปริมาตรด้วยน้ำกลั่น) ขวดละ 0.5 ml เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10% Na_2CO_3 ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที (ในกรณีที่สารละลายปฏิกิริยามีความขุ่น ให้นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 8 นาทีเพื่อแยกตะกอนออก) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 nm เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดแกลลิคเป็นไมโครกรัม

3.4.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง

เตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงให้มีความเข้มข้น 0.2 mg/ml โดยชั่งสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงมา 0.2 g ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร100 ml จากนั้นเจือจางสารละลายดังกล่าว 10 เท่า โดยปิเปตมา 1 ml เติมน้ำกลั่น 9 ml จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 0.2 mg/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้มา 0.5 ml เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu (เจือจางจากขวด 1:1 โดยปริมาตรด้วยน้ำกลั่น) ขวดละ 0.5 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10% Na_2CO_3 ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง10นาที (ในกรณีที่สารละลายปฏิกิริยามีความขุ่น ให้นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000รอบ/นาที เป็นเวลา 8 นาทีเพื่อแยกตะกอนออก) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 nm เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดแกลลิคเป็นไมโครกรัม

3.4.4 การทดสอบสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

การทดลอบสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง ใช้วิธี total antioxidant assay โดยดัดแปลงจากวิธีที่รายงานโดย (Landrault et al., 2001) วิธีนี้อาศัยการติดตามความสามารถของตัวอย่างสารสกัดในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของ 2,2-azinodi (3-ethylbenzthiazoline sulfonate หรือ ABTS) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ทำให้สารละลายมีสีน้ำเงินแกมเขียว และสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 600 nm ดังนั้น ถ้าสารตัวอย่างมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของสารดังกล่าวได้ดีจะทำให้อัตราการเกิดสีน้ำเงินแกมเขียวของสารละลายปฏิกริยาช้า ซึ่งแสดงว่าสารนั้นมีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี โดยจะเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐาน 2 ชนิดคือ propyl gallate (PG) และวิตามินซี (ascorbic acid) และเปรียบเทียบวิธีการสกัดเย็นกับการสกัดร้อน

3.4.4.1 การทดสอบสมบัติการต้านปฏิกริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง

ตัวอย่างสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ใช้ในการทดสอบสมบัติการต้านปฏิกริยาออกซิเดชัน เตรียมได้โดยชั่งสารสกัด 1 g ละลายใน phosphate buffer solution (PBS) ให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 ml ในขวดวัดปริมาตร จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างกันคือ 225, 200, 175, 125 µg จากนำตัวอย่างไปทดสอบสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยปิเปต สารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆกันจำนวน 25 µl, สารละลาย ABTS 100 µl,180 µl สารละลาย Metmyoglobin180 µl และ PBS 775 µl ลงในหลอดทดลองพลาสติกขนาดเล็ก (Eppendroff tube) จากนั้นเติมสารละลาย H_2O_2 120 µl ผสมสารละลายปฏิกิริยาให้เข้ากันทันที โดยใช้ vortex mixer พร้อมกับจับเวลา จากนั้นถ่ายสารละลายปฏิกิริยาใส่คิวเวต (cuvette) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm อ่านผลทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 10 นาที เปรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทียบกับปฏิกิริยาควบคุม (control) ซึ่งเติมPBS 25 µl แทนสารละลายตัวอย่าง สำหรับ blank จะเติม PBS (25+120 µl) แทนสารละลายตัวอย่างและสารละลาย H_2O_2 สำหรับรายละเอียดของวิธีการเตรียมสารละลายต่างๆที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา สามารถดูได้จากภาคผนวก ก

3.4.4.2 การทดสอบสมบัติการต้านปฏิกริยาออกซิเดชันของสารต้านปฏิกริยาออกซิเดชันมาตรฐาน

สารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง คือ โพรพิล แกลเลต และวิตามินซี โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นต่างๆกันคือ 5300, 530, 53 , 5.3 x 10^{-3}µg และวิตามินซี 4400. 440, 44, 4.4 x 10^{-3}µg จากนั้นนำไปทดสอบสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่นเดียวกับตัวอย่างสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง กรณีของโพรพิล แกลเลต จะใช้ 95% เอธานอลเป็นตัวทำละลายแทน PBS ดังนั้น blank และปฏิกิริยาควบคุมจึงใช้ 95% เอธานอลแทน PBS ด้วย

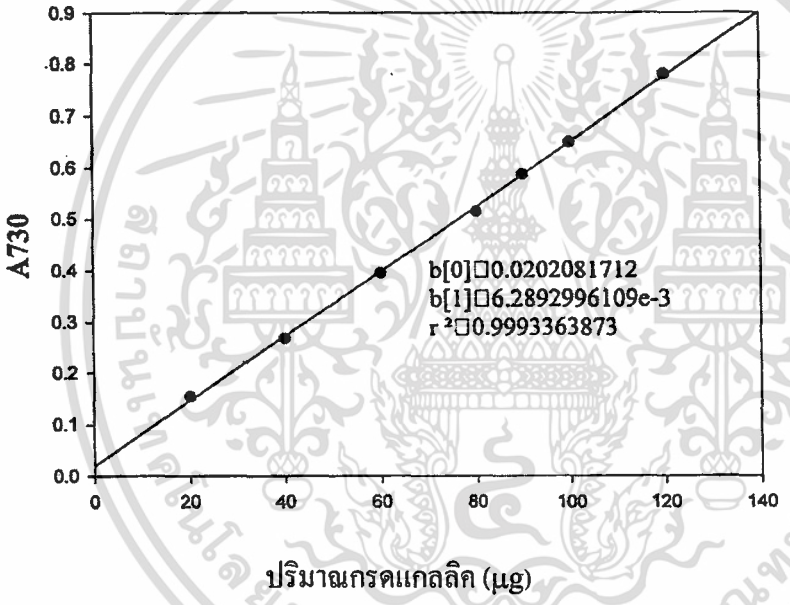
นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm กับเวลาในการเกิดปฏิกิริยา จากนั้นคำนวณหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ของตัวอย่างต่างๆ โดยให้ค่าดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาควบคุมที่เวลา 2 นาทีเป็น100% และเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาตัวอย่างที่เวลาเดียวกันเป็นร้อยละของปฏิกิริยาควบคุมดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง

ในการเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดโดยใช้กรดแกลลิคเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลมาตรฐานให้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด โดยใช้กรดแกลลิคเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลมาตรฐาน

จากภาพที่ 4.1 สมการเส้นตรงที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดคือ $Y=6.289x10^{-3} \pm 0.02$ โดยมีค่า $r^2=0.9993$

จากการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้จากวิธีการสกัดร้อนและการสกัดเย็นให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 จะเห็นว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงซึ่งใช้วิธีการสกัดร้อน จะมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดต่ำกว่าตัวอย่างที่ได้จากการสกัดเย็นเล็กน้อย

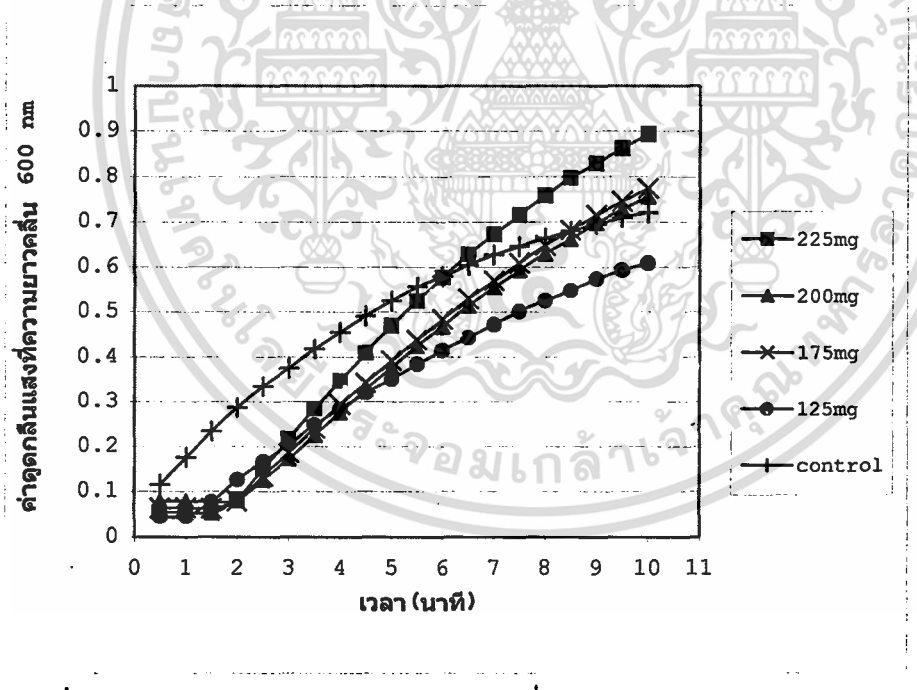
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง

ตัวอย่างสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง	ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (mg ของกรดแกลลิค /g สารสกัด)
สกัดร้อน	66.31
สกัดเย็น	69.60

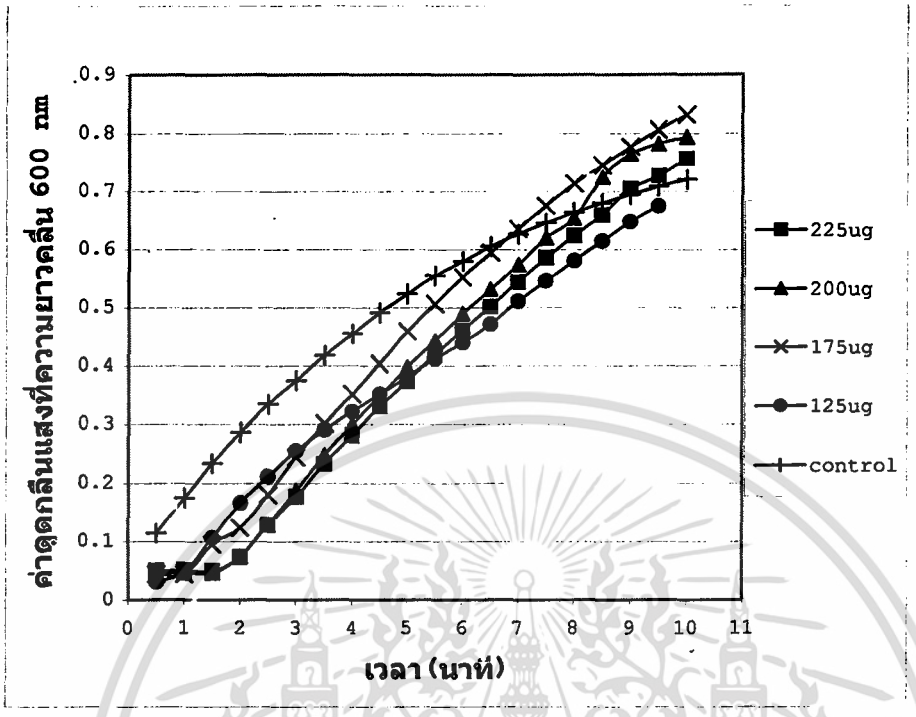
4.2 การศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง

ในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้จากวิธีการสกัดเย็นและการสกัดร้อนด้วย 95% เอธานอลโดยติดตามสีน้ำเงินแกมเขียวของสารละลายปฏิกิริยาอันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระของ ABTS ที่เกิดขึ้นโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.2 และ 4.3



ภาพที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของสารละลายปฏิกิริยากับเวลา ในการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้โดยการสกัดเย็นที่ปริมาณต่างๆกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

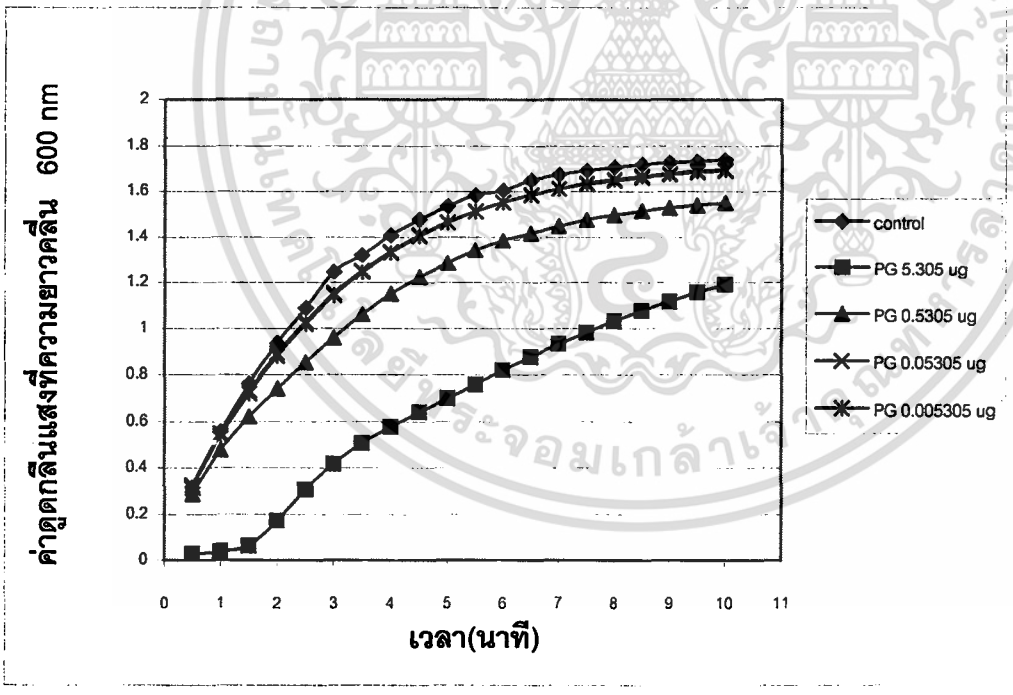


ภาพที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของสารละลายปฏิกิริยากับเวลา ในการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้โดยการสกัดร้อนที่ปริมาณต่างๆกัน

จากผลการทดลองในภาพที่ 4.2 และ4.3 เมื่อพิจารณากราฟของปฏิกิริยาควบคุม (control) ซึ่งไม่มีการเติมสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันใดๆ ตามทฤษฎีปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีที่สุดและสมบูรณ์ที่สุด ดังจะเห็นได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm มีค่าสูงขึ้นเมื่อเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น สำหรับปฏิกิริยาที่มีการเติมตัวอย่างของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ปริมาณต่างๆกัน พบว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดในอัตราที่ช้ากว่าของปฏิกิริยาควบคุมโดยลักษณะของกราฟมีความคล้ายคลึงกันทั้งกรณีของสารสกัดที่ได้จากการสกัดเย็นและการสกัดร้อน กล่าวคือในช่วง 2 นาทีแรกของปฏิกิริยาเส้นกราฟจะมีลักษณะของแลกเฟส (lag phase) ซึ่งแสดงให้เห็นชัดเจนว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงมีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี ซึ่งลักษณะของกราฟดังกล่าวพบได้ในปฏิกิริยาที่เติมโพรพิล แกลเลต 5.5 µg (ภาพที่ 4.4) แต่ไม่พบในกรณีของวิตามินซีที่ทุกความเข้มข้นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.5)

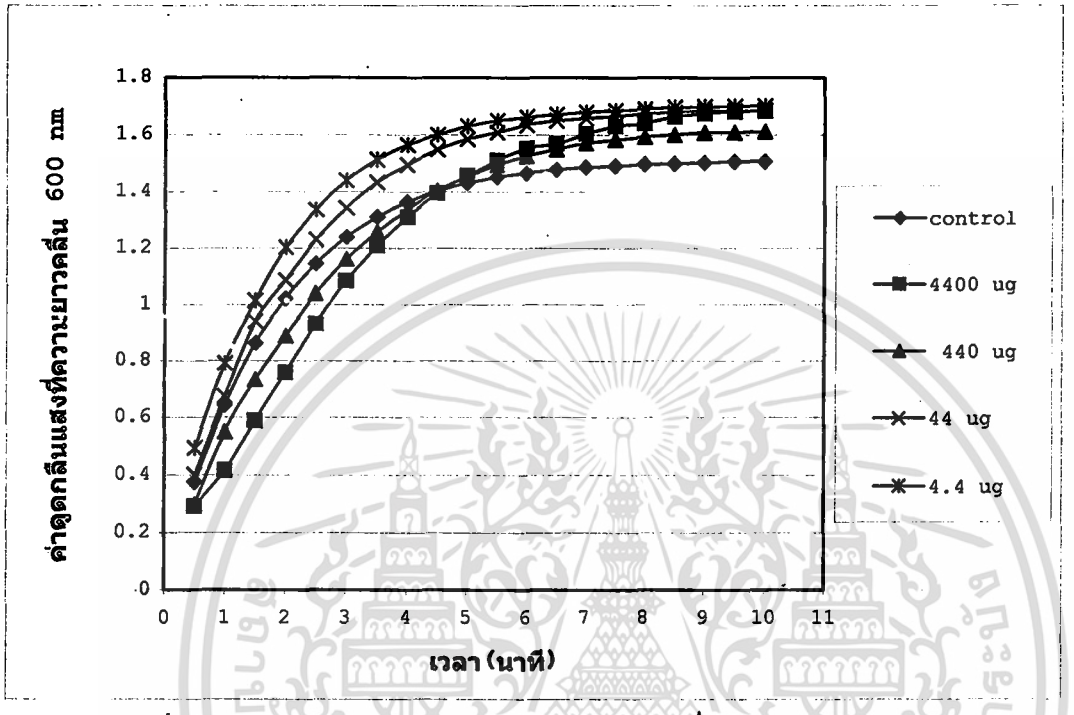
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาหลังจาก 2 นาที จะเห็นว่าเส้นกราฟของทุกตัวอย่างจะเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ที่ปริมาณสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่เติมลงในปฏิกิริยามีค่าสูงขึ้น (≥175µg) ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ของสารละลายปฏิกิริยาดังกล่าวจะมีค่าสูงกว่าปฏิกริยาควบคุมที่เวลามากกว่า 8 นาที ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวไม่พบในปฏิกิริยาที่เติมสารต้านปฏิกริยาออกซิเดชันมาตรฐานโพรพิลแกลเลต และวิตามินซี (ภาพที่ 4.4 และ4.5) การที่ตัวอย่างสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงทำให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm มีค่าสูงกว่าปฏิกิริยา ควบคุมโดยเฉพาะที่เวลาของการเกิดปฏิกิริยานานขึ้น (หลังจาก 8 นาที)นั้น อาจเนื่องมาจากสาเหตุหนึ่งที่มีความเป็นไปได้สูงคือ สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำลายอนุมูลอิสระของ ABTS โดยสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงนั้นสามารถดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ได้เช่นเดียวกับ อนุมูลอิสระของ ABTS ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีปริมาณสูงขึ้นรวมทั้งอนุมูลอิสระของ ABTS ที่ไม่ได้ถูกทำลายก็สะสมในปริมาณที่มากขึ้นด้วย ทำให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm มีค่ารวมกันสูงกว่าปฏิกิริยาควบคุมดังกล่าว



ภาพที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสง 600 nm ของสารละลายปฏิกิริยากับเวลาในการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานโพรพิลแกลเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของสารละลายปฏิกิริยากับเวลา ในการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานวิตามินซี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อให้การเปรียบเทียบสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงเมื่อเติมลงในสารละลายปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจสอบในปริมาณต่างๆกัน เป็นไปได้ง่ายขึ้น จึงกำหนดให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของปฏิกิริยาควบคุมที่เวลา 2 นาทีเป็น 100% จากนั้นคำนวณค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของปฏิกิริยาที่มีการเติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ปริมาณต่างๆ ณ เวลา 2 นาที คิดเป็นร้อยละเท่าไรของปฏิกิริยาควบคุม ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2 และ4.3 ในทำนองเดียวกันกับกรณีของโพรพิลแกลเลตและวิตามินซี ซึ่งให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ4.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ ของสารละลายปฏิกิริยาที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงซึ่งได้ จากการสกัดเย็นที่ปริมาณต่างๆ

ปริมาณสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง (µg)	อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์(%)
ปฏิกิริยาควบคุม	100
125	42.50 ± 1.97^{a}
175	28.22 ± 0.50^{b}
200	28.40 ± 0.25^{b}
225	29.79 ± 1.23^{b}

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.3 อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ ของสารละลายปฏิกิริยาที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงซึ่งได้ จากการสกัดร้อนที่ปริมาณต่างๆ

ปริมาณสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง (µg)	อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์(%)
ปฏิกิริยาควบคุม	100
125	59.53 ± 1.97^{a}
175	45.30 ± 2.96^{b}
200	27.09 ± 2.04^{c}
225	25.78 ± 3.45^{c}

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ ของสารละลายปฏิกิริยาที่เติมสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานโพรพิลแกลเลตที่ปริมาณต่างๆ

ปริมาณโพรพิลแกลเลต ($x10^{-3}$ µg)	อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์(%)
ปฏิกิริยาควบคุม	100
5.3	94.13 ± 2.42^{a}
53	94.34 ± 2.71^{a}
530	79.08 ± 2.11^{b}
5300	19.10 ± 1.05^{c}

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.5 อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ ของสารละลายปฏิกิริยาที่เติมสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานวิตามินซีที่ปริมาณต่างๆ

ปริมาณวิตามินซี ($x10^{-3}$µg)	อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์(%)
ปฏิกิริยาควบคุม	100
4.4	117.82 ± 1.24^{a}
44	111.21 ± 1.72^{b}
440	87.16 ± 1.66^{c}
4400	74.44 ± 1.66^{d}

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองในตารางที่ 4. 2 และ4.3 จะเห็นว่าการเติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงในสารละลายปฏิกิริยาในปริมาณที่สูงขึ้นมีผลทำให้ปฏิกริยาออกซิเดชันถูกยับยั้งมากขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงปริมาณ $\geq$ 175 µg ในกรณีของการสกัดเย็น และ 200 µg ในกรณีของการสกัดร้อนจะไม่มีผลทำให้อัตราการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ของสารสกัดดังกล่าวลดลงไปได้อีก หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ ความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้โดยวิธีสกัดเย็นในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจะสูงกว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้โดยวิธีสกัดร้อน โดยสังเกตได้จากที่อัตราการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์เท่ากันคือประมาณ 28% จะต้องการปริมาณของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้จากการสกัดร้อนสูงกว่า (200 µg) การสกัดเย็น (175 µg) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง ที่ได้จากการสกัดเย็นสูงกว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดร้อน (ตารางที่ 4.1) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารประกอบโพลีฟีนอลในสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงมีผลในการต้านปฏิกริยาออกซิเดชัน

เมื่อพิจารณาสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐาน 2 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง คือโพรพิลแกลเลตและวิตามินซี จะเห็นว่าการใช้ปริมาณสารประกอบดังกล่าวปริมาณที่น้อยกว่า ก็มีผลในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี (ตารางที่ 4.4 และ4.5) ในขณะที่ต้องใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงปริมาณที่มากกว่าจึงจะสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในระดับที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง เป็นสารผสมที่ประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิดไม่ได้อยู่ในรูปสารบริสุทธิ์ นอกจากนี้โดยธรรมชาติแล้วสารประกอบที่มีอยู่ในสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงดังกล่าวอาจจะมีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ไม่ดีเท่าโพรพิลแกลเลตและวิตามินซี อย่างไรก็ตามผลการทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ปริมาณสูง (เมื่อเปรียบเทียบกับโพรพิลแกลเลตและวิตามินซี) มีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง เปรียบเทียบระหว่างการสกัดเย็นและสกัดร้อนด้วย 95% เอธานอล โดยติดตามความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของ 2,2-azinodi(3-ethylbenzthiazoline sulfonate) หรือ ABTS ที่เกิดขึ้นในสารละลายปฏิกิริยา พบว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้โดยวิธีการสกัดเย็นจะมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าสารสกัดที่ได้โดยวิธีการสกัดร้อน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบ โพลีฟีนอลทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ โดยสารสกัดที่ได้โดยวิธีการสกัดเย็นจะมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดที่ได้โดยวิธีการสกัดร้อน จากผลการทดลองดังกล่าว สรุปได้ว่าสารประกอบโพลีฟีนอลที่มีอยู่ในสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงเกี่ยวข้องกับสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันและการสกัดร้อนมีผลทำให้ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลในสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดเย็น

เมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐาน 2 ชนิดคือโพรพิลแกลเลต และวิตามินซี สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงจะมีประสิทธิภาพไม่สูงเท่า เนื่องจากต้องใช้ปริมาณของสารสกัดสูงกว่าในการทำให้เกิดการต้านปฏิกริยาออกซิเดชันในระดับที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงมีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีเมื่อใช้ในปริมาณสูงในระดับมิลลิกรัม และการสกัดร้อนทำให้สารที่มีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันอาจมีการสลายตัวจึงทำให้ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดและสมบัติการต้านปฏิกริยาออกซิเดชันของการสกัดร้อนจึงมีค่าต่ำกว่านั่นเอง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1.เนื่องจากการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ต่างกันอาจให้ผลการทดลองต่างกัน จึงควรมีการศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงโดยใช้วิธีการตรวจสอบแบบอื่นๆ เช่น DPPH assay , hydroxyl radical assay เป็นต้น

2.ควรมีการทดลองนำสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงไปใช้ประโยชน์เป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันธรรมชาติ (natural antioxidant) ในผลิตภัณฑ์อาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัญจนา ดีวิเศษ. 2542. **ผักพื้นบ้านภาคกลาง**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร . โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

นันทวัน บุนยะประภัศร. 2535 . "ดอกกระเจี๊ยบแดง". **ข้อมูลสมุนไพร**. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 5 - 8

วิชัย ริ้วตระกูล, โกศัลย์ คูสำราญ, พิเชษฐ์ วิริยะจิตรา, สุรชัย นิมจิรวัฒน์ และ อภิชาติ สุขสำราญ. 2526. **การประยุกต์สเปคโตรสโคปีในเคมีอินทรีย์**. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพมหานคร: หจก. นำอักษรการพิมพ์

วัลยา เนาวรัตน์วัฒนา และ พัชรี บุญศิริ. 2542. **โปรออกซิแคนท์:อีกโฉมหน้าของแอนติออกซิแดนท์**. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สมยศ สุทธิไวกิจ. 2538. **เคมีอินทรีย์ชั้นสูง 2**. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. หน้า 127-128,153-158 .

สุนันทา วิบูลย์จันทร์. 2538. **"เคมีอินทรีย์"** กรุงเทพมหานคร : โครงการเอกสารภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล

สันติ ทิพยางค์. 2535. "สารกันหืนสำหรับอาหาร". **อาหาร** Food. 22(2) : 1-7

อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2536. **การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 7-194.

Duh, P.D. and Yen, G.H. 1997. Antioxidant actitivity of three herbal water extract. **Food Chem**. 60:639-645.

Tseng ,T.H. ,Hsu ,J.D. ,Lo, M.H. ,Chu, C.Y. ,Chou, F.P. ,Huang, C.L. and Wang ,C.J. 1998. Inhibitory effect of Hibiscus prototechuic acid on tumor promotion in mouse skin. **Cancer Lett** . 126:199-207.

Tseng, T.H. ,Kao ,E.S. ,Chu, C.Y. ,Chou ,F.P. ,Wu, H.W.L. and Wang ,C.J. 1997. Protective effect of dried flower extract of *Hibiscus sabdariffa* Linn. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. **Food Chem Toxicol**. 35:1159-1164.

Wang, C.J. ,Wang ,J.M. ,Chu, C.Y. and Tseng, T.H.2000. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induce hepatic toxicity in rats. **Food Chem Toxicol**. 38:411-416.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมีและตัวอย่างการคำนวณ

การเตรียมสารเคมี

1. Phosphate buffer solution (PBS)

1.1. 100 mM PBS (Stock Solution)

- $Na_2HPO_4 . 7H_2O$ (FW = 268.07) 26.81 g
- $NaH_2PO_4 . H_2O$ (FW = 137.99) 13.80 g
- NaCl (FW = 58.44) 87.66 g

ละลาย $Na_2HPO_4 . 7H_2O$ ในน้ำกลั่น 1 L, และละลาย $NaH_2PO_4 . H_2O$ ในน้ำกลั่น 1 L จากนั้นนำมาผสมกันจนกระทั่งได้สารละลายผสมที่มี pH 7.4 เติม NaCl คนให้ละลาย ปรับปริมาตรให้เป็น 1 L เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

1.2. 10 mM PBS (Working solution)

นำ Stock Solution ในข้อ 1.1 มาทำให้เจือจาง 10 เท่า เพื่อใช้ในการทดลอง

2. 2.5 mM *2,2 – azinodi (3-ethylbenzthiazoline sulfonate) หรือ ABTS*

ชั่ง ABTS 0.0137 g ละลายใน 10 ml 10 mM PBS จะได้สารละลาย ABTS ใน PBS ความเข้มข้น 2.5 mM เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ และแช่น้ำแข็งตลอดเวลาในระหว่างการทดลองในแต่ละวัน

3. Metmyoglobin (MetMG)

3.1 ชั่ง myoglobin 18.8 mg ละลายใน 10 mM PBS ปริมาตร 10ml โดยใช้ขวดวัดปริมาตร

3.2 ชั่ง 12 2 mg Potassium ferricyanide $[K_3Fe(cN)_6]$ ละลายใน 10 mM PBS ปริมาตร 200 ml โดยใช้ขวดวัดปริมาตร

นำสารที่เตรียมได้ในข้อ 3.1 และ 3.2 มารวมกัน โดยใช้อัตราส่วน 1: 1โดยปริมาตรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ และแช่น้ำแข็งตลอดเวลาในระหว่างการทดลองในแต่ละวัน

4. 10 mM H_2O_2 Solution นำ 30% H_2O_2 มา 0.091 ml ละลายในน้ำกลั่น 1 Lในขวดวัดปริมาตรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ และแช่น้ำแข็งตลอดเวลาในระหว่างการทดลองในแต่ละวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณ

ต้องการเตรียมสารละลาย H_2O_2ที่มีความเข้มข้น 10 mM ดังนั้นต้องชั่ง H_2O_2มา 0.34 g ปรับปริมาตรให้เป็น 1 L ในขวดวัดปริมาตร

แต่เนื่องจากสารละลาย H_2O_2 มีความเข้มข้น 30 %ดังนั้น

H_2O_2 100% ใช้ 0.34 g

ถ้า 30% H_2O_2 ใช้ 0.34x30/100 = 0.102 g / L

จาก $D = \frac{M}{V} \rightarrow V = \frac{M}{D}$

เมื่อ

D คือ ความหนาแน่นของสารละลาย

M คือ น้ำหนักสาร (g)

V คือ ปริมาตรของสารละลาย

FW ของ H_2O_2 = 34

ดังนั้น $\frac{0.102g}{1.12}$ = 0.091 ml / น้ำกลั่น 1 L

5. การเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง (สกัดร้อนและสกัดเย็น) เพื่อใช้ในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

เตรียมสารละลายสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงให้มีความเข้มข้น 1 g/100ml จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆดังตารางต่อไปนี้

ปริมาณสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงในสารละลาย 25µl (µg)	ปริมาณของสารละลายสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง ความเข้มข้น 1 g/100ml (ml)	ปริมาณของน้ำกลั่น (ml)
125	5.0	5.0
175	7.0	3.0
200	8.0	2.0
225	9.0	1.0

ตารางที่ ก.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง (สกัดร้อนและสกัดเย็น) เพื่อใช้ในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การเตรียมสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานโพรพิล แกลเลต เพื่อใช้ในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ละลาย 0.0212 g ของโพรพิล แกลเลต ในเอธานอล 10 ml จะได้โพรพิล แกลเลต ที่มีความเข้มข้น 1mM (5500x10^{-3}µg/25µl) ทำการเจือจางจากสารละลาย

ความเข้มข้น 550x10^{-3}µg/25µl ใช้ 1.0 ml ของ 1 mM โพรพิล แกลเลต เติมน้ำกลั่น 9 ml

ความเข้มข้น 55x10^{-3}µg/25µl ใช้ 1.0 ml จากข้อ 1 เติมน้ำกลั่น 9 ml

ความเข้มข้น 5.5x10^{-3}µg/25µl ใช้ 1.0 ml จากข้อ 2 เติมน้ำกลั่น 9 ml

7. การเตรียมสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานวิตามินซี เพื่อใช้ในการตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ละลาย 0.0176 g ของ วิตามินซี ในเอธานอล 10 ml จะได้วิตามินซี ที่มีความเข้มข้น 1 mM (4400x10^{-3}µg/25 µl) ทำการเจือจางจากสารละลาย 1mM ดังนี้

ความเข้มข้น 440x10^{-3}µg/25µl ใช้ 1.0 ml ของ 1mM วิตามินซี เติมน้ำกลั่น 9 ml

ความเข้มข้น 44x10^{-3}µg/25µl ใช้ 1.0 ml จากข้อ 1 เติมน้ำกลั่น 9 ml

ความเข้มข้น 4.4x10^{-3}µg/25µl ใช้ 1.0 ml จากข้อ 2 เติมน้ำกลั่น 9 ml

ตัวอย่างการคำนวณ

อัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์

กำหนดให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของปฏิกิริยาควบคุมที่เวลา 2 นาทีเป็น 100% จากนั้นคำนวณค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของปฏิกิริยาที่มีการเติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ปริมาณต่างๆ ณ เวลา 2 นาที คิดเป็นร้อยละเท่าไรของปฏิกิริยาควบคุม ดังแสดงในตัวอย่างต่อไปนี้

ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้จากการสกัดร้อนที่ความเข้มข้น 200 µg

ครั้งที่ 1

ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ของปฏิกิริยาควบคุม 0.277 คิดเป็น 100%

ถ้าค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nmของสารสกัด0.079คิดเป็น100x0.079/0.276=28.52%

ดังนั้นสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ครั้งที่ 1 = 28.52%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครั้งที่ 2

ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ของปฏิกิริยาควบคุม 0.277 คิดเป็น 100%

ถ้าค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nmของสารสกัด0.071คิดเป็น100x0.071/0.276=25.63%

ดังนั้นสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ครั้งที่ 2 = 25.63%

ดังนั้นสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์เฉลี่ย(%)ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 200 µg คือ 28.52+25.63/2=27.09%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ผลการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ.1 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำร้อนที่ปริมาณต่างๆ โดยวิธี total antioxidant assay

เวลา (นาที)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm														
	ปฏิกิริยาควบคุม			225 µg			200 µg			175 µg			125 µg		
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
0.5	0.110	0.120	0.115	0.051	0.051	0.051	0.045	0.047	0.046	0.044	0.046	0.045	0.033	0.029	0.031
1.0	0.168	0.184	0.176	0.052	0.052	0.052	0.046	0.048	0.047	0.044	0.046	0.045	0.052	0.046	0.049
1.5	0.222	0.246	0.234	0.050	0.052	0.051	0.046	0.048	0.047	0.094	0.098	0.096	0.113	0.101	0.107
2.0	0.276	0.278	0.277	0.067	0.081	0.074	0.071	0.079	0.075	0.124	0.136	0.125	0.176	0.168	0.167
2.5	0.318.	0.352	0.335	0.127	0.131	0.129	0.128	0.134	0.131	0.175	0.187	0.181	0.216	0.208	0.212
3.0	0.365	0.387	0.376	0.177	0.179	0.178	0.185	0.191	0.188	0.238	0.252	0.245	0.270	0.240	0.255
3.5	0.402	0.434	0.418	0.230	0.236	0.233	0.238	0.258	0.248	0.290	0.314	0.302	0.298	0.284	0.291
4.0	0.431	0.481	0.456	0.274	0.290	0.282	0.289	0.311	0.300	0.336	0.368	0.352	0.333	0.311	0.322
4.5	0.507	0.507	0.492	0.323	0.339	0.331	0.339	0.359	0.349	0.384	0.424	0.404	0.364	0.340	0.352
5.0	0.517	0.531	0.524	0.368	0.380	0.374	0.391	0.405	0.398	0.446	0.474	0.460	0.401	0.367	0.384
5.5	0.544	0.568	0.556	0.416	0.422	0.419	0.438	0.450	0.444	0.487	0.527	0.507	0.421	0.403	0.412
6.0	0.568	0.592	0.580	0.453	0.471	0.462	0.474	0.506	0.490	0.544	0.562	0.553	0.450	0.430	0.440
6.5	0.599	0.611	0.605	0.492	0.512	0.502	0.523	0.541	0.532	0.583	0.607	0.595	0.480	0.464	0.472
7.0	0.619	0.635	0.627	0.535	0.555	0.545	0.564	0.584	0.574	0.628	0.644	0.636	0.523	0.501	0.512
7.5	0.626	0.666	0.646	0.581	0.591	0.586	0.610	0.630	0.620	0.668	0.684	0.676	0.555	0.539	0.547
8.0	0.650	0.678	0.664	0.616	0.632	0.624	0.648	0.660	0.654	0.696	0.732	0.714	0.589	0.573	0.581
8.5	0.668	0.692	0.680	0.646	0.674	0.660	0.714	0.736	0.725	0.725	0.765	0.745	0.624	0.606	0.615
9.0	0.684	0.706	0.695	0.698	0.712	0.705	0.758	0.772	0.765	0.763	0.791	0.777	0.561	0.635	0.648
9.5	0.700	0.718	0.709	0.722	0.732	0.727	0.774	0.790	0.782	0.793	0.819	0.806	0.683	0.667	0.675
10.0	0.717	0.725	0.721	0.749	0.752	0.751	0.786	0.802	0.794	0.817	0.847	0.832	0.710	0.698	0.704

ตารางที่ ข.2 ผลการวิเคราะห์สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้จากการสกัดเย็นที่ปริมาณต่างๆ โดยวิธี total antioxidant assay

เวลา (นาที)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm														
	ปฏิกิริยาควบคุม			225 µg			200 µg			175 µg			125 µg		
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
0.5	0.110	0.120	0.115	0.046	0.062	0.054	0.080	0.078	0.079	0.068	0.060	0.064	0.045	0.047	0.046
1.0	0.168	0.184	0.176	0.048	0.062	0.055	0.080	0.078	0.079	0.070	0.060	0.065	0.045	0.047	0.046
1.5	0.222	0.246	0.234	0.044	0.062	0.053	0.077	0.079	0.078	0.065	0.061	0.063	0.076	0.078	0.077
2.0	0.276	0.298	0.287	0.087	0.089	0.088	0.080	0.082	0.081	0.076	0.084	0.080	0.124	0.128	0.126
2.5	0.318	0.352	0.335	0.144	0.154	0.149	0.120	0.132	0.126	0.013	0.138	0.134	0.165	0.167	0.166
3.0	0.365	0.387	0.376	0.212	0.222	0.217	0.161	0.183	0.172	0.177	0.195	0.186	0.197	0.211	0.204
3.5	0.402	0.434	0.418	0.271	0.297	0.284	0.214	0.236	0.225	0.234	0.248	0.241	0.243	0.253	0.248
4.0	0.431	0.481	0.456	0.333	0.361	0.347	0.263	0.289	0.276	0.290	0.298	0.294	0.274	0.294	0.284
4.5	0.507	0.507	0.492	0.402	0.416	0.409	0.323	0.333	0.328	0.340	0.346	0.343	0.306	0.334	0.320
5.0	0.517	0.531	0.524	0.459	0.481	0.470	0.374	0.380	0.377	0.390	0.394	0.392	0.339	0.363	0.351
5.5	0.544	0.568	0.556	0.528	0.542	0.525	0.432	0.418	0.425	0.441	0.437	0.439	0.374	0.394	0.384
6.0	0.568	0.592	0.580	0.573	0.581	0.577	0.489	0.449	0.469	0.491	0.479	0.485	0.405	0.425	0.415
6.5	0.599	0.611	0.605	0.613	0.543	0.628	0.533	0.495	0.514	0.539	0.519	0.529	0.433	0.455	0.444
7.0	0.619	0.635	0.627	0.656	0.688	0.672	0.571	0.539	0.555	0.583	0.557	0.570	0.467	0.479	0.473
7.5	0.626	0.666	0.646	0.710	0.722	0.716	0.608	0.580	0.594	0.626	0.592	0.609	0.493	0.511	0.502
8.0	0.650	0.678	0.664	0.747	0.769	0.758	0.641	0.619	0.630	0.661	0.635	0.648	0.511	0.539	0.525
8.5	0.668	0.692	0.680	0.784	0.810	0.797	0.666	0.658	0.662	0.699	0.665	0.682	0.540	0.556	0.548
9.0	0.684	0.706	0.695	0.816	0.844	0.830	0.714	0.682	0.698	0.732	0.698	0.715	0.566	0.582	0.574
9.5	0.700	0.718	0.709	0.850	0.876	0.863	0.741	0.715	0.728	0.754	0.736	0.745	0.580	0.606	0.593
10.0	0.717	0.725	0.721	0.888	0.898	0.893	0.767	0.745	0.756	0.779	0.769	0.774	0.599	0.619	0.609

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำผลไม้ผสมโพรพิล แกลเลต ที่ปริมาณต่างๆ โดยวิธี total antioxidant assay

เวลา (นาที)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm														
	ปฏิกิริยาควบคุม			PG 5300x10^{-3}µg			PG 530x10^{-3}µg			PG 53x10^{-3}µg			PG 5.3x10^{-3}µg		
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
0.5	0.330	0.301	0.316	0.028	0.032	0.030	0.290	0.286	0.288	0.333	0.318	0.326	0.318	0.309	0.314
1.0	0.574	0.539	0.557	0.040	0.050	0.045	0.491	0.465	0.478	0.558	0.545	0.552	0.545	0.536	0.541
1.5	0.775	0.749	0.762	0.062	0.080	0.071	0.644	0.598	0.621	0.751	0.713	0.732	0.713	0.728	0.721
2.0	0.946	0.927	0.937	0.172	0.186	0.175	0.768	0.714	0.741	0.922	0.866	0.894	0.866	0.898	0.882
2.5	1.093	1.086	1.090	0.306	0.361	0.334	0.865	0.845	0.855	1.062	1.000	1.031	1.000	1.041	1.021
3.0	1.211	1.218	1.245	0.416	0.432	0.424	0.962	0.958	0.960	1.186	1.120	1.153	1.120	1.167	1.144
3.5	1.310	1.329	1.320	0.508	0.548	0.528	1.094	1.030	1.062	1.285	1.217	1.251	1.217	1.271	1.244
4.0	1.390	1.425	1.408	0.578	0.604	0.591	1.182	1.118	1.150	1.375	1.299	1.337	1.299	1.362	1.331
4.5	1.452	1.503	1.478	0.640	0.684	0.662	1.252	1.196	1.224	1.451	1.368	1.410	1.368	1.440	1.404
5.0	1.503	1.567	1.535	0.700	0.709	0.705	1.299	1.271	1.285	1.507	1.425	1.466	1.425	1.503	1.464
5.5	1.544	1.621	1.583	0.759	0.791	0.775	1.351	1.333	1.342	1.555	1.468	1.512	1.468	1.555	1.512
6.0	1.574	1.663	1.604	0.821	0.863	0.842	1.397	1.373	1.385	1.597	1.505	1.551	1.505	1.599	1.552
6.5	1.603	1.696	1.650	0.878	0.901	0.890	1.432	1.404	1.418	1.630	1.535	1.583	1.535	1.637	1.586
7.0	1.623	1.726	1.675	0.934	0.969	0.952	1.456	1.440	1.448	1.661	1.559	1.610	1.559	1.663	1.611
7.5	1.639	1.744	1.692	0.983	1.050	1.017	1.491	1.980	1.476	1.679	1.583	1.631	1.583	1.688	1.636
8.0	1.651	1.762	1.707	1.032	1.050	1.041	1.518	1.476	1.497	1.696	1.597	1.647	1.597	1.707	1.652
8.5	1.663	1.774	1.719	1.077	1.052	1.065	1.527	1.501	1.514	1.710	1.612	1.661	1.612	1.724	1.668
9.0	1.673	1.780	1.727	1.117	1.052	1.085	1.532	1.524	1.528	1.721	1.625	1.673	1.625	1.732	1.679
9.5	1.678	1.787	1.733	1.157	1.052	1.105	1.544	1.532	1.538	1.732	1.637	1.685	1.637	1.744	1.691
10.0	1.686	1.793	1.740	1.190	1.052	1.121	1.555	1.543	1.549	1.738	1.644	1.691	1.644	1.747	1.696

ตารางที่ ผ.4 ผลการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดน้ำและสารละลายวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี total antioxidant assay

เวลา (นาที)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm														
	ปฏิกิริยาควบคุม			วิตามินซี 4400 x 10^{-3} µg			วิตามินซี 440 x 10^{-3} µg			วิตามินซี 44 x 10^{-3} µg			วิตามินซี 4.4 x 10^{-3} µg		
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
0.5	0.377	0.365	0.371	0.286	0.300	0.293	0.329	0.271	0.300	0.419	0.383	0.401	0.481	0.507	0.494
1.0	0.650	0.634	0.643	0.404	0.428	0.416	0.578	0.524	0.551	0.683	0.669	0.676	0.782	0.804	0.793
1.5	0.871	0.857	0.864	0.568	0.610	0.589	0.762	0.706	0.734	0.961	0.921	0.941	1.002	1.026	1.014
2.0	1.039	1.003	1.021	0.747	0.773	0.760	0.900	0.880	0.890	1.098	1.074	1.086	1.187	1.219	1.203
2.5	1.161	1.129	1.154	0.916	0.948	0.932	1.051	1.025	1.038	1.245	1.213	1.231	1.327	1.287	1.337
3.0	1.256	1.224	1.240	1.060	1.104	1.082	1.174	1.140	1.160	1.357	1.329	1.343	1.426	1.456	1.441
3.5	1.321	1.301	1.311	1.187	1.231	1.209	1.274	1.242	1.258	1.455	1.413	1.434	1.503	1.525	1.514
4.0	1.377	1.351	1.364	1.300	1.320	1.310	1.352	1.320	1.336	1.504	1.486	1.495	1.542	1.588	1.565
4.5	1.418	1.388	1.403	1.377	1.405	1.391	1.415	1.395	1.405	1.568	1.528	1.548	1.589	1.613	1.601
5.0	1.446	1.418	1.432	1.448	1.468	1.458	1.461	1.447	1.454	1.595	1.571	1.585	1.621	1.639	1.630
5.5	1.460	1.446	1.453	1.497	1.523	1.510	1.510	1.480	1.495	1.621	1.599	1.610	1.623	1.675	1.649
6.0	1.471	1.465	1.468	1.536	1.570	1.553	1.532	1.520	1.526	1.648	1.622	1.635	1.650	1.672	1.661
6.5	1.482	1.476	1.479	1.550	1.588	1.569	1.567	1.531	1.549	1.655	1.643	1.649	1.552	1.678	1.670
7.0	1.490	1.484	1.487	1.589	1.619	1.604	1.588	1.554	1.571	1.663	1.653	1.658	1.672	1.684	1.678
7.5	1.496	1.488	1.492	1.614	1.646	1.630	1.594	1.572	1.583	1.671	1.659	1.665	1.681	1.685	1.683
8.0	1.505	1.489	1.497	1.622	1.648	1.635	1.602	1.584	1.593	1.680	1.666	1.673	1.685	1.691	1.688
8.5	1.507	1.493	1.500	1.648	1.648	1.648	1.605	1.597	1.601	1.682	1.674	1.678	1.690	1.698	1.694
9.0	1.509	1.497	1.503	1.652	1.694	1.673	1.609	1.607	1.608	1.685	1.681	1.683	1.693	1.699	1.696
9.5	1.509	1.505	1.507	1.671	1.691	1.681	1.611	1.609	1.610	1.685	1.684	1.683	1.696	1.702	1.699
10.0	1.510	1.504	1.507	1.682	1.684	1.683	1.612	1.612	1.612	1.685	1.684	1.683	1.696	1.702	1.699

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ค.1 การทดสอบความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ เมื่อเติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้จากการสกัดร้อน ในสารละลายปฏิกิริยาที่ปริมาณต่างๆกัน

SOV	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1589.454	4	397.363	60.913	.000
Within Groups	32.618	5	6.524		
Total	1622.071	9			

ตารางที่ ค.2 การทดสอบความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ เมื่อเติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ได้จากการสกัดเย็น ในสารละลายปฏิกิริยาที่ปริมาณต่างๆกัน

SOV	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	780.108	4	195.027	82.624	.000
Within Groups	11.802	5	2.360		
Total	791.910	9			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3 การทดสอบความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ เมื่อเติมสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานวิตามินซี ในสารละลายปฏิกิริยาที่ปริมาณต่างๆกัน

SOV	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5090.713	4	1272.678	447.221	.000
Within Groups	14.229	5	2.846		
Total	5104.942	9			

ตารางที่ ค.4 การทดสอบความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสัมพัทธ์ เมื่อเติมสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานโพรพิล แกลเลต ในสารละลายปฏิกิริยาที่ปริมาณต่างๆกัน

SOV	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7672.884	3	2557.682	544.144	.000
Within Groups	18.801	4	4.700		
Total	7691.685	7			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาววัชราภรณ์ ฝาระมี ภูมิลำเนาเดิม จังหวัดนครพนม จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นจาก โรงเรียนธาตุพนม จังหวัดนครพนม และจบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจาก โรงเรียนสกลราชวิทยานุกูล จังหวัดสกลนคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้