การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า ที่สกัดด้วย 85% เอทานอล

กิ่งดาว โพธิ์ศรี

การศึกษาอิสระ เสนอเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี
มีนาคม 2563
มหาวิทยาลัยพะเยา

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

คณะกรรมการสอบการศึกษาอิสระ อาจารย์ที่ปรึกษา และคณบดีคณะวิทยาศาสตร์ ได้พิจารณาการศึกษา เรื่อง “การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า ที่สกัดด้วยเอทานอล 85%” เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาเคมี ของมหาวิทยาลัยพะเยา

.....

(ดร.ชัยพัฒน์ ลาพินี)

ประธานกรรมการ

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ นาสมใจ)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตระยุทธ์ จิตอ่อนน้อม)

กรรมการ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชยันต์ บุณยรักษ์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

เมษายน 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ นาสมใจ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ชี้แนะการศึกษาพร้อมทั้งให้ข้อมูล อีกทั้งยังได้รับคำแนะนำอันเป็นประโยชน์รวมถึงแนวทางการแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ด้วยความเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการศึกษามาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ดร.ชัยพัฒน์ ลาพินี และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตระยุทธ์ จิตอ่อนน้อม ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาเป็นคณะกรรมการสอบในครั้งนี้ พร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะ และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพย์วรรณ สรรสัตย์ ที่ได้อำนวยความสะดวกในเรื่องของอุปกรณ์สำหรับการทดลอง จนการศึกษาอิสระเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้ความร่วมมือและให้คำปรึกษา พร้อมทั้งอำนวยความสะดวกในเรื่อง อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือต่าง ๆ สำหรับการทดลอง อีกทั้งยังคอยให้คำแนะนำจนการศึกษาอิสระเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่คอยเป็นกำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาจนประสบ-ความสำเร็จ

กิ่งดาว โพธิ์ศรี

ชื่อเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า

ผู้ศึกษาค้นคว้า นางสาวกิ่งดาว โพธิ์ศรี

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทักษ์ นาสมใจ

คำสำคัญ ผักหวานป่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ABTS ปริมาณฟีนอลิกรวม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า ส่วนเนื้อของผลผักหวานป่า 100 กรัม ถูกนำมาสกัดด้วย 85% เอทานอล ปริมาตร 1 ลิตร โดยแช่ทิ้งไว้ 1 วัน หลังจากกรอง และระเหยตัวทำละลายจะได้สารสกัดหยาบ และทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง จะได้สารสกัดหยาบรวมน้ำหนัก 18 กรัม สารสกัดหยาบถูกนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay และ 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) cation radical scavenging assay และวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวมโดยเทคนิคทางสเปกโทรสโคปีโดยใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu ผลการวิเคราะห์พบว่า สารสกัดหยาบแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 4759.44 พีพีเอ็ม จากการทดสอบโดยวิธี DPPH และให้ค่า TEAC เท่ากับ 0.3371 มิลลิโมลาร์ จากผลทดสอบด้วยวิธี ABTS สำหรับปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดมีค่าเท่ากับ 2.80 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม

Title Study of antioxidant activity and total phenolic contents of crude extract of *Melientha suavis Pierre* flesh

Author Miss Kingdao Phosri

Advisor Asst. Prof. Pitak Nasomjai

Bachelor of Science Program in Chemistry

Keywords *Melientha suavis Pierre,* Antioxidant activity, DPPH, ABTS, and Total phenolic content

Abstract

This research aimed to study the antioxidant activities and total phenolic content in *Melientha suavis Pierre* flesh extract. A 100 g of M. *suavis Pierre* flesh was extracted with 85% ethanol and was left for 1 day. Then the extract was filtered off and solvents were evaporated off under reduced pressure to give the crude extract. The process was repeated twice to give 18 g of the crude extract. Antioxidant activities were evaluated with 2,2–diphenyl–1–picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2–Azino–bis (3–ethylbenzothiazoline–6–sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) assays. Total phenolic content was determined using a spectrophotometric technique based on Folin–ciocalteu reagent. The crude extract showed antioxidant activity with IC_{50} value of 4759.44 ppm in DPPH assay and TEAC of 0.3371 mM in ABTS assay. Total phenolic content of the crude extract was 2.80 mgGAE/gW.

สารบัญ

หน้า

หน้าอนุมัติ ข
กิตติกรรมประกาศ ค
บทคัดย่อ ง
ABSTRACT จ
สารบัญเรื่อง ฉ
สารบัญตาราง ฌ
สารบัญภาพ ฎ
อักษรย่อ ฎ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 4
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย 4
1.4 ขอบเขตของการศึกษาของงานวิจัย 5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5
1.6 แนวทางในการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ 5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผักหวานป่า 6
2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร 10
2.3 การสกัดสารสำคัญจากพืช 11
2.4 อนุมูลอิสระ 13
2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ 17

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (ต่อ)

2.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวม 20

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 23

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 26

3.2 วัสดุอุปกรณ์ 26

3.3 เครื่องมือ 27

3.4 แผนการดำเนินการวิจัย 27

3.5 วัตถุดิบ 28

3.6 การเตรียมตัวอย่างผักหวานป่า 28

3.7 การสกัดสารสกัดผักหวานป่าด้วยตัวทำละลาย 28

3.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH 28

3.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS 29

3.10 การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocalteu 31

บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการสกัดสารสกัดผักหวานป่าด้วยตัวทำละลาย 85%เอทานอล 33

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH 33

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS 38

4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocalteu 42

4.5 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 45

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุป

5.1 สรุปผลการดำเนินการวิจัย 47

5.2 ข้อเสนอแนะ 48

บรรณานุกรม 49

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก 51

ภาคผนวก ข 56

ประวัติผู้ศึกษางานวิจัย 62

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง	16
2	ผลน้ำหนักของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า สกัดด้วย 85% เอทานอล	33
3	ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH·	34
4	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า สกัดด้วย 85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH· (ชุดที่ 1)	34
5	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า สกัดด้วย 85% เอทานอลทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH·(ชุดที่ 2)	35
6	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า สกัดด้วย85% เอทานอลทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH·(ชุดที่ 3)	35
7	ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH	36
8	ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด	36
9	ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานมาตรฐานโทลอกซ์ ทำปฏิกิริยากับ สารละลาย $ABTS^{\cdot+}$	38
10	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า สกัดด้วย85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ (ชุดที่ 1)	39
11	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า สกัดด้วย85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ (ชุดที่2)	39
12	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า สกัดด้วย85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ (ชุด 3)	39
13	ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานโทลอกซ์	40
14	ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า สกัดด้วย85% เอทานอล ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด	40

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

15 แสดงผล TEAC สารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าสกัดด้วย 85% เอทานอล ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านด้วยวิธี ABTS 42

16 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu 43

17 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าสกัดด้วย 85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu 43

18 แสดงค่าปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าสกัดด้วย 85% เอทานอล ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านด้วยวิธี Folin–Ciocalte 45

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	ผักหวานป่า	6
2	ใบผักหวานป่า	9
3	ดอกผักหวานป่า	9
4	ผลผักหวานป่า	9
5	แสดงการเกิดปฏิกิริยา DPPH radical หลังจากการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH	21
6	โครงสร้างทางเคมีของ Trolox	22
7	โครงสร้างทางเคมีของ ABTS	22
8	โครงสร้างทางเคมีของ Gallic acid	23
9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินซี กับ ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย	37
10	กราฟมาตรฐานวิตามินซี แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย	37
11	กราฟมาตรฐานโทลอกซ์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ สารมาตรฐานโทลอกซ์ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย	41
12	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกแสดงความสัมพันธ์ระหว่าความเข้มข้น ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม	44
13	กราฟแสดงค่าการดูดกลืนของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า ที่สกัดด้วย85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin Ciocaltue	44

อักษรย่อ

DPPH	=	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ABTS	=	2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt
Trolox	=	(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid
TEAC	=	Trolox Equivalent Antioxidant capacity
Gallic acid	=	3,4,5-trihydroxybenzoic acid
Vit C	=	L-Ascorbic acid
IC_{50}	=	50% Inhibitory concentration
ppm	=	Parts Per Million (1 ส่วน ใน 1,000,000 ส่วน)
SD	=	Standard deviation
nm	=	นาโนเมตร
mL	=	มิลลิลิตร
mM	=	มิลลิโมลาร์

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ ไอออน อะตอม หรือโมเลกุล ซึ่งมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวอยู่ ซึ่งอนุมูลอิสระอาจมีประจุเป็นบวก ลบหรือเป็นศูนย์โดยอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเหล่านี้ทำให้อนุมูลอิสระว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูง กล่าวคือโมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอน ซึ่งโดยปกติในร่างกายของเรามีโมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนคู่ ในกรณีที่ร่างกายมีการสูญเสียอิเล็กตรอนจากการถูกอนุมูลอิสระแย่งจับ จะทำให้โมเลกุลของเซลล์ในร่างกายไม่เสถียร ขาดความสมดุล ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นตัวทำลายภูมิคุ้มกันและเซลล์ต่างๆ ทำให้เกิดการเสื่อมถอยของร่างกาย ซึ่งจะแสดงออกมาในรูปแบบของริ้วรอยแก่ก่อนวัย และโรคเสื่อมของอวัยวะต่างๆ และนอกจากจะทำให้เซลล์ร่างกายเสียหายได้แล้ว อนุมูลอิสระยังเป็นพิษต่อร่างกายคล้ายคลึงกับการทำปฏิกิริยาของออกซิเจนกับเหล็ก ส่งผลให้เหล็กขึ้นสนิม แอปเปิลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล รวมถึงการที่น้ำมันถูกเก็บไว้นานๆ แล้วมีกลิ่นเหม็นหืน ซึ่งก็เป็นผลจากการทำปฏิกิริยาของน้ำมันกับออกซิเจนก่อให้เกิดอนุมูลอิสระเช่นกัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังมีบทบาทสำคัญในเมทาบอลิซึมที่เป็นตัวกลางของสารประกอบทางชีวภาพหลายชนิด [1]

ในกระบวนการเผาผลาญสารอาหาร ร่างกายจำเป็นต้องอาศัยออกซิเจนช่วยในกระบวนการนี้ทำให้ได้ออกซิเจนที่มีประจุลบ ซึ่งก็คือ อนุมูลอิสระ สารตัวนี้นอกจากจะรวมตัวกับไขมันไม่ดีแล้ว ยังสามารถรวมตัวกับสารบางชนิดในร่างกายเรา แล้วก่อให้เกิดเป็นสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อ หรืออาจไปเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ปกติแปรสภาพเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด

อนุมูลอิสระเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาภายในร่างกาย เมื่อมีธาตุเหล็ก ทองแดง แมงกานีส โคบอลต์ โครเมียม นิกเกิล มักเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยร่างกายเรามีสารอนุมูลอิสระมาตั้งแต่เกิด แต่ในช่วงวัยเด็กและวัยรุ่น ร่างกายเรายังสามารถกำจัดตัวอนุมูลอิสระได้ดี แต่ที่เราต้องใส่ใจมากขึ้นเริ่มจากวัยทำงาน ถ้าอายุมากขึ้นหรือร่างกายอ่อนแอ มีความเครียด ภูมิคุ้มกันจะไม่สามารถต่อสู้กับอนุมูลอิสระได้ อนุมูลอิสระจะโจมตีเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์ทำงานผิดปกติ โดยปกติแล้วร่างกายจะมีระบบกำจัดอนุมูลอิสระ แต่หากร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอก เช่น ได้รับจากอาหารบางชนิด จากขบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่

มีไขมันสูง รวมไปถึงร่างกายขาดวิตามิน และเกลือแร่บางชนิด การใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผสมสารเคมีต่างๆ การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่อุณหภูมิสูงๆ กลับมาใช้ หรือจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสีอัลตราไวโอเลต การแผ่รังสี รังสีเอกซ์ หรือจากมลพิษ เช่น ควันบุหรี่ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์หากได้รับมากเกินไป หรือในภาวะที่ร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ลดลงก็จะทำให้อนุมูลอิสระมีมากเกินไป จึงเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคเรื้อรังที่สัมพันธ์กันได้ [2]

อนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อไขมัน โปรตีน หน่วยพันธุกรรม และคาร์โบไฮเดรต เอนไซม์ที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อจับกับอนุมูลอิสระ เช่นเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) เอ็นไซม์ Catalase glutathione peroxidaes แต่ร่างกายมักสร้างไม่เพียงพอ เซลล์จึงเกิดการบาดเจ็บขึ้น และเมื่อคนเรามีอายุมากขึ้น การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระจะลดลง ในขณะที่อัตราการเกิดอนุมูลอิสระยังเท่าเดิม จึงส่งผลกระทบตามมามากมายโดยการเกิดโรค ได้แก่ โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคมะเร็งบางชนิด โรคอัลไซเมอร์โรคไขข้ออักเสบ โรคแก่ก่อนวัย เป็นต้น

อนุมูลอิสระมีอยู่หลายชนิด ทุกครั้งที่ร่างกายเผาผลาญสารอาหารให้เป็นพลังงาน ออกซิเจนจะถูกเปลี่ยนให้เป็นอนุมูลอิสระที่มีชื่อว่า ซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide) ซึ่งเป็นอันตราย ร่างกายจึงต้องมีกลไกในการป้องกัน และกำจัดซูเปอร์ออกไซด์ เช่น วิตามินเอ วิตามินซี และวิตามินอี ที่ร่างกายได้รับจากอาหาร นอกจากนั้น ร่างกายยังมีเอนไซม์ ที่ช่วยเปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์ที่เป็นอันตรายนี้ ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน การที่เอนไซม์เหล่านี้จะทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ จะต้องมีสารอาหารที่จำเป็น ได้แก่ กลูต้าไธโอน วิตามินบี 2 สังกะสี และซีลีเนียม

ดังนั้นการทำลายหรือควบคุมปริมาณของอนุมูลอิสระดังกล่าว อาจช่วยในการป้องกันการเกิดโรคต่างๆได้ สารที่นำมาใช้ในการต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ เรียกว่าสารต้านอนุมูลริสระ (Antioxidant) หรืออาจเรียกว่า สารกำจัดอนุมูลอิสระ คือสารที่สามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (Free radical) โดยปกติแล้วร่างกายมีการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระมาตั้งแต่เกิด สารต้านอนุมูลอิสระจึงมีบทบาทที่จะช่วยป้องกันเซลล์จากการถูกทำลาย และป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ดังนั้น จึงควรเลือกรับประทานอาหารจากธรรมชาติ ที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ และอาจรับประทานอาหารเสริมที่มีสารต้านอนุมูลอิสระอย่างถูกหลักเพื่อเป็นการป้องกันการเกิดโรคต่างๆในอนาคต [3]

ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระอย่างแพร่หลาย ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมักพบมากในพืชผักและผลไม้บางชนิด จึงได้มีการสนับสนุนให้เป็นทางเลือกหนึ่งในการดูแลสุขภาพ ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาสารที่ส่งเสริมสุขภาพ โดยเฉพาะงานวิจัยที่เกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระในพืชผักจึงมีความสำคัญอย่างมากในการป้องกันที่จะทำให้เกิดโรคต่างๆ

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระเข้ามามีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารโดยการประยุกต์ใช้สารต้านอนุมูลริสระ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มคุณค่าและมูลค่าของอาหารให้เกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภค และผู้ผลิตอาหาร ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาเพื่อวิจัยหาแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าในตัวทำละลายเอทานอล 85% เพื่อนำมาใช้เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านนอนุมูลอิสระ รวมถึงการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านสุขภาพ ตลอดจนการพัฒนารูปแบบของผลิตภัณฑ์

ผักหวานป่า ชื่อวิทยาศาสตร์: *Melientha suavis Pierre* เป็นพืชในวงศ์ Opiliaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ต้นที่โตเต็มที่สูง 13 เมตร ที่พบโดยทั่วไปมักมีลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กหรือเป็นไม้พุ่ม เนื่องจากมีการหักกิ่ง เด็ดยอด เพื่อกระตุ้นให้เกิดกิ่งและยอดอ่อนซึ่งเป็นส่วนที่ใช้บริโภค ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับกัน ใบอ่อนรูปร่างแคบรี ปลายใบแหลม สีเขียวอมเหลือง ใบแก่เต็มที่รูปร่างรีกว้างถึงรูปไข่หรือรูปไข่กลับ ใบสีเขียวเข้ม เนื้อใบกรอบ ขอบใบเรียบ ปลายใบมน ขนาดของใบประมาณ 2.5–5 x 6– 12 เซนติเมตร ก้านใบสั้น ช่อดอกแตกกิ่งก้านคล้ายช่อดอกมะม่วงหรือลำไย และเกิดตามกิ่งแก่ หรือตามลำต้นที่ใบร่วงแล้ว ดอกมีขนาดเล็กเป็นตุ่มสีเขียวอัดกันแน่นเป็นกระจุก ขณะที่ยังอ่อนอยู่ ผลเป็นผลเดี่ยวติดกันเป็นพวง เหมือนช่อผลของมะไฟหรือลางสาด แต่ละผลมีขนาดประมาณ 1.5 x 2.5 เซนติมตร ผลอ่อนสีเขียวมีนวลเคลือบ และ

เปลี่ยนเป็นสีเหลืองถึงเหลืองอมส้ม เมื่อผลสุกแต่ละผลมีเมล็ดเดียว [ขวัญฤทัย คำฝาเชื้อ. 2551 พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวกะเหรี่ยง.]

สามารถนำยอดและใบอ่อนมาปรุงอาหารได้หลากหลายทั้งต้ม ผัด แกง เช่น แกงเลียงผักหวานป่า ต้มจืดผักหวานป่า ยอดอ่อนใส่แกง ซึ่งผักหวานป่าก็สามารถนำมาเป็นตัวช่วยควบคุมน้ำหนักได้เป็นอย่างดี เป็นผักที่มีคุณค่าทางโภชนาการและเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ เช่น เบตาแคโรทีน วิตามินเอ วิตามินซี และสารประกอบฟีนอลิก จึงมีการศึกษาพืชชนิดนี้ โดยพืชจำพวกนี้เป็นอีกหนึ่งแนวทางที่จะนำมาใช้ในการดูแล บำรุงรักษา ป้องกันสุขภาพของร่างกายซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า เพื่อนำมาเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาทางเภสัชวิทยา ยา และผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า โดยวิธี DPPH ABTS และหาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยใช้วิธี Folin Ciocalteu Regent ซึ่งทำการตรวจวัดโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1.2.2 เพื่อศึกษาตัวทำละลายเอทานอลที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

1.3.1 ถ้าสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่จริง เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี DPPH ABTS และหาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยใช้วิธี Folin Ciocalteu Regent จะเกิดการฟอกจางสีจากสีม่วงของสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH เปลี่ยนเป็นสีเหลืองใส สีน้ำเงินของสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS จางลง และจะต้องเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินซึ่งสามารถหาปริมาณฟีนอลิกได้ ตามลำดับ โดยใช้วิธีการตรวจวัดด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีได้

1.3.2 สารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูง จะมีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำหรือไม่มีขั้ว โดย

พิจารณาจากค่า IC_{50}, TEAC และปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่ใช้ในการทดสอบ

1.4 ขอบเขตการศึกษาของงานวิจัย

1.4.1 ขอบเขตด้านระยะเวลาการศึกษา

1. เริ่มตันศึกษา เมื่อวันที่ 1 เดือน มกราคม 2563
2. สิ้นสุดการศึกษา เมื่อวันที่ 31 เดือน มีนาคม 2563

1.4.2 ขอบเขตด้านเนื้อหา

1. ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด 85% เอทานอล
2. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า โดยใช้วิธี DPPH ABTS และหาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยใช้วิธี Folin Ciocalteu Regent

1.4.3 ขอบเขตด้านพื้นที่

1. เก็บตัวอย่างผักหวานป่า ในพื้นที่จังหวัดพะเยา ประเทศไทย
2. ห้องปฏิบัติการเคมี SC1307 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา
3. ห้องปฏิบัติการเคมี SC2310 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทำให้ทราบว่าสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า มีปริมาณฟีนอลิกมากน้อยเพียงใด

1.5.2 สามารถนำงานวิจัยนี้ไปเป็นแนวทางประยุกต์ใช้ในด้านเคมี ชีวเคมี เภสัชกรรม และทางการแพทย์

1.6 แนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์

1.6.1 เพื่อส่งเสริมให้ผักหวานป่า เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่สามารถใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้

1.6.2 สามารถนำงานวิจัยนี้ไปเป็นแนวทางพัฒนาสารสกัดผักหวานป่า ในทางการแพทย์และเภสัชกรรม นำไปเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อเป็นประโยชน์ในการเสริมสร้างสุขภาพ และการบำบัดหรือป้องกันโรคเรื้อรังต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผักหวานป่า[1]

ภาพที่ 1 ผักหวานป่า

ที่มา : https://medthai.com/ผักหวานป่า

1. **ชื่อวิทยาศาสตร์**

   Melientha suavis Pierre

2. **ชื่อวงศ์**

   OPILIACEAE

3. **ชื่อพื้นเมือง**

   ผักหวาน ผักหวานป่า

4. **ลักษณะทางพฤกษศาสตร์**

   ลำต้น เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง มีลำต้นสูงประมาณ 5–10 เมตร หรือโตเต็มที่อาจสูงได้มากถึง 15 เมตร แต่ที่พบทั่วไปในแปลงปลูกจะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก เพราะมีการตัดยอด และตัดแต่งกิ่ง โดยลำต้นเป็นไม้เนื้อแข็ง ลำต้นแตกกิ่งมาก เปลือกลำต้นมีสีน้ำตาลอมเทา ผิวลำต้นขรุขระ 1.5–1.7 เซนติเมตรและยาวประมาณ 2.3–3 เซนติเมตร ผลอ่อนเป็นสีเขียว เมื่อแก่แล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้มหรือสีแดง ส่วนก้านผลจะยาวประมาณ 3–5 มิลลิเมตร

ใบผักหวานป่าเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ แตกใบออกเป็นใบเดี่ยวๆ เรียงสลับกันบริเวณปลายกิ่ง มีก้านใบสั้น ใบมีรูปไข่ค่อนข้างรี โคนใบสอบ ปลายใบแหลม แผ่นใบ และขอบใบเรียบ ใบอ่อนหรือยอดอ่อนมีสีเขียวอ่อน ใบแก่มีสีเขียวเข้ม และเป็นมัน แผ่นใบบางค่อนข้างกรอบ ขนาดใบกว้างประมาณ 2.5–5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 5–12 เซนติเมตร

ดอกผักหวานป่าออกดอกเป็นช่อบริเวณกิ่ง และลำต้น ก้านช่อดอกยาวประมาณ 15–20 เซนติเมตร ช่อดอกประกอบด้วยดอกย่อยขนาดเล็กจำนวนมาก ดอกย่อยมีลักษณะทรงกลม สีเขียวอ่อน ประกอบด้วยดอกตัวผู้ที่ไม่มีก้านดอก 3–5 ดอก ส่วนดอกตัวเมียมีก้านดอกยาวประมาณ 3–8 มิลลิเมตร มักพบเป็นดอกเดี่ยว หรืออาจพบเป็นกลุ่ม 3–5 ดอก

ผลของผักหวานป่ามีลักษณะกลมเกือบเป็นรูปไข่ ขนาดผล 1.5–2 เซนติเมตร ยาว 2.2–4 เซนติเมตร เปลือกผลเรียบ และบาง เนื้อผลค่อนข้างหนา และฉ่ำน้ำ ผลอ่อนมีสีเขียว และมีนวลเคลือบ เมื่อสุกมีสีเหลือง และสุกจัดจนร่วงจะมีสีเหลืองเข้ม ภายในมีเมล็ด 1 เมล็ด [นิตยสารเกษตรศาสตร์. “ผักหวานป่า”.]

5. การกระจายพันธุ์

ผักหวานป่า มีถิ่นกำเนิดในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ พม่า มาเลเซีย ลาว จีนตอนใต้ ฯลฯ รวมถึงประเทศไทยด้วย พบเติบโตในพื้นที่ที่สูงกว่าระดับน้ำทะเลประมาณ 200 เมตร ขึ้นไป แต่ไม่เกิน 600 เมตร พบเติบโตทั่วไปในป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรัง โดยพบมากบริเวณเชิงเขาด้านล่างที่ระดับ 200–300 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล [นิตยสารเกษตรศาสตร์. “ผักหวานป่า”.]

การใช้ประโยชน์ [มูลนิธิหมอชาวบ้าน. นิตยสารหมอชาวบ้าน เล่มที่ 243 คอลัมน์]

- คนไทยนิยมใช้ยอดอ่อน ใบอ่อน ดอกอ่อน และผลอ่อนมารับประทานเป็นผัก โดยอาจนำมาลวกให้สุกแล้วใช้เป็นผักจิ้มกับน้ำพริก ลาบ ใช้เป็นเครื่องเคียง หรืออาจนำไปผัดน้ำมัน หรือนำมาใช้ประกอบอาหารในเมนูต่าง ๆ เช่น แกงเลียง แกงส้ม แกงอ่อม แกงปลา แกงกะทิสด แกงกับไข่มดแดงหรือป่าแห้ง แกงคั่ว ต้มจืด เป็นต้น
- นอกจากจะใช้รับประทานเป็นผักและใช้เป็นยาสมุนไพรแล้ว ผลสุกของผักหวานป่ายังสามารถนำมารับประทานเป็นผลไม้ได้ด้วย เพียงแต่จะไม่นิยมเท่านำมาใช้

รับประทานเป็นผัก และในธรรมชาติผลสุกยังเป็นอาหารของนกและสัตว์ต่าง ๆ อีกด้วย

- ผักหวานป่าเป็นผักที่มีคุณค่าทางโภชนาการและเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ เช่น เบตาแคโรทีน วิตามินเอ วิตามินซี และสารประกอบฟีนอลิก ดังนั้นการรับประทานผักหวานป่าจึงไม่เพียงแต่จะได้คุณค่าทางโภชนาการเท่านั้น หากแต่ยังได้รับสารอาหารที่ช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย จึงช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคได้เป็นอย่างดี
- ผักหวานป่ายังอุดมไปด้วยแคลเซียมและฟอสฟอรัส ที่ช่วยในการบำรุงกระดูกและฟันให้แข็งแรง ช่วยในการยืดหดของกล้ามเนื้อให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น มีเบตาแคโรทีนสูง ช่วยในการบำรุงสายตา มีวิตามินซีสูง ช่วยป้องกันเนื้อเยื่อหรือเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากมลพิษทางอากาศ ช่วยป้องกันมะเร็งผิวหนังจากรังสีแสงแดด ช่วยทำให้ผิวหนังไม่เหี่ยวย่นหรือแก่ก่อนวัย มีวิตามินบี 2 ที่ช่วยป้องกันโรคปากเปื่อยหรือโรคปากนกกระจอก นอกจากนี้ผักหวานป่ายังมีเส้นใยอาหารสูง จึงช่วยในการขับถ่ายและเป็นยาระบายอ่อน ๆ
- มีการนำผักหวานป่ามาพัฒนาเป็นชาสำเร็จรูป ซึ่งเป็นเครื่องดื่มต้านอนุมูลอิสระ โดยชาผักหวานจะประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายและช่วยป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ
- ในทางโภชนาการ นำผักหวานป่ามาแปรรูปโดยวิธีการอบแห้งจะมีการเปลี่ยนแปลงของสีและคุณค่าทางโภชนาการเพียงเล็กน้อยเท่านั้น สรุปก็คือ วิตามินซีของยอดผักหวานป่าสดเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผักหวานป่าที่แปรรูปโดยวิธีการอบแห้ง พบว่าวิตามินซีจะลดลงไม่เกินร้อยละ 10
- มีการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากผักหวานป่าอีกหลากหลายรูปแบบ เช่น น้ำผักหวานป่าไวน์ คุกกี้ ขนมถ้วย ข้าวเกรียบ ทองม้วน เป็นต้น
- ใช้ต้นผักหวาน นำมาต้มกับน้ำรับประทานเป็นยาแก้อาการปวดตามข้อหรือปานดง
- ใช้ต้นผักหวานกับต้นนมสาวเป็นยาเพิ่มน้ำนมแม่หลังการคลอดบุตรได้

6. ส่วนต่างๆของผักหวานป่า

ภาพที่ 2 ใบผักหวานป่า

ที่มา : https://medthai.com/ผักหวานป่า

ภาพที่ 3 ดอกผักหวานป่า

ที่มา : https://medthai.com/ผักหวานป่า

ภาพที่ 4 ผลผักหวานป่า

ที่มา : https://medthai.com/ผักหวานป่า/

2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร[9]

2.2.1 การคัดเลือกพืชสมุนไพร

1) คุณสมบัติเบื้องต้น

คัดเลือกสมุนไพรที่สามารถกินเป็นอาหาร หรือมีสรรพคุณเป็นยากินพื้นบ้าน หรือยาแผนโบราณ (Folk medicine, Herbal remedies) ซึ่งถือว่าเป็นกลุ่มพืชสมุนไพรที่ค่อนข้างมีความปลอดภัยในระดับหนึ่ง

2) คุณสมบัติเฉพาะ

คัดเลือกพืชในวงศ์ (Family) เดียวกันหรือวงศ์ที่ใกล้เคียงกันกับพืชที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.2.2 ประเภทพืช

1) พืชสด (Fresh plant material)

โดยส่วนมากใช้ในยาแผนโบราณ แต่งกลิ่นอาหาร และผลิตภัณฑ์น้ำหอม ใช้ตัวอย่างพืชสดเพื่อรักษาคุณสมบัติที่สำคัญ เช่น ไทม์สด (Thyme) มีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ แต่หากตัวอย่างของพืชแห้งจะมีผลทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยานี้หมดไป โดยทั่วไปการสกัดจะได้ผลดีเมื่อสามารถสกัดสารจากพืชสด โดยการนำพืชสดที่เก็บมาต้มกับแอลกอฮอล์ เพื่อฆ่าเอมไซม์ก่อนการสกัด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีต่างๆ ภายในพืช

2) พืชแห้ง (Dried plant material)

ส่วนใหญ่พืชประเภทนี้จะได้มาจากร้านสมุนไพร แต่หากต้องเก็บพืชสดมาทำให้แห้งเอง จำเป็นต้องใช้วิธีที่เหมาะสม วิธีการทำตัวอย่างพืชให้แห้งมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและสารสำคัญในพืช

2.2.3 การทำสมุนไพรให้แห้ง

วิธีการทำให้แห้งสามารถคงคุณภาพของสมุนไพรไว้ควรทำให้แห้งด้วยวิธีที่เร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะอุณหภูมิที่สูงอาจทำให้สาระสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลงไป การทำสมุนไพรให้แห้งอาจทำได้โดย

1) การทำให้แห้งในอากาศ (Air drying)

เช่น ทำให้แห้งในที่ร่ม (Shade drying) หรือตากแห้ง (Sun drying)

2) การทำให้แห้งโดยความร้อนจากแหล่งพลังงานอื่น (Artificial heat)

เช่น พลังงานไฟฟ้า โดยการเข้าตู้อบที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและอากาศที่ผ่านเข้าออกได้ดีกว่า เนื่องจากที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้แน่นอน แต่ถ้าหากอุณหภูมิสูงเกินไปอาจทำให้เสียฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.2.4 การแตกย่อยเนื้อเยื่อ

เป็นการทำให้ตัวอย่างพืชมีขนาดเล็กลง เพื่อให้ตัวสกัด เช่น ตัวทำละลาย หรือไอน้ำแทรกซึมผ่านเซลล์พืชได้ทั่วถึง สามารถสกัดสาระสำคัญจากพืชได้ผลดี วิธีการแตกย่อยเนื้อเยื่อ 3 วิธี ได้แก่

1) การย่อยด้วยเครื่องมือ (Mechanical disintegration)

เป็นวิธีการทำให้ตัวอย่างพืชมีขนาดเล็กลงโดยอาศัยเครื่องมือที่เหมาะสม เช่น การบดด้วยครก การหั่นด้วยมีด การปั่นด้วยเครื่องปั่น ฯลฯ

2) การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymatic disintegration)

เป็นวิธีย่อยเนื้อเยื่อโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น เอนไซม์ สำหรับย่อย Pectin และ Ellulose เป็นต้น

3) การย่อยด้วยการเคมี (Chemical disintegration)

เป็นวิธีย่อยเนื้อเยื่อโดยใช้สารเคมี เช่น Dimethyl formide, Cholic, Deoxycholic acid, Sodium dodecyl sulfate และ Phenol ฯลฯ เพื่อให้เซลล์แตก

2.3 การสกัดสารสำคัญจากพืช

การสกัดสาระสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธีขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ฯลฯ แต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันไป วิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชแบ่งออกเป็น 5 วิธี ได้แก่

2.3.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

2.3.2 การสกัดด้วยเครื่องมือ (Mechanical extraction)

2.3.3 การสกัดด้วยการกลั่น (Distillation)

2.3.4 การสกัดด้วยการดูดซับ (Resorption)

2.3.5 การสกัดด้วยการบีบ (Expression)

ในที่นี้จะอธิบายเพียง 1 วิธีการ ที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดเพื่อการศึกษาวิจัยพืชสมุนไพร คือ การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

2.3.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

เป็นการสกัดจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ความสามารถของสารสกัดกับอัตราการซึมผ่าน (Rate of diffusion) ของส่วนที่ละลายได้ผ่านชั้นสัมผัสของของเหลว ที่ทำหน้าที่เป็นตัวสกัด (Solvent) กับสารตั้งต้นที่นำมาสกัด โดยขั้นตอนในการสกัดอาจผ่านกระบวนการต่างๆ ดังนี้

1) การหมัก (Maceration)

เป็นการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ โถแก้ว และถังพลาสติก ฯลฯ ภายในระยะเวลาที่กำหนด (ประมาณ 2–7 วัน) โดยในระหว่างการหมักต้องหมั่นเขย่าหรือคนบ่อยๆ เพื่อให้ตัวอย่างพืชสัมผัสกับตัวทำละลายมากที่สุด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆ รินสารสกัดออกและพยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (Marc) ให้มากที่สุด ทำซ้ำหลายๆครั้ง จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ จากนั้นรวมสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดนำไปกรอง (Filtration) เพื่อแยกเอากากสมุนไพรออกไป การสกัดด้วยวิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2) การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentrated extraction)

หลังจากสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักเจือจางและมีปริมาตรมาก การแยกส่วนหรือการศึกษาต่อไปทำได้ไม่สะดวก และไม่มีประสิทธิภาพจึงจำเป็นต้องแยกตัวทำละลายออกไปเพื่อให้ได้สารสกัดที่เข้มข้น (Concentrated extraction) และปราศจากตัวทำละลาย โดยการระเหยด้วยการกลั่นในสุญญากาศ (Distillation in vacuum) เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงจนเกือบเป็นสุญญากาศ การกลั่นโดยวิธีนี้ต้องอาศัยการทำงานของเครื่องมือหลัก 3 ชนิด ประกอบกัน ได้แก่

1. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporation)
2. เครื่องทำน้ำหล่อเย็น (Cooled)
3. เครื่องดูดอากาศเพื่อทำสุญญากาศ (Vacuum pump, aspirator)

ในส่วนของเครื่อง Rotary evaporation ประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญ คือ ขวดกลั่น (Distillation flask) เป็นภาชนะที่บรรจุสารสกัดที่ต้องการทำให้เข้มข้น

หลอดควบแน่น (Condenser) เป็นแหล่งทำความเย็นเพื่อให้ไอระเหยของตัวทำละลายกลั่นตัวเป็นของเหลวและขวดรับตัวทำละลาย (Receiving flask) ในการทำงานขวดกลั่นที่บรรจุสารสกัดจะแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำและหมุนอยู่ตลอดเวลาเพื่อให้ความร้อนกระจายได้อย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ เมื่อสารละลายในขวดกลั่นเดือด (อุณหภูมิประมาณ 100–120 °C) จะระเหยเป็นไอผ่านไปยังหลอดควบแน่นแล้วกลั่นตัวเป็นของเหลวลงสู่ขวดรับตัวทำละลาย ทำการกลั่นไปเรื่อยๆ จนกระทั่งสารสกัดเกือบแห้ง เทใส่ขวดสีชานำไประเหยตัวทำละลายที่อาจตกค้างออกให้หมดบนเครื่องทำความร้อน (Hot plate) โดยใช้ระดับความร้อนต่ำ จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เครื่องมือที่ใช้ในการทำสารสกัดให้เข้มข้นที่ดีต้องมีระบบการทำสุญญากาศที่ดี ระหว่างขวดกลั่นและหลอดควบแน่นสั้น และมีระบบทำความเย็นของหลอดควบแน่นที่ดี

3) การแช่แข็ง (Freezing)

การแช่แข็งทำให้สารสกัดกลายเป็นของแข็ง หากเป็นสารที่สกัดด้วยน้ำหรือมีน้ำปนมาด้วยหลังจากแช่แข็งแล้วจะนำไปกำจัดน้ำออกด้วยเครื่อง Lyophilized แต่หากเป็นตัวทำละลายอื่นเฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่เป็นของแข็งที่สามารถแยกออกจากการสกัดโดยการปั่นเหวี่ยง (Centrifugation)

2.4 อนุมูลอิสระ [9]

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง รวมถึงอะตอมของไฮโดรเจนและไอออนของโลหะทรานซิชัน นอกจากนี้ยังรวมถึงโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งเป็นอนุมูลเพราะมีอิเล็กตรอนจำนวน 2 อิเล็กตรอน แต่ละอิเล็กตรอนจะแยกกันอยู่เป็นอิเล็กตรอนเดี่ยวในแต่ละออร์บิทัล อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้า และในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระคืออิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $A^{\bullet}$ อนุมูล $A^{\bullet-}$ และอนุมูล $A^{\bullet+}$ โดยเฉพาะอนุมูลที่มีมวลโมเลกุลต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีมวลโมเลกุลสูง เพราะว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและจะพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น

ดังนั้น อนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะ คือ มีความไวสูงต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ อย่างไรก็ตามยังคงมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความเสถียร ไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา สามารถคงอยู่ในสภาพอนุมูลได้นาน อนุมูลอิสระที่มีความเสถียรมีจำนวนน้อย

ชนิดมาก ตัวอย่าง อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) อนุมูลไฮดรอกซี (OH$^{\bullet}$) อนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี่($H_2O^{\bullet}$) อนุมูลอิระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก

2.4.1 แหล่งที่มาของอนุมูลอิสระ [10]

ในสิ่งมีชีวิตจะมีกระบวณการเผาผลาญสารอาหารร่างกายจำเป็นจะต้องใช้ออกซิเจนช่วย จึงมีอนุมูลอิสระของออกซิเจนเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา การเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้มีสาเหตุมาจากปัจจัยทั้งภายในและภายนอกร่างกายดังนี้

1) ปัจจัยภายในร่างกาย

ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีปฏิกิริยามากมาย ที่เกี่ยวข้องกับทั้งการสร้างและการสลายโมเลกุลของสารที่เรียกว่ากระบวนการเมทาบอลิซึม ซึ่งถือเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้แก่

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (Auto oxidation) เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

1. ระยะเหนี่ยวนำเริ่มต้น (Initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระโดยมีแสง หรืออุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

2. ระยะเพิ่มจำนวน (Propagation) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (Peroxy radical) แล้วทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydro peroxide) และอนุมูลอิสระ ซึ่งถ้ามีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่งก็จะเกิดปฏิกิริยาต่อทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นก็สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนใหม่ได้ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ

3. ระยะสิ้นสุด (Termination) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่งการทำงานของเอ็นไซม์สำคัญ 2 ชนิดที่มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกายได้แก่

1. เอ็นไซม์แซนธีนออกซิเดส (Xanthine oxidase : XO) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสลายเบสพิวรีน (Purine) โดยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโพแซนธีน (Hypoxanthine) เป็นแซนธีน (Xanthine) และแซนธีน เป็นกรดยูริก (Uric acid) พร้อมๆ กับเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนให้ออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$)

2. เอนไซม์ไลโพออกซีจีเนส (Lipoxygenase: LOX) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated fatty acid) ภายในโมเลกุลของเอ็นไซม์นี้มีเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นส่วนประกอบอยู่ทำหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันและเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมัน เกิดเป็นไฮโดรเพอรอกไซด์ ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมัน

กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว ในขั้นตอนการทำลายสิ่งแปลกปลอม โดยเฉพาะเชื้อโรคที่ถูกกลืนกินเข้ามาภายในร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจน (O_2) มาใช้เป็นจำนวนมากเพื่อผลิตเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) โดยการทำงานของเอ็นไซม์ NADPH ออกซิเดส (NADPH oxidase) ที่อยู่บนเยื่อบุชั้นนอก (Outer membrane) ของเม็ดเลือดขาว

โลหะทรานสิชัน (Transition metal) โลหะทรานสิชัน 2 ชนิดคือ เหล็ก (Fe^{2+}) และ ทองแดง (Cu^{2+}) ที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกาย สามารถเร่งการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลจากซูปเปอร์–ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) ในปฏิกิริยา Fenton (Fenton'sreaction)

2) ปัจจัยภายนอกร่างกาย

ยารักษาโรค ยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไปในร่างกายสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง เช่น บลีโอไมซิน (Bleomycin) แอนทราไซคลินส์ (Antracyclines) และเมโธทรีเสต (Methotrexate) เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Prooxidation)

รังสี การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสีเอกซ์ (Xray), รังสีแกมมา (γ–ray) อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกาย จากการถ่ายทอดพลังงานให้กับน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์ แล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาขั้นต่อไป (Secondary reaction) กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์นั้น ได้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น

ควันบุหรี่ ในควันบุหรี่มีส่วนประกอบของไนตริกออกไซด์ (NO) ไนโตรเจน–ออกไซด์ (NO_2) และเพอรอกซีไนไตรท์ ($ONOO^-$) รวมทั้งสารมลพิษได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และคาร์บอนเตรตะคลอไรด์ (CCl_4) ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการทำงานของเอ็นไซม์ไซโทโครม P–450 ไฮดรอกซีเจส (Cytochrome P–450 hydroxylase) ที่มีอยู่มากในเซลล์ตับและพบได้บ้างในเซลล์ปอด และลำไส้เล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ดังกล่าว

2.4.2 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

ตาราง 1 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง

อนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว			
อนุมูลอิสระ	**สูตรโครงสร้าง**	**ไม่ใช่อนุมูลอิสระ**	**สูตรโครงสร้าง**
อนุมูลออกซิเจน	$O_2^{\bullet}$	อนุมูลออกซิเจน	$^1O_2$*
ซุเปอร์ออกไซด์ประจุลบ	$O_2^{\bullet-}$	ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์	H_2O_2
อนุมูลไฮดรอกซิล	$OH^{\bullet}$	โอโซน	O_3
อนุมูลไฮโดรเปอร์ลอกซิล	$HO_2^{\bullet}$	สารอินทรีย์เปอร์ออกไซด์	ROOH
อนุมูลเปอร์ลอกซิล	$RO_2^{\bullet}$		
อนุมูลอัลโคซิล	$RO^{\bullet}$		
อนุมูลคาร์บอเนต	$CO_3^{\bullet-}$		
อนุพันธ์คลอรีนที่ว่องไว			
อนุมูลคลอรีน	$Cl^{\bullet}$	กรดไฮโพคลอรัส	HOCl
		ไนทิลคลอไรด์	NO_2Cl
		แก๊สคลอรีน	Cl_2
อนุพันธ์ไนโตรเจนที่ว่องไว			
อนุมูลไนตริกออกไซด์	$NO^{\bullet}$	ไนตริกออกไซด์	HNO_2
อนุมูลไนโตรเจนไดออกไซด์	$NO_2^{\bullet}$	เปอร์ออกซีไนไตร	$ONOO^-$
		กรดเปอร์ออกซีไนตรัส	ONOOH
		ไนทิลคลอไรด์	NO_2Cl

[สารต้านอนุมูลอิสระ. สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.)] [6]

2.4.3 อนุมูลอิสระกับการเกิดโรค

การสร้างอนุมูลอิสระหรือการกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระทั้งจากอนุมูลอิสระและสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (Non–radicals) ของ ROS และ RS ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระจำนวนมากซึ่งไม่สมดุลกับสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ที่ถูกสร้างขึ้นในการกำจัดทำให้เกิดภาวะที่เรียกว่า Oxidative stress ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ ไดแก โรคมะเร็ง โรคหัวใจขาดเลือด โรคความจำเสื่อม โรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบประสาท โรคภูมิแพ โรคความผิดปกติเกี่ยวกับสายตา รวมถึงการแกชรา เป็นต้น

2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ [11]

สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ กระบวนการออกซิเดชั่นมีได้หลายรูปแบบ เช่น กระบวนการออกซิเดชั่นที่ทำให้เหล็กกลายเป็นสนิม ทำให้แอปเปิ้ลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืน หรือกระบวนการออกซิเดชั่นที่เกิดในร่างกาย เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจ ควันบุหรี่ รังสียูวี ล้วนทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายของเราซึ่งสร้างความเสียหายต่อร่างกายได้ ในความเป็นจริงไม่มีสารประกอบสารใดสารหนึ่งสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นได้ทั้งหมด แต่ละกลไกอาจต้องใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันในการหยุดกระบวนการออกซิเดชั่น

สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ

1. Preventive antioxidant ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ
2. Scavenging antioxidant ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น
3. Chain breaking antioxidant ทำให้ลูกโซ่ของอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง

เช่น ดักจับ (Scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (Chelate) กับโลหะ เพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารประกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (Nitrogen compounds) และแคโรทีนอยด์ (Catotinoid)

บทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระสารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสี่ยงต่อโรคหลายโรคโดยเฉพาะโรคเรื้อรังที่สัมพันธ์กับอาหาร เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคสมอง (เช่น อัลไซเมอร์) เป็นต้น รวมทั้งช่วยชะลอกระบวนการบางขั้นตอนที่ทำให้เกิดความแก่โดยปกติร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระก่อนที่มันจะทำอันตราย แต่ถ้ามีการสร้างอนุมูลอิสระเร็วหรือมากเกินกว่าร่างกายจะกำจัดทัน อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะสร้างความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อได้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพ

อย่างไรก็ตาม ในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระ อยู่แล้วซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และส่วนที่สองคือกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือ เบต้าแคโรทีน (β–carotenoid) รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นพฤกษเคมีที่สามารถพบได้ในพืชผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย เช่น เอนไซม์คะตะเลส (Catalase) กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส (Glutathione peroxidase) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase) สารประกอบโปรตีนบางอย่าง เช่น อัลบูมิน (Albumin), บิลิรูบิน (Bilirubin) เซอรูโลพลาสมิน (Ceruloplasmin) กลูตาไธโอน และยูเรต (Urate) เป็นต้น สารเหล่านี้มีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่างๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะ แต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “Oxidative stress” ขึ้น ภายใต้สภาวะดังกล่าวอนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของรางก่าย ซึ่งถ้าสะสมมากๆ อาจนำไปสู่ความผิดปกติหลายอย่าง

2.5.1 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ได้มาจากพืชผัก เครื่องเทศ องุ่น และสมุนไพร ได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากกระแสเรื่องความปลอดภัยของสารสกัดจากธรรมชาติ สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิดได้แก่

1. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) สารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์ 5 ชนิดได้แก่

- Propyl gallate
- 2–butylated hydroxyanisole
- 3–butylate hydroxyanisole
- BHT (butylated hydroxytoluene)
- Tertiary butylhydroquinone

เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค

2. สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน อีกทั้งสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล ซึ่งพบในพืชพรรณธรรมชาตินานาชนิด สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการ (In vitro) และในสิ่งมีชีวิต

แต่ถ้าเราได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอ สารต้านอนุมูลอิสระเข้าไปป้องกันหรือแย่งที่จับกับอนุมูลอิสระ และนำอนุมูลอิสระเหล่านั้นไปทิ้งนอกเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่ถูกทำลาย ร่างกายจึงมีกลไกที่จะกำจัดอนุมูลอิสระอยู่ 2 วิธี คือ

1. การใช้เอนไซม์ที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อจับกับอนุมูลอิสระ เช่นเอ็นไซม์ Superoxide dismutase (SOD) เอ็นไซม์ Catalase glutathione peroxidaes แต่ร่างกายมักสร้างไม่เพียงพอ เซลล์จึงเกิดการบาดเจ็บขึ้น และเมื่อคนเรามีอายุมากขึ้น การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระจะลดลง ในขณะที่อัตราการเกิดอนุมูลอิสระยังเท่าเดิม ผลที่ตามมาคือ ทำให้เกิดโรคต่างๆมากมาย

2. การได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากอาหาร เช่นวิตามิน อี เบ้ตาแคโรทีน แอนโทไซยานิดิน (Anthrocyanidin) สารประกอบโฟลีฟีนอลต่างๆ เช่น แทนนิน แคทซิชิน เป็นต้น นอกจากนี้ยังรวมถึงโคเอนไซม์คิวเท็น (CoenzymeQ10) หรือโคคิวเท็น (Co Q10) หรือเป็นที่รู้จักกันในชื่ออื่นๆ

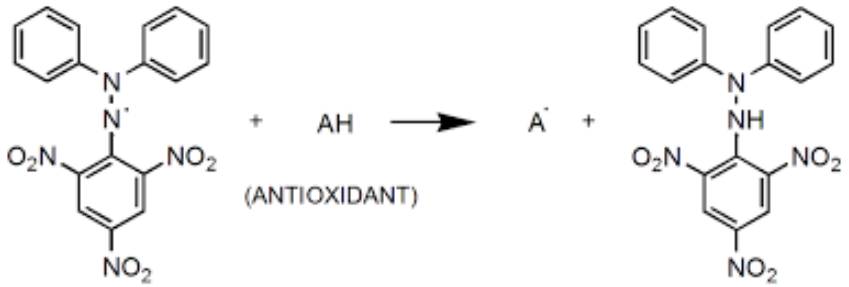
เช่น ยูบิควิโนน (Ubiquinone) โดยจัดเป็นสารจำพวกวิตามิน หรือคล้ายวิตามิน และมีอยู่ในทุกเซลล์ของร่างกาย ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ที่จำเป็นตัวหนึ่งในการเริ่มปฏิกิริยาเคมีเพื่อสร้างพลังงาน ในร่างกาย จึงมีความสำคัญต่อกล้ามเนื้อส่วนต่างๆ โดยเฉพาะกล้ามเนื้อหัวใจ เนื่องจากหัวใจต้องทำงานตลอดเวลา สำหรับบุคคลทั่วไป แม้ว่าร่างกายจะสร้าง CoQ10 ได้เอง แต่ความสามารถนี้จะลดลง เมื่ออายุ 21ปีขึ้นไป ในขณะที่ปริมาณที่ร่างกายต้องการกลับไม่ลดลง

จากข้อมูลในการทำวิจัยเบื้องต้นพบว่าน้ำมันรำข้าวที่ผ่านการสกัดเย็นเป็นแหล่งที่ดีของ CoQ10 เช่นกัน และมีหลายการศึกษาพบว่า CoQ10 มีบทบาทที่สำคัญต่อการรักษาโรคธาลัสซีเมีย นอกจากนี้ CoQ10 ยังช่วยลด Oxidative stress ทำให้มีการต้านอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น และยังสามารถชะลอการเสื่อมของเซลล์สมองที่เกิดจาก Oxidative stress โดย CoQ10 จะทำหน้าที่ Stabilizing mitochondria membrane ด้วยเหตุนี้ CoQ10 จึงอาจเป็นทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยที่เกิดจากเซลล์สมองเสื่อม ได้แก่ โรคพาร์กินสัน โรค Friedreich's Ataxia ดังที่กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่า ข้าวนับว่าเป็นธัญญาหารที่มหัศจรรย์ กล่าวคือในตัวข้าวเองมีคุณค่าทางโภชนาการอยู่บนทุกอณูของเมล็ด ทั้งเนื้อข้าว รำข้าว หรือจมูกข้าว ดังนั้นเราควรกินข้าวให้ครบทุกส่วนของเมล็ด เพื่อชีวิตที่แข็งแรง ห่างไกลจากโรคเรื้อรังต่างๆ และมีสุขภาพดี

2.6 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวม [12]

2.6.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

การทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระก็คืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH$^{\bullet}$, 2,2-diphynyl-picryhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH$^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลง ๆ จนเป็นสีเหลือง ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงจะต้องทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH



สารสีม่วง **สารสีเหลือง**

ภาพ 5 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ DPPH หลังจากการเติมสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

สูตรคำนวณของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

ค่าที่วัดได้จะแสดงความสามารถในสารต้านอนุมูลอิสระออกมาในค่า %Inhibition ตามสมการ ดังนี้

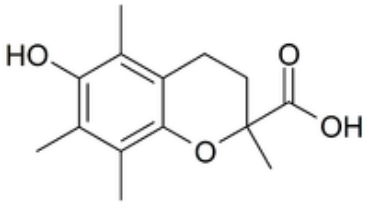
โดย $A^{Control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A^{Sample} = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

%inhibition = $[(A^{Control} - A^{Sample}) / A^{Control}] \times 100$

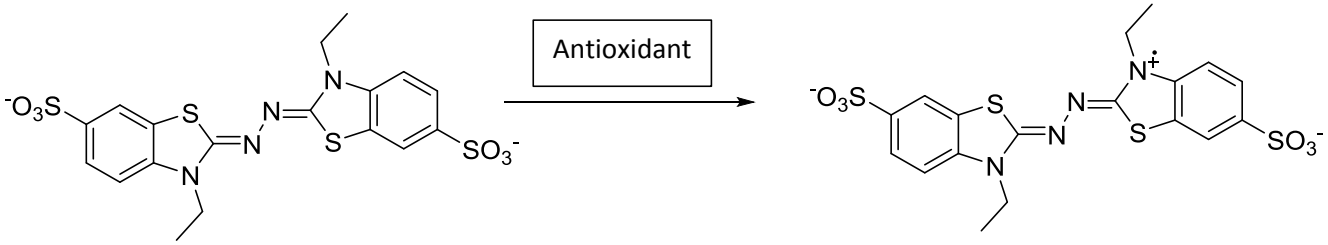
2.6.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

การทดสอบวัดความสามารถในการฟอกจางสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$, 2,2'–azino–bis (3–ethylbenzothiazoline–6–sulfonic acid) diammonium salt radicals) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 751 นาโนเมตร โดยปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น $ABTS^{\bullet+}$ ให้เป็น 0.7±0.02 เนื่องจาก $ABTS^{\bullet+}$ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจืองจาง $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ $ABTS^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ นั่นคือ %Inhibition ตามสมการ ผลการวิเคราะห์จะคำนวนเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox จึงมีชื่อว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)



ภาพ 6 โครงสร้างทางเคมีของ Trolox

[(±)–6–Hydroxyl–2,5,7,8–tetramethyl–chromane–2– carboxylic acid]



ภาพ 7 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของ ABTS radical หลังจากการเติมสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

[2,2'–azino–bis (3–ethylbenzthiazoline–6–sulphonic acid) diammonium salt]

สูตรคำนวณของการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

สูตรคำนวนได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่สารตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น ดังนี้

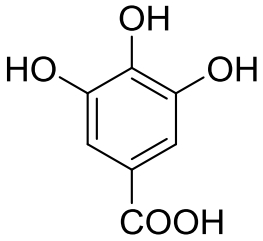
โดย $A^{Control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A^{Sample} = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

%inhibition = $[(A^{Control} - A^{Sample}) / A^{Control}] \times 100$

2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocaltaeu

การวัดปริมาณสารประกอบฟีนลิกรวมทั้งหมดโดยวิธี Folin–Ciocaltaeu method อาศัยหลักการ คือ สารประกอบฟีนอลิกรวมทำปฏิกิริยากับรีเอเจนของ Folin–Ciocaltaeu ซึ่งประกอบด้วย Phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย Phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกรวมเกิดเป็น Tungsten และ Molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน



ภาพ 8 โครงสร้างทางเคมีของกรดแกลลิก

[3,4,5–Trihydroxybenzoic acid]

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง [13] [14]

ปีพ.ศ. 2556 ลักขณา เจริญใจ ได้ศึกษาการแยกสกัดและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผักหวานป่าและผักหวานเมา เป็นการวิจัยเชิงทดลอง มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกสกัดสารในผักหวานป่าและผักหวานเมา นำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2–diphenyl–1–picryhydrazyl radical scavenging assay (DPPH) และ ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) การหาปริมาณฟลาโวนอยด์และปริมาณฟีนอลลิกรวม ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด และเชื้อรา รวมถึงศึกษาฤทธิ์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็นเซลล์ไลน์มะเร็งบางชนิดเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ ตัวอย่างผักหวานป่าซื้อจากจังหวัดสระบุรีเป็นกิ่งและยอดอ่อน และจากอุทัยธานีเป็นกิ่ง และใบที่เจริญเต็มที่ และตัวอย่างผักหวานเมาเป็นกิ่งและใบที่เจริญเต็มที่ ได้จากจังหวัดกาญจนบุรี ผลการวิจัยพบว่าส่วนสกัดผักหวานป่าและผักหวานเมาที่ได้จากวิธีการแช่หมักใน 95% เอทานอล แล้วนำมาแยกต่อตามลำดับด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เฮกเซนและ ไดคลอโรมีเทนนั้น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงและน้อยกว่าสารสกัดผักหวานป่าและผักหวานเมาที่เตรียมสกัดด้วยชุด soxhlet โดยใช้ตัว

ทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ ส่วนสกัดผักหวานป่า สระบุรีด้วยไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH โดยมีค่า แอคติวิตี DPPH เป็น 40.28±0.46 มก.สมมูลของแกลลิคแอซิดต่อน้ำหนักส่วนสกัดแห้ง 100 กรัม ส่วนสกัดผักหวานป่าอุทัยธานีด้วย 95% เอทานอล มีค่า 1805.39±41.12 มิลลิกรัมสมมูลของ Trolox ต่อน้ำหนัก ส่วนสกัดแห้ง 100 กรัม ในการทดสอบ FRAP เช่นเดียวกับส่วนสกัดผักหวานเมากาญจนบุรีด้วย 95% เอทานอล มีค่า 18,072.36±6.41 มิลลิกรัม สมมูลของ Trolox ต่อน้ำหนักส่วนสกัดแห้ง 100 กรัม แต่เมื่อนำมาแยกผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงยกเว้นสารที่แยกได้จากส่วนสกัดของผักหวานเมากาญจนบุรียังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่าเดิม ในการวิจัยครั้งนี้พบว่า ส่วนสกัดผักหวานป่าและผักหวานเมาทุกตัวอย่างไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และเชื้อรา *Candida Albicans* ส่วนสกัดผักหวานป่าสระบุรีด้วย 95%เอทานอล และเฮกเซน และส่วนสกัดผักหวานเมากาญจนบุรีด้วยเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* น้อยกว่าแอมพิซิลิน (10 ไมโครกรัม/disc) และเจนต้าไมซิน (10 ไมโครกรัม/disc) โดยมีขนาด clear zone 0.74–0.98 ซม. เทียบกับขนาด 0.83 และ 2.38 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนสกัดผักหวานป่าและผักหวานเมา ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphyloccus aureus* โดยมีขนาด clear zone 1.14–1.50 ซม. เทียบกับ ขนาด 3.83 และ 3.13 เซนติเมตร ของแอมพิซิลินและเจนต้าไมซินตามลำดับ นอกจากนี้ตัวอย่างส่วนใหญ่มีค่า MIC และ MBC มากกว่า 1024 μg/mL ยกเว้นส่วนสกัดเฮกเซนของผักหวานป่าสระบุรี มีค่า MIC 128, 256 μg/mL และค่า MBC 512, 1024 μg/mL ต่อเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* ตามลำดับ แต่เมื่อนำมาแยกผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีพบว่าสารสกัดไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว ส่วนฤทธิ์ยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองพบว่า ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทของผักหวานเมากาญจนบุรีมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ใหญ่สูงสุด (IC_{50} = 86.24±4.87 μg/mL) ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทของผักหวานป่าสระบุรีมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสูงสุด (IC_{50} = 85.37±25.57 μg/mL) และส่วนสกัดเฮกเซนและเอทิลอะซิเตทของผักหวานป่าสระบุรีมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งตับสูงสุด (IC_{50} = 211.46–212.34 μg/mL) ซึ่งส่วนสกัดเหล่านี้มีฤทธ์ยับยั้งเซลล์ไลน์ปกติด้วย (IC_{50} = 142.26–363.64 μg/mL) เมื่อนำมาศึกษารูปแบบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส พบว่า ส่วนสกัดเฮกเซนของผักหวานเมากาญจนบุรีและผักหวานป่าสระบุรีที่ความเข้มข้น 220–240 μg/mL ทำให้การ

ตายของเซลล์ไลน์มะเร็งตับชนิด HCT116 แบบอะพอพโทซิสคล้ายกับผลของยา Cisplatin ที่ความเข้มข้น 320 μg/m

ปีพ.ศ. 2558 ธิดา ไชยวังศรี, กัลยา จำปาทอง และรักสกุล แก่นเรณู ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากยอด และใบของผักหวานป่า ซึ่งถูกสกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างชนิดกัน คือ เฮกเซน เอทิลอะซีเตท และ 85% เอทานอล โดยผักหวานป่าที่ทำการศึกษานำมาจากอำเภอเชียงม่วน และอำเภอปง จังหวัดพะเยา สารสกัดหยาบเหล่านี้ถูกนำมาทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH และ ABTS รวมทั้งการหาปริมาณฟีนอลิกรวม และนำมาทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด*(Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus)* อีกทั้งได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากของคน (KB–Oral cavity cancer) ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของคน (MCR7–breast cancer) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Neuraminidase ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสเริมที่ปาก และความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง

จากการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบ ที่สกัดด้วย 85% เอทานอล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด และพบว่าสารสกัดหยาบจากยอดของผักหวานป่าจากอำเภอปงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับปริมาณฟีนอลิกรวม และพบว่าสารสกัดหยาบจากใบผักหวานป่าที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทของอำเภอปงมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Bacillus cereus* โดยปริมาณที่ต่ำที่สุด(MIC) ที่สามารถยับยั้งได้ คือ 125 มิลลิกรัม อีกทั้งพบว่าสารสกัดจากยอดผักหวานป่าที่สกัดด้วยเฮกเซนของอำเภอปงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสเริมที่ปาก (Anti–HSV–1) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.08 พีพีเอ็ม

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เมทานอล (Methanol, CH_3OH) (AR grade.)

3.1.2 เอทานอล (Ethanol, CH_3CH_2OH) (AR grade.)

3.1.3 2,2–ไดฟีนิล–1–พิกริลไฮดราซิล (DPPH, $C_{18}H_{12}N_5O_6$)

3.1.4 วิตามินซี (L–Ascorbic acid, $C_6H_8O_6$, ASSAY 99.0–100.5%) (AR grade.)

3.1.5 2,2–อะซิโน–บิส (3–เอททิลเบนโซโทโซลีน–6–ซัลโฟนิค แอสิค) (ABTS, $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$, MW = 548.68, ASSAY >98.0%)

3.1.6 (±)–6–Hydroxy–2,5,7,8–tetramethylchromane–2–carboxylic acid (Trolox, $C_{14}H_{18}O_4$, MW = 250.294, ASSAY >97.0%)

3.1.7 โฟลิน–เซียคัลธู (Folin–Ciocalteu) (AR grade.)

3.1.8 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate, Na_2CO_3, ASSAY 99.8%) (AR grade)

3.1.9 โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate, $K_2S_2O_8$,)

3.1.10 กรดแกลลิก (Gallic acid, $C_7H_6O_5$, ASSAY >98.0%)

3.1.11 น้ำ DI

3.2 วัสดุอุปกรณ์

3.2.1	บีกเกอร์	ขนาด 25 50 100 และ 500 มิลลิลิตร
3.2.2	หลอดทดลอง	ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร
3.2.3	ไมโครปิเปต	ขนาด 10–100 และ 100–1.000 ไมโครลิตร
3.2.4	ขวดปรับปริมาตร	ขนาด 5 10 25 50 และ 100 มิลลิลิตร
3.2.5	ไมโครปิเปตทิป	ขนาด 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
3.2.6	หลอดหยด	
3.2.7	แท่งแก้วคนสาร	

3.2.8 อะลูมิเนียมฟอยล์

3.2.9 พาราฟิล์ม

3.2.10 ขวดสีชาเก็บสาร

3.2.11 ตะแกรงวางหลอดทดลอง

3.2.12 ช้อนตักสาร

3.2.13 ถุงมือยาง

3.2.14 คิวเวต ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.2.15 ผ้าขาวบาง

3.3 เครื่องมือ

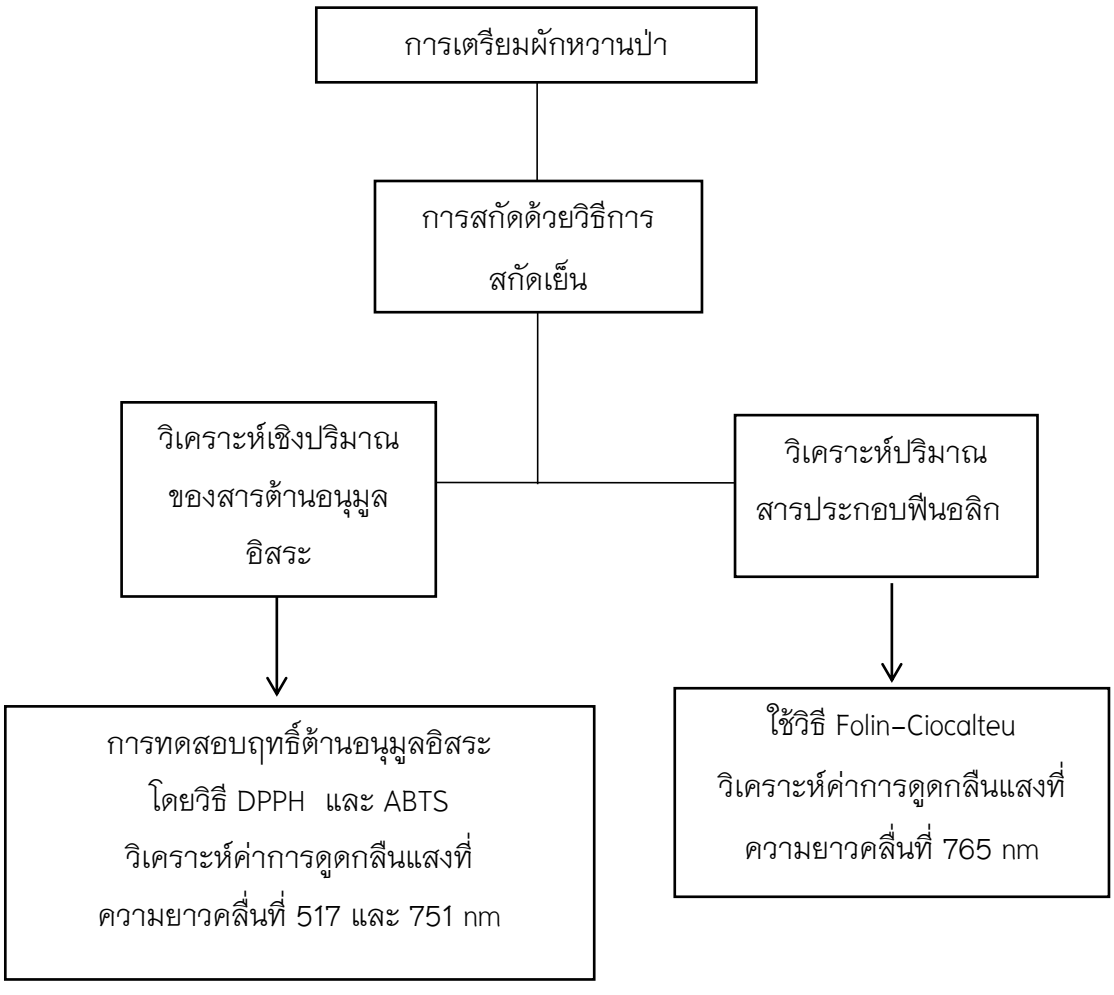
3.3.1 เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer)

3.3.2 เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.3.3 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-dryer)

3.3.4 เครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary Evaporator)

3.4 แผนการดำเนินการวิจัย



3.5 วัตถุดิบ

3.5.1 เนื้อของผลผักหวานป่า

3.6 การเตรียมสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า

3.6.1 นำเนื้อของผลผักหวานป่า มาสับให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และนำใส่ในภาชนะที่ปิดสนิท

3.7 การสกัดสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าด้วยตัวทำละลาย

3.6.1 การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 85%

นำเนื้อของผลผักหวานป่า 100 กรัมบรรจุลงในห่อผ้าขาวบางและนำมาทำการสกัดเย็นโดยตัวทำละลายเอทานอล 85% ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2 ลิตร ที่ปิดปากสนิทด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ เพื่อป้องกันการระเหยของตัวทำละลาย เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงกรองสารละลายที่สกัดผ่านกระดาษกรอง ทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดันเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ 85%เอทานอลจากเนื้อของผลผักหวานป่า กากที่เหลือจากการแช่ครั้งแรกนำมาแช่ในเอทานอล 85% ซ้ำอีก 2 ครั้ง นำส่วนสกัดหยาบที่ได้จากการสกัด 3 ครั้งรวมกันจะได้ส่วนสกัดหยาบ 18.19 กรัม

3.8 วิธีการเตรียมสารละลาย (Stock Solution) ที่ใช้ทดสอบโดยวิธี DPPH

3.8.1 การเตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH

เตรียมสารละลาย DPPH radical ให้มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสาร DPPH มา 0.0039 กรัม ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.8.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (L–Ascorbic acid)

เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ให้มีความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม (Stock Solution) โดยชั่งวิตามินซี 0.0100 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้เตรียมไว้จาก (Stock Solution) ให้มีความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 และ 640 มิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินซี 1,000 พีพีเอ็ม (Stock Solution) มา 0.0125 0.0250 0.0500 0.1000 0.2000 0.4000 0.8000 1.6000 และ 3.2000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้เป็น 5 มิลลิลิตร

3.8.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

1) ปิเปตสารละลาย DPPH (ข้อ 3.8.1) 1.0000 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์บรรจุตัวอย่าง 1 เซลล์ นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิลสเปกโตโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เมทานอลเป็น blank ทำซ้ำ 3 ครั้ง (Control)

2) ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ความเข้มข้น 2.5 พีพีเอ็ม (ข้อ 3.8.2) 0.5000 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองจากนั้นเติม DPPH radical (ข้อ 3.8.1) 1.0000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

3) นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเมอร์ โดยใช้เมทานอลเป็น blank

4) บันทึกผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลอง แล้วนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Inhibition) เพื่อนำไปพล็อตกราฟหาค่า IC_{50} ต่อไป (ให้ทำการทดลองซ้ำ 3 ชุด)

3.9 วิธีการเตรียมสารละลาย (Stock solution) ที่ใช้ทดสอบโดยวิธี $ABTS^{\cdot+}$

3.9.1 เตรียมสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$

เตรียมสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ ให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสาร ABTS มา 0.0360 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

3.9.2 เตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate)

เตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้มีความเข้มขัน 2.45 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต มา 0.0165 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้มีปริมาตร เป็น 25 มิลลิลิตร

3.9.3 เตรียมสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ (Stock Solution 2)

ปิเปตสารละลาย ABTS solution ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ (ข้อ 3.9.1) 8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ 12 มิลลิลิตร (ข้อ 3.9.2) ใส่ในขวดสีชา เขย่าให้เข้ากัน เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างสมบูรณ์ ($ABTS^{\cdot+}$ Stock Solution 1) และสารอนุมูลอิสระนี้สามารถเก็บไว้ได้นาน ประมาณ 2–3 วัน ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง โดยก่อนนำมาทดสอบเจือจางสารจาก ($ABTS^{\cdot+}$ Stock Solution 1) โดยงานวิจัยนี้ใช้สารละลายผสม 2 มิลลิลิตร แล้ว

ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ($ABTS^{\cdot+}$ Stock Solution 2) ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 0.7±0.02

3.9.4 เตรียมสารละลายมาตรฐานโทลอกซ์ (Trolox)

เตรียมสารละลายมาตรฐานโทลอกซ์ ให้มีความเข้มข้น 60 พีพีเอ็ม (Stock Solution) โดยชั่งโทลอกซ์มา 0.0015 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้เตรียมไว้จาก (Stock Solution) ให้มีความเข้มข้น 0 10 20 30 40 50 และ 60 โดยปิเปตสารละลายจาก (Stock Solution) มา 0.0000 0.8333 1.6667 2.5000 3.3333 4.1667 และ 5.0000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตรด้วยเอทานอล

3.9.5 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี $ABTS^{\cdot+}$

1) ปิเปตสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ Stock Solution 2 (ข้อ 3.9.3) 1.0000 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์บรรจุสารตัวอย่าง 1 เซลล์ นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbonce) ที่ความยาวคลื่น 751 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เอทานอลเป็น Blank ทำซ้ำ 3 ครั้ง (Control) ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 0.7±0.02

2) ปิเปตสารละลายมาตรฐานโทลอกซ์ความเข้มข้น 0 พีพีเอ็ม (ข้อ 3.9.4) 0.3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองจากนั้นเติม $ABTS^{\cdot+}$ Stock Solution 2 (ข้อ 3.9.3) 2.7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที

3) นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 751 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เอทานอลเป็น Blank

4) สำหรับสารละลายแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทลอกซ์และสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม ให้ทำการทดลองตามข้อ 2–3 ซ้ำ 3 ครั้ง/ 1 ชุด (สารมาตรฐานและสารตัวอย่างให้ทดสอบในวันเดียวกัน) บันทึกผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลอง แล้วนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) นำไปพล็อตกราฟเพื่อคำนวณหาค่า TEAC ต่อไป (ให้ทำการทดลองซ้ำ 3 ชุด)

3.10 การเตรียมสารละลาย (Stock Solution) ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม(Total phenolic content) โดยวิธี Folin–Ciocalteu Reagent

3.10.1 เตรียมสารละลายโฟลิน–เซียคัลธู (Folin–Ciocalteu Reagent) 10% v/v

เตรียมสารละลายโฟลิน–เซียคัลธู โดยปิเปตสารละลายโฟลิน–เซียคัลธูมา 5.0000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.10.2 เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) 7.5% w/v

เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตมา 1.8788 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.10.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ให้มีความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม (Stock Solution) โดยชั่งกรดแกลลิกมา 0.0102 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมททานอลให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้เตรียมไว้จาก (Stock Solution) ให้มีความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 พีพีเอ็ม โดยปิเปตสารละลายจาก (Stock Solution) มา 0.0000 0.1000 0.2000 0.3000 0.4000 และ 0.5000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยเมททานอล

3.10.4 เตรียมสารละลายที่สกัดในตัวทำละลาย 85% เอทานอล

เตรียมสารละลายที่สกัดด้วยผักหวานป่าให้มีความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม โดยชั่งสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า 0.0050 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.10.5 วิธีการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวม

1) ปิเปตสารละลายโฟลิน–เซียคัลธู (ข้อ3.10.1) 1.0000 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (ข้อ 3.10.2) 0.4000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลาอีก 50 นาที

2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้เมททานอลเป็น Blank

3) สำหรับสารละลายแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกและสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม ให้ทำการทดลองตามข้อ

1–2 ซ้ำ 3 ครั้ง/1 ชุด (สารมาตรฐานและสารตัวอย่างให้ทดสอบในวันเดียวกัน) บันทึกผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลอง แล้วนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงไปพล็อตกราฟเพื่อคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมต่อไป (ให้ทำการทดลองซ้ำ 3 ชุด)

ข้อแนะนำ

1) ก่อนชั่งสารทดสอบ ควรตรวจเช็คเครื่องชั่งสารให้มีความเที่ยงตรง
2) การชั่งน้ำหนักสารทดสอบ ควรใช้เครื่องชั่งสารเครื่องเดิมในการชั่งน้ำหนักสารทดสอบ
3) การชั่งน้ำหนักสารทดสอบที่เก็บอยู่ในที่อุณหภูมิต่ำ (ตู้เย็น) ก่อนนำสารทดสอบมาใช้ควรตั้งทิ้งไว้ให้สารทดสอบอยู่ในอุณหภูมิห้องก่อนจึงค่อยชั่งน้ำหนักสารทดสอบ
4) หลังใช้สารทดสอบควรปิดฝาบรรจุภัณฑ์ให้สนิท
5) การวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงให้วิเคราะห์ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่ำไปหาตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูง โดยไม่ต้องทำความสะอาดเซลล์บรรจุสารตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย
6) สำหรับการทดสอบสารที่มีความไวต่อแสงให้ควบคุมปริมาณแสงในห้องปฏิบัติการให้ได้มากที่สุด เพื่อควบคุมปัจจัยการเกิดอนุมูลอิสระจากพลังงานแสงภายในห้อง
8) การปิเปตสารทดสอบด้วยไมโครปิเปต โดยให้ไมโครปิเปตทิปสัมผัสกับข้างหลอดทดลองทุกครั้งเสมอ เพื่อป้องกันสารในหลอดทดลองกระเด็นขึ้นสัมผัสไมโครปิเปตทิปอาจทำให้เกิดการเจือปนของสารได้ และป้องกันเกิดปฏิกิริยารุนแรงจากปฏิกิริยาของสารทดสอบที่อาจกระเด็นออกมาได้
9) การทำความสะอาดอุปกรณ์เครื่องแก้ว หลังจากทำความสะอาดแล้วให้ล้างด้วยน้ำ RO หรือ DI เพื่อควบคุมตัวรบกวนจากการสารชนิดอื่นที่อาจตกค้างอยู่ เช่น น้ำยาล้างจาน ฯลฯ

บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการสกัดสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล

การสกัดสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล โดยการนำผักหวานป่าในพื้นที่จังหวัดพะเยา มาทำการสกัดเย็นโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล 85% และนำสารละลายที่สกัดได้มาทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน เพื่อให้ได้สารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าจริง ดังตาราง 2

ตาราง 2 แสดงผลน้ำหนักของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วยเอทานอล 85%

ตัวทำละลายที่ในการสกัด	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	Yield (%w/w)
เอทานอล 85%	100	18.19	18.19

4.2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าในพื้นที่จังหวัดพะเยา ที่สกัดเย็นโดยใช้ตัวทำละลาย 85% เอทานอล ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ซึ่งใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทร-โฟโตมิเตอร์ จะได้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเพื่อนำไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Inhibition) และนำไปพล๊อตกราฟหาค่า IC_{50}

ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานวิตามินซีและสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าจากสารสกัด 85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH แสดงดังตาราง 3-6 ตามลำดับ

ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี และสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด แสดงดังตาราง 9-10 ตามลำดับ

ตาราง 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	1.222	1.073	1.069	1.1213	0.07 12
2.5	1.211	1.034	1.012	1.0857	0.0891
5	1.058	0.716	0.781	0.8517	0.1483
10	0.870	0.710	0.708	0.7627	0.0759
20	0.319	0.312	0.307	0.3127	0.0049
40	0.068	0.056	0.056	0.0600	0.0057
80	0.085	0.082	0.112	0.0930	0.0135
160	0.070	0.054	0.124	0.0827	0.0299
320	0.063	0.059	0.049	0.0570	0.0059
640	0.065	0.065	0.062	0.0640	0.0014

ตาราง 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH (ชุดที่ 1)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	1.243	1.292	1.285	1.2733	0.0216
20	1.264	1.294	1.446	1.3347	0.0797
40	1.262	1.286	1.310	1.2860	0.0196
80	1.259	1.285	1.355	1.2997	0.0405
160	1.254	1.278	1.322	1.2847	0.0282
1,000	1.187	1.270	1.291	1.2493	0.0449
2,000	1.231	1.235	1.271	1.2457	0.0180
3,000	1.210	1.232	1.250	1.2307	0.0164

ตาราง 5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH· (ชุดที่ 2)

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	1.214	1.261	1.294	1.2563	0.0328
20	1.247	1.295	1.372	1.2120	0.0422
40	1.246	1.294	1.346	1.2953	0.0408
80	1.194	1.168	1.174	1.1787	0.0111
160	1.172	1.171	1.162	1.1683	0.0045
1,000	1.151	1.151	1.150	1.1507	0.0005
2,000	1.125	1.113	1.164	1.1340	0.0218
3,000	1.098	1.097	1.097	1.0973	0.0005

ตาราง 6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH· (ชุดที่ 3)

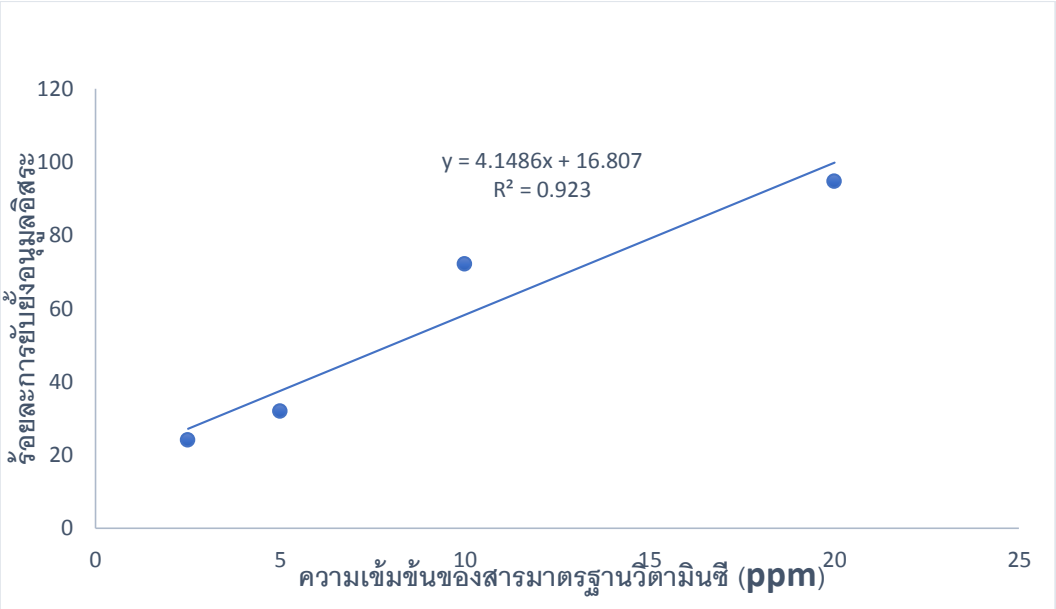
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	1.129	1.149	1.119	1.1323	0.0125
20	1.202	1.166	1.268	1.2120	0.0422
40	1.254	1.200	1.190	1.2147	0.0281
80	1.194	1.168	1.174	1.1787	0.0111
160	1.172	1.171	1.162	1.1683	0.0045
1000	1.151	1.151	1.150	1.1507	0.0005
2,000	1.125	1.113	1.164	1.1340	0.0218
3,000	1.098	1.097	1.097	1.0973	0.0005

ตาราง 7 แสดงค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH

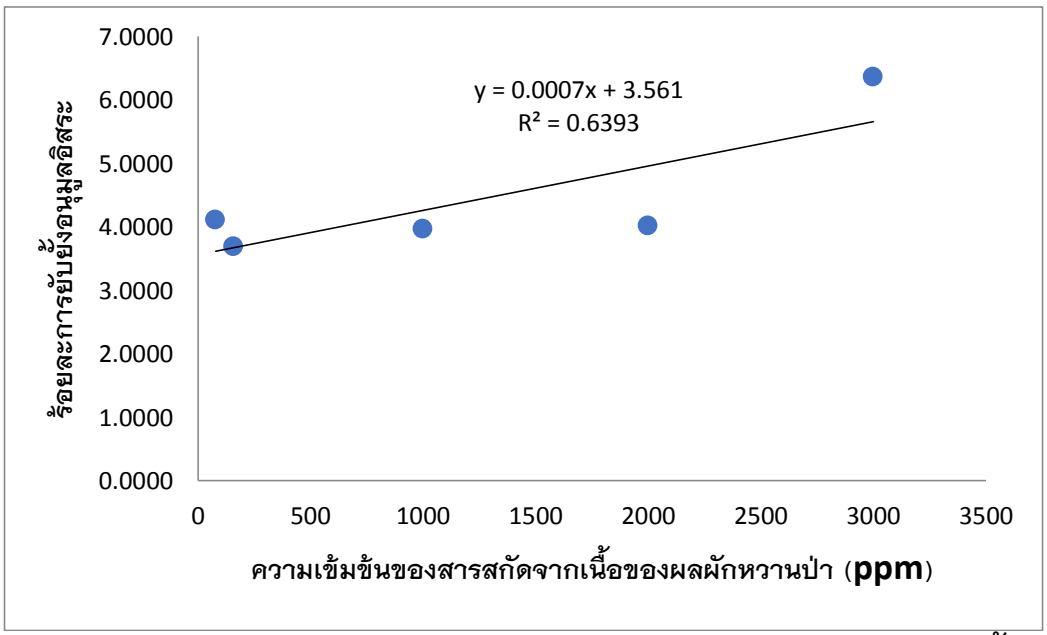
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	± SD	%inhibition
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
Control	1.222	1.073	1.069	1.1213	0.0712	0
2.5	1.211	1.034	1.012	1.0857	0.0891	3.180737
5	1.058	0.716	0.781	0.8517	0.1483	24.04875
10	0.870	0.710	0.708	0.7627	0.0759	31.98573
20	0.319	0.312	0.307	0.3127	0.0049	72.11653
40	0.068	0.056	0.056	0.0600	0.0057	94.64923
80	0.085	0.082	0.112	0.0930	0.0135	91.7063
160	0.070	0.054	0.124	0.0827	0.0299	92.62782
320	0.063	0.059	0.049	0.0570	0.0059	94.91677
640	0.065	0.065	0.062	0.0640	0.0014	94.29251

ตาราง 8 แสดงค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด

ความเข้มข้น (ppm)	%inhibition	%inhibition	%inhibition	%inhibition เฉลี่ย	± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
20	4.8221	7.0388	3.5262	5.1290	1.4503
40	0.9974	7.2772	3.1044	3.7930	2.6095
80	2.0734	4.0979	6.1769	4.1161	1.6753
160	0.8953	3.1794	7.0047	3.6931	2.5205
1,000	1.8849	1.6250	8.4056	3.9718	3.1369
2,000	2.1676	0.1501	9.7349	4.0175	4.1258
3,000	3.3456	3.0911	12.6562	6.3643	4.4503



ภาพ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานวิตามินซีกับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย



ภาพ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่ากับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย

4.3 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าในพื้นที่จังหวัดพะเยา ที่สกัดเย็นโดยใช้ตัวทำละลาย 85% เอทานอล วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ซึ่งใช้โทลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 751 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จะได้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเพื่อไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ(%Inhibition) และนำไปพล๊อตกราฟเพื่อคำนวณหาค่า TEAC

ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทลอกซ์ และสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$ แสดงดังตาราง 9–12 ตามลำดับ

ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานโทลอกซ์ และสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยทั้ง 3 ชุด แสดงดังตาราง 13–14 ตามลำดับ

กราฟมาตรฐานโทลอกซ์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทลอกซ์ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย แสดงดังภาพ 11

ตาราง 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทลอกซ์ ทำปฏิกิริยากับสารละลาย $ABTS^{\cdot+}$

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	0.283	0.259	0.241	0.2610	0.0172
0	0.254	0.224	0.192	0.2233	0.0253
10	0.190	0.125	0.104	0.1397	0.0366
20	0.057	–0.007	0.000	0.0167	0.0287
30	0.001	–0.009	–0.001	–0.0030	0.0043
40	0.004	–0.009	–0.001	–0.0020	0.0054
50	0.037	–0.008	–0.001	0.0093	0.0198
60	0.015	–0.009	–0.001	0.0017	0.0100

ตาราง 10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย ABTS$^{\cdot+}$ (ชุดที่ 1)

ความเข้มข้น	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืน	± SD
(ppm)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	แสงเฉลี่ย	
Control	0.405	0.387	0.371	0.3877	0.0139
1,000	0.354	0.348	0.333	0.3450	0.0088

ตาราง 11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย ABTS$^{\cdot+}$ (ชุดที่ 2)

ความเข้มข้น	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืน	± SD
(ppm)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	แสงเฉลี่ย	
Control	0.405	0.387	0.371	0.3877	0.0139
1,000	0.349	0.336	0.321	0.3353	0.0114

ตาราง 12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย ABTS$^{\cdot+}$ (ชุดที่ 3)

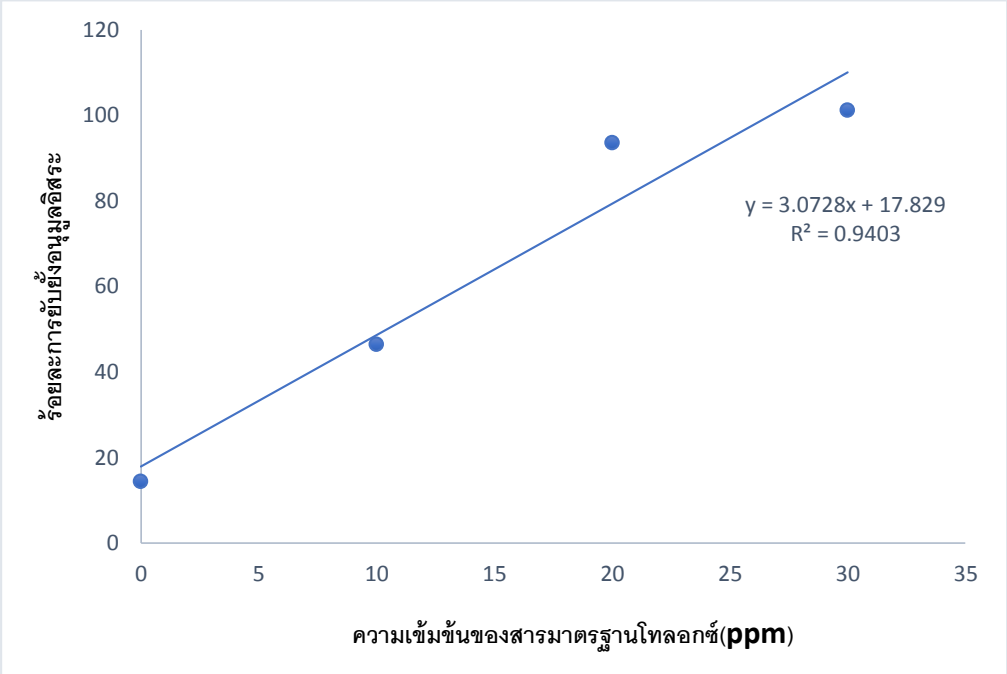
ความเข้มข้น	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืน	± SD
(ppm)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	แสงเฉลี่ย	
Control	0.405	0.387	0.371	0.3877	0.0139
1,000	0.341	0.330	0.322	0.3310	0.0078

ตาราง 13 แสดงค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานโทลอกซ์

ความเข้มข้น (mg/l)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	± SD	%inhibition
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
Control	0.283	0.259	0.241	0.261	0.0712	0
0	0.254	0.224	0.192	0.223333	0.0891	14.4318
10	0.190	0.125	0.104	0.139667	0.1483	46.4877
20	0.057	–0.007	0.000	0.016667	0.0759	93.6142
30	0.001	–0.009	–0.001	–0.003	0.0049	101.1494
40	0.004	–0.009	–0.001	–0.002	0.0057	100.7663
50	0.037	–0.008	–0.001	0.009333	0.0135	96.4241
60	0.015	–0.009	–0.001	0.001667	0.0299	99.3613

ตาราง 14 แสดงค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า ที่สกัดด้วย 85% เอทานอล

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	± SD	%Inhibition	**%Inhibition เฉลี่ย**
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3				
Control	0.405	0.387	0.371	0.3877	0.0139	0	13.0513
1,000	0.354	0.348	0.333	0.3450	0.0088	11.0137	
1,000	0.349	0.336	0.321	0.3353	0.0114	13.5156	
1,000	0.341	0.330	0.322	0.3310	0.0078	14.6247	



ภาพ 11 กราฟมาตรฐานโทลอกซ์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทลอกซ์ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย

จากกราฟมาตรฐานโทลอกซ์ ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทลอกซ์ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ยจะได้สมการเส้นตรง $y = mx + C$ แสดงดังภาพ 11

จากนั้นนำค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 มิลลิกรัมของสาร สกัดผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล แทนในค่า y ในสมการเพื่อคำนวณหาค่า x ซึ่งเป็นค่า TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) ในหน่วยมิลลิโมลาร์ แสดงดังตาราง 15

ตาราง 15 แสดงผลค่า TEAC สารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

สารตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ	ค่า TEAC (mM)
1. สารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล	0.3371

4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocalteu

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าในพื้นที่จังหวัดพะเยา ที่สกัดเย็นโดยใช้ตัวทำละลาย 85% เอทานอล วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocalteu ซึ่งใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี–วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จะได้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงนำไปพล๊อตกราฟเพื่อคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม

ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก และสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu แสดงดังตาราง 16 และ 17 ตามลำดับ

กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม แสดงดังภาพ 12

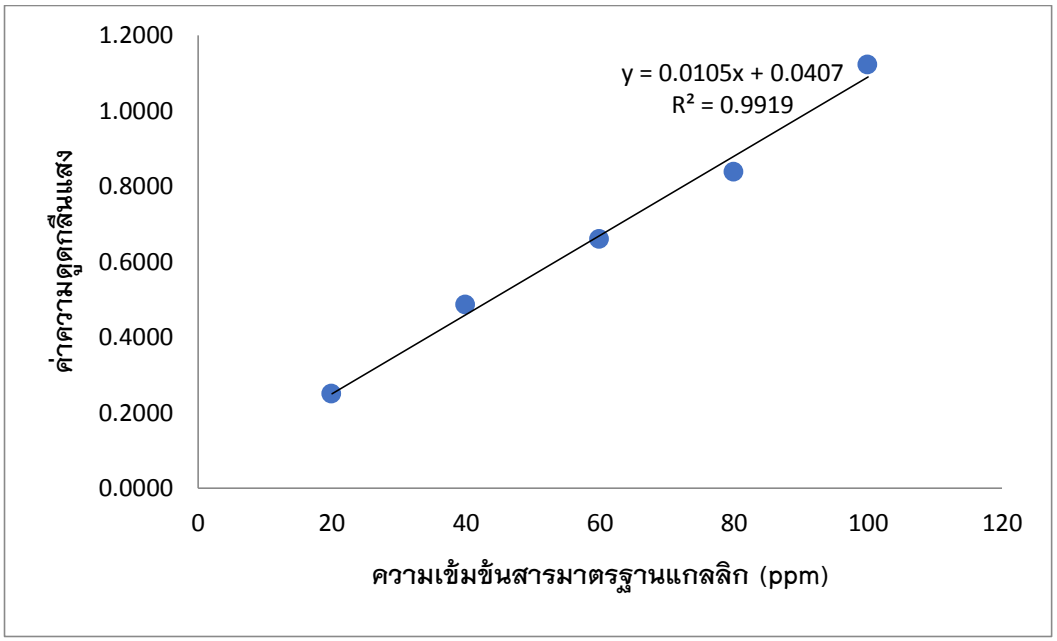
ค่าปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocalteu แสดงดังตาราง 18

ตาราง 16 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu

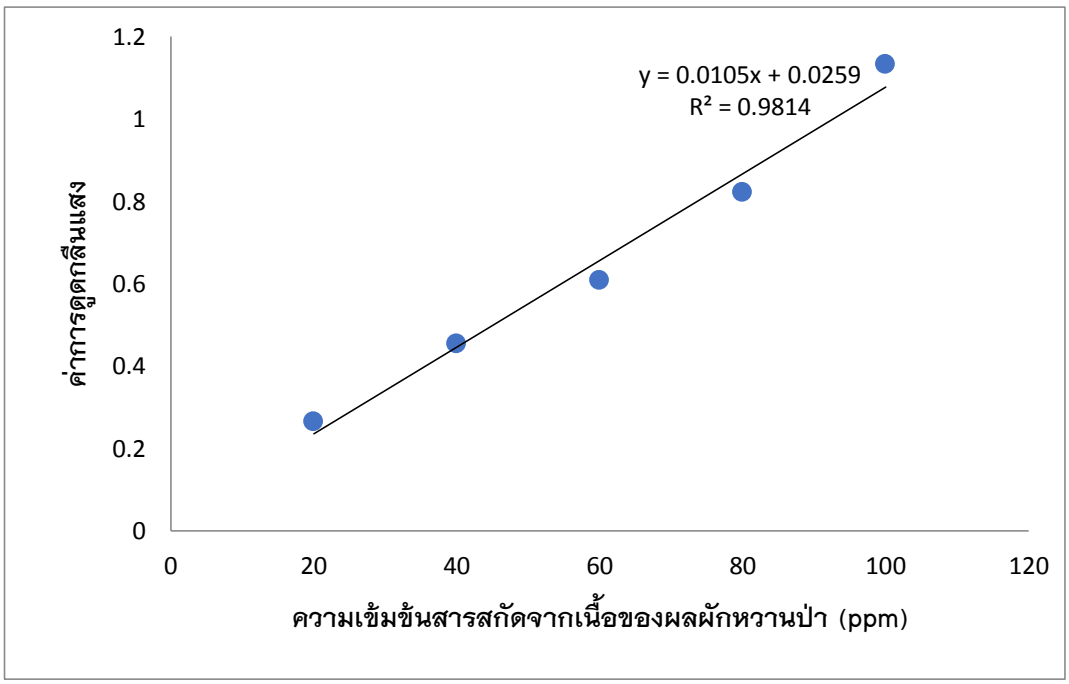
ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	0.276	0.273	0.233	0.2607	0.0196
0	0.058	0.052	0.050	0.0533	0.0034
20	0.254	0.248	0.241	0.2477	0.0053
40	0.485	0.481	0.489	0.4850	0.0033
60	0.652	0.652	0.671	0.6583	0.0090
80	0.845	0.831	0.833	0.8363	0.0062
100	1.116	1.110	1.134	1.1200	0.0102

ตาราง 17 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	± SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	0.274	0.262	0.243	0.2597	0.0128
0	0.030	0.013	0.024	0.0223	0.0070
20	0.267	0.265	0.265	0.2657	0.0009
40	0.459	0.452	0.451	0.4540	0.0036
60	0.603	0.612	0.611	0.6087	0.0040
80	0.835	0.811	0.820	0.8220	0.0099
100	1.141	1.110	1.148	1.1330	0.0165



ภาพ 12 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม



ภาพ 13 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–Ciocalteu

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม จะได้สมการเส้นตรง y = mx + c แสดงดังภาพ 12 จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล แทนในค่า y ในสมการเพื่อคำนวณหาค่า x ซึ่ง เป็นปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วย พีพีเอ็ม แล้วนำค่าปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วยพีพีเอ็มที่ได้ ไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วย มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมน้ำหนักของสารสกัด แสดงดังตาราง 18

ตาราง 18 แสดงผลค่าปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocalteu

สารตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ	ปริมาณฟีนอลิกรวม (ppm)	ปริมาณฟีนอลิกรวมต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้ง (mg GAE/gW)
สารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล	0.0014	0.28

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH จากค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ของสารมาตรฐานวิตามินซี และสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล โดยคำนวณค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) จากกราฟสารมาตรฐานวิตามินซี และสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย (%Inhibition) จะได้สมการเส้นตรง y = mx + c ซึ่งคำนวณค่าได้ดังนี้ สารมาตรฐานวิตามินซีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 8.00 พีพีเอ็ม ($y = 4.1486x + 16.807$; $R^2 = 0.923$) และสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล เท่ากับ 4759.44 พีพีเอ็ม ($y = 0.0007x + 3.561$; $R^2 = 0.6393$) โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ที่มีค่าน้อยจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซีกับสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล พบว่า วิตามินซีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS จากค่า TEAC ของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ซึ่งใช้โทลอกซ์เป็นสารมาตรฐานโดยคำนวณค่า TEAC จากสมการของกราฟโทลอกซ์ แสดงดังนี้ ($y = 3.0728x + 17.829$; $R^2 = 0.9403$) สารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 0.3371 มิลลิโมลาร์

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocalteu จากค่าปริมาณฟีนอลิก รวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล โดยคำนวณค่าปริมาณฟีนอลิกรวม จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานแกลลิก ($y = 0.0105x + 0.0407$; $R2 = 0.9919$) พบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล เท่ากับ 56.3429 พีพีเอ็ม นำค่าปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วย พีพีเอ็ม ไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วยมิลลิกรัม ต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้งได้ เท่ากับ 0.28 mg GAE/g W

บทที่ 5

สรุปผลการดำเนินการวิจัย

5.1 สรุปผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวม

ในการวิจัยครั้งนี้พบว่า จากการสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ที่ความเข้มข้น 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH พบว่า แสดงผลค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานวิตามินซีมีฤทธิ์การยับยั้ง เท่ากับ 8.00 พีพีเอ็ม เมื่อเทียบกับสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล มีฤทธิ์การยับยั้ง ค่า IC_{50} 4759.44 พีพีเอ็ม เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารมาตรฐานวิตามินซีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย85% เอทานอล โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ที่มีค่าน้อยจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

จากนั้นวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ซึ่งใช้โทลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน โดยคำนวณค่า TEAC จากสมการของกราฟโทลอกซ์แสดงค่า TEAC ของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล แสดงดังนี้ สารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล เท่ากับ 0.3371 มิลลิโมลาร์

จากนั้นผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocalteu จากค่าปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล พบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล เท่ากับ 56.3429 พีพีเอ็ม และปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วยมิลลิกรัม ต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้งได้ เท่ากับ 0.28 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.21 ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีอื่นๆ เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

5.2.2 ควรทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้มาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หรือวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีที่มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น

บรรณานุกรม

[1] ธิดา ไชยวังศรี กัลยา จำปาทอง และรักสกุล แก่นเรณู (2558). ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากยอดและใบของผักหวานป่า.วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต.วิทยาศาสตร์.มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

[2] ผักหวานป่า เข้าได้ถึงจาก https://medthai.com/ผักหวานป่า/

[3] รัชนี คงคาฉุยฉาย และอริญ เจริญศิริ. กำจัดสารอนุมูลอิสระ. สถาบันวิจัยโภชนาการ. มหาวิทยาลัยมหิดล.

[4] ลักขณา เจริญ (2556), การแยกสกัดและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผักหวานป่าและผักหวานเมา.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยรังสิต.

[5] สารต้านอนุมูลอิสระ เข้าถึงได้จาก https://erp.mju.ac.th/openFile.aspx?id=MTY4ODkx

[6] สารต้านอนุมูลอิสระ. สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.)

[7] อนุมูลอิสระ เข้าถึงได้จาก https://dna.kps.ku.ac.th/index.php/article-rice-rsc-rgdu/36-free-radicle- antioxidant-anthrocyanidin

[8] อนุมูลอิสระ เข้าถึงได้จาก https://www.scimath.org/article-biology/item/6903-2017- 05-14-06-44-3

[9] อภิชาติ วรรณวิจิตร และศิริพัฒน์ เรืองพยัคฆ์. กำจัดสารอนุมูลอิสระ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน.

[10] ขวัญฤทัย คำฝาเชื้อ 2551 พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวกะเหรี่ยง. ที่ตำบลบ้านจันทร์และแจ่มหลวง อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่. วิทยานิพนธ์ (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

[11] มูลนิธิหมอชาวบ้าน. นิตยสารหมอชาวบ้าน เล่มที่ 243 คอลัมน์: พืช-ผัก-ผลไม้. “ผักหวานป่า สุดยอดผักของไทยและเอเชียอาคเนย์”. (เดชา ศิริภัทร). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.doctor.or.th. [28 เม.ย. 2014].

[12] นิตยสารเกษตรศาสตร์. “ผักหวานป่า”. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.ku.ac.th/e-magazine/november46/. [28 เม.ย. 2014].

ภาคผนวก ก

ตัวอย่างการคำนวณ

1. การคำนวณหาน้ำหนักสาร (g) จากหน่วยพีพีเอ็ม (Part per million)

จาก

หน่วย พีพีเอ็ม (ppm) เทียบเท่ากับ หน่วย มิลลิกรัม/ลิตร (mg/L)

ตัวอย่างการคำนวณ

จงเตรียมสารละลายจากสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า ให้มีความเข้มข้น 3,000 พีพีเอ็ม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร

แสดงว่า

เมทานอล 1,000 มิลลิลิตร มีสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า 3,000 มิลลิกรัม

ถ้า เมทานอล 25 มิลลิลิตร จะมีสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า เท่ากับ

$$= \frac{(25\ \text{ml})(3{,}000\ \text{mg})}{1{,}000\ \text{ml}}$$

$$= \frac{75{,}000\ \text{ml.mg}}{1{,}000\ \text{ml}}$$

$$= 75\ \text{mg}$$

$$= 75 \times 10^{-3}\ \text{g}$$

$$= 0.075\ \text{g}$$

ดังนั้น

การเตรียมสารละลายจากสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า ให้มีความเข้มข้น 3,000 พีพีเอ็ม

จะต้องชั่งสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า 0.075 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร

2. การคำนวณหาน้ำหนักสาร (g) จากหน่วยมิลลิโมลาร์ (mM)

จากสูตร

$$n = \frac{g}{Mw} = \frac{cv}{1000}$$

เมื่อ

n คือ จำนวนโมลของตัวละลาย

C คือ ความเข้มข้น หน่วย โมล/ลิตร

V คือ ปริมาตรของสารละลาย หน่วย มิลลิลิตร

Mw คือ มวลโมเลกุลของตัวทำละลาย หน่วย กรัม/โมล

g คือ มวลของสาร หน่วย กรัม

ตัวอย่างการคำนวณ

จงเตรียมสารละลาย ABTS ให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร (มวลโมเลกุล เท่ากับ 514.62 กรัม/โมล)

วิธีทำ

$$g = \frac{(C)(V)(Mw)}{1{,}000}$$

$$= \frac{(7\times10^{-3}\text{mol})(10\text{ml})(514.62\text{ g/mol})}{1{,}000\text{ ml}}$$

$$= 0.0360\text{ g}$$

ดังนั้น

การเตรียมสารละลาย ABTS ให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ จะต้องชั่งสาร ABTS มา 0.0360 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้มีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

3. การเจือจางสารละลายจากสารละลายที่ได้เตรียมไว้

จากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ

C_1 คือ ความเข้มข้นสารละลายก่อนเจือจาง

C_2 คือ ความเข้มข้นสารละลายหลังเจือจาง

V_1 คือ ปริมาตรสารละลายก่อนเจือจาง

V_2 คือ ปริมาตรสารละลายหลังเจือจาง

ตัวอย่างการคำนวณ

จากสารละลายสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า ความเข้มข้น 3,000 พีพีเอ็ม เจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 300 พีพีเอ็ม แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร

จากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(3{,}000 \text{ ppm})(V1) = (300 \text{ ppm})(5 \text{ ml})$$

$$V1 = \frac{(300 \text{ ppm})(5 \text{ ml})}{(3{,}000 \text{ ppm})}$$

$$V1 = 0.5 \text{ ml}$$

ดังนั้น

การเจือจางสารละลายจากสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า ความเข้มข้น 3,000 พีพีเอ็ม ให้มีความเข้มข้น 300 พีพีเอ็ม จะต้องปิเปตสารละลายมา 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร

5. การคำนวณค่า %Inhibition

จากสูตร

$$\%\text{Inhibition} = \frac{(\text{A control} - \text{A sample})}{\text{A control}} \times 100$$

เมื่อ

$A^{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลาย DPPH radical และตัวทำละลายที่ใช้

A^{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH radical

ตัวอย่างการคำนวณ

การคำนวณ % Inhibition ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม จากค่าดูดกลืนแสง

เมื่อ $A_{control} = 1.1213$

$A_{sample} = 1.0857$

จากสูตร

$$\%\text{ Inhibition} = \frac{(\text{A control} - \text{A sample})}{\text{A control}} \times 100$$

$$= \frac{(1.1213 - 1.0857)}{1.1213} \times 100$$

$$= 3.180737 \text{ เปอร์เซ็น}$$

ดังนั้น

%Inhibition ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม เท่ากับ 3.180737 เปอร์เซ็นต์

6. การคำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากสูตร

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{N-1}}$$

เมื่อ

S.D. = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดข้อมูล

N = จำนวนข้อมูลทั้งหมด

$\sum$ = ผลรวม

X = ข้อมูล

ตัวอย่างการคำนวณ

ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี

เมื่อ $\overline{X}$ = 0.0640

X = 0.065, 0.065, 0.062

N = 3

$$= \sqrt{\frac{\sum(0.065-0.0640)^2 + (0.065-0.0640)^2 + (0.062-0.0640)^2}{3-1}}$$

$$= \sqrt{\frac{\sum(0.001)^2+(0.001)^2+(0.002)^2}{2}}$$

$$= \sqrt{\frac{2.4\times10^{-3}}{2}}$$

= 0.0014

ดังนั้น

ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซี เท่ากับ 0.0014

ภาคผนวก ข

การคำนวณหาค่า IC_{50}, TEAC และปริมาณฟีนอลิกรวม

1. การคำนวณหาค่า IC_{50} (50% of inhibitory concentration)

1.1 การคำนวณของมาตรฐานวิตามินซี

จากสมการ $y = 4.1486x + 16.807$

แทน $y = 50$ ในสมการ

$50 = 4.1486x + 16.807$

$$x = \frac{(50-16.807)}{4.1486}$$

จะได้ค่า $IC_{50} = 8.00$ ppm

1.2 การคำนวณของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย85% เอทานอล

จากสมการ $y = 0.0105x + 0.0259$

แทน $y = 50$ ในสมการ

$50 = 0.0105x + 0.0259$

$$x = \frac{(50 - 0.0259)}{0.0105}$$

จะได้ค่า$IC_{50} = 4759.44$ ppm

2. การคำนวณหา TEAC

2.1 การคำนวณของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย85% เอทานอล

ขั้นตอนที่ 1 คำนวณหาค่า %Inhibition

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 1

เมื่อ $A_{control} = 0.3877$

$A_{sample} = 0.3450$

$$\%Inhibition = \frac{(0.3877 - 0.3450)}{0.3877} \times 100$$

= 11.0137 เปอร์เซ็นต์

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 2

เมื่อ $A_{control}$ = 0.3877

A_{sample} = 0.3353

$$\%\text{Inhibition} = \frac{(0.3877 - 0.3353)}{0.3877} \times 100$$

= 13.5156 เปอร์เซ็นต์

จากค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 3

เมื่อ $A^{control}$ = 0.3877

A^{sample} = 0.3310

$$\%\text{Inhibition} = \frac{(0.3877 - 0.3310)}{0.3877} \times 100$$

= 14.6247 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้น

ค่า %Inhibition เฉลี่ย เท่ากับ 13.0513 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 2 คำนวณหาน้ำหนักสารสกัด (มิลลิกรัม) จากปริมาณสารละลายที่นำมาทดสอบ

0.0050 มิลลิลิตร ของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85%เอทานอล ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม

แสดงว่า

เอทานอล 1,000 มิลลิลิตร มีสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า 1,000มิลลิกรัม

ถ้า เอทานอล 0.0050 มิลลิลิตร จะมีสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่า เท่ากับ

$$= \frac{(0.0050\ \text{ml})(1{,}000\text{mg})}{1{,}000\text{ml}}$$

= 0.0050 mg

ดังนั้น

ปริมาณสารละลายที่นำมาทดสอบ 0.0050 มิลลิลิตร จะมีสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85%เอทานอล เท่ากับ 0.0050 มิลลิกรัม

ขั้นตอนที่ 3 คำนวณหาค่า % Inhibition ต่อ น้ำหนักสารสกัด 1 มิลลิกรัมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85%เอทานอล

จาก ขั้นตอนที่ 1 %Inhibition เท่ากับ 13.0513 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 2 สารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล เท่ากับ 0.0050 มิลลิกรัม

แสดงว่า

สารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล 0.0050 มิลลิลิตร

มี %Inhibition เท่ากับ 13.0513 เปอร์เซ็นต์

ถ้าสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล 1 มิลลิลิตร จะมี %Inhibition เท่ากับ

$$= \frac{(1\ ml) \times (13.0513\ \%)}{0.0050ml}$$

$$= 2610.26\ \%$$

ดังนั้น

ค่า % Inhibition ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 มิลลิลิตรของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล เท่ากับ 2610.26 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนที่ 4 คำนวณหาค่า TEAC

จากกราฟมาตรฐานโทลอกซ์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานโทลอกซ์ กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ย

$$y = 3.0728x + 17.829$$

จากนั้น

นำค่า %Inhibition ต่อ น้ำหนักสารสกัด 1 มิลมิลิตรของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล

แทนในค่า y ในสมการเพื่อคำนวณหาค่า x ซึ่งเป็นค่า TEAC ใน หน่วย ppm

จากสมการ $y = 3.0728x + 17.829$

แทน $y = 2610.26$ ในสมการ

$$2610.26 = 3.0728x + 17.829$$

$$y = \frac{(2610.26-17.829)}{3.0728}$$

$$= 843.6706 \text{ ppm}$$

จากนั้น

นำค่า 843.6706 พีพีเอ็ม เปลี่ยนเป็นหน่วย มิลลิโมลาร์

เมื่อ

มวลโมเลกุลโทลอกซ์ = 250.290 กรัม/โมล

ขั้นตอนที่ 1 เปลี่ยนหน่วย พีพีเอ็ม หรือมิลลิกรัม/ลิตร ให้เป็นหน่วย กรัม/ลิตร

$$\frac{843.6706 \text{ mg/L}}{1{,}000} = 0.8437 \text{ g/L}$$

ขั้นตอนที่ 2 เปลี่ยนหน่วย กรัม/ลิตร ให้เป็นหน่วย โมล

$$\frac{0.8437 \text{ g/L}}{250.29 \text{ g/mol}} = 3.3709 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

หรือ 3.3709×10^{-3} M

ดังนั้น

ค่า TEAC ของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล เท่ากับ 0.3371 มิลลิโมลาร์

4. การคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม

4.1 การคำนวณของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล

ตาราง ข2 จากขั้นตอนการทดลองหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล

ขั้นตอนการทดลอง การหาปริมาณฟีนอลิกรวม	ปริมาตร
น้ำหนักแห้งผักหวานป่า	0.1000 กิโลกรัม
น้ำหนักสารสกัดเนื้อของผลผักหวานป่า	18.1900 กรัม
น้ำหนักสารสกัดที่ใช้ทดสอบ	0.0050 กรัม
ปริมาตรในขวดปรับปริมาตร	25.0000 มิลลิลิตร
ปริมาณสารละลายที่นำมาทดสอบ	0.2000 มิลลิลิตร
ค่าการดูดกลืนแสง	0.5509

ตัวอย่างการคำนวณ

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวม จะได้สมการเส้นตรง

$$y = 0.0105x - 0.0407$$

จากนั้น

นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยรวมของสารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล

แทนในค่า y ในสมการเพื่อคำนวณหาค่า x ซึ่งเป็นปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วย พีพีเอ็ม

จากสมการ $y = 0.0105x - 0.0407$

แทน $y = 0.5509$ ในสมการ

$$0.5509 = 0.0105x - 0.0407$$

$$x = \frac{(0.5509 + 0.0407)}{0.0105}$$

$$= 56.3429 \text{ ppm}$$

นำค่า 56.3429 พีพีเอ็ม เทียบเป็นหน่วย มิลลิกรัม

แสดงว่า เมทานอล 1,000 มิลลิลิตร มีปริมาณฟีนอลิกรวม 56.3429 มิลลิกรัม

ถ้า เมทานอล 0.2000 มิลลิลิตร จะมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ

$$= \frac{(0.2000\ \text{ml})(56.3429\text{mg})}{1{,}000}$$

$$= 0.0112\ \text{mg}$$

ดังนั้น เมทานอล 0.2000 มิลลิลิตร มีปริมาณฟีนอลิกรวม 0.0112 มิลลิกรัม

ถ้า เมทานอล 25 มิลลิลิตร จะมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ

$$= \frac{(25\ \text{ml})(0.0112\text{mg})}{0.2000\text{ml}}$$

$$= \frac{1.40\ \text{mg}}{1{,}000}$$

$$= 0.0014\ \text{g}$$

แสดงว่า น้ำหนักสารสกัดที่ใช้ทดสอบ 0.0050 กรัม มีปริมาณฟีนอลิกรวม 0.0014 กรัม

ถ้า น้ำหนักสารสกัดทั้งหมด 1 กรัม จะมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ

$$= \frac{(1\ \text{g})(0.0014\ \text{g})}{0.0050\ \text{g}}$$

$$= 0.28\ \text{g}$$

ดังนั้น สารสกัดจากเนื้อของผลผักหวานป่าที่สกัดด้วย 85% เอทานอล ต่อ น้ำหนักเนื้อของผลผักหวานป่า 1 กรัม จะมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 0.28 mg GAE/g W

ประวัติผู้ศึกษาวิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวกิ่งดาว โพธิ์ศรี
วันเดือนปีเกิด	28 เมษายน 2540
ประวัติการศึกษา	พ.ศ.2555 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนนิรมลวิทยา ตำบลป่าหว้าน อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร
	พ.ศ.2558 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนธาตุนารายณ์วิทยา ตำบลธาตุนาเวง อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่271 หมู่6 ตำบลท่าแร่ อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร
รหัสไปรษณีย์	47230
เบอร์ติดต่อ	06 4304 0082
อีเมล์	namploy2494@gmail.com