



วิทยานิพนธ์

ผลของปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อม และอายุของมะกอกน้ำ
ต่อปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน

**EFFECT OF INDIAN GOOSEBERRY BROWNING AND
SPANISH PLUM MATURITY ON TOTAL PHENOLICS,
FLAVONOIDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES**

นางสาวอริยา เรืองจักรเพชร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อม และอายุของมะกอกน้ำ ต่อปริมาณฟีนอลิก
ฟลาโวนอยด์และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน

Effect of Indian Gooseberry Browning and Spanish Plum Maturity on Total Phenolics,
Flavonoids and Antioxidant Activities

นามผู้วิจัย นางสาวอริยา เรืองจักรเพชร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบุญย์ สัจจอนันตกุล, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สุคนธ์ชื่น ศรีงาม, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สมบัติ ขอทวีวัฒนา, M.S.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบุญย์ สัจจอนันตกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจฉกหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อม และอายุของมะกอกน้ำ ต่อปริมาณฟีนอลิก
ฟลาโวนอยด์และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน

Effect of Indian Gooseberry Browning and Spanish Plum Maturity on Total Phenolics,
Flavonoids and Antioxidant Activities

โดย

นางสาวอริยา เรืองจักรเพชร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร)

พ.ศ. 2550

อริยา เรื่องจักรเพ็ชร 2550: ผลของปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อม และอายุของมะกอกน้ำ ต่อปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร
ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ปรชานกรรมการที่ปรึกษา:
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบุญย์ สัจจอนันตกุล, Ph.D. 119 หน้า

ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ 0, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ในมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* Linn.) มีผลต่อปริมาณสารและความสามารถในการต้านออกซิเดชัน มะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมงมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ร้อยละ 7.4 และเพิ่มขึ้นร้อยละ 17.8 เมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมง (2,108.6 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด) และพบว่ามีฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ร้อยละ 3.6 เมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง และเพิ่มเป็นร้อยละ 10.3 เมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมง (157.8 มิลลิกรัมแคเทคินต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด) เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าปริมาณควอเซตินเพิ่มขึ้นร้อยละ 21.4 และ 60.7 เมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 4 และ 8 ชั่วโมง โดยที่ 8 ชั่วโมงมีปริมาณแคเทคิน 4.5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ผลการหา กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันพบว่าค่า total antioxidant capacity (TAC) จากวิธี ORAC มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จาก 78.2 เป็น 98.3 ไมโครโมล Trolox ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด เมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง โดยพบว่าปริมาณควอเซตินมีค่าสหสัมพันธ์ (correlation) สูง ($r = 0.977$) กับการเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อม

จากการศึกษามะกอกน้ำ (*Elaeocarpus hygrophilus* Kurz.) ที่มีอายุการเก็บเกี่ยว 5-8 เดือน หลังติดดอก พบว่าอายุ 6 เดือน มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด คือ 345.8 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด และมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด คือ 49.0 มิลลิกรัมแคเทคินต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่ามะกอกน้ำอายุ 6 เดือน มีปริมาณกรดแกลลิกมากกว่าที่อายุ การเก็บเกี่ยวอื่นโดยมีค่า 103.6 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด แต่ไม่พบทั้งควอเซตินและ แคมป์เฟอร์อลในทุกอายุการเก็บเกี่ยว ส่วนค่า TAC และค่า antiradical efficiency (AE) มีค่าสูงสุดที่ อายุ 6 เดือนเช่นกัน มีค่าเป็น 24.4 ไมโครโมล Trolox ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด และ 0.014 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์พบว่าค่า TAC จากวิธี ORAC มีค่าสหสัมพันธ์สูง ($r = 0.997$) กับปริมาณ ฟลาโวนอยด์ และค่า AE จากวิธี DPPH มีค่าสหสัมพันธ์สูง ($r = 0.992$) กับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

Atiya Ruangchakpet 2007: Effect of Indian Gooseberry Browning and Spanish Plum Maturity on Total Phenolics, Flavonoids and Antioxidant Activities. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Assistant Professor Tanaboon Sajjaanantakul, Ph.D 119 pages.

Browning reaction (0, 4, 6 and 8 hours) in Indian Gooseberry (*Phyllanthus emblica* Linn.) caused changes in active compounds and antioxidant activities. Total phenolics increased significantly ($p < 0.05$) at 7.4 and 17.8% for 4 and 8 hr browning (2,108.6 mg gallic acid/ 100 g fresh weight (FW)), respectively. Flavonoids content also increased at 3.6 and 10.3% for 4 and 8 browning (157.8 mg catechin/ 100 g FW), respectively. HPLC analysis showed that quercetin increased at 21.7 and 60.7% after 4 and 8 hr browning sample, respectively. The 8 hr browning had 4.5 mg quercetin/ 100 g FW. Total antioxidant capacity (TAC) as determined by ORAC method increased significantly ($p < 0.05$) from 78.2 to 98.3 μ mole Trolox equivalent/ 100 g FW after 6 hr browning. Quercetin had a good correlation with browning reaction in Indian Gooseberry ($r = 0.977$).

Spanish Plum (*Elaeocarpus hygrophilus* Kurz.) at 5 to 8 month after pollination was studied. The 6 month maturity had the highest total phenolics content at 345.8 mg gallic acid/ 100 g FW and flavonoids content at 49.0 mg catechin/ 100 g FW. The highest value of gallic acid as determined by HPLC was 103.6 mg/ 100 g FW at 6 month maturity. Quercetin and kaempferol could not be found in 5 to 8 samples. The highest antioxidant activity (TAC) from ORAC method and antiradical efficiency (AE) from DPPH method were found in 6 month maturity sample with a value of 24.4 μ mole Trolox equivalent/ 100 g FW and 0.014, respectively. TAC from ORAC method had a good correlation with flavonoids content ($r = 0.997$) and AE from DPPH method had a good correlation with total phenolics ($r = 0.992$).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนะบุญย์ สัจจานันตกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษาเป็นอย่างสูง ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำทั้งในส่วนของการเรียนและงานวิจัย รวมถึงให้คำปรึกษา และสละเวลาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุคนธ์ชื่น ศรีงาม กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รองศาสตราจารย์ สมบัติ ขอทวีวัฒนา กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาและแนวทางแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่อบรม สั่งสอนมาจนถึงบัดนี้ ขอขอบพระคุณโครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบพระคุณสวนมะกอกน้ำสาละ จังหวัดสุพรรณบุรี ที่เอื้อเฟื้อข้อมูล และตัวอย่างมะกอกน้ำที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร เจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร เจ้าหน้าที่ห้องสมุดคณะอุตสาหกรรมเกษตร และเจ้าหน้าที่หอสมุดกลาง ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และคำปรึกษาต่างๆ เกี่ยวกับเครื่องมือ และข้อมูลที่ใช้ในการทำวิจัย ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นิสิตปริญญาโทและเอก สาขาวิทยาศาสตร์การอาหารและพัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจเสมอมา

และท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติผู้ใหญ่ทุกท่าน ที่ให้การอบรมสั่งสอนเสมอมา ขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัว รวมถึงเพื่อนๆ ทุกคน ที่มอบแรงกาย แรงใจให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดระยะเวลาการศึกษาและการทำวิจัย จนสำเร็จลุล่วงถึงวันนี้

อริยา เรืองจักรเพ็ชร

เมษายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(9)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
มะขามป้อม	4
มะกอกน้ำ	6
สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์	7
การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์	15
สารต้านออกซิเดชัน	18
ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล	25
ปัจจัยเรื่องอายุการเก็บเกี่ยวต่อฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชัน	28
อุปกรณ์และวิธีการ	30
อุปกรณ์	30
วิธีการ	35
ผลและวิจารณ์	44
สรุป	77
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	79
ภาคผนวก	86
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์ทางเคมี	87
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน	104
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ทางสถิติ	114
ประวัติการศึกษา	119

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณค่าทางโภชนาการของมะขามป้อม	5
2	คุณค่าทางโภชนาการของมะกอกน้ำ	7
3	จำนวนคาร์บอน โครงสร้างหลัก กลุ่ม ชนิดสาร และตัวอย่างผลไม้ที่พบ สารประกอบฟีนอลิก	9
4	ความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารฟีนอลิกและ ฟลาโวนอยด์	17
5	สัดส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ อัตรเร็วในการไหล และความยาวคลื่น เครื่องตรวจวัดที่ใช้ในการวิเคราะห์ในช่วงเวลาต่างๆ	39
6	องค์ประกอบทางเคมี (Proximate) ของมะขามป้อมพันธุ์พื้นเมืองชนิดผลเล็ก ที่นำมาใช้ในการศึกษา	45
7	ค่าสีและค่า BI ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	47
8	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาล นาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8) และปริมาณที่ เพิ่มขึ้น	49
9	ปริมาณฟลาโวนอยด์ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	51
10	ปริมาณควอเซตินของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8) และปริมาณที่เพิ่มขึ้น	53
11	ปริมาณแคมป์เฟอร์อลและเคทเทคินของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	55
12	ปริมาณควอเซตินและแคมป์เฟอร์อลที่พบในผักและผลไม้ชนิดต่างๆ	57
13	ประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) ของ มะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	59

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
14	ค่า L-ORAC, H-ORAC และ TAC ที่วัดด้วยวิธี ORAC ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)
15	ตารางค่าสหสัมพันธ์ระหว่างดัชนีการเกิดสีน้ำตาล ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณสารที่วัดจากวิธี HPLC และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันของมะขามป้อม
16	องค์ประกอบทางเคมีของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)
17	ปริมาณกรดแกลลิกของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m) และปริมาณที่ลดลง
18	ประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)
19	ค่า L-ORAC, H-ORAC และ TAC ที่วัดด้วยวิธี ORAC ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)
20	ค่า AE เมื่อวัดด้วยวิธี DPPH และค่า TAC เมื่อวัดด้วยวิธี ORAC ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล มะกอกน้ำอายุ 6 เดือน เปรียบเทียบกับผักและผลไม้ชนิดอื่น
21	ตารางค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณกรดแกลลิกที่วัดจากวิธี HPLC และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันของมะกอกน้ำ
ตารางผนวกที่	หน้า
ก1	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณฟลาโวนอยด์ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	114
ก3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกรดแกลลิกเมื่อวัดด้วยวิธี HPLC ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	114
ก4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของควอเซตินเมื่อวัดด้วยวิธี HPLC ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	115
ก5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) เมื่อวัดด้วยวิธี DPPH ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	115
ก6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในส่วนชอบไขมัน (L-ORAC) เมื่อวัดด้วยวิธี ORAC ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	115
ก7 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในส่วนชอบน้ำ (H-ORAC) เมื่อวัดด้วยวิธี ORAC ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	116
ก8 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งหมด (TAC) เมื่อวัดด้วยวิธี ORAC ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	116
ก9 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)	116
ก10 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณฟลาโวนอยด์ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)	117

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค11 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกรดแกลลิกเมื่อวัดด้วยวิธี HPLC ของมะกอกน้ำ อ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)	117
ค12 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) เมื่อวัดด้วยวิธี DPPH ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)	117
ค13 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในส่วนขอบไขมัน (L-ORAC) เมื่อวัดด้วยวิธี ORAC ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6- m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)	118
ค14 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในส่วนขอบน้ำ (H- ORAC) เมื่อวัดด้วยวิธี ORAC ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)	118
ค15 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งหมด (TAC) เมื่อ วัดด้วยวิธี ORAC ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)	118

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกและอนุพันธ์ที่พบได้ทั่วไป (a) Benzoic acid (b) Cinnamic acid	8
2	โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์	10
3	การสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์	10
4	โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์กลุ่มต่างๆ	12
5	โครงสร้างทางเคมีของควอเซติน แคมป์เฟอร์อล เกทเทกิน และกรดแกลลิก	14
6	กราฟการลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ของตัวอย่างและสาร มาตรฐาน	21
7	โครงสร้างทางเคมีของ DPPH	23
8	โครงสร้างทางเคมีของ ABTS	24
9	ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เร่งด้วยเอนไซม์ PPO (cresolase และ catecholase)	26
10	ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลของออโท-ควิโนนในสภาวะที่มีสารฟีนอลิก	27
11	ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลของออโท-ควิโนนในสภาวะที่ไม่มีสารฟีนอลิก	28
12	มะขามป้อมที่ใช้ในการทดลอง	45
13	สีและลักษณะของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8) ก่อนการทำแห้ง	46
14	สีของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8) หลังการทำแห้ง	47
15	แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสี น้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	49
16	การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ของมะขามป้อม ที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	52
17	โครมาโทแกรมของ a) มะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง และ b) มะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18 ปริมาณกรดแกลลิกของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	57
19 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแกลลิกและควอเซตินของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	58
20 การเปลี่ยนแปลงค่า AE ที่วัดได้จากวิธี DPPH และค่า TAC ที่วัดได้จากวิธี ORAC ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)	63
21 มะกอกน้ำที่ใช้ในการทดลอง	65
22 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)	67
23 ปริมาณฟลาโวนอยด์ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)	69
24 โครมาโทแกรมของมะกอกน้ำอายุ 6 เดือน	70
25 การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณกรดแกลลิกของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)	71
26 การเปลี่ยนแปลงค่า AE ที่วัดได้จากวิธี DPPH และค่า TAC ที่วัดได้จากวิธี ORAC ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)	74
ภาพผนวกที่	หน้า
ก1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร และความเข้มข้นของกรดแกลลิก	97
ก2 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และความเข้มข้นของเคทเทกิน	98

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสม	100
ก4 กราฟมาตรฐานของควอเซติน	101
ก5 กราฟมาตรฐานของแคมป์เฟอร์อล	101
ก6 กราฟมาตรฐานของเคทเทกิน	101
ก7 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก	102
ข1 กราฟมาตรฐานระหว่าง % radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล	106
ข2 กราฟมาตรฐานระหว่าง % radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดมะกอกน้ำอายุ 6 เดือน	106
ข3 กราฟมาตรฐานของส่วนชอบไขมัน	112
ข4 กราฟมาตรฐานของส่วนชอบน้ำ	112

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

PPO	=	Polyphenoloxidase
POD	=	Peroxidase
ROS	=	Reactive Oxygen Species
RNS	=	Reactive Nitrogen Species
$O_2^{\bullet -}$	=	Superoxide radical
H_2O_2	=	Hydrogen peroxide
$HO^{\bullet}$	=	Hydroxyl radical
HOCl	=	Hypochlorous acid
$ROO^{\bullet}$	=	Peroxyl radical
1O_2	=	Singlet oxygen
$ONOO^-$	=	Peroxyl nitrite
ORAC	=	Oxygen Radical Absorbance Capacity assay
DPPH	=	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay
TRAP	=	Total Radical trapping Antioxidant Parameter assay
TEAC	=	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity assay
ABTS	=	2,2-azobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) assay
FRAP	=	Ferric ion Reducing Antioxidant Power assay
AAPH	=	2',2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride
RMCD	=	Randomly Methylated Betacyclodextrin
B-PE	=	B-phycoerythrin
AE	=	Antiradical Efficiency
L-ORAC	=	ORAC value of lipophilic phase
H-ORAC	=	ORAC value of hydrophilic phase
TAC	=	Total Antioxidant Capacity

ผลของปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อม และอายุของมะกอกน้ำ ต่อปริมาณ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน

Effect of Indian Gooseberry Browning and Spanish Plum Maturity on Total Phenolics, Flavonoids and Antioxidant Activities

คำนำ

ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารกลุ่มหนึ่งในสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งทั้งสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายอย่าง เช่น เป็นสารต้านออกซิเดชัน ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจ และต้านมะเร็ง (Häkkinen *et al.*, 1999) สารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ในผักและผลไม้แทบทุกชนิดและพบได้ในปริมาณมากคือ กรดแกลลิก (gallic acid) สารฟลาโวนอยด์ที่พบในปริมาณมากและพบได้บ่อยในผักและผลไม้ คือสารในกลุ่มฟลาโวนอล (flavonol) ได้แก่ ควอเซทิน (quercetin) และแคมป์เฟอรอล (kaempferol) โดยมีงานวิจัยเกี่ยวกับสารกลุ่มฟลาโวนอลในผักและผลไม้ชนิดต่างๆ เช่น หัวหอมใหญ่ เบอรี่ชนิดต่างๆ และแอปเปิ้ล ส่วนผลไม้ไทยที่มีการศึกษาสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ ทับทิม และลำไย แต่ในส่วน of ผลไม้พื้นบ้านยังมีการศึกษาถึงสารกลุ่มนี้ไม่มากนัก เช่นมะขามป้อมตรวจพบกรดแกลลิก ควอเซทิน และแคมป์เฟอรอล แต่ไม่ทราบปริมาณที่แน่ชัด ส่วนในมะกอกน้ำไม่มีรายงานถึงการตรวจพบสารเหล่านี้

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าปัจจัยที่พบมากและค่อนข้างเห็นได้ชัดที่ส่งผลต่อปริมาณของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในผักและผลไม้ ได้แก่ ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล และอายุการเก็บเกี่ยวของผักและผลไม้ชนิดต่างๆ นอกจากปริมาณสารจะเปลี่ยนแปลงแล้วแล้วความสามารถในการต้านออกซิเดชันยังเปลี่ยนแปลงไปอีกด้วย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับชนิดของผักและผลไม้

มะขามป้อม มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนชื้นแถบเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ พม่า มาเลเซีย อินเดีย และไทย ซึ่งในประเทศไทยจัดมะขามป้อมว่าเป็นพื้นสมุนไพร และผลไม้พื้นบ้านของไทย มีการปลูกเป็นการค้าบ้างเล็กน้อย ส่วนมากเป็นเพียงการปลูกแซมตามบริเวณต่างๆ ของสวนหรือทุ่งนาเท่านั้น เป็นที่ทราบกันดีว่ามะขามป้อมมีสรรพคุณหลายอย่าง เช่น ช่วยให้ชุ่มคอ และลดอาการเลือดออกตามไรฟัน เป็นต้น นอกจากนั้นมะขามป้อมยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ยับยั้งการดูดซึมของหลอดเลือด ลดปริมาณน้ำตาลในเลือด และลดระดับคอเรสเตอรอลในเลือด เป็นต้น (นนทวัน, 2539) มะขามป้อมเป็นผลไม้ที่เกิดสีน้ำตาลได้ง่ายหากไม่มีการควบคุม

กระบวนการผลิต ปัจจุบันในไทยมีผู้นำมะขามป้อมมาใช้ประโยชน์บ้าง แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลของการเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อมต่อปริมาณสาร และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาว่าเมื่อเกิดสีน้ำตาลแล้ว จะส่งผลดี หรือผลเสียต่อผลิตภัณฑ์อย่างไร

มะกอกน้ำ เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย มาเลเซีย และพม่า เป็นต้น จัดว่าเป็นผลไม้พื้นบ้านของไทยเช่นเดียวกับมะขามป้อม นิยมนำมารับประทานทั้งในรูปผลสดและแปรรูปเป็นมะกอกดอง มีสรรพคุณทำให้ชุ่มคอ แก้กระหายน้ำ เป็นต้น (สัมฤทธิ์, 2545) ในไทยมีการปลูกเป็นการค้าค่อนข้างแพร่หลาย การเก็บเกี่ยวผลผลิตมักคำนึงถึงความเหมาะสมในการนำไปแปรรูป แต่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับอายุการเก็บเกี่ยวของมะกอกน้ำที่มีปริมาณสาร และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันมากที่สุด ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของอายุการเก็บเกี่ยวมะกอกน้ำที่อายุต่างๆ กัน ว่าส่งผลดีต่อปริมาณ และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันอย่างไร

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของการเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อม และอายุการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกันของมะกอกน้ำ ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ ชนิดและปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิก และเคทเทกิน และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ควอเซติน และแคมป์เฟอร์อล ด้วยวิธี HPLC นอกจากนั้นยังทำการศึกษากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และ ORAC เพื่อศึกษาถึงสภาวะของมะขามป้อมและมะกอกน้ำที่มีปริมาณสารที่ให้ประโยชน์มากที่สุด และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันมากที่สุด

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของการเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อมที่ระยะเวลาต่างๆ ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic) ปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid content) ปริมาณสารเมื่อวัดด้วยวิธี HPLC ได้แก่ ควอเซติน (quercetin) แคมพ์เฟอรอล (kaempferol) แคทเทคิน (catechin) และ กรดแกลลิก (gallic acid) และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH และ ORAC

2. ศึกษาผลของอายุการเก็บเกี่ยวของมะขามป้อม ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic) ปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid content) ปริมาณสารเมื่อวัดด้วยวิธี HPLC ได้แก่ ควอเซติน (quercetin) แคมพ์เฟอรอล (kaempferol) แคทเทคิน (catechin) และ กรดแกลลิก (gallic acid) และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH และ ORAC

การตรวจเอกสาร

มะขามป้อม

มะขามป้อม หรือชื่อภาษาอังกฤษว่า Indian Gooseberry, Emblic, Malacca tree, Myrobalan และ Emblic myrobalan จัดอยู่ในวงศ์ EUPHORBIACEAE มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Phyllanthus emblica* Linn. มีชื่อพ้อง คือ *Embelia officinalis* Gaertn. ส่วนชื่อท้องถิ่นที่เรียกกันในประเทศไทยมีหลายชื่อ ได้แก่ จังหวัดราชบุรีเรียกว่ากำทวด จังหวัดแม่ฮ่องสอนเรียกว่าสันยาสำ และจังหวัดจันทบุรีเรียกว่า กันโศด เป็นต้น มีแหล่งกำเนิดในเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบมากในพม่า มาเลเซีย อินเดีย และไทย เป็นต้น มักขึ้นตามป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าดิบเขา สามารถพบได้ในหลายภาคของประเทศไทย เช่น ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำปาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครนายก ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดราชบุรี กรุงเทพมหานคร ส่วนภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดร้อยเอ็ด ชัยภูมิ และอุบลราชธานี เป็นต้น ในประเทศไทยพบมะขามป้อม 2 ชนิด คือ ชนิดผลเล็ก พบตามเขตป่าเบญจพรรณ และป่าโปร่งทั่วประเทศ และชนิดผลใหญ่ พบเพียงบางแห่งเท่านั้น เช่น ในจังหวัดกาญจนบุรี สุโขทัย พิษณุโลก พิจิตร และนครราชสีมา มีการกระจายพันธุ์ต่ำ โดยชนิดผลใหญ่จัดว่าเป็นพืชปลูก (cultivate type) ในขณะที่ชนิดผลเล็กจัดเป็นพืชป่า (wild type) (อรนุช, 2548)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะขามป้อม คือ เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ทรงพุ่มค่อนข้างโปร่ง สูงประมาณ 7-15 เมตร เปลือกลำต้นผิวค่อนข้างเรียบ สีน้ำตาลอมเทา ดอกออกเป็นแผ่นได้เนื้อไม้สีน้ำตาลอมแดง ใบเดี่ยวขนาดเล็กคล้ายใบย่อยของมะขาม ก้านสั้น กิ่งก้านเรียวยาว ออกดอกเป็นช่อเรียงชิดกันอัดแน่นได้ใบ ขนาดเล็กสีขาวนวล ผลกลมถึงกลมแป้น ผิวเรียบเกลี้ยง สีเขียวอมเหลือง ฉ่ำน้ำ เนื้อหนา มีเส้นพาดบนลูก 6 เส้น เนื้อแบ่งออกเป็น 6 พู ในหนึ่งผลมีเมล็ดชั้นนอกที่เป็นกะลาแข็งรูปทรงคล้ายหยดน้ำที่มีเหลี่ยมและรอยแยก 6 ช่อง ภายในกะลาจะมีเมล็ดสีน้ำตาล 6 เมล็ด อยู่ในแต่ละช่อง

ประโยชน์ของมะขามป้อมมีหลากหลาย ได้แก่ ผลรับประทานเพื่อให้ชุ่มคอ แก้ไอ แก้ไข้ แก้ท้องเสีย ขับปัสสาวะ รักษาเยื่อตาอักเสบ และแก้โรคเลือดออกตามไรฟัน เป็นต้น ผลนิยมนำมาแปรรูปเป็นผลไม้ เช่น ทำเป็นผลไม้กวน แยม หรือทำน้ำผลไม้ เป็นต้น

นอกจากผลแล้ว ปมที่ก้านสามารถแก้ปวดกระเพาะอาหาร แก้ปวดเมื่อยกระดูก และแก้ปวดฟัน ใบแก้ผิวหนังเป็นแผล แก้โรคความดันโลหิตสูง และราก มีสรรพคุณแก้พิษต่างๆ แก้ท้องเสีย แก้ร้อนใน และลดความดันโลหิต เป็นต้น ส่วนสารที่สามารถพบได้ในมะขามป้อม ได้แก่ ascorbic acid, polysaccharide, inositol, β -sitosterol, rutin, tannin, gallic acid, quercetin และ kaempferol เป็นต้น (นันทวัน, 2539) มะขามป้อมมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น ยับยั้งการอุดตันของหลอดเลือด ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดระดับคอเรสเตอรอลในเลือด ลดการอักเสบ และต้านมะเร็ง เป็นต้น (เนาวรัตน์, 2530; สมสุข, 2534; วุฒิ, 2540; พร้อมจิต, 2543) ในประเทศไทยยังมีการศึกษาถึงชนิดและปริมาณสารที่ให้ประโยชน์ในมะขามป้อมไม่มากนัก โดยเฉพาะสารในกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ รวมถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ส่วนคุณค่าทางโภชนาการของมะขามป้อม มีผู้ทำการวิเคราะห์ไว้แล้วดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการของมะขามป้อม

สารอาหาร	ปริมาณที่พบในส่วนที่รับประทานได้ 100 กรัม
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	70
น้ำ (กรัม)	82.2
โปรตีน (กรัม)	0.3
ไขมัน (กรัม)	0.1
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	17.0
เส้นใยหยาบ (กรัม)	2.1
เถ้า (กรัม)	0.4
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	18.0
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	4.0
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.5
เบต้าแคโรทีน (ไมโครกรัม)	21.0
วิตามินเอ (ไมโครกรัม)	4.0
ไทอามีน (มิลลิกรัม)	0.02
ไนอาซิน (มิลลิกรัม)	0.8
วิตามินซี (มิลลิกรัม)	111.0

ที่มา: ดัดแปลงจาก คณะกรรมการสวัสดิการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข (2545)

มะกอกน้ำ

มะกอกน้ำ หรือชื่อภาษาอังกฤษว่า Spanish Plum จัดอยู่ในวงศ์ ELAEocarpaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Elaeocarpus hygrophilus* Kurz. นอกจากนั้นมีชื่อพ้องทางวิทยาศาสตร์ คือ *Elaeocarpus madopetalous* Pierre ชื่อพื้นเมือง ได้แก่ ภาคกลางเรียกว่าสารภีน้ำ และจังหวัดระยองเรียกว่าสมอพิพาย เป็นต้น มีแหล่งกำเนิดอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย พม่า และมาเลเซีย ในไทยมักพบปลูกตามที่ราบชายน้ำ ภูเขา และใกล้แหล่งน้ำจัดทั่วไป โดยพบมากที่สุดบริเวณภาคกลางของประเทศ เพราะเป็นแหล่งปลูกเพื่อการค้า (ไพโรจน์, 2545) มะกอกน้ำที่นิยมปลูกในประเทศไทยมีหลายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ประเสริฐสุวรรณ หรือพันธุ์แก้มแหม่ม พันธุ์แขกดำ พันธุ์บางปราบ พันธุ์นายวอ พันธุ์สินวล พันธุ์ละออ พันธุ์ปุยฝ้าย และพันธุ์จัมโบ้ โดยแต่ละพันธุ์จะมีแหล่งที่ปลูกแตกต่างกัน (สัมฤทธิ์, 2545)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะกอกน้ำ คือ เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก มีลำต้นสูงประมาณ 10 เมตร แตกกิ่งก้านสาขาเป็นพุ่มกลม ขยายพันธุ์ได้ทั้งการเพาะเมล็ดและการตอนกิ่ง เปลือกและลำต้นมีสีน้ำตาลปนเทา มีปานสีขาวแซมอยู่ทั่วไป ลักษณะใบเรียวยาวไป สีเขียวเข้มเส้นใบสีขาวเป็นมันเหลือ้มแล้วเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อใบแก่จนวนร่วง ขอบใบจัก ขาวประมาณ 8-14 เซนติเมตร ก้านใบและยอดอ่อนสีม่วงอมแดง ช่อดอกสีเขียวอมเทา ออกดอกขนาดเล็กสีขาว ผลมีลักษณะกลมรี แหลมหั่วแหลมท้าย ผิวผลเรียบ เมื่อผลอ่อนมีสีเขียวเข้ม แล้วค่อยๆ จางลงเมื่ออายุมากขึ้น มีสีเขียวอมเหลืองเมื่อตอนเก็บเกี่ยว (อายุประมาณ 6 เดือนหลังติดดอก) และมีสีแดงมากขึ้นเมื่อแก่จนใกล้ร่วงจากต้น (อายุประมาณ 7-8 เดือนหลังติดดอก) ภายในเป็นเมล็ดเดี่ยว แข็งมาก ขรุขระ สีน้ำตาลถึงออกแดง หัวท้ายแหลมคล้ายลูกหนามเลียบ เนื้อในสีขาว นุ่ม พุเล็กน้อย ฉ่ำน้ำ ผลแก่จัดมีรสเปรี้ยวอมฝาด อายุในการเก็บเกี่ยวของสวนที่ปลูกเป็นการค้า นิยมเก็บเกี่ยวมาแปรรูปเมื่ออายุประมาณ 6 เดือนหลังติดดอก

ประโยชน์ของผลมะกอกน้ำ เช่น ช่วยให้อิ่มท้อง แก้อ่อนในกระหายน้ำ ผลมีรสฝาด นิยมรับประทานสดและแปรรูป โดยมีการปลูกเป็นการค้าเพื่อนำมาแปรรูป เช่นมะกอกน้ำอายุประมาณ 6 เดือนหลังติดดอกนิยมนำมาทำเป็นมะกอกดอง มะกอกเชื่อม มะกอกแช่อิ่ม น้ำมะกอก หรือนำมาทำเป็นสมุนไพร เป็นต้น ส่วนผลที่แก่ขึ้นอายุประมาณ 7-8 เดือนหลังติดดอก นิยมนำมารับประทานสด นอกจากผลแล้ว เปลือกต้นยังสามารถนำมาชงน้ำรับประทานได้ มีรสฝื่อน และมีสรรพคุณทางยาไว้ขจัดลมฟอกโลหิตหลังคลอด เนื้อผลมีวิตามินเอสูง มีวิตามินซี ธาตุฟอสฟอรัสและแคลเซียม (นิรนาม, 2549) คุณค่าทางโภชนาการของมะกอกน้ำมีผู้ทำการวิเคราะห์ไว้ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณค่าทางโภชนาการของมะกอกน้ำ

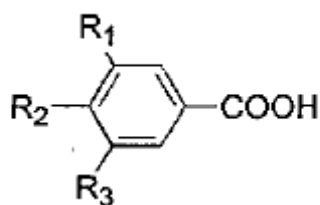
สารอาหาร	ปริมาณที่พบในส่วนที่รับประทานได้ 100 กรัม
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	86
น้ำ (กรัม)	75.8
โปรตีน (กรัม)	1.0
ไขมัน (กรัม)	0.3
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	22.3
เส้นใยหยาบ (กรัม)	0.5
เถ้า (กรัม)	0.6
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	14.0
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.9
วิตามินเอ (IU)	375
วิตามินซี (มิลลิกรัม)	49.0

ที่มา: ดัดแปลงจาก วิวัฒน์ (2543)

สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์

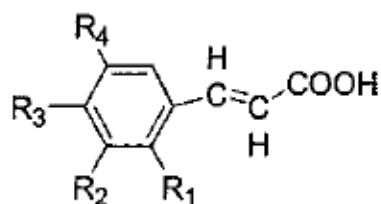
1. สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds)

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นวงแหวน (aromatic ring) ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) เข้ามาแทนที่ ซึ่งอาจเข้ามาแทนที่ 1 หมู่ หรือมากกว่า สารประกอบฟีนอลิกสามารถจำแนกเป็นกลุ่มได้จากโครงสร้างที่แตกต่างกัน ได้แก่ จำนวนคาร์บอน และหมู่ที่เข้ามาแทนที่ในตำแหน่งต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งมีการจำแนกชนิดของสารประกอบฟีนอลิกแล้วมากกว่า 8,000 ชนิด (Kris-Etherton *et al.*, 2002) โดยจำแนกเป็นกลุ่มๆ ได้แก่ กรดฟีนอลิก (phenolic acids), ลิกนิน (lignin), กรดไฮดรอกซีซินนามิกและอนุพันธ์ (hydroxycinnamic acid and derivatives) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกแต่ละกลุ่มที่มีโครงสร้างและองค์ประกอบแตกต่างกัน จะพบได้ในผักหรือผลไม้ต่างชนิดกัน ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งฟลาโวนอยด์เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบได้ทั่วไปในพืชหลายชนิด



(a) Benzoic acid

Acid	R ₁	R ₂	R ₃
ρ-Hydroxybenzoic acid	H	OH	H
Protocatechuic acid	H	OH	OH
Vanillic acid	H	OH	OCH ₃
Gallic acid	OH	OH	OH
Syringic acid	OCH ₃	OH	OCH ₃



(b) Cinnamic acid

Acid	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
ρ-Coumeric acid	H	H	OH	H
Caffeic acid	H	H	OH	OH
Ferulic acid	H	H	OH	OCH ₃
Sinapic acid	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกและอนุพันธ์ที่พบได้ทั่วไป (a) Benzoic acid

(b) Cinnamic acid

ที่มา: Robards *et al.* (1999)

ตารางที่ 3 จำนวนคาร์บอน โครงสร้างหลัก กลุ่ม ชนิดสาร และตัวอย่างผลไม้ที่พบสารประกอบฟีนอลิก

จำนวนคาร์บอน	โครงสร้างหลัก	กลุ่ม	ชนิดสาร	ตัวอย่างผลไม้ที่พบ
7	C ₆ -C ₁	Phenolic acids	p-Hydroxybenzoic acid	Strawberry
9	C ₆ -C ₃	Cinnamic acids	Caffeic acid	Apple
		Coumarins	Scopolin	Citrus
10	C ₆ -C ₄	Naphthoquinones	Juglone	Walnut
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangostin, Mangiferin	Mango
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stibenes	Resveratrol	Grape
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonols	Quercetin, Kaempferol	Apple
		Flavanols	(+)-catechin	Apple
n	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignin	pinoresinol	

ที่มา: Robards *et al.* (1999)

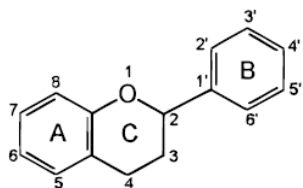
สารประกอบฟีนอลิกสามารถเป็นได้ทั้งสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล และเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยจะทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันเมื่อมีอยู่ในปริมาณน้อย และหากมีอยู่ในปริมาณที่มากจะไวต่อการเกิดออกซิเดชัน โดยจะทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล สารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดีทั้งในระบบอาหารและในร่างกาย ในขณะที่ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในระบบอาหารหรือในเซลล์พืชเท่านั้น (Robards *et al.*, 1999)

2. ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

2.1 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์

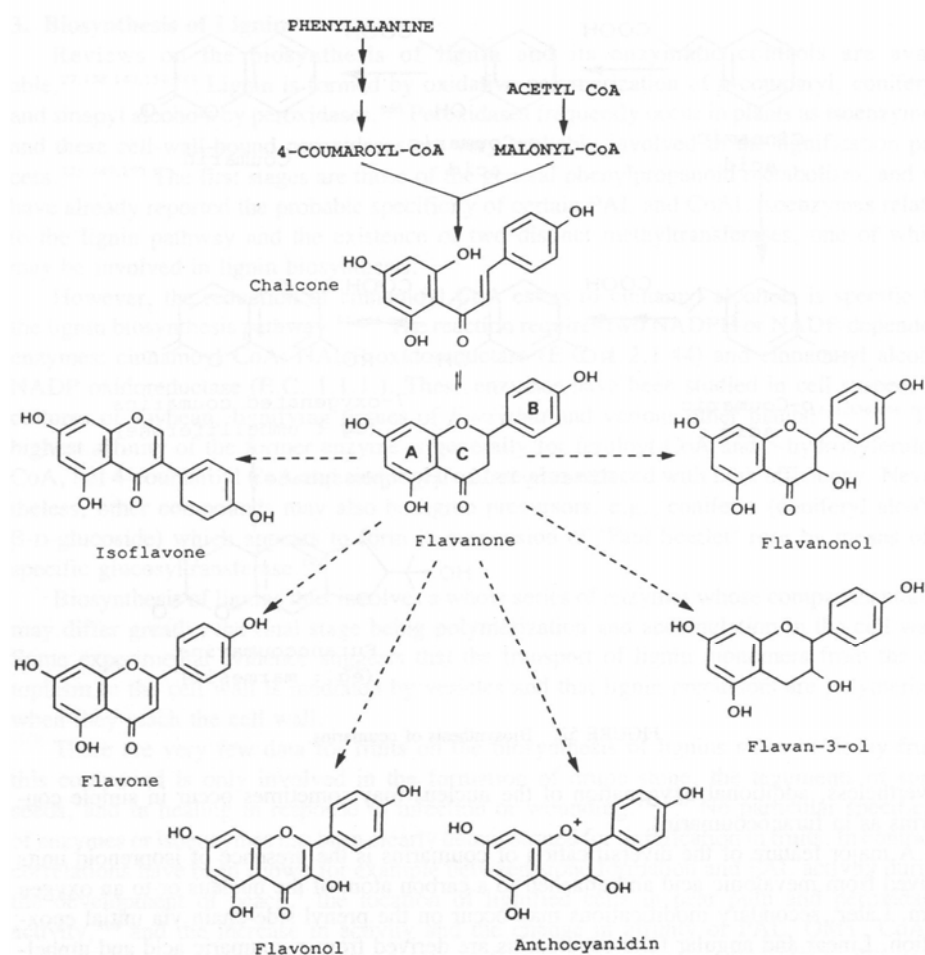
ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารกลุ่มหลักในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ทั่วไปในผักและผลไม้ และเป็นสารที่มีผู้นิยมศึกษามากที่สุดในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก มีโครงสร้างหลักเป็นไดฟีนิลโพรเพน (diphenylpropane) ประกอบด้วยคาร์บอนทั้งหมด 15 อะตอม

จัดเรียงตัวเป็นวงแหวน 3 วงเรียงต่อกัน ($C_6-C_3-C_6$) ให้ชื่อว่า วงแหวน A, วงแหวน B และวงแหวน C มีการเรียกชื่อตำแหน่งคาร์บอนตำแหน่งต่างๆ บนวงแหวนดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งสารแต่ละกลุ่มย่อยของฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างที่แตกต่างกันที่พันธะคู่บนวงแหวน A และวงแหวน B นอกจากนั้นยังมีความแตกต่างเมื่อมีหมู่ต่างๆ เช่น หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group), หมู่เมทอกซิล (methoxyl group) หรือน้ำตาลชนิดต่างๆ เข้ามาแทนที่บริเวณคาร์บอนตำแหน่งต่างๆ บนวงแหวนอีกด้วย (Heim *et al.*, 2002) การสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ กลุ่มต่างๆ แสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 2 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์

ที่มา: Pietta (2000)



ภาพที่ 3 การสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์

ที่มา: Macheix *et al.* (1990)

2.2 ชนิดของฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์สามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ตามโครงสร้าง โดยฟลาโวนอยด์แต่ละกลุ่มจะมีโครงสร้างแตกต่างกันบริเวณวงแหวน C ในขณะที่สารแต่ละชนิดในกลุ่มจะมีโครงสร้างแตกต่างกันบริเวณวงแหวน A และวงแหวน B โดยเป็นการที่มีหมู่ต่างๆ ได้แก่ หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group), หมู่เมทอกซิล (methoxyl group) หรือน้ำตาลชนิดต่างๆ เข้ามาแทนที่ในคาร์บอนตำแหน่งต่างๆ ได้มีการจำแนกฟลาโวนอยด์ออกเป็นกลุ่มไว้ถึงมากกว่า 13 กลุ่ม จำแนกได้เป็นสารมากกว่า 5,000 ชนิด (Kris-Etherton *et al.*, 2002) แต่ฟลาโวนอยด์กลุ่มที่ได้รับความสนใจทำการศึกษาเนื่องจากพบได้ทั่วไป และพบได้ในปริมาณที่ค่อนข้างมากในผักและผลไม้ มีอยู่เพียง 6 กลุ่ม ซึ่งมีสูตรโครงสร้างที่แตกต่างกันออกไปดังแสดงในภาพที่ 4 สารฟลาโวนอยด์ในแต่ละกลุ่มนั้นสามารถพบได้ในผักและผลไม้ต่างชนิดกัน โดยส่วนมากตามธรรมชาติที่พบจะพบในรูปที่มีน้ำตาลมาเกาะอยู่ด้วย (glycosylated derivatives) ฟลาโวนอยด์ทั้ง 6 กลุ่มที่นิยมนศึกษามีดังนี้

2.2.1 ฟลาโวน (flavones) ได้แก่ luteolin และ apigenin สามารถพบได้มากในพวก เมล็ดพืช และพืชสมุนไพรต่างๆ เช่น parsley, celery, rosemary และ thyme เป็นต้น นอกจากนั้นยังพบในผลไม้ตระกูลส้ม เช่น พบได้ในน้ำมันผิวส้ม

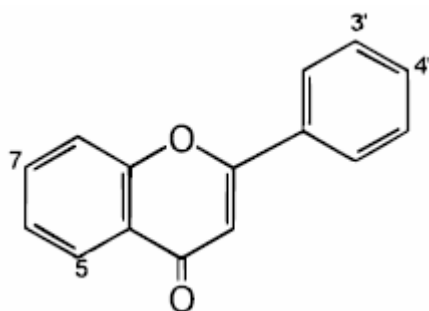
2.2.2 ฟลาโวนอล (flavonols) ได้แก่ quercetin, kaempferol และ myricetin กลุ่มนี้เป็นสารที่สามารถพบได้ทั่วไปและพบได้ในปริมาณมากในผักและผลไม้หลายชนิด เช่น แอปเปิ้ล บร็อกโคลี่ กระเทียมต้น หัวหอมใหญ่ แครนเบอร์รี่ และสตรอเบอร์รี่ เป็นต้น

2.2.3 ฟลาวานอล หรือ ฟลาวาน-3-อล (flavanols or flavan-3-ols) ได้แก่ (+)-catechin, (-)-epicatechin และ (-)-epigallocatechin สามารถพบได้มากที่สุดในใบชา ทั้งชาดำ และชาเขียว ในผลไม้เช่น องุ่น แอปเปิ้ล และแพร์ รวมทั้งไวน์แดง

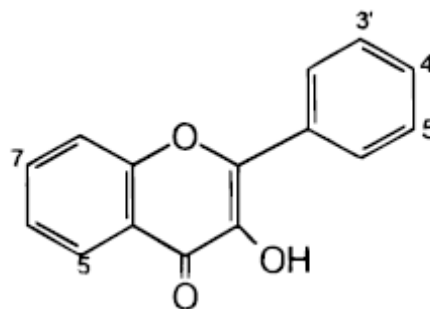
2.2.4 ฟลาวานอน (flavanones) ได้แก่ hesperetin และ naringenin สามารถพบได้มากในพืชตระกูลส้ม ทั้งในผลส้ม และผิวส้ม และพบได้ในมะเขือเทศเช่นกัน

2.2.5 แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) ได้แก่ anthocyanin สามารถพบมากในผลไม้ที่มีสีแดง เช่น แอปเปิ้ล องุ่นแดง และในเบอร์รี่ชนิดต่างๆ ได้แก่ สตรอเบอร์รี่ ราสเบอร์รี่ และเชอร์รี่ เป็นต้น

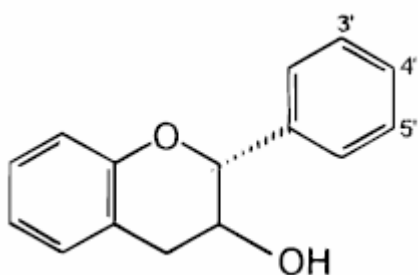
2.2.6 ไอโซฟลาโวน (isoflavones) ได้แก่ genistein, genistin, daidzein และ daidzin สามารถพบได้มากใน alfalfa, clover พักตระกูล brassica เช่น บร็อคโคลี่ นอกจากนั้นเมล็ดพืชต่างๆ เช่น ถั่วเหลือง ถั่วดำ และถั่วเขียว ยังเป็นแหล่งสำคัญที่สามารถพบสารในกลุ่มนี้ได้อีกด้วย



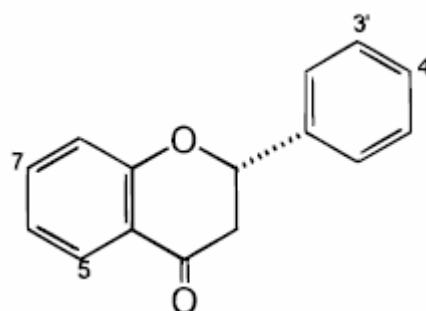
Flavones



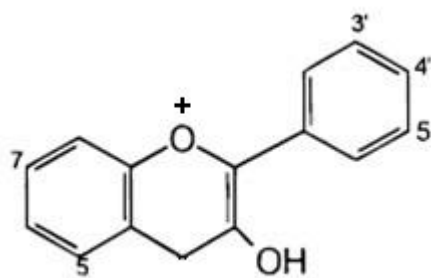
Flavonols



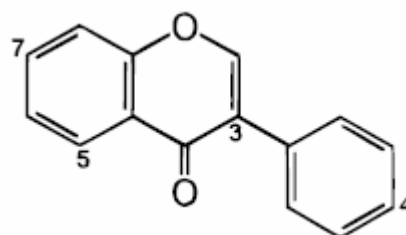
Flavanols



Flavanones



Anthocyanidins



Isoflavone

ภาพที่ 4 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์กลุ่มต่างๆ

ที่มา: Pietta (2000)

2.3 ประโยชน์ทางเภสัชวิทยาของสารฟลาโวนอยด์

2.3.1 Antioxidation ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยประสิทธิภาพของการต้านออกซิเดชันขึ้นอยู่กับโครงสร้างและหมู่ที่เข้ามาแทนที่ เช่น หากมีหมู่ 3-hydroxyl เข้ามาแทนที่บริเวณวงแหวน C จะทำให้มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันมากขึ้น ในขณะที่หากมีหมู่ hydroxyl เข้ามาแทนที่ในตำแหน่ง 5 และ 7 จะมีผลต่อประสิทธิภาพของการต้านออกซิเดชันน้อยกว่าการเข้ามาแทนที่ในตำแหน่งที่ 3 (Rice-Evans *et al.*, 1996)

2.3.2 Anticarcinogen มีสมบัติในการต้านการเกิดมะเร็ง โดยมีหน้าที่หลัก คือ ทำลายอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเนื้องอก และทำหน้าที่ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Hertog *et al.*, 1992a)

2.3.3 Cardiovascular properties มีความสามารถในการป้องกันการแตกของเส้นเลือด และป้องกันการแข็งตัวของเส้นเลือด

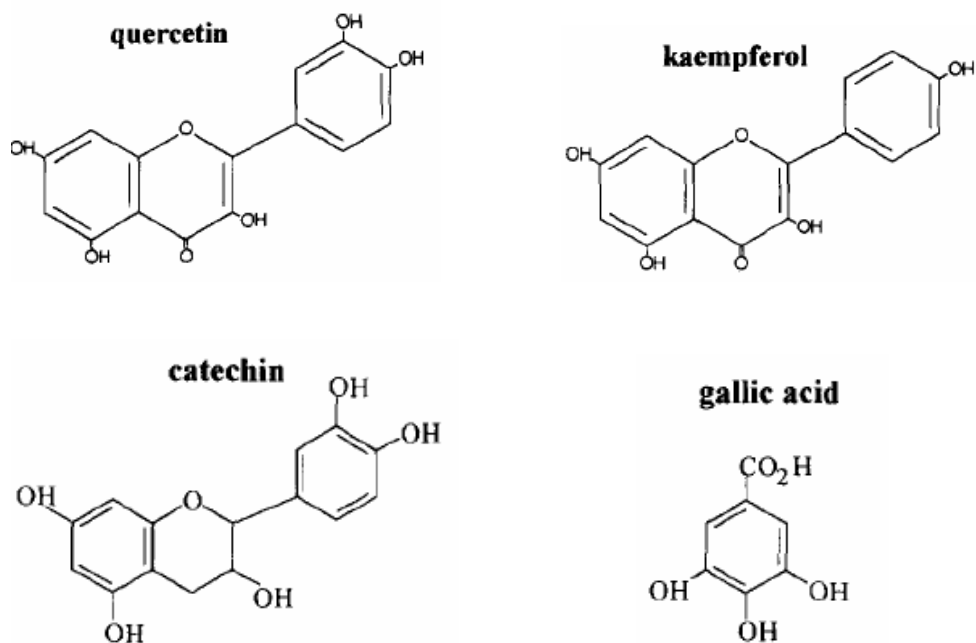
2.3.4 Metal cation chelators ทำหน้าที่ในการจับไอออนของโลหะไว้ เนื่องจากไอออนของโลหะเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันส่งผลให้เกิดการทำลายเซลล์ร่างกาย

2.3.5 Anti-inflammatory ทำหน้าที่ยับยั้งการอักเสบ เนื่องจากเมื่อเกิดการอักเสบจะเป็นการเพิ่มอนุมูลอิสระ และเร่งการพัฒนาอนุมูลอิสระ ซึ่งสารที่มีคุณสมบัตินี้มากคือ สารในกลุ่มฟลาโวนอล

2.3.6 ลดปริมาณ LDL cholesterol ซึ่งเป็นคอเรสเตอรอลที่เป็นผลเสียต่อร่างกาย ซึ่งหากร่างกายมีปริมาณ LDL cholesterol มาก จะส่งผลให้เกิดอาการหลอดเลือดแดงตีตัน

สารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารที่พบได้ทั่วไปและมีปริมาณมากในผักและผลไม้แทบทุกชนิด ส่วนในกลุ่มฟลาโวนอยด์สารที่พบได้ทั่วไปและพบได้ในปริมาณมากในผักและผลไม้หลายชนิด คือ สารกลุ่มฟลาโวนอล (flavonols) ซึ่งได้แก่ ควอเซติน และแคมป์เฟอรอล (Rice-Evans *et al.*, 1996) นอกจากสารในกลุ่มฟลาโวนอลแล้ว สารในกลุ่มฟลาเวานอล (flavanols) เช่นเคทเทกิน ก็เป็นสารที่เป็นที่สนใจในขณะนี้ ซึ่งส่วนมากพบใน

ใบชา ทั้งชาดำ และชาเขียว แต่ก็สามารถพบได้ในผลไม้เช่นกัน เช่นองุ่น แอปเปิ้ล และลูกแพร์ เป็นต้น (Robards *et al.*, 1999) โดยชนิดของสารและปริมาณที่พบจะขึ้นกับชนิด สายพันธุ์ อายุการเก็บเกี่ยว และสถานที่ในการปลูก โดยควอเซติน แคมพ์เฟอร์อล เคทเทคิน และกรดแกลลิก มีโครงสร้างที่แตกต่างกันไปดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของควอเซติน แคมพ์เฟอร์อล เคทเทคิน และกรดแกลลิก
ที่มา: Rice-Evans *et al.* (1996)

Hertog *et al.* (1992a) ศึกษาถึงสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในผลไม้ 1 ชนิด และผัก 5 ชนิด พบว่าส่วนใหญ่จะพบควอเซตินและแคมพ์เฟอร์อล โดยผลไม้พบควอเซติน และไมริซิดิน ในผัก 3 ชนิด พบควอเซติน และในผักอีก 2 ชนิดพบแคมพ์เฟอร์อล ในขณะที่มีเพียงขึ้นฉ่ายฝรั่งเท่านั้นที่พบ ลูทีโอลิน และอะพิจินิน

Häkkinen *et al.* (1999) วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ ได้แก่ควอเซติน แคมพ์เฟอร์อล และไมริซิดิน ในเบอร์รี่ 25 ชนิด ในประเทศฟินแลนด์ พบว่าเบอร์รี่ทั้ง 25 ชนิดมีควอเซติน เบอร์รี่ 8 ชนิดพบไมริซิดิน และมีเพียง 4 ชนิดเท่านั้นที่สามารถวัดปริมาณแคมพ์เฟอร์อลได้ นอกนั้นมีปริมาณน้อยจนไม่สามารถวัดได้

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

1. การสกัดสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

วิธีการสกัดสารกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์มีหลายวิธี แตกต่างทั้งส่วนเครื่องมือที่ใช้ และการใช้สารสกัดที่แตกต่างกัน โดยส่วนมากจะทำการสกัดผักหรือผลไม้ที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งเยือกแข็งแล้ว และมักมีการไฮโดรไลซิสร่วมด้วยในกระบวนการสกัดเพื่อตัดส่วนที่เป็นน้ำตาลออก เนื่องจากส่วนมากมักนิยมวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในรูปที่ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ (aglycone) มากกว่าโครงสร้างที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ (glycoside)

Hertog *et al.* (1992a) ทำการศึกษานิดและปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในผักและผลไม้หลายชนิด เช่น ผักกาดแก้ว กระเทียมต้น ขึ้นฉ่ายฝรั่ง และแครนเบอร์รี่ โดยสกัดและไฮโดรไลซิสตัวอย่างที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งแล้วด้วยเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 62.5 (ที่มีการเติมสารต้านออกซิเดชัน เช่น TBHQ) ร่วมกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ ทำการสกัดแบบย้อนกลับ (reflux) ที่อุณหภูมิ 90 °C นาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ซึ่งสาเหตุที่ Hertog และคณะ เลือกใช้เมทานอลและกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นดังกล่าวนี้ เนื่องจาก Hertog และคณะ ได้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างกรดซัลฟูริกกับกรดไฮโดรคลอริก พบว่าเมื่อสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกจะได้ปริมาณควอเซตินมากกว่า และความเข้มข้นดังกล่าวทำให้มีประสิทธิภาพในการสกัดมากที่สุด ซึ่งวิธีการสกัดนี้เป็นที่นิยมนำมาปรับใช้กันมากในการทดลองอื่นๆ

Häkkinen and Auriola (1998) วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอล ซึ่งได้แก่แคมป์เฟอร์อล ควอเซติน และรูทีน ในเบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศฟินแลนด์ โดยสกัดสารฟลาโวนอลเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นฟลาโวนอลที่ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Hertog *et al.* (1992a) คือสกัดเบอร์รี่แช่แข็งกับเมทานอลและกรดไฮโดรคลอริกที่อุณหภูมิ 85 °C นาน 2 ชั่วโมง และส่วนที่สองเป็นฟลาโวนอลที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ โดยสกัดเบอร์รี่แช่แข็งด้วยเมทานอลที่อุณหภูมิห้อง (21 °C) นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปหมუნเหวียง (3,000g, 10 นาที, 4 °C) แล้วจึงนำส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

Zhishen *et al.* (1999) ศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ในใบมัลเบอร์รี่ ซึ่งสกัดใบมัลเบอร์รี่ที่ทำแห้งแล้วโดยใช้เครื่อง soxhlet ด้วยน้ำหรือเอทานอลนาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารสกัดไปวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) และนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เพื่อหาปริมาณรูทีน และควอเซติน

Wolfe *et al.* (2003) ศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ในผิว และเนื้อแอปเปิ้ล ทำการสกัดด้วยการปั่นส่วนผิว ส่วนเนื้อ และส่วนเนื้อรวมกับส่วนผิวของแอปเปิ้ลสกัดกับอะซิโตนเข้มข้นร้อยละ 80 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน กรองแต่ส่วนใสไปแยกส่วนตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 °C จนเหลือเพียงร้อยละ 10 แล้วจึงนำมาปรับปริมาตรเพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงต่อไป เพื่อเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ ที่พบในส่วนต่างๆ ของแอปเปิ้ล

Bergeron *et al.* (2005) เปรียบเทียบวิธีการสกัดฟลาโวนอยด์ด้วย accelerated solvent extraction (ASE) ร่วมกับน้ำ, supercritical fluid extraction (SFE) ร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 เปรียบเทียบกับการสกัดฟลาโวนอยด์แบบเก่าสองวิธี คือวิธีการ ใช้น้ำร้อน และวิธีการใช้เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ได้ผลคือ การใช้ ASE ที่อุณหภูมิ 85 °C เหมาะสมในการสกัดสารฟลาโวนอยด์ที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ (flavonoid glycosides) ในขณะที่ SFE สามารถสกัดฟลาโวนอยด์ที่ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ (flavonoid aglycones) ได้ดีกว่า

2. การจำแนกชนิดของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี HPLC

มีการวิจัยเพื่อปรับปรุงวิธีการจำแนกชนิดของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี HPLC ก่อนข้างหลากหลาย เพื่อให้เหมาะสมกับชนิดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ หรือวิธีการที่ใช้ในการสกัดสารก่อนทำการวิเคราะห์ เป็นต้น แต่โดยทั่วไปแล้วมีหลักการที่คล้ายกัน ได้แก่ มักใช้คอลัมน์ในระบบ reverse phase ชนิดและสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อน (mobile phase) ที่ใช้มักเป็นเมทานอล อะซิโตน ไตรคลอโรเอทิลีน บัฟเฟอร์ หรือน้ำที่ถูกปรับสภาพให้เป็นกรดเล็กน้อยด้วยกรดชนิดต่างๆ และใช้ detector เป็นชนิด UV ความยาวคลื่นหลักมีสองช่วง ได้แก่ ช่วงแรกคือ 250-285 นาโนเมตร แสดงการดูดกลืนแสงของวงแหวน A ส่วนช่วงที่สองคือ 320-385 นาโนเมตร จะแสดงการดูดกลืนแสงของ วงแหวน B (Robards *et al.*, 1999) โดยการให้อ่านค่าความยาวคลื่นช่วงต่างๆ จะเหมาะสมกับชนิดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

ความยาวคลื่น	สาร
280 nm	Gallic acid, Epigallocatechin, Catechin, Vanillic acid, Syringic acid, Epicatechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin gallate, Naringin
320 nm	Chlorogenic acid, Caffeic acid, p-Coumaric acid, Sinapic acid, Ferulic acid, Resveratol, Cinnamic acid
370 nm	Rutin, Rhoifolin, Quercitrin, Myricetin, Luteolin, Quercetin, Apigenin, Kaempferol
520 nm	Kuromanin, Malvin, Keracyanin, Delphinidin, Oenin, Cyanidin, Pelargonidin, Peonidin, Malvidin

ที่มา: Kim and Lee (2002)

Hertog *et al.* (1992a) ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ในผักและผลไม้ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด Nova-Pak C₁₈ ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์อยู่ที่ 30 °ซ มีวัฏภาคเคลื่อนที่สองชนิด ได้แก่ อะซิโตไนไตรด์เข้มข้นร้อยละ 25 ในสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.025 โมลาร์ (พีเอช 2.4) และเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 45 ในสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.025 โมลาร์ (พีเอช 2.4) ใช้อัตราเร็วในการไหล 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้สารสกัด 10 ไมโครลิตรในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง และใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร

Häkkinen and Auriola (1998) ศึกษาปริมาณฟลาโวนอลที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ และไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบด้วยวิธี HPLC โดยใช้ระบบการวิเคราะห์ 2 ชนิด คือ HPLC-electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) ใช้ในการศึกษาทั้งฟลาโวนอลที่มีน้ำตาลและไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ และใช้ HPLC-photodiode-array detection (HPLC-DAD) ซึ่งเหมาะกับการศึกษาฟลาโวนอลที่ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบเท่านั้น ในการวิเคราะห์ใช้คอลัมน์ LiChroCART ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น กรดฟอร์มิกเข้มข้นร้อยละ 1 และอะซิโตไนไตรด์ ปรับให้สัดส่วนเปลี่ยนแปลงไปตามเวลาในการวิเคราะห์ (gradient system) อัตราเร็วในการไหลเป็น 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้สารสกัด 20 และ 5 ไมโครลิตรในการวิเคราะห์แต่ละครั้งสำหรับ HPLC-ESI-MS และ HPLC-DAD ตามลำดับ

Breitfellner *et al.* (2003) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสตรอเบอร์รี่ ได้แก่ แคเทชิน อีพิแคเทชิน ควอเซติน-3-ไกลโคไซด์ และ แคมป์เฟอรอล-3-ไกลโคไซด์ ใช้คอลัมน์ Hypersil ODS ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอล อะซิโตไนไตรด์ และกรดฟอสฟอริกเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปรับสัดส่วนให้เปลี่ยนแปลงไปตามเวลาในการวิเคราะห์ อัตราเร็วในการไหลเป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้สารสกัด 50 ไมโครลิตรในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง และใช้ diode-array detector ที่ความยาวคลื่น 210, 250, 270 และ 325 นาโนเมตร สำหรับกรดฟีนอลิก และ 210, 250, 280 และ 350 นาโนเมตร สำหรับฟลาโวนอยด์และแคเทชิน

สารต้านออกซิเดชัน

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) หมายถึงสารที่ไปทำหน้าที่ลด หรือยับยั้งปฏิกิริยาที่จะก่อให้เกิดออกซิเจนหรือสารเปอร์ออกไซด์ (peroxide) หรืออีกความหมายหนึ่ง คือ สารในอาหารที่มีผลในการลด reactive oxygen species (ROS) หรือ reactive nitrogen species (RNS) ในร่างกาย (Huang *et al.*, 2005) โดยอนุมูลอิสระมีหลายประเภท ได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical, $O_2^{\cdot-}$), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2), อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical, $HO^{\cdot}$), กรดไฮโปคลอรัส (hypochlorous acid, $HOCl$), อนุมูลเพอร์ออกซิล (peroxyl radical, $ROO^{\cdot}$), ซิงเกิลออกซิเจน (singlet oxygen, 1O_2) และเพอร์ออกซิลไนไตรท์ (peroxyl nitrite, $ONOO^{\cdot}$) (Sánchez-Moreno, 2002)

1. หลักการของวิธีการวัดกิจกรรมของการต้านออกซิเดชัน (Huang *et al.*, 2005)

1.1 วิธีการวัดการแลกเปลี่ยนอะตอมไฮโดรเจน (based on hydrogen atom transfer (HAT) reaction)

วิธีการนี้เป็นปฏิกิริยาที่เกิดการแข่งขันระหว่างสารต้านออกซิเดชัน กับสารตั้งต้นของปฏิกิริยา โดยจะมีการกระตุ้นสารประกอบอะโซ (azo compounds) ด้วยความร้อนเพื่อให้เกิดการสลายตัวกลายเป็นอนุมูลเพอร์ออกซิลเพื่อเป็นตัวแทนอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ วิธีการในกลุ่มนี้ได้แก่ oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay และ total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) assay มีกลไกดังแสดงในสมการที่ 1 ซึ่งวิธีการกลุ่มนี้จะวัดปริมาณอะตอมไฮโดรเจนที่มีการแลกเปลี่ยน โดยจะวัดการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนต์ ที่ลดลงเมื่อเกิดการออกซิเดชัน เมื่อระบบมีสารต้านออกซิเดชัน สารต้านออกซิเดชันจะไปแย่งจับสารเรืองแสง ส่งผล

ให้ความเข้มข้นสารฟลูออเรสเซนต์ลดลงด้วยความเร็วที่ช้าลง ส่วนกลไกในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันแสดงในสมการที่ 2-9



เมื่อ $X^\bullet$ = สารประกอบต่างๆ
 AH = สารต้านออกซิเดชัน

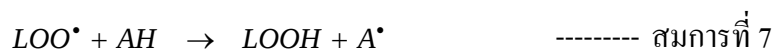
Initiation



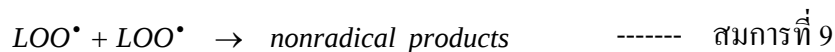
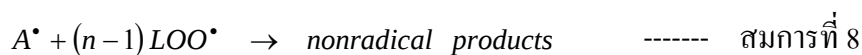
Propagation



Inhibition



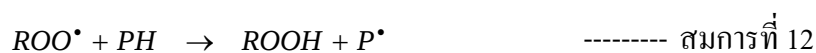
Termination



เมื่อ R_2N_2 = สารประกอบอะโซ (azo compound)
 $ROO^\bullet$ = อนุมูลเพอร์ออกซิล (peroxyl radical)
 LH = สารตั้งต้น (substrate)
 AH = สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant)

วิธีการวิเคราะห์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ORAC และ TRAP จำเป็นต้องใช้สารตัวแทนเพื่อเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา (probes or substrates) โดยสารต้านออกซิเดชันจะแย่งกันทำปฏิกิริยากับสาร

ตั้งต้น ในระบบการทดลองจะประกอบด้วย สารกลุ่มอะโซเพื่อผลิตอนุมูลอิสระ (AAPH), probes เพื่อติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (สารฟลูออเรสซิน) และสารต้านออกซิเดชัน โดย AAPH จะถูกให้ความร้อนเพื่อสร้างอนุมูลเพอร์ออกซิล เมื่อใส่ฟลูออเรสซิน และสารต้านออกซิเดชันแล้ว จะเกิดการแย่งกันทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอร์ออกซิล โดยสารต้านออกซิเดชันจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว เมื่อสารต้านออกซิเดชันทำปฏิกิริยาจนหมดแล้วสารฟลูออเรสซินจึงเข้าทำปฏิกิริยาต่อ การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์จึงค่อยๆ ลดลง กลไกการแย่งทำปฏิกิริยาของสารต้านออกซิเดชันและฟลูออเรสซินแสดงในสมการที่ 10-13



เมื่อ PH = สารตัวแทนสารตั้งต้น (oxidized probes)

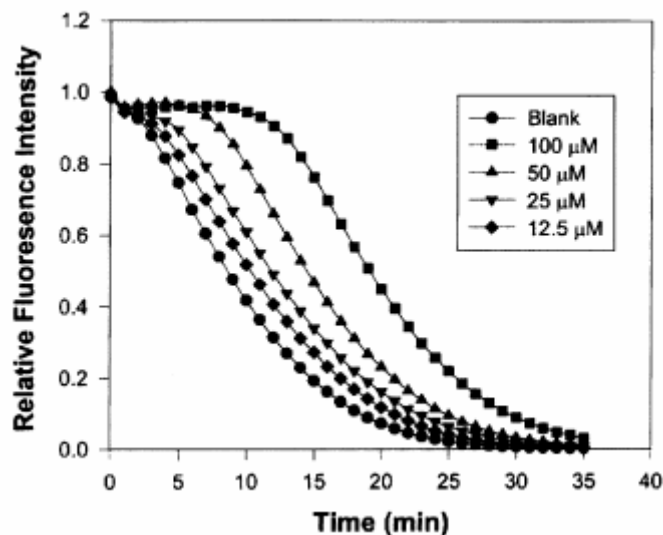
1.1.1 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay

วิธีนี้เป็นวิธีการวัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยหลักการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยเมื่อฟลูออเรสซินทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอร์ออกซิลแล้วความเข้มของแสงจะลดลง หากในระบบมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันน้อยจะทำให้ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลงอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าปริมาณสารต้านออกซิเดชันมากความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์จะลดลงช้า เนื่องจากอนุมูลอิสระต้องทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันจนหมดก่อนแล้วจึงทำปฏิกิริยากับฟลูออเรสซิน วิธีนี้นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง และสามารถใช้ได้ทั้งการวัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในพืชและระบบร่างกาย

ในช่วงแรกของการพัฒนาวิธีนี้มีการใช้ B-PE (B-phycoerythrin) เป็น probes ซึ่งทำหน้าที่เช่นเดียวกับสารฟลูออเรสซิน แต่ B-PE มีข้อเสียหลายประการ ได้แก่ B-PE ผลิตมาจาก *Porphyridium cruentum* ทำให้ในแต่ละครั้งการผลิตมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง นอกจากนั้น B-PE จะมีสีซีดลง (photobleached) เมื่ออยู่ในสถานะของการทดลองด้วย plate-reader และประการสุดท้าย B-PE จะทำปฏิกิริยากับสารพอลิฟีนอลแล้วสีซีดลง แม้ยังไม่ได้เติมสารที่ผลิตอนุมูลอิสระ

ลงไปในระบบก็ตาม ทำให้ภายหลังเปลี่ยนมาใช้ฟลูออเรสซินซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ ทดแทนการใช้ B-PE

วิธี ORAC นี้เป็นการรวมกันระหว่างการหาค่าเวลาในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (inhibition time) และปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ ในขณะที่วิธีการอื่นมักหาค่าเวลาในการยับยั้งเมื่อกำหนดปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ หรือหาปริมาณในการยับยั้งอนุมูลอิสระเมื่อกำหนดระยะเวลา หลักการคร่าวๆ ของวิธี ORAC คือนำตัวอย่าง หรือตัวแทนควบคุม หรือสารมาตรฐาน ผสมกับสารฟลูออเรสซิน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ แล้วเติม AAPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา วัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 485 nm excitation/525 nm emission เป็นเวลา 35 นาที โดยประมาณ และตั้งอุณหภูมิภายในเครื่องที่ 37 °ซ โดยในการทดลองใช้สาร Trolox (สารจำลองของวิตามินอี) ความเข้มข้น 4-5 ระดับ เป็นสารมาตรฐาน ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 6 นำผลที่ได้คำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) แล้วคำนวณเป็นค่าพื้นที่ใต้กราฟสุทธิ (net AUC) นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ Trolox (Y) (μM) กับพื้นที่ใต้กราฟ (X) ค่าที่ได้แสดงเป็นไมโครโมลของ Trolox ต่อตัวอย่างสด 100 กรัม



ภาพที่ 6 กราฟการลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ของตัวอย่างและสารมาตรฐาน
ที่มา: Huang *et al.* (2005)

การวัดค่าด้วยวิธี ORAC นี้ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ดีขึ้นควรใช้เปิดชนิดหลายทาง (multichannel) เพื่อใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างลงในไมโครเพลตให้สั้นที่สุด ควบคู่กับเครื่องอ่านค่าพร้อมถาดชนิด 96 หรือ 48 หลุม นอกจากนั้นวิธีนี้ค่อนข้างไวต่ออนุมูล จึงต้องควบคุมทั้งอุณหภูมิภายในเครื่อง และอุณหภูมิของบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ให้อยู่ที่ 37 °ซ ก่อนนำมาละลายสาร AAPH สิ่งสำคัญอีกเรื่องหนึ่งคือในการทดลองแต่ละครั้งไม่ควรใช้เวลาเกิน 1 ชั่วโมง เนื่องจากสารหมดประสิทธิภาพ (Prior *et al.*, 2005)

1.1.2 total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) assay

วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้หลักการเดียวกับวิธี ORAC คือใช้สาร AAPH ในการผลิตอนุมูลเพอร์ออกไซด์ ผลที่ได้เปรียบเทียบกับ Trolox และใช้สารฟลูออเรสซินเป็นสารเรืองแสงเช่นเดียวกัน แต่แตกต่างกันตรงที่ วิธี ORAC สนใจความเข้มของแสงที่ลดลงเมื่อวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟ ในขณะที่วิธี TRAP สนใจปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปในปฏิกิริยาโดยดูที่เวลาการเกิดปฏิกิริยาเป็นหลัก ผลที่ได้คำนวณออกมาเป็นค่าไมโครโมลของอนุมูลเพอร์ออกไซด์ที่ถูกจับไว้ต่อพลาสมา 1 ลิตร แต่วิธีการนี้มีปัญหาเนื่องจากมีจุดสิ้นสุดของปฏิกิริยา (endpoint) หลายจุด ซึ่งอาจทำให้เกิดความสับสนในการทดลองได้

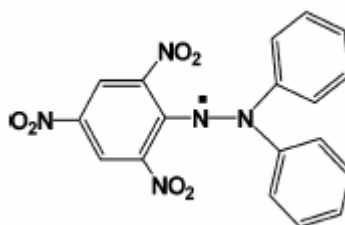
1.2 วิธีการวัดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนเดี่ยว (based on single electron transfer (SET) reaction)

วิธีการนี้จะวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในปฏิกิริยาการรับของตัวรับอิเล็กตรอน ปฏิกิริยานี้จะมีการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อเกิดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน โดยการเปลี่ยนสีจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชัน คือถ้าสารต้านออกซิเดชันมีความเข้มข้นมากสีของสารละลายก็จะลดลงเร็วขึ้น วิธีการในกลุ่มนี้ ได้แก่ total phenols assay by Folin-Ciocalteu reagent (FCR), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH) assay, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay หรือ ABTS และ ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay มีกลไกดังแสดงในสมการที่ 14



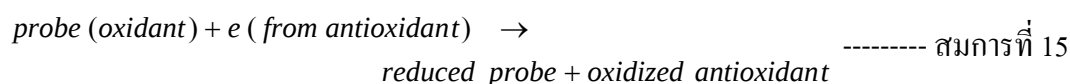
1.2.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH) assay

วิธีนี้จะวัดความสามารถในการยับยั้ง 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ดังภาพที่ 7 โดย DPPH เป็นสารอนุมูลในโตรเจนที่ค่อนข้างคงตัว โดยขณะเริ่มต้นการทดลองจะให้สารสีเข้ม เมื่อเกิดปฏิกิริยามากขึ้นสารจะมีสีซีดจางลง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ตามระยะเวลาที่กำหนด หากในระบบมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันมาก สีของสารละลายก็จะลดลงเร็ว กลไกของการเกิดปฏิกิริยาแสดงในสมการที่ 15 ค่าที่ได้สามารถแสดงได้หลายรูปแบบ ได้แก่ แสดงเป็นร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% radical scavenging activity), ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ ร้อยละ 50 จากปริมาณอนุมูลอิสระเริ่มต้น (IC_{50}) หรือค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antiradical efficiency, AE)



ภาพที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH

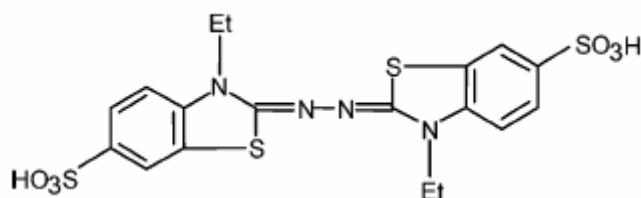
ที่มา: Prior *et al.* (2005)



วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย มีความแม่นยำ ใช้เวลาน้อย และใช้เครื่องมือแค่เครื่องวัดการดูดกลืนแสงเท่านั้น เหมาะสำหรับวัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในน้ำผักและน้ำผลไม้ หรือในสารสกัดผักและผลไม้ แต่ไม่เหมาะสำหรับการวัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในพลาสมา เนื่องจากสาร DPPH ต้องละลายในเมทานอล จึงส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีน (Sánchez-Moreno, 2002) วิธีการวัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้ เช่น DPPH TEAC และ FRAP จะมีความสัมพันธ์ดีมาก ($R^2 > 0.99$) กับการวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เนื่องจากกลไกในการเกิดปฏิกิริยาเป็นกลไกเดียวกัน (Huang *et al.*, 2005) แต่ในบางกรณีสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดมีที่ประสิทธิภาพดี วัดผลได้รวดเร็วเมื่อวัดด้วยวิธีอื่น อาจให้ผลที่ไม่ดี หรือให้ผลการยังยั้งช้าเมื่อวัดด้วยวิธีนี้ เนื่องจากเป็นวิธีการวัดกลไกที่แตกต่างกัน

1.2.2 trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay หรือ ABTS assay

วิธีนี้เป็นวิธีการวัดความเข้มข้นของ Trolox ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน ต่อ 0.1 มิลลิโมลาร์ของสารตั้งต้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระของ ABTS (ABTS radical cation, $\text{ABTS}^{\cdot+}$) สาร ABTS (2,2-azobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) มีสูตรโครงสร้างดังแสดงใน ภาพที่ 8 ซึ่งสภาวะปกติจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 342 นาโนเมตร เมื่อถูกกระตุ้นให้ผลิตอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนมาดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร หลักการของวิธีนี้คือวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการยับยั้งอนุมูลเพอร์ออกซิลของ ABTS วัดได้จากการลดลงของสีในสารละลาย



ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของ ABTS

ที่มา: Prior *et al.* (2005)

2. ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันตามธรรมชาติที่มีความสำคัญมากที่สุด โดยมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันทั้งในระบบอาหารและในร่างกายมนุษย์ (Robards *et al.*, 1999) ความสามารถในการต้านออกซิเดชันขึ้นกับโครงสร้างของสาร เช่นกรดฟีนอลิกมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันน้อยกว่าฟลาโวนอยด์เนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซิลมาแทนที่น้อยกว่า ฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันได้หลายแบบ เช่น กำจัดอนุมูลอิสระ ยับยั้งซิงเกิ้ลออกซิเจน กำจัดไอออนของเหล็ก และกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น

ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของฟลาโวนอยด์สัมพันธ์กับตำแหน่งและปริมาณการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิลโดยเฉพาะบนวงแหวน B แต่การแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิลเพียงตำแหน่งเดียวจะไม่ส่งผลหรือส่งผลน้อยมากต่อประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชัน เช่นฮีสเพอร์รีทิน และนารินจินิน เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอนซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลมาแทนที่บนวงแหวน B เพียงตำแหน่งเดียว พบว่ามีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันน้อยมาก ในขณะที่ควอเซติน และ ไซยานิดิน ซึ่ง

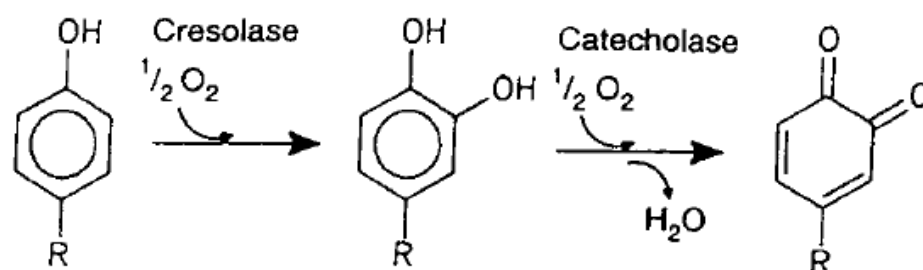
มีหมู่ไฮดรอกซิลเข้ามาแทนที่ในตำแหน่ง 3' และ 4' บนวงแหวน B ส่งผลให้ประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันสูงกว่า Trolox ถึง 4 เท่า (Rice-Evans *et al.*, 1995) นอกจากนั้นการที่มีน้ำตาลเข้ามาแทนที่ในโครงสร้างจะทำให้ประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันลดลง เช่นฟลาโวนอยด์ที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบมีค่า ORAC น้อยกว่าโครงสร้างที่ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ (Robards *et al.*, 1999) และยังพบว่าพบว่าการเสริมฤทธิ์กันระหว่างส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ชอบไขมัน ทำให้ในการทดลองจำเป็นต้องวัดค่าทั้งสองส่วน

ในการทดลองวัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในสารต่างๆ ควรวัดหลายวิธีเพื่อเป็นการยืนยันผล ดังการทดลองของ Ou *et al.* (2002) วัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในผักหลายชนิด ซึ่งใช้วิธี ORAC และ FRAP ในการวิเคราะห์เพื่อยืนยันผล และ Payet *et al.* (2005) ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันในน้ำตาลจากอ้อย ด้วยวิธี DPPH และ ABTS

ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล

ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (browning reaction) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ในอาหาร ผัก และผลไม้หลายชนิด ซึ่งสามารถเกิดได้ตั้งแต่ช่วงหลังจากการเก็บเกี่ยว ระหว่างกระบวนการแปรรูป จนถึงระหว่างการจัดเก็บรักษาวัตถุดิบ โดยปฏิกิริยาแบ่งออกได้เป็น ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่อาศัยเอนไซม์ (non-enzymatic browning reaction) และ ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เร่งด้วยเอนไซม์ (enzymatic browning reaction)

ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เร่งด้วยเอนไซม์ (enzymatic browning reaction) จะถูกเร่งด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม oxidoreductase ซึ่งได้แก่ พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase, PPO) และ เพอออกซิเดส (peroxidase, POD) เป็นต้น โดยปฏิกิริยาจะเริ่มต้นจากการที่สาร monophenol โดนเร่งด้วยเอนไซม์ PPO และออกซิเจน ได้โครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปเป็น diphenol และเมื่อโครงสร้าง diphenol ถูกเร่งด้วย PPO ในสภาวะที่มีออกซิเจนอีกครั้ง ได้โครงสร้างออกโทควิโนน (O-quinone) มีปฏิกิริยาดังภาพที่ 9 ซึ่งเมื่อสารออกโทควิโนนถูกกระตุ้นด้วยกรดอะมิโน โปรตีน หรือสารประกอบฟีนอลอื่นๆ ทำให้เปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำตาล ก่อให้เกิดปัญหาแก่ผลิตภัณฑ์



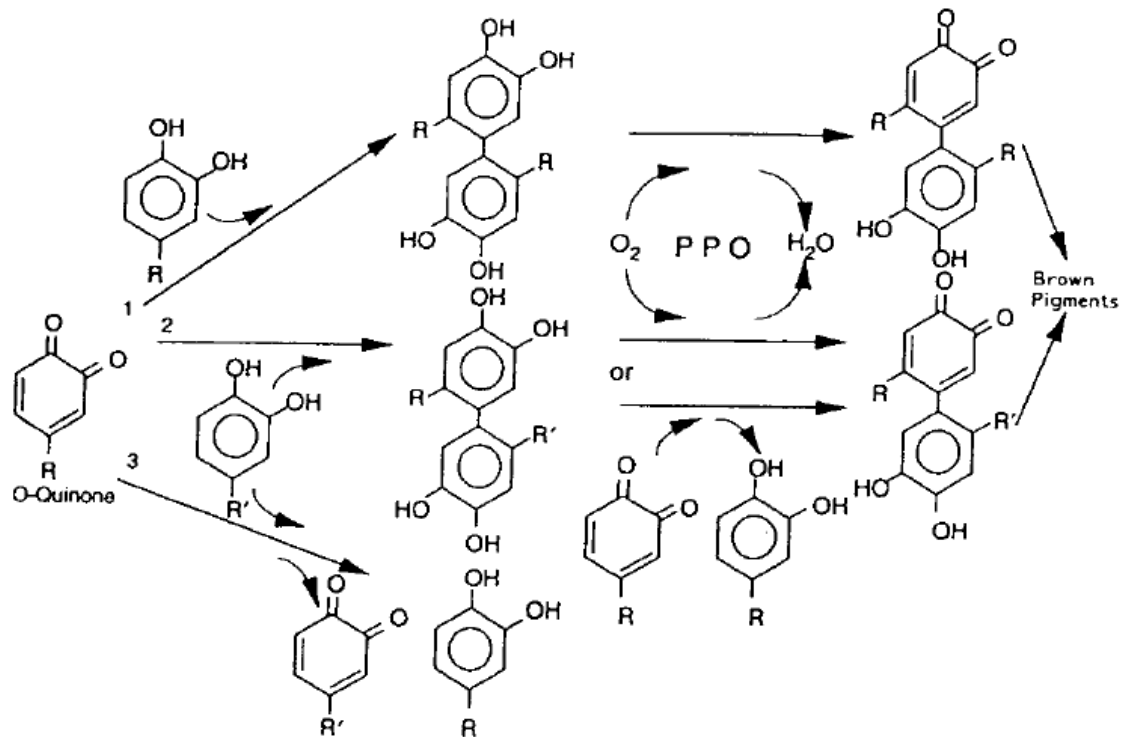
ภาพที่ 9 ปฏิกริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เร่งด้วยเอนไซม์ PPO (cresolase และ catecholase)

ที่มา: Robards *et al.* (1999)

ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่อาศัยเอนไซม์ (non-enzymatic browning reaction) สามารถแบ่งออกได้อีก 2 ปฏิกริยา ได้แก่ การเกิดคาราเมลไลเซชัน (caramelization) มีสารเริ่มต้นเป็นน้ำตาล และถูกเร่งด้วยความร้อน เกิดเป็นสารสีน้ำตาลประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เรียกว่า คาราเมล (caramel) มีกลิ่นเฉพาะตัว และมีรสหวาน เป็นที่ต้องการของผลิตภัณฑ์บางชนิด ส่วนอีกปฏิกิริยา คือปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction) เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกับกรดอะมิโน ในสภาวะที่มีน้ำน้อย และมีความร้อนร่วมด้วย ได้เป็นสารสีน้ำตาลประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน เนื่องจากมีกรดอะมิโนร่วมอยู่ในปฏิกิริยา เรียกว่า เมลานอยดิน (melanoidins)

การเกิดสีน้ำตาลโดยไม่อาศัยเอนไซม์นั้น สามารถเกิดได้เมื่อมีการรวมตัวของไอออนเหล็กกับสารฟีนอลิก หรือการสลายตัวของวิตามินซี เป็นต้น การเกิดสีน้ำตาลเนื่องมาจากการรวมตัวของไอออนเหล็กนั้นพบบ่อยในน้ำผลไม้ เพราะไอออนเหล็กพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่นในดิน สารเคมีทางการเกษตร และอุปกรณ์ในกระบวนการผลิต ซึ่งไอออนเหล็กปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้เกิดสีน้ำตาลในน้ำผลไม้ได้ ปฏิกริยาการเกิดสีน้ำตาลทั้งสองแบบส่งผลให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำตาลเช่นเดียวกัน แตกต่างกันว่าปฏิกิริยาที่อาศัยเอนไซม์มีอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยามากกว่า ปฏิกริยาการเกิดสีน้ำตาลส่วนมากจะเป็นการเกิดสีน้ำตาลที่อาศัยเอนไซม์ในส่วนแรกเกิดเป็นสารออกโท-ควิโนนและเป็นการเกิดสีน้ำตาลโดยไม่อาศัยเอนไซม์ในส่วนหลัง ซึ่งสารออกโท-ควิโนนนี้สามารถเปลี่ยนเป็นสารอื่นได้มากมาย ทั้งกรณีที่มีสารประกอบฟีนอลิกร่วมด้วย ดังแสดงภาพที่ 10 ซึ่งออกโท-ควิโนนจะมีการเปลี่ยนเป็นสารฟีนอลตัวอื่น หรืออาจเปลี่ยนกลับมาเป็นสารไดเมอร์ตั้งต้นได้ แต่มีการกล่าวถึงสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดที่ไม่ได้เป็นสาร

ตั้งต้นของปฏิกิริยานี้ เช่นฟลาโวนอลไกลโคไซด์ และแอนโทไซยานินไกลโคไซด์ อาจเกิดการสลายตัวระหว่างการเกิดปฏิกิริยาได้ (Amiot *et al.*, 1992, Amiot *et al.*, 1995)



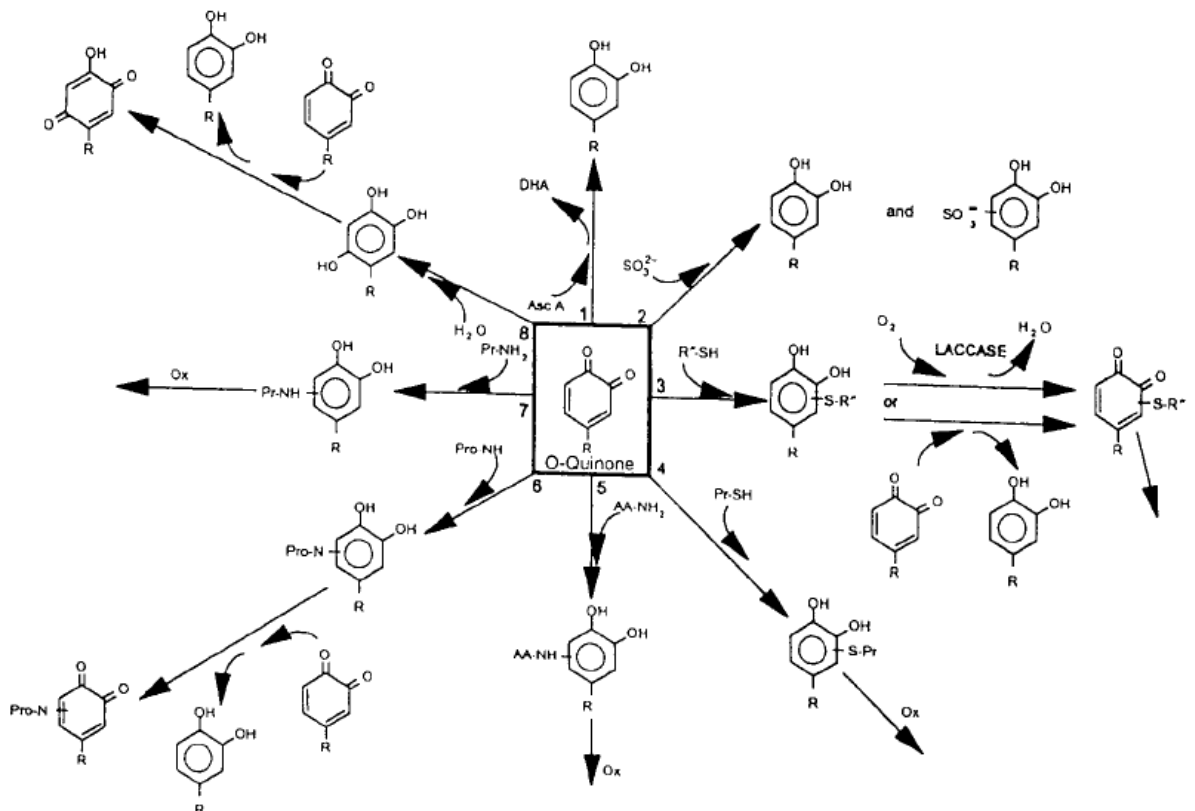
ภาพที่ 10 ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลของอโท-ควิโนนในสถานะที่มีสารฟีนอลิก

ที่มา: Robards *et al.* (1999)

นอกจากสถานะที่มีสารประกอบฟีนอลิกแล้ว อโท-ควิโนนยังสามารถเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนได้ในสถานะที่ไม่มีสารประกอบฟีนอลิกได้อีกด้วย ดังแสดงในภาพที่ 11 โดยเป็นสถานะที่มีวิตามินซี ซัลไฟท์ ไธโอน เอมีน และน้ำร่วมอยู่ด้วย ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดสารสีน้ำตาลเช่นกัน ในสถานะที่มีวิตามินซีการเกิดสีน้ำตาลจะถูกยับยั้งจนวิตามินซีหมดไป จึงเกิดการรวมตัวเป็นสารสีน้ำตาลต่อไป

ดังนั้นเมื่อสารฟีนอลถูกเร่งด้วยเอนไซม์ PPO แล้ว สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปได้สองรูปแบบหลักๆ คือ เปลี่ยนไปเป็นสารโคพอลิเมอร์ (copolymer) ทั้งที่เปลี่ยนเป็นสารสีน้ำตาลและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารฟีนอลโครงสร้างอื่นๆ ส่วนอีกรูปแบบหนึ่งคือ เปลี่ยนแปลงกลับมาเป็นฟีนอลอีกครั้ง กรณีหลังพบมากในผลไม้ต่างๆ ที่มีองค์ประกอบเป็นสารที่ไม่ได้เป็นสาร

ตั้งต้นของเอนไซม์ PPO เช่นฟลาโวนอยด์ที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ หรือแอนโทไซยานินที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ เป็นต้น



ภาพที่ 11 ปฏิกริยาการเกิดสีน้ำตาลของอโท-ควิโนนในสถานะที่ไม่มีสารฟีนอลิก
ที่มา: Robards *et al.* (1999)

ปัจจัยเรื่องอายุการเก็บเกี่ยวต่อฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชัน

จากการทดลองเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในกรณีที่ไม่มีการมีอายุที่แตกต่างกันพบว่าปริมาณแตกต่างกันเมื่ออายุการเก็บเกี่ยวแตกต่างกัน และยังขึ้นกับชนิดของผลไม้เช่นกัน โดยฟีนอลิกจะมีปริมาณลดลงเมื่อผลไม้สุกมากขึ้น เช่นกรดแอสคอร์บิกมีปริมาณมากเมื่อเป็นผลอ่อน และจะมีปริมาณลดลงเมื่อแก่ขึ้น ส่วนของฟลาโวนอยด์พบว่าปริมาณลดลงเช่นกันเมื่อผลไม้แก่ขึ้น โดยพบว่าผลไม้บางชนิด เช่น บลูเบอร์รี่ และ เรดเคอเรนท มีปริมาณควอเซติน และแคมป์เฟอร์อลมากที่สุดเมื่อยังอ่อนอยู่ และมีปริมาณลดลงเมื่อผลไม้มีการสุกมากขึ้น แต่ในทาง

กลับกัน ในผลไม้บางชนิด เช่น แบลคเคอเรนท์ หรือ บลูเบอร์รี่บางสายพันธุ์ มีปริมาณควอเซติน และ โพลีฟีนอลมากขึ้นเมื่อผลไม้สุกมากขึ้น (Macheix *et al.*, 1990)

Pandjaitan *et al.* (2005) ทำการทดลองในผักขม (spinach) หลายสายพันธุ์ เพื่อศึกษา กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระที่วัดด้วยวิธี ORAC เมื่อผักแก่ขึ้น พบว่าประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของผักขมทุกสายพันธุ์มีค่าไปในทิศทางเดียวกัน คือเพิ่มขึ้นจากช่วง immature เป็น midmature และมีการลดลงจากช่วง midmature ไปเป็นช่วง mature

Kulkarni and Aradhya (2005) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระใน ผลทับทิม พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลงเมื่ออายุมากขึ้น ในขณะที่แอนโทไซยานินมีปริมาณ เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารฟีนอลิกไปเป็นสารจำพวก ฟลาโวนอยด์ ได้แก่ แอนโทไซยานิน

แต่ในทางกลับกัน Deepa *et al.* (2007) ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิก วิตามินซี แคโรทีนอยด์ และกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระในพริกหวาน (sweet pepper) พบว่าทุกค่ามี แนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อพริกหวานแก่ขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

1.1 ผลมะขามป้อมสด *Phyllanthus emblica* Linn. พันธุ์พื้นเมืองผลเล็ก ชื้อจากตลาด ทำน่านนทบุรี จังหวัดนนทบุรี เก็บเกี่ยวเดือนกันยายน พ.ศ. 2548 ขนส่งโดยรถยนต์จากจังหวัดจันทบุรีมาถึงกรุงเทพมหานครภายใน 2 วัน นำมาเตรียมตัวอย่างทันที ตามวิธีการทดลองข้อ 1.1 ส่วนตัวอย่างที่ยังไม่ได้ทำแห้งเก็บรักษาไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 °ซ

1.2 ผลมะกอกน้ำสด *Ellaeocarpus hygrophilus* Kurz. พันธุ์ประเสริฐสุวรรณ หรือชื่อเดิมคือพันธุ์แก้มแหม่ม จากสวนมะกอกน้ำสาเลี จังหวัดสุพรรณบุรี อายุ 5, 6, 7 และ 8 เดือนหลังติดดอก เก็บเกี่ยวช่วงเดือนสิงหาคมถึงพฤศจิกายน พ.ศ. 2548 ขนส่งโดยรถยนต์จากตำบลสาเลี อำเภอบางปลาม้า จังหวัดสุพรรณบุรี ถึงกรุงเทพมหานครภายในวันเดียวกัน นำมาเตรียมตัวอย่างทันที ตามวิธีการทดลองข้อ 1.2 ส่วนตัวอย่างที่ยังไม่ได้ทำแห้งเก็บรักษาไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 °ซ

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2.1.1 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid; H_2SO_4 : Analytical grade, lot. K35221131 539, Merck, Germany)

2.1.2 กรดบอริก (Boric acid; H_3BO_3 : Analytical grade, lot. A577065 442, Merck, Germany)

2.1.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH: analytical grade: lot B287198 315, Merck, Germany)

2.1.4 คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate; $CuSO_4$: Analytical grade, lot. 0236071A, Fisher Scientific, UK)

2.1.5 โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulfate; K_2SO_4 : Analytical grade, lot.

AF505372, Ajax Finechem, New Zealand)

2.1.6 เมทิลเรด (Methyl red; $C_{15}H_{15}N_3O_2$: Analytical grade, lot. 810278KP, Panreac,

Panreac Quimica SK, Spain)

2.1.7 โบรโมครีซอลกรีน (Bromocresol green; $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$: Analytical grade, lot.

AF404011, Ajax Finechem, New Zealand)

2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

2.2.1 ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether; Analytical grade, lot. B10756,

Mallinckrodt Chemicals, USA)

2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยหยาบ

2.3.1 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid) เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1

2.3.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) เช่นเดียวกับข้อ 2.1.3

2.3.3 เอทานอล (Ethanol; C_2H_5OH : Analytical grade, lot. K35091883 536, Merck,

Germany)

2.4 สารเคมีสำหรับการสกัดเพื่อวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

2.4.1 เมทานอล (Methanol; CH_3OH : analytical grade: lot K32337709 332, Merck,

Germany)

2.5 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

2.5.1 โฟลิน-ซีโอคาลเทอ (Folin-Ciocalteu reagent: analytical grade, lot 15911/1,

Fluka, Switzerland)

2.5.2 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate anhydrous; Na_2CO_3 : analytical grade,

lot A408829 308, BDH Laboratory Supplies, England)

2.5.3 กรดแกลลิก (Gallic acid 97%; $(\text{HO})_3\text{C}_6\text{H}_2\text{CO}_2\text{H}$; analytical grade: lot 025K0143, sigma-aldrich Inc., China)

2.6 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์

2.6.1 โซเดียมไนไตรท์ (Sodium nitrite; NaNO_2 ; analytical grade: lot 8A82278B, Carlo erba)

2.6.2 อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminum chloride; AlCl_3 ; analytical grade: lot F3C266, Ajax Finechem, Australia)

2.6.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) เช่นเดียวกับข้อ 2.1.3

2.6.4 แคทเทชิน ((+)-Catechin hydrate 98%; $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$; analytical grade: lot 064K1269, sigma-aldrich Inc., Japan)

2.7 สารเคมีสำหรับการสกัดเพื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

2.7.1 เมทานอล (Methanol) เช่นเดียวกับข้อ 2.4.1

2.7.2 กรดไฮโดรคลอริก 37% (Hydrochloric acid 37%; HCl ; analytical grade: lot K33998617 448, Merck, Germany)

2.8 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยวิธี HPLC

2.8.1 กรดฟอสฟอริก 85% (Phosphoric acid 85%; H_3PO_4 ; analytical grade: lot 2796X16A00, Mallinckrodt Baker Inc., USA.)

2.8.2 เมทานอล (Methanol; CH_3OH ; HPLC grade: lot 05 01 0065, Lab-Scan, Thailand)

2.8.3 ควอร์เซติน (Quercetin dehydrate 98%; $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; HPLC grade: lot 123K1373, sigma-aldrich Inc., Switzerland)

2.8.4 แคมพ์เฟอรอล (Kaempferol 90%; $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$; HPLC grade: lot 084K1645, sigma-aldrich Inc., Switzerland)

2.8.5 กรดแกลลิก (Gallic acid 97%) เช่นเดียวกับข้อ 2.5.3

2.8.6 แคทเทชิน ((+)-Catechin hydrate 98%) เช่นเดียวกับข้อ 2.6.4

2.9 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

2.9.1 เมทานอล (Methanol) เช่นเดียวกับข้อ 2.4.1

2.9.2 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริล-ไฮดราซิล (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl, DPPH; $C_{18}H_{12}N_5O_6$; 90%: lot 035K0872, sigma-aldrich Inc., USA.)

2.10 สารเคมีสำหรับสกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ORAC

2.10.1 เฮกเซน (Hexane; $CH_3(CH_2)_4CH_3$; analytical grade: lot 0A41B11, J.T. Baker, USA.)

2.10.2 อะซิโตน (Acetone; CH_3COCH_3 ; analytical grade: lot 0423154, Fisher Scientific, UK.)

2.10.3 กรดอะซิติก (Acetic acid; CH_3COOH ; analytical grade: lot K28278817039, BDH Laboratory Supplies, England)

2.10.4 แทรพโซล แรนดอมลิ เมทิลเลทเทด บีต้าไซโคลเดกดิน (Trappsol® Randomly Methylated Betacyclodextrin, RMCD: Technical grade: lot 060671T039, Cyclodextrin Technologies Development Inc., USA.)

2.10.5 ฟลูออเรสซีน (Fluorescein sodium salt: analytical grade: lot 064K0153, sigma-aldrich Inc., USA.)

2.10.6 2',2'-อะโซบิส (2-เมทิลโพรพิโอนามิดีน) ไดไฮโดรคลอไรด์ (2',2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride, AAPH; $[=NC(CH_3)_2C(=NH)NH_2]_2 \cdot 2HCl$; 97%: lot 11824LA-045, sigma-aldrich Inc., Germany)

2.10.7 โซเดียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium dihydrogenphosphate; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; analytical grade: lot 4B217284E, Carlo erba)

2.10.8 ไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต แอนไฮดรัส (di-sodium hydrogen phosphate anhydrous; Na_2HPO_4 ; analytical grade: lot 3G736193N, Carlo erba)

2.10.9 6-ไฮดรอกซี-2,5,7,8-เตตระเมทิลโครแมน-2-คาร์บอกซีลิก แอซิด (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Trolox; $C_{14}H_{18}O_4$; 97%: lot S27444-065, sigma-aldrich Inc., Germany)

3. อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1 อุปกรณ์งานครัว

3.2 เครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze dryer) ยี่ห้อ FTSSYSTEMS™ รุ่น Dura-Top และ Dura-DryFD

3.3 เครื่องบด (Blender: MX-T31GN, National, Japan)

3.4 ตะแกรงร่อน 35 mesh (Sieve: Endecotts Ltd., England)

3.5 เครื่องวัดสี (Colorimeter: 3500 D, Minolta, Japan)

3.6 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven : model 400, TMemmert GmbH+Co. KGT, Germany)

3.7 ชุดวิเคราะห์โปรตีน (BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland) (ภาคผนวก ก2)

3.8 ชุดวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (ภาคผนวก ก3)

3.9 ชุดวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยหยาบ (ภาคผนวก ก4)

3.10 ชุดวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ภาคผนวก ก5)

3.11 เครื่องทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenizer: ULTRA TURRAX T-25, JANKE & KUNKEL IKA- bortechnik, Malaysia) พร้อมหัวปั่น S25N – 18G

3.12 เครื่องสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียง (Sonicator: Branson 22, Branson)

3.13 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Refrigerate centrifuge: RC 5C Plus, Sorval Instruments, USA.)
พร้อมหัว Rotor F28/36

3.14 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer: Spectro 22, LaboMed, Inc., USA.)

3.15 ชุดสกัดแบบย้อนกลับ (Reflux)

3.16 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HP 1100, HEWLETT PACKARD, USA.)

3.17 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence spectrophotometer: FLUOstar OPTIMA, BMG) พร้อม well plate สีดำ

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์โดยวิธีการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze dryer)

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ การเตรียมทำแห้งตัวอย่าง มะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลเป็นระยะเวลาแตกต่างกัน และการเตรียมทำแห้งตัวอย่างมะกอกน้ำที่มีอายุการเก็บเกี่ยวแตกต่างกัน

1.1 การเตรียมตัวอย่างมะขามป้อม นำมะขามป้อมมาคัดผลที่เน่าเสียทิ้ง ล้างด้วยน้ำสะอาด แยกส่วนเมล็ดทิ้ง นำส่วนเนื้อมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ เซนติเมตร แบ่งมะขามป้อมออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นส่วนที่ป้องกันไม่เกิดสีน้ำตาล โดยจุ่มในไนโตรเจนเหลว (-196°C) ทันทีหลังหั่นเสร็จเป็นเวลานาน 1 นาที แล้วนำไปเก็บที่ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -40°C เพื่อรอการทำแห้ง ส่วนที่สอง คือมะขามป้อมที่ต้องการให้เกิดสีน้ำตาล หลังจากหั่นเสร็จแล้ว นำไปวางไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิห้องนาน 4, 6 และ 8 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปจุ่มในไนโตรเจนเหลว และแช่ในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -40°C เช่นเดียวกัน ให้รหัสตัวอย่าง คือ มะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาลให้รหัสเป็น IG, มะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 4, 6 และ 8 ชั่วโมงให้รหัสเป็น IB4, IB6 และ IB8 ตามลำดับ

นำมะขามป้อมที่แช่แข็งไว้ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (freeze dryer) จนแห้งด้วยสภาวะดังนี้ Mode Auto, เวลาที่ใช้ในขั้นตอนแช่เยือกแข็ง (FRTm) เป็น 60 นาที, จำนวนหัววัดอุณหภูมิที่ใช้ (PT#) เป็น 3 หัว, อุณหภูมิขณะแช่เยือกแข็ง (Tfc) เป็น -18°C , อุณหภูมิขณะทำแห้ง (STf) เป็น 20°C และความถี่ในการพัมป์ผล (PRTm) คือ ทุก 3 นาที นำตัวอย่างที่แห้งแล้วมาบดด้วยเครื่องบด (blender) แล้วนำไปร่อนผ่านตะแกรกร่อนขนาด 35 mesh (ขนาด 500 ไมโครเมตร) บรรจุในซองอะลูมิเนียมฟอยล์ ปิดผนึกให้สนิท แล้วเก็บในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -40°C ทุกตัวอย่างมีการบันทึกน้ำหนักสดก่อนนำไปจุ่มในไนโตรเจนเหลว และน้ำหนักแห้งหลังการทำแห้ง บด และร่อนแล้ว

1.2 การเตรียมตัวอย่างมะกอกน้ำ นำมะกอกน้ำที่รับมาจากสวน อายุ 5, 6, 7 และ 8 เดือน มาคัดผลที่เน่าเสียออก ล้างด้วยน้ำสะอาด แยกส่วนเมล็ดทิ้ง นำส่วนเนื้อมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ เซนติเมตร จุ่มในไนโตรเจนเหลวทันทีหลังหั่นเสร็จ นาน 1 นาที แล้วจึง

นำไปแช่ที่ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -40 °ซ เพื่อรอการทำแห้ง ให้รหัสตัวอย่าง คือ มะกอกน้ำที่มีอายุ 5, 6, 7 และ 8 เดือน เป็น 5-m, 6-m, 7-m และ 8-m ตามลำดับ

นำมะกอกน้ำที่แช่แข็งไว้ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็งจนแห้งโดยใช้สภาวะในการทำแห้งเช่นเดียวกับสภาวะการทำแห้งของมะขามป้อมหลังจากนั้นนำตัวอย่างที่แห้งแล้วมาบดด้วยเครื่องบด แล้วนำไปร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 35 mesh (ขนาด 500 ไมโครเมตร) บรรจุในซองอะลูมิเนียมฟอยล์ ปิดผนึกให้สนิท แล้วเก็บในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -40 °ซ ทุกตัวอย่างมีการบันทึกน้ำหนักสดก่อนนำไปจุ่มในไนโตรเจนเหลว และน้ำหนักแห้งหลังการทำแห้ง บด และร่อนแล้ว

2. การวัดสีมะขามป้อมหลังผ่านการทำให้เกิดสีน้ำตาล

นำตัวอย่าง IG, IB4, IB6 และ IB8 มาวัดสีด้วยเครื่องวัดสี ในระบบ CIE Lab* (L*, a* และ b*) ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นเมื่อเกิดสีน้ำตาลที่เวลาต่างกัน เทียบกับตัวอย่างที่ไม่เกิดสีน้ำตาล นำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นค่า ΔE ดังสมการที่ 16 และค่า Browning Index (BI) ดังสมการที่ 17 ซึ่งการหาค่า BI ทำได้โดยนำค่า L*, a* และ b* มาแปลงค่าเป็นค่าในระบบ Hunter Lab (L, a และ b) โดยใช้โปรแกรมการแปลงค่าระบบสีจาก เว็บไซต์ <http://colorpro.com/info/tool/convert.htm> (Dawes, 1998) แล้วนำค่า L, a และ b ไปหาค่า BI เพื่อนำไปเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อตัวอย่างผ่านการทำให้เกิดสีน้ำตาลในเวลาที่ต่างกัน ซึ่งสามารถเปรียบเทียบได้ว่าเกิดสีน้ำตาลมาก-น้อย แตกต่างกันหรือไม่ เพียงใด เนื่องจากค่า BI เป็นค่าที่เหมาะสม และนิยมใช้ในการเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในผักและผลไม้ชนิดต่างๆ

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{----- สมการที่ 16}$$

$$BI = \frac{100 \times (x - 0.31)}{0.172} \quad \text{----- สมการที่ 17}$$

$$\text{เมื่อ } x = \frac{a + 1.75 L}{5.645 L + a - 0.3012 b}$$

ที่มา: Palou *et al.* (1999)

3. การหาความชื้นของมะขามป้อม และมะกอกน้ำ

นำตัวอย่างมะขามป้อม และมะกอกน้ำ ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งจนแห้ง บด และ ร่อนผ่านตะแกรงร่อนแล้ว มาหาความชื้นตามวิธี AOAC (2000) (รายละเอียดในการวิเคราะห์แสดง ในภาคผนวกที่ ก1)

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (proximate analysis)

นำตัวอย่างมะขามป้อม และมะกอกน้ำ ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งจนแห้ง บด และ ร่อนผ่านตะแกรงร่อนแล้ว มาหาโปรตีน ไขมัน เส้นใย เถ้า และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธี AOAC (2000) (รายละเอียดในการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวกที่ ก2 ถึง ก5)

5. การสกัดสารตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ และ กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

นำตัวอย่างแห้งจากข้อ 1 มาชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 2.000 กรัม เติมนีโตรเจน 80 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องทำให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 1 นาที นำไปเข้า เครื่องสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียง ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 20 นาที หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ อุณหภูมิ 4 °ซ ด้วยความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที ด้วยหัว Rotor F28/36 นาน 20 นาที (4598 xg) แยกส่วนใสมาใส่ในหลอดทดลองเก็บไว้ นำส่วนตะกอนที่ได้ไปสกัดซ้ำอีกครั้งตั้งแต่ขั้นตอนการ เติมนีโตรเจน 80 เมื่อหมุนเหวี่ยงแล้วนำส่วนใสที่ได้อีกครั้งมารวมกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอลร้อยละ 80 ได้เป็นสารสกัด ทำการสกัดเช่นเดียวกันนี้ 2 ครั้ง ได้เป็นสาร สกัดตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ และ กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ต่อไป

6. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic)

ทำการวิเคราะห์โดยดัดแปลงวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ตามวิธีของ Wolfe *et al.* (2003) โดยนำสารสกัดตามข้อ 3 มา 125 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นอยู่ 500 ไมโครลิตร แล้วเติม Folin-Ciocalteu reagent 125 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 6 นาที หลังจากนั้น เติมนิโคตินิกแอซิดร้อยละ 7 ปริมาตร 1250 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 1000 ไมโครลิตร วางไว้ที่

อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ทำการวัดค่าเช่นเดียวกันนี้สารสกัดละ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ดังแสดงในภาคผนวกที่ ก7 แล้วคำนวณค่าเป็นมิลลิกรัมกรดแกลลิก ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด

7. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid content)

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Wolfe *et al.* (2003) โดยนำสารสกัดตามข้อ 3 มา 250 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นอยู่ 1250 ไมโครลิตร ตามด้วยโซเดียมไนไตรท์ ร้อยละ 5 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติมอะลูมิเนียมคลอไรด์ร้อยละ 10 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ทิ้งไว้อีก 6 นาที เติมน้ำกลั่นไฮดรอกซีอะซิติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 275 ไมโครลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ทำการวัดค่าเช่นเดียวกันนี้สารสกัดละ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคเทชิน ดังแสดงในภาคผนวกที่ ก8 แล้วคำนวณเป็นมิลลิกรัมเคเทชินต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด

8. การสกัดเพื่อการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

ทำการสกัดโดยดัดแปลงจากวิธีของ Hertog *et al.* (1992a) โดยการนำตัวอย่างแห้งที่ได้จากข้อ 1 มาชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 0.500 กรัม ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติมนิวทอน ร้อยละ 62.5 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดแบบย้อนกลับ (reflux) ที่อุณหภูมิ 90 °C นาน 2 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง ยี่ห้อ whatman เบอร์ 1 แล้วปรับปริมาตรให้ได้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยนิวทอนร้อยละ 62.5 ทำการสกัดเช่นเดียวกันนี้ตัวอย่างละ 2 ครั้ง ได้เป็นสารสกัดตัวอย่างละ 2 replicate หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่สกัดแล้วมากรองผ่านแผ่นกรองตัวอย่าง (membrane) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

9. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิก แคทเทคิน และฟลาโวนอลด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอลโดยเฉพาะควอเซตินและแคมป์เฟอร์อลด้วยวิธี HPLC ซึ่งทำการดัดแปลงจากวิธีของ Huber (1998) และ Breitfellner *et al.* (2003) มีสถานะในการวิเคราะห์ ได้แก่ คอลัมน์ชนิด Hypersil ODS มีวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) 2 ชนิด คือ A : กรดฟอสฟอริกร้อยละ 0.5 ในน้ำกลั่น และ B : เมทานอล โดยสัดส่วนที่ใช้เป็นระบบ gradient ซึ่งอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ และอัตราเร็วในการไหล ที่ใช้ในการวิเคราะห์ในช่วงเวลาต่างๆ แสดงในตารางที่ 5 ใช้สารสกัด 10 ไมโครลิตรในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง ควบคุมอุณหภูมิภายในคอลัมน์เป็น 25 °ซ ใช้ detector ชนิด UV ความยาวคลื่นเครื่องตรวจวัดที่ใช้ในการวิเคราะห์ในช่วงเวลาต่างๆ แสดงในตารางที่ 5 เช่นกัน ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 35 นาที เว้นระยะเวลาล้างการวิเคราะห์ ก่อนทำการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อไป 5 นาที

ตารางที่ 5 สัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราเร็วในการไหล และความยาวคลื่นเครื่องตรวจวัดที่ใช้ในการวิเคราะห์ในช่วงเวลาต่างๆ

เวลา	กรดฟอสฟอริก ร้อยละ 0.5 (ร้อยละ)	เมทานอล (ร้อยละ)	อัตราเร็วในการไหล (มิลลิลิตร/นาที)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)
นาทีที่ 0	95	5	1	280
นาทีที่ 5	95	5	1	280
นาทีที่ 8	85	15	2	280
นาทีที่ 12	75	25	2	370
นาทีที่ 14	62	38	2	370
นาทีที่ 26	52	48	2	370
นาทีที่ 30	0	100	2	370
นาทีที่ 35	95	5	1	280

สารมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ ควอเซติน แคมป์เฟอร์อล แคทเทคิน และกรดแกลลิก ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อหาปริมาณสาร สารสกัดละ 2 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของควอเซติน แคมป์เฟอร์อล แคทเทคิน และกรดแกลลิก (ดังแสดงในภาพผนวกที่ ก9) แล้วนำมา

คำนวณค่าที่ได้เป็นมิลลิกรัมของควอเซติน มิลลิกรัมของแคมป์เฟอร์อล มิลลิกรัมของเคทเทคิน และมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด

10. การวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (Antioxidant Activity: DPPH Assay)

วิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging Capacity Assay (DPPH) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Singh *et al.* (2002) คือนำสารสกัดตามข้อ 3 มาเจือจางด้วยเมทานอล ให้มีความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมา 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรุนแรง ทิ้งไว้ 20 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณเป็น % radical scavenging activity ดังสมการที่ 18 โดยค่าการดูดกลืนคลีนแสงควบคุม (control OD) หาได้จากการวิเคราะห์ตามวิธีข้างต้นแต่ใช้เมทานอลแทน ตัวอย่าง นำค่า % radical scavenging activity ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟ เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมในสารสกัด 1 มิลลิลิตร) ที่สามารถทำให้ค่า % radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) แล้วนำค่า IC_{50} มาคำนวณเป็นค่าประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) ดังสมการที่ 19 (กราฟมาตรฐานของตัวอย่าง และวิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวกที่ ข1)

$$\% \text{ radical scavenging activity} = \frac{(\text{control OD} - \text{sample OD})}{\text{control OD}} \times 100 \quad \text{---- สมการที่ 18}$$

เมื่อ control OD = ค่าการดูดกลืนแสงควบคุม
sample OD = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

$$AE = \frac{1}{IC_{50}} \quad \text{----- สมการที่ 19}$$

เมื่อ AE = Antiradical Efficiency
 IC_{50} = ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถทำให้ค่า % radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50

11. การสกัดและการวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ORAC (Antioxidant Activity: ORAC Assay)

วิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assay โดยดัดแปลงจากวิธีของ Prior *et al.* (2003) คือนำตัวอย่างแห้งจากข้อ 1 มาชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 0.500 กรัม ใส่ในหลอดสำหรับหมุนเหวี่ยง เดิมเฮกเซน 10 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที ด้วยหัว Rotor F28/36 นาน 15 นาที (ประมาณ 1565 xg) แล้วจึงแยกเอาส่วนของเฮกเซนออกมา นำส่วนกากไปสกัดอีกครั้งตั้งแต่ขั้นตอนการเดิมเฮกเซน แล้วจึงนำส่วนเฮกเซนที่ได้ทั้ง 2 ส่วน มารวมกันได้เป็นสารสกัดส่วนที่ 1 คือส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic) นำส่วนกากที่ได้หลังจากการแยกส่วนเฮกเซนออกแล้วมาระเหยด้วยแก๊สในโตรเจน (ไนโตรเจนอุตสาหกรรม) ภายในตู้ดูดควันจนแห้ง เดิมสารละลาย อะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติก (70/29.5/0.5 v/v/v) 10 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย vortex mixer นาน 30 วินาที แล้วนำไปปั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียง (sonicate) ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 15 นาที โดยมีการกลับหลอดตัวอย่างเป็นครั้งคราว ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และมีการกลับหลอดตัวอย่างเป็นครั้งคราวเช่นกัน นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที ด้วยหัว Rotor F28/36 นาน 15 นาที แยกส่วนใสออกมาแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ได้เป็นสารสกัดส่วนที่ 2 คือส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) (วิธีการเตรียมสารละลายในการวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ORAC แสดงในภาคผนวกที่ ข2)

11.1 การวิเคราะห์สารสกัดส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic) นำสารสกัดมาระเหยเฮกเซนด้วยแก๊สในโตรเจนออกจนแห้ง เดิมอะซิโตน 250 ไมโครลิตร และสารละลาย RMCD ร้อยละ 7 (ที่ละลายในสารละลายอะซิโตน ร้อยละ 50) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร เขย่าจนตัวอย่างละลายหมด (หากต้องการเจือจางตัวอย่างให้เจือจางด้วย RMCD ร้อยละ 7) นำสารสกัดมา 20 ไมโครลิตร ใส่ใน well plate เดิมสารละลายฟลูออเรสซิน 200 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลายฟลูออเรสซินที่อุ่นที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 15 นาทีแล้ว หลังจากนั้นนำ well plate ไปใส่ในเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ กำหนดให้ป้อนภายในเครื่องเดิมสารละลาย AAPH (ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่อุ่นที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 30 นาที) (Prior *et al.*, 2003; Prior *et al.*, 2005) ความเข้มข้น 63.4 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ลงในหลุมแล้วทำการอ่านค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ (relative fluorescence intensity) ทันที โดยมีการตั้งค่าความยาวคลื่น excitation เป็น 480 นาโนเมตร และ emission เป็น 520 นาโนเมตร ทำการอ่านค่าทุก 65 วินาที (Cycle time) จนกว่าค่าที่

อ่านได้จะมีค่าไม่เกิน ร้อยละ 5 ของค่าเริ่มต้น หรือใช้เวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง (Kurilich *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Prior *et al.*, 2005) รายละเอียดการตั้งค่าการวัดแสดงในภาคผนวกที่ ข2

การวิเคราะห์ผลทำได้โดยหาพื้นที่ใต้กราฟของสารสกัด จากสมการระหว่างค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์กับเวลา ดังแสดงในสมการที่ 20 แล้วนำไปลบออกด้วยพื้นที่ใต้กราฟของ blank แล้วจึงนำค่าไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (กราฟมาตรฐาน และกราฟของตัวอย่าง ดังแสดงในภาคผนวกที่ ข2) โดยการสร้างกราฟมาตรฐานใช้ Trolox แทนสารสกัด และการหาค่า blank ใช้ RMCD ร้อยละ 7 แทนสารสกัด ค่าที่ได้คำนวณแสดงเป็นปริมาณของ Trolox ในหน่วยไมโครโมลต่อตัวอย่างสด 100 กรัม

$$AUC = (0.5 + f_5/f_4 + f_6/f_4 + f_7/f_4 + \dots + f_i/f_4) \times CT \text{ --- สมการที่ 20}$$

$$\begin{aligned} \text{เมื่อ } AUC &= \text{พื้นที่ใต้กราฟ (Area Under Curve)} \\ f_4 &= \text{ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์เริ่มต้นโดยเริ่มอ่านที่รอบที่ 4} \\ &\quad (\text{initial fluorescence reading at cycle 4}) \\ f_i &= \text{ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่ออ่านที่รอบที่ i} \\ &\quad (\text{fluorescence reading at cycle i}) \\ CT &= \text{เวลาที่ใช้ต่อรอบ มีหน่วยเป็นนาที (Cycle time)} \end{aligned}$$

11.2 การวิเคราะห์สารสกัดส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) มีวิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์สารสกัดส่วนที่ชอบไขมัน เพียงแตกต่างกันที่ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 แทนสารละลาย RMCD ร้อยละ 7 คือ หากต้องเจือจางสารสกัด ให้เจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 และเติมสารละลาย AAPH ปริมาตร 37.5 มิลลิลิตร นอกนั้นมีการวิเคราะห์และการตั้งค่าต่างๆ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์สารสกัดส่วนที่ชอบไขมัน

การวิเคราะห์ผลทำได้โดยหาพื้นที่ใต้กราฟของสารสกัด จากสมการระหว่างค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์กับเวลา ดังแสดงในสมการที่ 20 แล้วนำไปลบออกด้วยพื้นที่ใต้กราฟของ blank แล้วจึงนำค่าไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (กราฟมาตรฐาน และกราฟของตัวอย่าง ดังแสดงในภาคผนวกที่ ข2) โดยการสร้างกราฟมาตรฐานใช้ Trolox แทนสารสกัด และการหาค่า

blank ใช้ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 แทนสารสกัด ค่าที่ได้คำนวณแสดงเป็นปริมาณของ Trolox ในหน่วยไมโครโมลต่อตัวอย่างสด 100 กรัม

12. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan (Duncan's Multiple Range Test, DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลและวิจารณ์

การศึกษานี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งเป็นการศึกษาผลของการเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อมต่อการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณควอเซติน แคมป์เฟอร์อล เกทเทกิน และกรดแกลลิกที่วัดด้วยวิธี HPLC และการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระที่วัดด้วยวิธี DPPH และ ORAC โดยใช้ตัวอย่างมะขามป้อมที่มีการควบคุมให้เกิดสีน้ำตาลในระยะเวลาแตกต่างกันรวม 4 ระยะเวลา ซึ่งตัวอย่างทั้งสี่มีการเกิดสีน้ำตาลที่ต่างกัน โดยทราบได้จากค่า BI ที่แตกต่างกัน แล้วนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างกับตัวอย่างที่ไม่เกิดสีน้ำตาล เพื่อศึกษาว่าการเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อมส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวหรือไม่ และมีผลดีหรือเสียเช่นไร ในการนำมะขามป้อมไปบริโภคสดหรือแปรรูป เพื่อให้ได้ประโยชน์จากสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ส่วนที่สองเป็นการศึกษาผลของอายุการเก็บเกี่ยวมะขามป้อมต่อการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณควอเซติน แคมป์เฟอร์อล เกทเทกิน และกรดแกลลิกที่วัดด้วยวิธี HPLC และการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระที่วัดด้วยวิธี DPPH และ ORAC โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างมะขามป้อมที่มีอายุการเก็บเกี่ยวแตกต่างกัน 4 ระดับอายุ เพื่อเป็นการศึกษาว่าอายุการเก็บเกี่ยวมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมากหรือน้อยเพียงใด และหากต้องการใช้ประโยชน์จากสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์นี้ ควรใช้มะขามป้อมในช่วงอายุเช่นไร

1. ผลของการเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อมต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน

1.1 ลักษณะและองค์ประกอบของมะขามป้อม

มะขามป้อมที่นำมาทำการทดลองเป็นมะขามป้อมชนิดผลเล็ก มีขนาดผลประมาณ 2.5 x 2.5 x 2.5 เซนติเมตร ผลค่อนข้างกลม สีเขียวอ่อน เนื้อหนา สีเขียวอมเหลือง ฉ่ำน้ำ มีเส้นพาดกลางผล 6 เส้น เนื้อสามารถแบ่งได้เป็น 6 พู ดังภาพที่ 12 มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 2.49 และมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total Soluble Solid) เป็น 11.5



ภาพที่ 12 มะขามป้อมที่ใช้ในการทดลอง

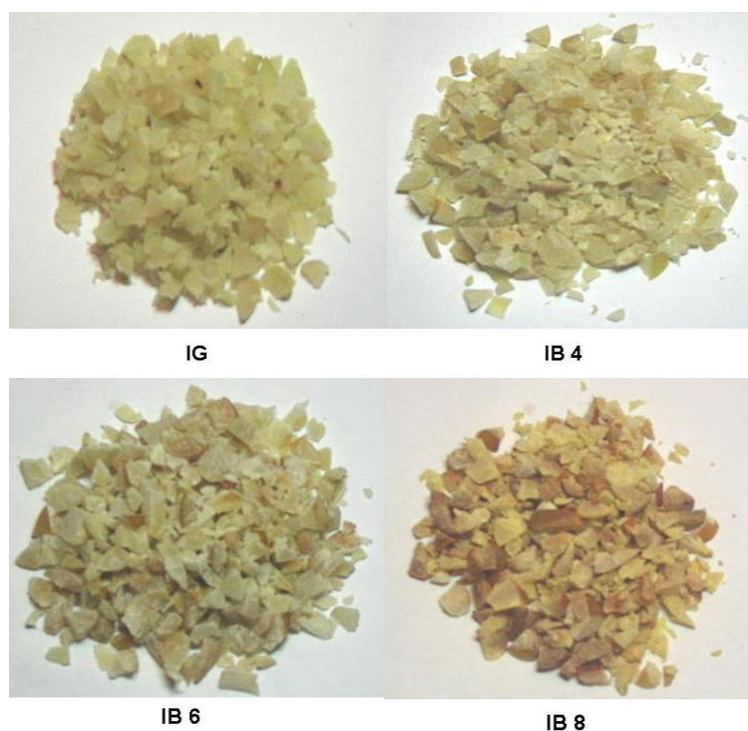
เมื่อนำมะขามป้อมที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง บด และร่อนผ่านตะแกรงร่อน ขนาด 35 mesh แล้ว (มีความชื้นร้อยละ 7.72) มาหาปริมาณน้ำ โปรตีน ไขมัน เส้นใย เถา และ คาร์โบไฮเดรต เพื่อหาค่าประกอบทางเคมีของมะขามป้อม แล้วคำนวณให้ได้เป็นปริมาณสารในส่วน of ผลสดที่รับประทานได้ 100 กรัม ได้ผลดังตารางที่ 6 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่วิเคราะห์ของ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข (2545)

ตารางที่ 6 องค์ประกอบทางเคมี (Proximate) ของมะขามป้อมพันธุ์พื้นเมืองชนิดผลเล็กที่นำมาใช้ในการศึกษา

สารอาหาร	ปริมาณที่พบในส่วนที่รับประทานได้ 100 กรัม (กรัม)
น้ำ	84.14
โปรตีน	0.65
ไขมัน	0.03
เส้นใย	1.60
เถา	0.48
คาร์โบไฮเดรต	13.10

1.2 สีของมะขามป้อมหลังการทำให้เกิดสีน้ำตาล

มะขามป้อมสดที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้ว มีสีเขียวอมเหลือง ลักษณะฉ่ำน้ำ ดังแสดงในภาพที่ 13 เมื่อทำให้เกิดสีน้ำตาลนาน 4, 6 และ 8 ชั่วโมง จะมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น และมีลักษณะฉ่ำน้ำลดลงเป็นลำดับ โดยมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมง มีสีน้ำตาลเข้มที่สุด มะขามป้อมทั้ง 4 สภาวะเมื่อผ่านการทำแห้ง บด และร่อนแล้วจะมีสีที่แตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 14 เมื่อนำมาวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสีในระบบ CIE Lab* ได้ค่าความสว่าง (L^*), ค่าสีแดง (a^*) และค่าสีเหลือง (b^*) แล้วคำนวณเป็นค่าความแตกต่างของสี (ΔE) และค่า Browning Index (BI) เพื่อให้เหมาะสมต่อการเปรียบเทียบการเกิดสีน้ำตาลในผลไม้ ได้ผลตารางที่ 7



ภาพที่ 13 สีและลักษณะของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8) ก่อนการทำแห้ง



ภาพที่ 14 สีของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8) หลังการทำแห้ง

ตารางที่ 7 ค่าสีและค่า BI ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

Sample	L*	a*	b*	ΔE	BI
IG	85.98	-1.94	17.67	-	-
IB4	78.97	2.36	21.63	9.18 ^c	1.00 ^c
IB6	76.46	3.82	26.10	14.04 ^b	2.87 ^b
IB8	72.44	5.01	24.14	16.56 ^a	4.11 ^a

หมายเหตุ 1. ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. L* แสดงค่าความสว่าง

a* ค่าบวก (+) แสดงค่าสีแดง ค่าลบ (-) แสดงค่าสีเขียว

b* ค่าบวก (+) แสดงค่าสีเหลือง ค่าลบ (-) แสดงค่าสีน้ำเงิน

จากตารางที่ 7 พบว่าเมื่อเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลมากขึ้น ตัวอย่างจะมีค่าความสว่างลดน้อยลง มีค่าสีแดงมากขึ้น และมีค่าสีเหลืองมากขึ้น ทำให้สีโดยรวมมีสีเข้มขึ้น และเปลี่ยนไปในโทนสีน้ำตาล ซึ่งมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมง มีสีเข้มที่สุด เมื่อคำนวณเป็นค่า ΔE และ Browning Index แล้ว พบว่ามะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8) มีค่าสีที่แตกต่างจากมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG) อย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีค่าแตกต่างกันมากขึ้นเป็นลำดับ โดยค่า ΔE ของมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 4, 6 และ 8 ชั่วโมง มีค่าเป็น 9.18, 14.04 และ 16.56 ตามลำดับ ส่วนค่า Browning Index ของมะขามป้อมทั้งสามตัวอย่างเป็น 1.00, 2.87 และ 4.11 ตามลำดับ ซึ่งมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลทั้งสามสภาวะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

1.3 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic) ในมะขามป้อม

นำมะขามป้อมทั้ง 4 ตัวอย่าง คือมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG) เกิดสีน้ำตาล 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8) ที่ผ่านการสกัดแล้ว ไปวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด นำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก คำนวณเป็นมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด เพื่อเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล และเกิดสีน้ำตาลในระดับที่แตกต่างกัน พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณที่เปลี่ยนแปลงไปแสดงในตารางที่ 8 โดยมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาลมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 1,790.4 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด เมื่อมะขามป้อมถูกทำให้เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง ส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เป็น 1,923.5 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด คิดเป็นเพิ่มขึ้นจากมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาลร้อยละ 7.4 ส่วนเมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 6 และ 8 ชั่วโมงมีปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 8.6 และ 17.8 ตามลำดับจากแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงดังแสดงในภาพที่ 15 พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีแนวโน้มโดยรวมเพิ่มขึ้นเมื่อมะขามป้อมเกิดสีน้ำตาลมากขึ้น คือมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง และมีค่าเพิ่มขึ้นอีกเมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง ($p \geq 0.05$) หลังจากนั้นจึงมีค่าเพิ่มขึ้นอีกอย่างชัดเจนเมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 17.8 จากมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล

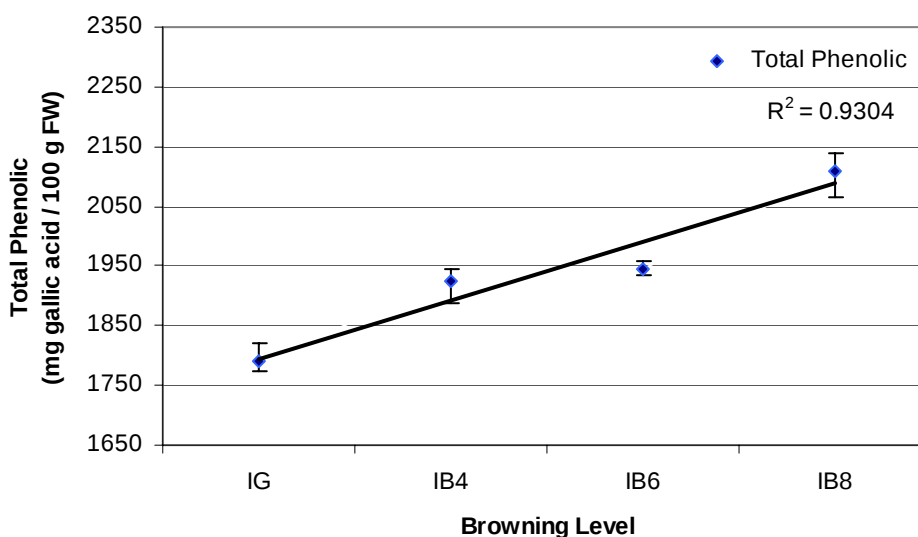
การเพิ่มขึ้นของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในมะขามป้อมเมื่อเกิดสีน้ำตาลมากขึ้นนั้น มีสาเหตุมาจากการเพิ่มขึ้นของสารประกอบฟีนอลิกที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเกิดสีน้ำตาล (browning reaction) ในกระบวนการเกิดสีน้ำตาลจะมีสารประกอบฟีนอลิกส่วนหนึ่งเปลี่ยนเป็นสารสีน้ำตาล (browning pigment) และยังมีอีกส่วนหนึ่งที่เปลี่ยนไปเป็นสารประกอบฟีนอลิกเริ่มต้นหรือเปลี่ยนเป็นสารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่นที่สามารถวัดได้ด้วยวิธีการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เช่นเดียวกับการทดลองนี้ ส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่วัดได้ในมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลมีค่ามากขึ้นกว่ามะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล ซึ่งกรณีหลังนี้สามารถพบได้บ่อยในผลไม้ที่มีวิตามินซีเป็นองค์ประกอบ หรือฟลาโวนอยด์ที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ (flavonoid glycoside) ได้แก่

ควอเซตินหรือแคมพ์เฟอร์อลไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบ (Robards *et al.*, 1999) ซึ่งมะขามป้อมมีทั้งวิตามินซีและควอเซตินไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบ (นันทวัน, 2539)

ตารางที่ 8 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8) และปริมาณที่เพิ่มขึ้น

ตัวอย่าง	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด)	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่เพิ่มขึ้น	
		มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด	ร้อยละ
IG	1,790.4 ^c	-	-
IB4	1,923.5 ^b	133.1	7.4
IB6	1,943.9 ^b	153.5	8.6
IB8	2,108.6 ^a	318.2	17.8

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวดังหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 15 แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

การเพิ่มขึ้นของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในการทดลองนี้ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Vina and Chaves (2006) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในกิ่งชายฝรั่ง (Celery) ที่เกิดสีน้ำตาลขณะเก็บในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 10 °ซ โดยขณะเก็บไว้นานขึ้นทำให้เกิดสีน้ำตาลมากขึ้น เมื่อวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดพบว่ามีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อเกิดสีน้ำตาลมากขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Durmaz and Alpaslan (2007) ในเนื้อแอปริคอตที่ผ่านการให้ความร้อน (roasted apricot kernel) พบว่าปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดสีน้ำตาลมากขึ้น ดังนั้นจึงอาจบอกได้ว่าหากมะขามป้อมถูกปล่อยให้เกิดสีน้ำตาล ซึ่งอาจเกิดขึ้นในช่วงกระบวนการเก็บเกี่ยว หรือระหว่างกระบวนการผลิตจะไม่ส่งผลเสียต่อผลิตภัณฑ์นั้นๆ ในเชิงปริมาณสารที่มีประโยชน์ เช่น ฟีนอลิก เพราะการเกิดสีน้ำตาลจะส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกเพิ่มมากขึ้น

1.4 ปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid content) ในมะขามป้อม

นำมะขามป้อมทั้ง 4 ตัวอย่าง คือมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG) เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8) ที่ผ่านการสกัดแล้ว มาวัดปริมาณ ฟลาโวนอยด์ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของคาเท킨 แล้วคำนวณเป็นมิลลิกรัมเคทเทคินต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด เพื่อเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ในมะขามป้อมที่ไม่เกิด และเกิดสีน้ำตาลที่เวลาต่างๆ กัน ซึ่งปริมาณฟลาโวนอยด์มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อมะขามป้อมมีการเกิดสีน้ำตาลมากขึ้น

ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่วัดได้ และปริมาณที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นแสดงในตารางที่ 9 โดยมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาลมีค่าปริมาณฟลาโวนอยด์เป็น 143.1 มิลลิกรัมเคทเทคินต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด เมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง พบว่ามะขามป้อมมีปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นจากมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 148.2 มิลลิกรัมเคทเทคินต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด มะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง มีปริมาณฟลาโวนอยด์ลดลงเล็กน้อย และเมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมงพบว่าปริมาณ ฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) เป็น 157.8 มิลลิกรัมเคทเทคินต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด คิดเป็นเพิ่มขึ้นร้อยละ 10.3 จากมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล

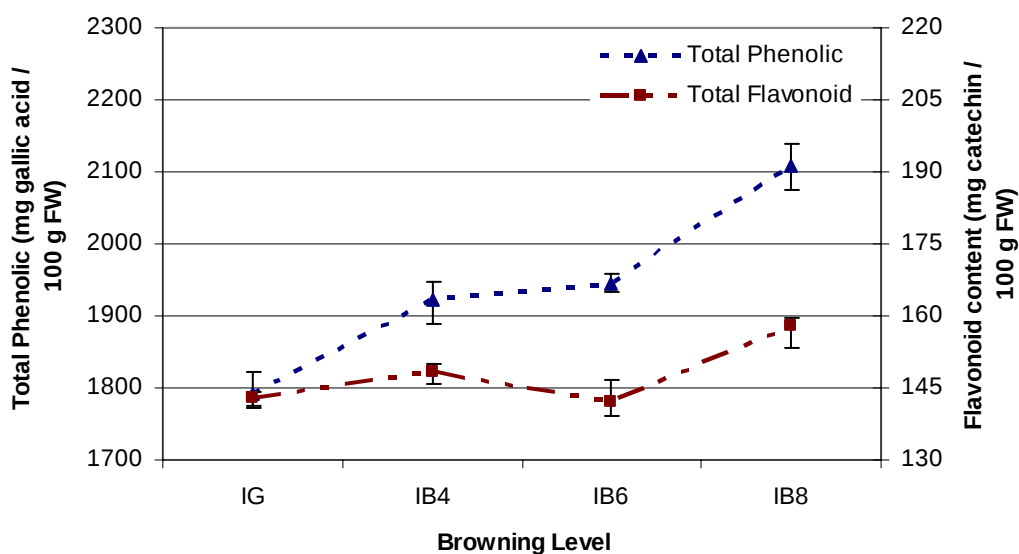
ตารางที่ 9 ปริมาณฟลาโวนอยด์ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

ตัวอย่าง	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัมเคทเทคินต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด)
IG	143.1 ^c
IB4	148.2 ^b
IB6	142.1 ^c
IB8	157.8 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่าง
นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การเพิ่มขึ้นของปริมาณฟลาโวนอยด์ระหว่างการเกิดสีน้ำตาลนั้น อาจมาจากสาเหตุเดียวกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณฟีนอลิกระหว่างการเกิดสีน้ำตาล ดังแสดงในภาพที่ 16 คือในผลไม้ที่มีองค์ประกอบส่วนหนึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ เช่น คิวเซติน หรือแคมป์เฟอร์อลที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ หรือมีวิตามินซีเป็นองค์ประกอบจะมีโอกาสที่สารจำพวกฟีนอลิก หรือฟลาโวนอยด์จะเปลี่ยนกลับมาเป็นสารเดิม คือสารฟีนอลิกหรือฟลาโวนอยด์ได้อีกครั้งระหว่างการเกิดสีน้ำตาล (Robards *et al.*, 1999) ซึ่งมะขามป้อมมีทั้งวิตามินซีและ คิวเซติน ไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบ (นันทวัน, 2539)

สาเหตุที่ปริมาณฟลาโวนอยด์มีปริมาณลดลงเล็กน้อยเมื่อมะขามป้อมเกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมงนั้น เนื่องมาจากการลดลงตามธรรมชาติของสารฟลาโวนอยด์บางชนิด เช่นในการทดลองของ Del Caro *et al.* (2004) ซึ่งทำการทดลองเก็บเนื้อส้มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่าเมื่อเริ่มต้นการทดลองมีปริมาณนารูทิน (สารฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่ง) น้อยที่สุด เมื่อเก็บนาน 4 วันมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากเก็บนาน 8 วันมีปริมาณลดลงมาใกล้เคียงกับเมื่อเริ่มต้นการทดลอง และมีค่าเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่งเป็นมีปริมาณมากที่สุดเมื่อเก็บไว้นาน 12 วัน



ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟลาโวนอยด์ในผักหรือผลไม้ระหว่างการเกิดสีน้ำตาลนั้น มีผู้ศึกษาน้อย ส่วนหนึ่งของการศึกษาเป็นการเปลี่ยนแปลงของฟลาโวนอยด์ในเห็ดหอมที่เกิดสีน้ำตาลในสภาวะที่มีความร้อนร่วมด้วย (Choi *et al.*, 2006) โดยเห็ดหอมที่มีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 10 นาที มีปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นจากเห็ดหอมสด และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอีกเมื่อให้ความร้อนนาน 30 นาที ซึ่งความร้อนเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลในเห็ดหอม

ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมะขามป้อมเกิดสีน้ำตาล โดยมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดสีน้ำตาลตั้งแต่ 4 ชั่วโมง ถึงแม้จะมีปริมาณลดลงเมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง แต่ก็ยังมีความแตกต่างจากมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล และยังเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อมะขามป้อมเกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมง ดังนั้นหากผักหรือผลไม้ เช่นมะขามป้อมเกิดสีน้ำตาลระหว่างกระบวนการต่างๆ ในการเก็บเกี่ยวหรือการผลิต จะยังคงมีปริมาณฟลาโวนอยด์ไม่น้อยไปกว่ามะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล และหากต้องการให้ฟลาโวนอยด์มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น อาจทำให้มะขามป้อมเกิดสีน้ำตาลมากขึ้นตั้งแต่ 4 ชั่วโมงเป็นต้นไป แต่ถ้าต้องการให้ปริมาณเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดก็อาจทำให้เกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมง เนื่องจากฟลาโวนอยด์มีปริมาณมากขึ้นเมื่อเกิดสีน้ำตาลนานขึ้น

1.5 ปริมาณควอเซติน แคมพ์เฟอร์อล เคเพเทกิน และกรดแกลลิกในมะขามป้อมที่วัดด้วยวิธี HPLC

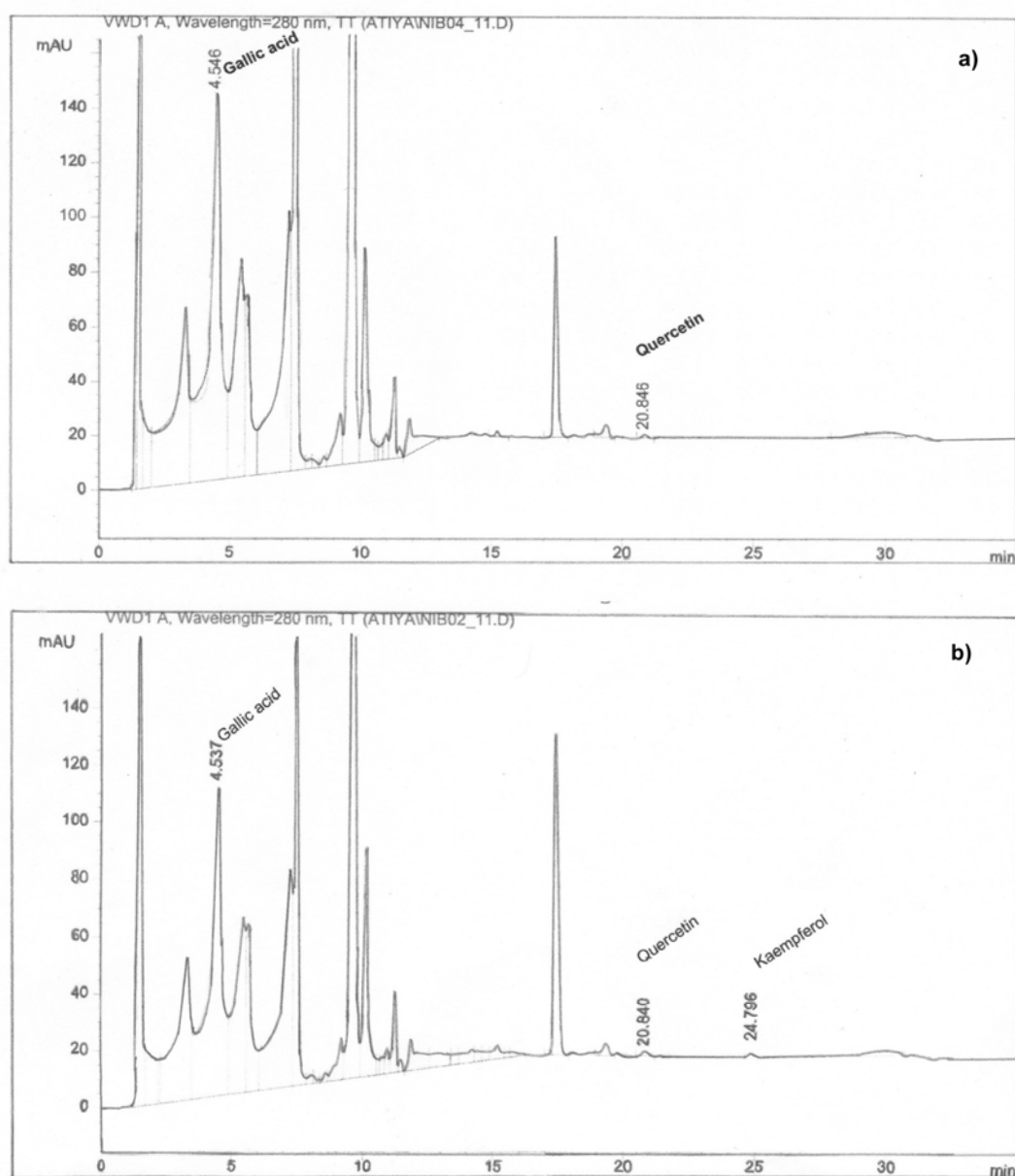
เมื่อนำตัวอย่างมะขามป้อมที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีการสกัดสำหรับ HPLC ตามวิธีการทดลองข้อ 8 แล้ว มาวิเคราะห์หาปริมาณควอเซติน แคมพ์เฟอร์อล เคเพเทกิน และกรดแกลลิก ด้วย HPLC ตามวิธีการวิเคราะห์ดังวิธีการทดลองข้อ 9 ซึ่งวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการจำแนกและหาปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยเฉพาะควอเซติน และแคมพ์เฟอร์อล และมีการปรับสภาวะในการวิเคราะห์ให้เหมาะสมกับการจำแนก และการหาปริมาณสารอื่น เช่นกรดแกลลิก และเคเพเทกินอีกด้วย

ตารางที่ 10 ปริมาณควอเซตินของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8) และปริมาณที่เพิ่มขึ้น

ตัวอย่าง	ปริมาณควอเซติน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด)	ปริมาณควอเซตินที่เพิ่มขึ้น	
		มิลลิกรัมควอเซตินต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด	ร้อยละ
IG	2.8 ^d	-	-
IB4	3.4 ^c	0.6	21.4
IB6	4.2 ^b	1.4	50.0
IB8	4.5 ^a	1.7	60.7

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากผลการทดลองเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในภาพที่ 17 ปริมาณฟลาโวนอยด์ ซึ่งได้แก่ควอเซตินและแคมพ์เฟอร์อล พบว่าในมะขามป้อมมีทั้งควอเซติน และแคมพ์เฟอร์อล ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ของนันทวัน (2539) โดยจากการทดลองนี้พบว่าควอเซตินสามารถพบได้ในมะขามป้อมทุกสภาวะ ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วนแคมพ์เฟอร์อลสามารถพบได้ในมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมงเท่านั้น และพบในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณควอเซตินที่พบ ดังแสดงในตารางที่ 11 ในขณะที่ไม่สามารถตรวจเคเพเทกินในมะขามป้อมสภาวะใดเลย ดังแสดงในตารางที่ 11



ภาพที่ 17 โครมาโทแกรมของ a) มะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง และ b) มะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง

ตารางที่ 11 ปริมาณแอมป์เฟอร์อลและเคเทคินของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

ตัวอย่าง	แอมป์เฟอร์อล	เคเทคิน
	(มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด)	(มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด)
IG	ND	ND
IB4	ND	ND
IB6	0.2	ND
IB8	ND	ND

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่าง

นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ND หมายถึง สารมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถวัดได้

ปริมาณควอเซตินจะเพิ่มขึ้นเมื่อมะขามป้อมเกิดสีน้ำตาลมากขึ้น โดยมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาลมีควอเซติน 2.8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด เมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง พบว่าควอเซตินมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เป็น 3.4 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ซึ่งเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 21.4 เมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง ควอเซตินมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ($p < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 50.0 จากมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล เป็น 4.2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด และเมื่อมะขามป้อมเกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมง ควอเซตินมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เป็น 4.5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ซึ่งเพิ่มขึ้นจากมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาลถึงร้อยละ 60.7 แต่การเปลี่ยนแปลงปริมาณควอเซตินของมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นจากมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมงไม่มากนักหรือค่อนข้างคงที่ คือเพิ่มขึ้นเพียง 0.3 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด คิดเป็นเพิ่มขึ้นเพียงร้อยละ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณควอเซตินเป็นไปในทิศทางเดียวกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ที่มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดสีน้ำตาลนานขึ้น

แอมป์เฟอร์อลเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอลที่สามารถพบได้ในผักและผลไม้หลายชนิด แต่พบได้ในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับควอเซตินซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอลเช่นกัน

ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ มะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมงเป็นเพียงตัวอย่างเดียวเท่านั้นที่สามารถพบแคมพ์เฟอร์รอลได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อเกิดสีน้ำตาลแล้วแคมพ์เฟอร์รอลมีปริมาณเพิ่มขึ้นในทิศทางใกล้เคียงกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณควอเซตินซึ่งเป็นสารในกลุ่มเดียวกัน โดยแคมพ์เฟอร์รอลมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากปริมาณที่น้อยจนไม่สามารถวัดได้ในตัวอย่างมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล และเกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง เป็นปริมาณที่สามารถวัดได้เมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง คือ 0.2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด และมีปริมาณที่ค่อนข้างคงที่หรือลดลงเล็กน้อยจนไม่สามารถวัดได้เช่นเดิมเมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมง ส่วนเคทเทกินซึ่งเป็นสาร ฟลาโวนอยด์ ชนิดหนึ่ง ไม่สามารถตรวจวัดได้ในมะขามป้อมสภาวะใดเลย โดยเคทเทกินเป็นสารที่พบได้มากในใบชา (Watson, 2001)

ดังที่มีผู้ศึกษามาก่อนหน้านี้พบว่าผักและผลไม้หลายชนิดมีปริมาณแคมพ์เฟอร์รอลค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณควอเซตินที่พบ ดังแสดงในตารางที่ 12 โดยปริมาณที่พบขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของผักและผลไม้ ซึ่งจากผลการศึกษาดังตารางที่ 12 มีอัตราส่วนคิดเป็นร้อยละของแคมพ์เฟอร์รอลเมื่อเทียบกับควอเซตินตั้งแต่ร้อยละ 0.39 ในหัวหอมใหญ่ ถึงร้อยละ 6.27 ในผักกาดหอม ตามการทดลองของ Hertog *et al.* (1992a) ในการทดลองครั้งนี้พบแคมพ์เฟอร์รอลในมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมงร้อยละ 4.76 ของควอเซตินที่พบ

จากภาพที่ 18 พบว่ามะขามป้อมมีปริมาณกรดแกลลิกลดลงเมื่อมีการเกิดสีน้ำตาลนานขึ้นเป็นลำดับ โดยมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง มีค่าน้อยที่สุด มะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาลมีปริมาณกรดแกลลิกมากกว่ามะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลทุกสภาวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาลพบว่ามีกรดแกลลิก 931.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ในขณะที่มะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง มีกรดแกลลิกลดลงเป็น 642.8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ซึ่งคิดเป็นมีปริมาณลดลงร้อยละ 31.0 และในมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง มีปริมาณกรดแกลลิกลดลงอีกเป็น 524.9 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด คิดเป็นลดลงร้อยละ 43.6 จากมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล แต่ในมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมง มีปริมาณกรดแกลลิกมากกว่ามะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง คือ 619.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด คิดเป็นลดลงจากมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาลร้อยละ 33.5

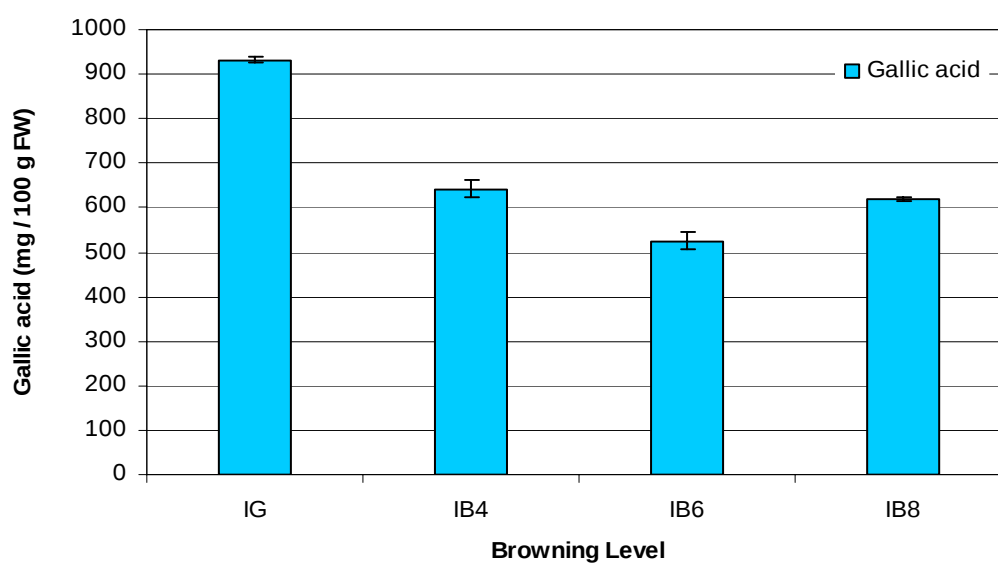
ตารางที่ 12 ปริมาณควอเซตินและแคมป์เฟอร์อลที่พบในผักและผลไม้

ตัวอย่าง	ปริมาณ ควอเซติน	ปริมาณ แคมป์เฟอร์อล	เอกสารอ้างอิง
หัวหอมใหญ่ (onion) <i>Allium cepa</i> L	5,076 ^a 347 ^b	<20 ^a <2 ^b	Hertog <i>et al.</i> (1992a) Hertog <i>et al.</i> (1992b)
ผักกาดหอม (lettuce) <i>Lactuca sativa</i> L	319 ^a	<20 ^a	Hertog <i>et al.</i> (1992a)
แครนเบอร์รี่ (cranberry) <i>Vaccinium macrocarpon</i> Ait	1,485 ^a	<20 ^a	Hertog <i>et al.</i> (1992a)
บลูเบอร์รี่ (blueberry) <i>Vaccinium corymbosum</i>	24 ^b	ND	Häkkinen <i>et al.</i> (1999)
แบล็กเคอร์เรนท์ (blackcurrent) <i>Ribes nigrum</i> Öjebryn	44 ^b	ND	Häkkinen <i>et al.</i> (1999)

หมายเหตุ ^a มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมในผลแห้ง 1 กิโลกรัม

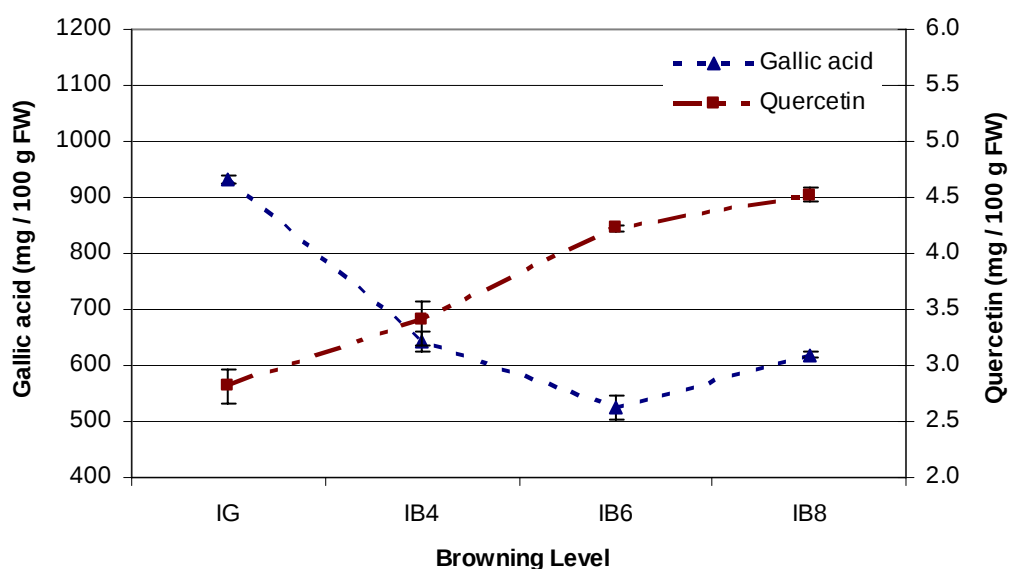
^b มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมในผลสด 1 กิโลกรัม

ND หมายถึง สารมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถวัดได้



ภาพที่ 18 ปริมาณกรดแกลลิกของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแกลลิกเป็นไปในทิศทางตรงข้ามกับการวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เป็นเพราะวิธีการวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะวัดปริมาณฟีนอลิกโดยรวมทุกชนิด แต่วิธีการวัดปริมาณกรดแกลลิกด้วยวิธี HPLC จะจำเพาะกับการหาปริมาณกรดแกลลิกเท่านั้น ไม่รวมฟีนอลิกชนิดอื่นทำให้ค่าที่ได้อาจไม่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยเมื่อเกิดสีน้ำตาลนานขึ้น ส่งผลให้ปริมาณกรดแกลลิกลดลง ขณะเดียวกันสารอื่นมีปริมาณเพิ่มขึ้น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจึงมีปริมาณเพิ่มขึ้น การลดลงของปริมาณกรดแกลลิกระหว่างปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิกสามารถสลายตัวได้ในระหว่างกระบวนการเกิดสีน้ำตาล (ToMas-Barberan and Robins, 1997) นอกจากนั้นกรดแกลลิกยังสามารถเปลี่ยนไปเป็นสารพอลิฟีนอลิกโครงสร้างอื่นได้อีกด้วย ดังเช่นการทดลองของ Kulkarni and Aradhya (2005) ที่ทำการทดลองในผลทับทิมพบว่าช่วงเวลาที่ฟีนอลิกมีปริมาณน้อยเป็นช่วงเวลาที่แอนโทไซยานินมีปริมาณมาก เนื่องมาจากสารฟีนอลิกเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็นแอนโทไซยานิน และในการทดลองครั้งนี้พบว่าการลดลงของกรดแกลลิกมีความสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณควอเซตินจึงบอกได้ว่าสาเหตุหนึ่งที่ปริมาณกรดแกลลิกลดลงเนื่องมาจากกรดแกลลิกมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็นควอเซติน ดังแสดงในภาพที่ 19



ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแกลลิกและควอเซตินของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

การเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อมส่งผลให้ปริมาณควอเซติน และแคมพ์เฟอร์อลเพิ่มขึ้น แต่ส่งผลให้ปริมาณกรดแกลลิกลดลง ทำให้ยังไม่สามารถบอกได้อย่างแน่ชัดว่าเมื่อมะขามป้อมเกิด

สีน้ำตาลแล้วจะส่งผลดีหรือผลเสียต่อผลิตภัณฑ์ หากต้องการสกัดกรดแกลลิกจากมะขามป้อม ควรสกัดในมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล แต่หากต้องการสกัดควอเซติน ควรให้มะขามป้อมเกิดสีน้ำตาลก่อนอย่างน้อย 4 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ปริมาณควอเซตินที่มากขึ้น ในการทดลองครั้งนี้อกจากสนใจปริมาณของสารฟีนอลิก เช่นกรดแกลลิก และสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น ควอเซตินและแคมป์เฟอรอลแล้ว ยังสนใจคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในเชิงเป็นสารต้านออกซิเดชัน ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของมะขามป้อมทั้งที่ไม่เกิดสีน้ำตาล และเกิดสีน้ำตาลที่เวลาต่างกัน เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของมะขามป้อมที่สภาวะต่างๆ

1.6 กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในมะขามป้อมเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH

นำสารสกัดมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล และเกิดสีน้ำตาลนาน 4, 6 และ 8 ชั่วโมงตามวิธีการทดลองข้อ 5 เจือจางให้แต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้นแตกต่างกันแล้วทำการวัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ตามวิธีการทดลองข้อ 10 นำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นค่า % radical scavenging activity นำค่าที่ได้ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมในสารสกัดมะขามป้อม 1 มิลลิลิตร) ที่สามารถทำให้ค่า % radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) หลังจากนั้นนำค่า IC_{50} ที่ได้มาคำนวณเป็นค่าประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

ตัวอย่าง	ประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน
	Antiradical Efficiency, AE
IG	0.094 ^a
IB4	0.092 ^a
IB6	0.080 ^b
IB8	0.090 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ค่า AE บ่งบอกถึงความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน หากมีค่ามากแสดงว่ามีประสิทธิภาพมาก ดังในการทดลองนี้ทำการศึกษาถึงผลของการเกิดสีน้ำตาลต่อกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในมะขามป้อม พบว่ามะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาลมีค่า AE เป็น 0.094, มะขามป้อมที่เกิดมีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมงมีค่าเป็น 0.092 และมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมง มีค่าเป็น 0.090 ซึ่งมะขามป้อมทั้งสามสภาวะมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ส่วนในตัวอย่างมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมงมีค่า AE น้อยกว่าตัวอย่างอื่นเล็กน้อย คือมีค่าเป็น 0.080 ซึ่งแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่า AE มะขามป้อมมีแนวโน้มเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแกลลิกเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC คือมีค่าน้อยที่สุดเมื่อมะขามป้อมเกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง และมีค่าเพิ่มขึ้นในตัวอย่างที่เกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมง จึงกล่าวได้ว่าปริมาณกรดแกลลิกมีผลต่อกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันเมื่อวัดด้วยวิธีด้วยวิธี DPPH มากกว่าปริมาณควอเซติน

ผลของการเกิดสีน้ำตาล (ที่ไม่ได้มีความร้อนร่วมด้วย) ต่อกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน มีผู้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้พอสมควร ส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ของกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันที่วัดด้วยวิธี DPPH กับปริมาณสารฟีนอลิกชนิดต่างๆ ก็มีไม่มากนัก ในการทดลองของ Rangkadilok *et al.* (2007) ซึ่งได้ศึกษากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในเนื้อและเมล็ดลำไยพันธุ์ต่างๆ พบว่าในเนื้อลำไยซึ่งมีปริมาณกรดแกลลิกน้อยที่สุด มีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันน้อยที่สุดเช่นกัน โดยในการทดลองนี้กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของกรดแกลลิก เนื่องจากสารสกัดลำไยที่มีสารประกอบฟีนอลิก เช่นกรดแกลลิกในปริมาณมาก จะส่งผลให้มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากด้วย

1.7 กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในมะขามป้อมเมื่อวัดด้วยวิธี ORAC

นำสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดตามข้อ 11 ที่แยกเป็นส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) มาวิเคราะห์ตามวิธีการทดลองข้อ 11 ได้เป็นค่ากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันของส่วนที่ชอบไขมัน (L-ORAC) และส่วนที่ชอบน้ำ (H-ORAC) เพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารที่ชอบไขมัน และสารที่ชอบน้ำ แล้วนำค่าที่ได้ทั้งสองส่วนมารวมกันเป็นค่ากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งหมด (Total Antioxidant Capacity : TAC) มีหน่วยเป็นไมโครโมลของสาร Trolox (TE) ในผลสด 100 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 14 สาเหตุที่ต้องทำการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันทั้งในส่วนที่ชอบไขมัน และส่วน

ที่ชอบน้ำ เนื่องจากต้องการทราบว่ นอกจากสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ละลายได้ในน้ำ แล้ว ยังมีสารอื่นหรือไม่ที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันเช่นกัน เช่น สารในกลุ่มที่ละลายในไขมัน

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า สารสกัดในส่วนที่ชอบไขมันมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดส่วนที่ชอบน้ำ ดังนั้น สารส่วนใหญ่ในมะขามป้อมที่มีความสามารถต้านออกซิเดชันเป็นสารที่ละลายได้ในน้ำ และสารที่มีอิทธิพลมากต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันเป็นสารที่ละลายได้ในน้ำเช่นกัน ซึ่งสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ก็เป็นสารที่ละลายในน้ำ จึงบอกได้ว่า สารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบในมะขามป้อมมีผลต่อความสามารถต้านออกซิเดชัน และปริมาณที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเกิดสีน้ตาลมีส่วนในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถต้านออกซิเดชัน ค่ากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งหมด (TAC) ของมะขามป้อมที่เน่า โน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดสีน้ตาลมากขึ้น โดยค่ามีค่าเพิ่มขึ้นจากมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ตาลเมื่อเกิดสีน้ตาลนาน 4 ชั่วโมง โดยเพิ่มขึ้นจาก 78.2 เป็น 80.4 ไมโครโมลของสาร Trolox ในผลสด 100 กรัม และเมื่อเกิดสีน้ตาลนาน 6 ชั่วโมงมีค่าเพิ่มขึ้นจากมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ตาลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ มีค่า 98.3 ไมโครโมลของสาร Trolox ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด แต่เมื่อเกิดสีน้ตาลนาน 8 ชั่วโมง มีค่าลดลงเล็กน้อยเป็น 90.3 ไมโครโมลของสาร Trolox ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด

ตารางที่ 14 ค่า L-ORAC, H-ORAC และ TAC ที่วัดด้วยวิธี ORAC ของมะขามป้อมไม่เกิดสีน้ตาล (IG), เกิดสีน้ตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

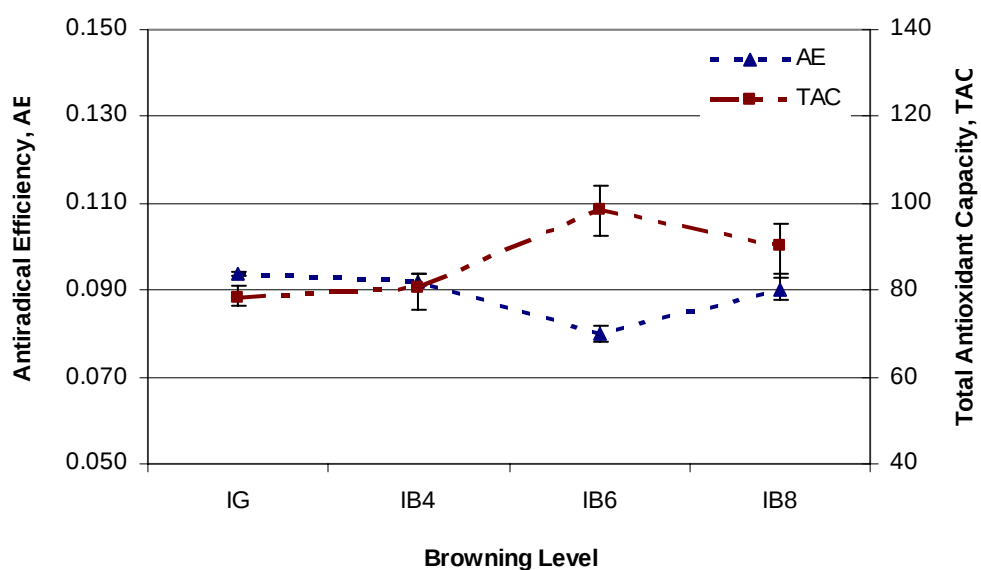
(หน่วย : ไมโครโมลของสาร Trolox ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด)

ตัวอย่าง	L-ORAC	H-ORAC	TAC
IG	0.178 ^b	78.0 ^c	78.2 ^c
IB4	0.173 ^b	80.2 ^c	80.4 ^c
IB6	0.164 ^b	98.2 ^a	98.3 ^a
IB8	0.509 ^a	89.8 ^b	90.3 ^b

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่า TAC ก่อนข้างใกล้เคียงกับการเปลี่ยนแปลงของค่าฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ และปริมาณควอเซตินเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC คือมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดสีน้ำตาลมากขึ้น ดังเช่นในการทดลองของ Aaby *et al.* (2005) ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก และความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในสโตรเบอร์รี่ พบว่ากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันที่วัดด้วยวิธี ORAC มีแนวโน้มไปในทิศทางใกล้เคียงกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ แต่ไม่เหมือนกันเสียทีเดียว เนื่องจากกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันไม่ได้ขึ้นกับสารใดสารหนึ่งเท่านั้น แต่มีสารหลายชนิดที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

จากผลการทดลองเกี่ยวกับความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันทั้งสองวิธี พบว่าค่าจากทั้งสองวิธีมีทิศทางตรงข้ามกันดังแสดงในภาพที่ 20 คือค่า AE ที่วัดได้จากวิธี DPPH มีค่ามากที่สุดในขณะที่มะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล และมีค่าน้อยที่สุดในมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง ในทางกลับกันค่า TAC ที่วัดได้จากวิธี ORAC มีค่ามากที่สุดในขณะที่มะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง และมีค่าน้อยที่สุดในมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล ทำให้บอกได้ว่าในการวิเคราะห์สองวิธีนี้ มีปัจจัยที่ทำให้ผลการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีมีค่าไม่สอดคล้องกัน หากต้องการศึกษาว่าสภาวะการเกิดสีน้ำตาลแบบใดระหว่างเกิดสีน้ำตาล และไม่เกิดสีน้ำตาลจะส่งผลดีกว่า ซึ่งอาจทำได้โดยวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธีอื่น เพื่อยืนยันผล เช่นวิธี ABTS หรือ FRAP เป็นต้น แต่จากผลการทดลองข้างต้นอาจบอกได้ว่าเมื่อเกิดสีน้ำตาลแล้วน่าจะให้ผลที่ดีกว่า เนื่องจากปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณควอเซติน และค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันจากวิธี ORAC มีค่าเพิ่มมากขึ้น Rice-Evans *et al.* (1996) ได้ศึกษาโครงสร้างของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านออกซิเดชัน พบว่าสารฟีนอลิกมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันน้อยกว่าสารฟลาโวนอยด์ นอกจากนั้น Huang *et al.* (2005) ได้กล่าวไว้ว่าวิธี ORAC เป็นวิธีที่เหมาะสมในการเปรียบเทียบประโยชน์ต่อร่างกาย เนื่องจากเป็นวิธีวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันในร่างกาย และเหมาะสมกว่าวิธี DPPH เนื่องจากวิธี DPPH เหมาะในการวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันในพืชเท่านั้น ไม่เหมาะในการเปรียบเทียบผลดีต่อร่างกาย ดังนั้นหากระหว่างขั้นตอนการเก็บเกี่ยว หรือการผลัดก่อให้เกิดสีน้ำตาลก็จะไม่ส่งผลเสียต่อผลิตภัณฑ์ หรือถ้าอีกแง่หนึ่งหากต้องการให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพมากขึ้น อาจมีขั้นตอนการทำให้เกิดสีน้ำตาลเพื่อเพิ่มปริมาณสารต่างๆ เช่น ฟลาโวนอยด์ เป็นการเพิ่มคุณภาพ และเพิ่มมูลค่าให้แก่ผลิตภัณฑ์อีกด้วย



ภาพที่ 20 การเปลี่ยนแปลงค่า AE ที่วัดได้จากวิธี DPPH และค่า TAC ที่วัดได้จากวิธี ORAC ของมะขามป้อมไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

1.8 ผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation analysis) ของดัชนีการเกิดสีน้ำตาล ปริมาณสาร และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในมะขามป้อม

จากผลการวิเคราะห์ข้างต้น ได้แก่อำนาจการเกิดสีน้ำตาล (Browning Index, BI) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid content) ปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่วัดจากวิธี HPLC และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันที่วัดด้วยวิธี DPPH (AE) และ ORAC (TAC) นำค่าต่างๆ มาทำการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ เพื่อหาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงเมื่อเกิดสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ตารางค่าสหสัมพันธ์ระหว่างดัชนีการเกิดสีน้ำตาล ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณสารที่วัดจากวิธี HPLC และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันของมะขามป้อม

	BI	Phenolic	Flavonoid	Quercetin	Gallic acid	AE
Phenolic	0.858**					
Flavonoid	0.596**	0.748**				
Quercetin	0.977**	0.818**	0.522*			
Gallic acid	-0.748**	-0.639**	-0.209	-0.820**		
AE	-0.571*	-0.239	0.233	-0.655**	0.763**	
TAC	0.720**	0.392	0.094	0.711**	-0.648**	-0.799**

หมายเหตุ *, ** หมายความว่าค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นน้อยกว่า 0.05 และ 0.01 ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์พบว่า การเกิดสีน้ำตาลมีความสัมพันธ์กับปริมาณควอเซตินมากที่สุด ($r = 0.977$) และมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ($r = 0.858$), ค่ากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันที่วัดด้วยวิธี ORAC ($r = 0.720$) และปริมาณฟลาโวนอยด์ ($r = 0.596$) เป็นลำดับ แสดงว่าเมื่อมะขามป้อมเกิดสีน้ำตาลมากขึ้นจะส่งผลให้ค่าเหล่านี้เพิ่มขึ้นด้วย ในทางกลับกันการเกิดสีน้ำตาลมีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดแกลลิกและค่ากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันที่วัดด้วยวิธี DPPH ในทิศทางตรงข้าม ($r = -0.748, -0.571$ ตามลำดับ) หมายความว่าเมื่อมะขามป้อมเกิดสีน้ำตาลมากขึ้นจะส่งผลให้ค่าดังกล่าวลดลง ค่า AE จากวิธี DPPH มีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดแกลลิก ($r = 0.763$) จึงอาจกล่าวได้ว่าในกรณีการเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อมกรดแกลลิกเป็นตัวแทนที่ดีของการเปลี่ยนแปลงค่า AE จากวิธี DPPH ส่วนค่า TAC จากวิธี ORAC มีความสัมพันธ์กับปริมาณควอเซติน ($r = 0.711$) ดังนั้นควอเซตินจึงจัดว่าเป็นตัวแทนที่ดีของการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันที่วัดด้วยวิธี ORAC ในมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาล สำหรับมะขามป้อมการวัดค่า BI เป็นวิธีที่ง่ายในการทำนายการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณควอเซติน และความสามารถในการต้านออกซิเดชันเมื่อวัดด้วยวิธี ORAC

2. ผลของอายุการเก็บเกี่ยวของมะกอกน้ำต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกฟลาโวนอยด์และ กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน

2.1 ลักษณะและองค์ประกอบของมะกอกน้ำ

มะกอกน้ำที่ใช้ในการทดลองเป็นมะกอกน้ำพันธุ์ประเสริฐสุวรรณ หรือชื่อเดิมคือพันธุ์
แก้มแหม่ม อายุที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นอายุ 5, 6, 7 และ 8 เดือน หลังจากติดดอก อายุของ
มะกอกน้ำที่ชาวสวนนิยมเก็บเกี่ยวมาขายและนิยมนำมาแปรรูปเป็นมะกอกดอง คือมะกอกน้ำอายุ
ประมาณ 6 เดือน และมะกอกน้ำอายุประมาณ 7 เดือน นิยมนำมารับประทานในรูปผลสด ในการ
ทดลองครั้งนี้จึงศึกษามะกอกน้ำที่มีอายุอ่อนกว่าช่วงอายุที่เก็บเกี่ยวเป็นปกติ (5 เดือน), มะกอกน้ำ
ช่วงอายุที่เก็บเกี่ยวเป็นปกติ (6 เดือน) และช่วงอายุที่แก่กว่าอายุที่เก็บเกี่ยวเป็นปกติ (7 และ 8 เดือน)
เพื่อศึกษาถึงผลของอายุการเก็บเกี่ยวต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และ
กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน ผลมะกอกน้ำมีลักษณะเป็นผลรี ขนาดประมาณ 4 x 4 x 6
เซนติเมตร ดังแสดงในภาพที่ 21 โดยลักษณะของผลมะกอกน้ำอายุ 5 เดือน จะมีสีเขียวเข้ม เนื้อแข็ง
มะกอกน้ำอายุ 6 เดือน ผลมีสีเขียวอมเหลือง เนื้อค่อนข้างแข็ง และฟูเล็กน้อย มะกอกน้ำอายุ 7 เดือน
ผลมีส่วนที่เป็นสีแดงมากขึ้น ผลเริ่มนุ่มเล็กน้อย เนื้อนุ่มขึ้น เริ่มมีกลิ่น และมะกอกน้ำอายุ 8 เดือน
ผลจะมีส่วนที่เป็นสีแดงมากขึ้น ผลนุ่มมาก เนื้อค่อนข้างเละ มีกลิ่นแรงมากขึ้น



ภาพที่ 21 มะกอกน้ำที่ใช้ในการทดลอง

เมื่อนำมะกอกน้ำที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง บด และร่อนผ่านตะแกรกร่อนขนาด
35 mesh แล้ว (มีความชื้นร้อยละ 8.45) หาปริมาณน้ำ โปรตีน ไขมัน เส้นใย เถ้า และคาร์โบไฮเดรต
เพื่อหาองค์ประกอบทางเคมีของมะกอกน้ำ ได้ผลดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 องค์ประกอบทางเคมีของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)

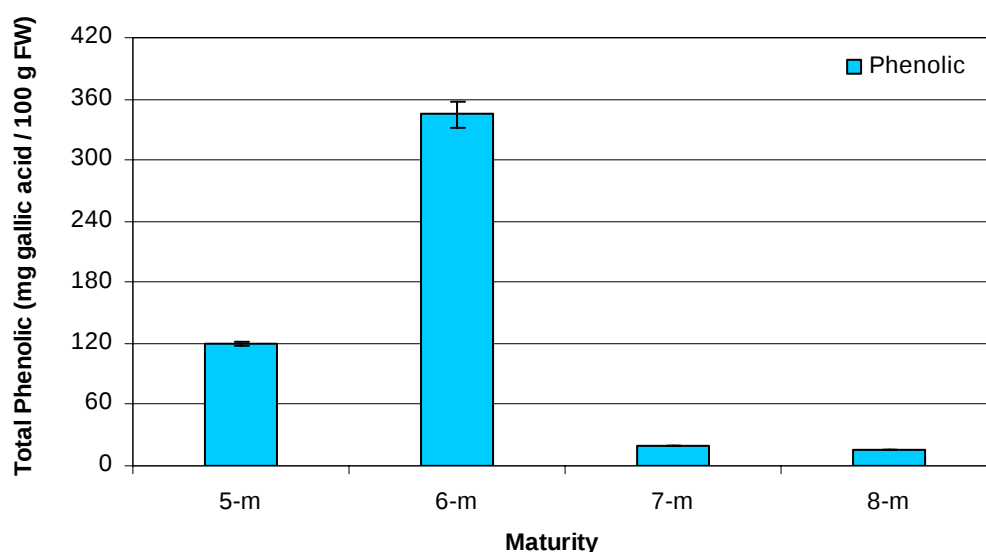
สารอาหาร	ปริมาณที่พบในส่วนที่รับประทานได้ 100 กรัม (กรัม)			
	5-m	6-m	7-m	8-m
น้ำ	84.98	85.55	86.91	85.62
โปรตีน	0.52	0.50	0.45	0.49
ไขมัน	0.31	0.44	0.24	0.30
เส้นใย	1.66	1.11	1.43	1.56
เถ้า	0.48	0.63	0.48	0.49
คาร์โบไฮเดรต	12.05	11.77	10.49	11.54

2.2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic) ในมะกอกน้ำ

นามะกอกน้ำทั้ง 4 สภาวะ คือมะกอกน้ำอ่อน (อายุ 5 เดือน, 5-m), มะกอกน้ำอายุปกติ (อายุ 6 เดือน, 6-m), มะกอกน้ำแก่ (อายุ 7 เดือน, 7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (อายุ 8 เดือน, 8-m) ที่ผ่านการสกัดตามวิธีการทดลองข้อ 5 แล้วไปวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดตามวิธีการทดลองข้อ 6 นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน แล้วคำนวณค่าเป็นหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกในมะกอกน้ำสด 100 กรัม เพื่อเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในมะกอกน้ำอายุต่างๆ พบว่าค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่ตรวจวัดได้แสดงในภาพที่ 22 โดยมะกอกน้ำอายุปกติ คืออายุ 6 เดือน มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด ($p < 0.05$) เป็น 345.8 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด และมะกอกน้ำอ่อน คืออายุ 5 เดือน มีค่าน้อยกว่ามะกอกน้ำอายุปกติ คือมีค่าเป็น 119.8 มิลลิกรัมกรด แกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ซึ่งคิดเป็นมีค่าน้อยกว่ามะกอกน้ำอายุปกติถึงร้อยละ 65.3 ส่วนมะกอกน้ำที่สุกมากขึ้นมีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัดได้แก่มะกอกน้ำแก่และแก่มาก คืออายุ 7 เดือน และ 8 เดือน มีค่าลดลงเป็นลำดับ และมีค่าแตกต่างจากมะกอกน้ำปกติ และมะกอกน้ำอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือมีค่า 19.8 และ 15.7 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด คิดเป็นมีค่าลดลงจากมะกอกน้ำปกติถึงร้อยละ 94.3 และ 95.5 ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่ามะกอกน้ำอายุปกติมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด ส่วนมะกอกน้ำอ่อนมีค่าน้อยกว่า และเมื่อมะกอกน้ำสุกมากขึ้นปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าลดลงอย่าง

เห็นได้ชัด ซึ่งเป็นธรรมชาติของผลไม้ส่วนใหญ่ที่ค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะลดลงเมื่อผลไม้สุกมากขึ้น โดยจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและค่อยๆ คงที่ในช่วงหลัง ในผลไม้ที่มีสีแดงเข้ม เช่น องุ่นแดง สารสีแดงเข้มคือแอนโทไซยานิน และเมื่อปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นแล้ว จะส่งผลให้ค่าต่างๆ เช่น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันมีค่าเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Macheix *et al.*, 1990)



ภาพที่ 22 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)

Kulkarni and Aradhya (2005) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในผลทับทิมระหว่างการสุก พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าลดลงเมื่อทับทิมสุกมากขึ้น ซึ่งสาเหตุมาจากการเปลี่ยนไปสารอื่น เช่น แอนโทไซยานิน เป็นต้น ส่วน Termentzi *et al.* (2006) ได้ทำการทดลองในผลของต้น Greek Service Tree ซึ่งเป็นผลไม้ชนิดหนึ่งของกรีก พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าลดลงเมื่อผลไม้สุกมากขึ้น แต่ในผักหรือผลไม้บางชนิดไม่ได้มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเป็นเช่นนี้ เช่น การทดลองของ Deepa *et al.* (2007) ในพริกหวาน (Sweet pepper) พบว่ามีปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นเมื่อสุกมากขึ้น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจึงขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของผักหรือผลไม้แต่ละชนิดด้วย ซึ่งจากผลการทดลองในมะกอกน้ำอายุต่างๆ กันครั้งนี้ พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นจากมะกอกน้ำอ่อน และมีค่าลดลงเมื่อมะกอกน้ำสุกมากขึ้น จึงอาจบอกได้ว่าช่วงอายุการเก็บเกี่ยวที่มีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุดคือช่วงอายุ 6 เดือน ซึ่งเป็นช่วงอายุที่เก็บเกี่ยวเป็นปกติ โดยช่วงอายุนี้จะมีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุด

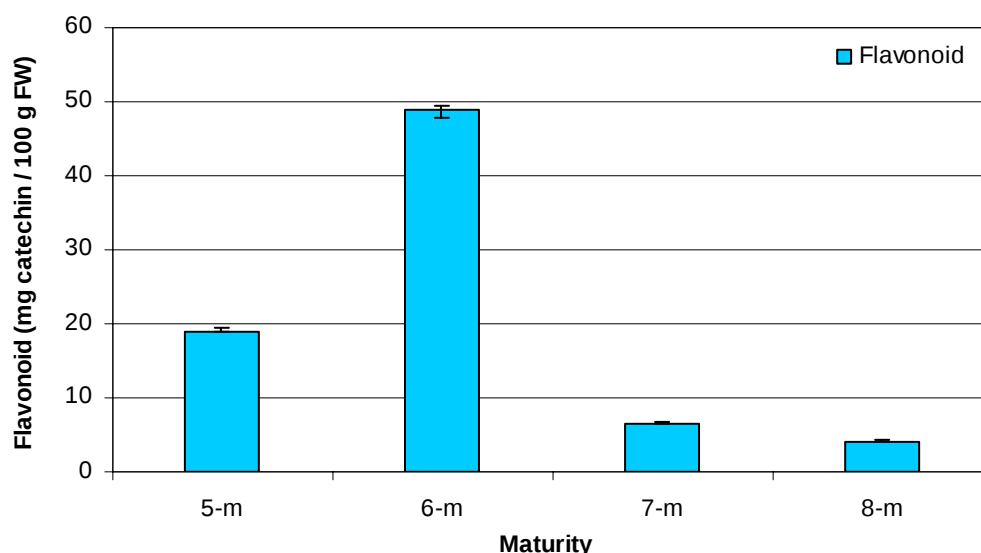
แต่หากต้องการทราบถึงประโยชน์ต่อร่างกายอย่างแท้จริงควรทำการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน เพื่อยืนยันคุณภาพให้แน่นอนมากยิ่งขึ้น

2.3 ปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid content) ในมะกอกน้ำ

นำมะกอกน้ำทั้ง 4 สภาวะ คือมะกอกน้ำอ่อน (อายุ 5 เดือน, 5-m), มะกอกน้ำอายุปกติ (อายุ 6 เดือน, 6-m), มะกอกน้ำแก่ (อายุ 7 เดือน, 7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (อายุ 8 เดือน, 8-m) ที่ผ่านการสกัดตามวิธีการทดลองข้อ 5 ไปวัดปริมาณฟลาโวนอยด์ตามวิธีการทดลองข้อ 7 แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคเทคินซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน คำนวณค่าเป็นหน่วย มิลลิกรัมเคเทคินต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด เพื่อเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ในมะกอกน้ำอายุต่างๆ ได้ปริมาณฟลาโวนอยด์ของมะกอกน้ำที่อายุต่างๆ และปริมาณที่เปลี่ยนแปลงไปแสดงในภาพที่ 23 โดยมะกอกน้ำอายุปกติ คืออายุ 6 เดือน มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด ($p < 0.05$) คือ 49.0 มิลลิกรัมเคเทคินต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ในมะกอกน้ำอ่อนคืออายุ 5 เดือน มีค่าน้อยกว่าที่อายุ 6 เดือนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือมีค่า 19.0 มิลลิกรัมเคเทคินต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ซึ่งคิดเป็นมีค่าลดลงถึง ร้อยละ 61.2 ส่วนเมื่อมะกอกน้ำสุกมากขึ้นจะมีปริมาณฟลาโวนอยด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมะกอกน้ำแก่อายุ 7 เดือนมีค่า 6.5 มิลลิกรัมเคเทคินต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด และมะกอกน้ำแก่มาก อายุ 8 เดือน มีค่าปริมาณฟลาโวนอยด์เป็น 4.1 มิลลิกรัมเคเทคินต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ซึ่งทั้งสองสภาวะนี้มีค่าลดลงมากอย่างเห็นได้ชัด คือมีค่าลดลง ร้อยละ 86.7 และ 91.6 ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด คือมีค่ามากที่สุดในช่วงอายุปกติ ส่วนมะกอกน้ำอ่อนจะมีปริมาณฟลาโวนอยด์ไม่มากนัก แต่เมื่อปล่อยให้สุกมากขึ้นคือ 7 และ 8 เดือน จะมีปริมาณฟลาโวนอยด์ลดลงมากอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเช่นนี้สามารถพบได้ในผลไม้หลายชนิด เช่นการศึกษาในผลแอปเปิ้ลพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์โดยเฉพาะสารกลุ่มฟลาโวนอลมีค่าลดลงเมื่อแอปเปิ้ลสุกมากขึ้น (Macheix *et al.*, 1990) ซึ่งการลดลงอาจเนื่องจากการสลายตัวของสารหรือการเปลี่ยนไปเป็นสารชนิดอื่น เช่นเดียวกับสาเหตุการลดลงของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดคือมีการเปลี่ยนไปเป็นสารอื่น (Kulkarni and Aradhya, 2005) ซึ่งในการทดลองในมะกอกน้ำครั้งนี้มีผลไปในทิศทางเดียวกับการทดลองอื่นๆ ก่อนหน้า และถ้าต้องการทราบถึงปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอลชนิดต่างๆ ที่พบในมะกอกน้ำ และการเปลี่ยนแปลงไปที่อายุต่างๆ จำเป็นต้องใช้การวิเคราะห์ด้วย

HPLC เพื่อระบุถึงสารที่พบและปริมาณที่เปลี่ยนแปลงไป โดยภาพรวมแล้วมะกอกน้ำที่อายุ 6 เดือน มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด ซึ่งน่าจะส่งผลดีต่อผลิตภัณฑ์



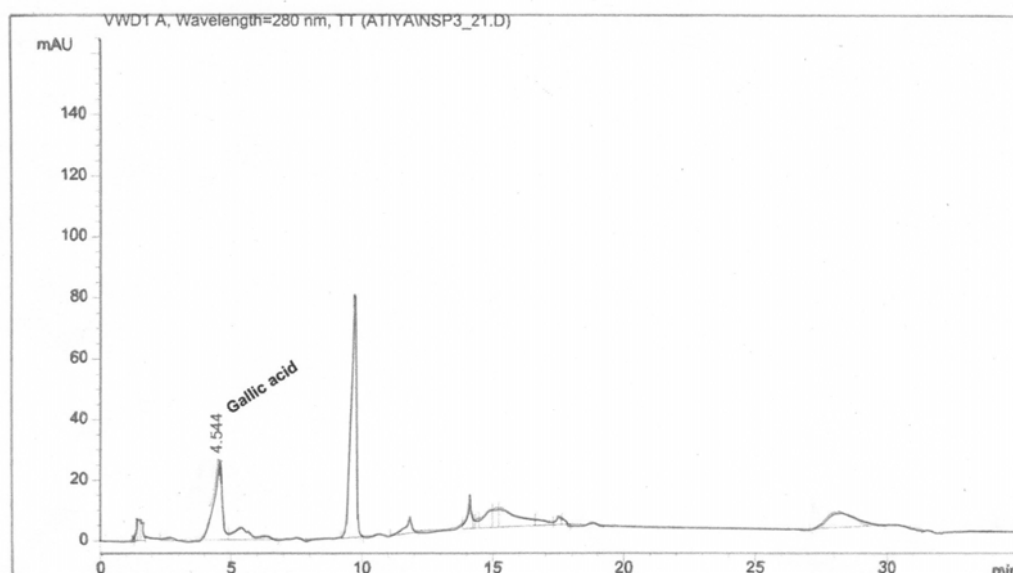
ภาพที่ 23 ปริมาณฟลาโวนอยด์ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)

2.4 ปริมาณควอเซติน แคมป์เฟอร์อล เคทเทคิน และกรดแกลลิกในมะกอกน้ำที่วัดด้วยวิธี HPLC

นำมะกอกน้ำทั้ง 4 สภาวะ ที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีการสกัดสำหรับ HPLC ตามวิธีการทดลองข้อ 8 แล้ว นำมาวิเคราะห์ปริมาณควอเซติน แคมป์เฟอร์อล เคทเทคิน และกรดแกลลิก ด้วยวิธี HPLC ดังวิธีการทดลองข้อ 9 ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการจำแนกชนิด และหาปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอล โดยเฉพาะควอเซติน และแคมป์เฟอร์อล นอกจากนั้นสภาวะการสกัดและการวิเคราะห์นี้ยังปรับให้เหมาะสมกับการจำแนก และการหาปริมาณสารอื่น เช่นกรดแกลลิก และเคทเทคินอีกด้วย

จากผลการทดลองพบว่าในมะกอกน้ำทุกสภาวะพบเพียงแค่กรดแกลลิกเท่านั้น ส่วนควอเซติน แคมป์เฟอร์อล และเคทเทคินนั้นไม่พบในตัวอย่างใดเลย ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในภาพที่ 24 ซึ่งไม่เคยมีข้อมูลว่ามีการวิเคราะห์และตรวจพบสารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในมะกอกน้ำมาก่อน ส่วนปริมาณกรดแกลลิกที่พบ และการเปลี่ยนแปลงไปที่อายุต่างๆ ดังแสดงใน

ตารางที่ 17 โดยพบว่ามะกอกน้ำอายุ 6 เดือนมีปริมาณกรดแกลลิกมากที่สุด ($p < 0.05$) คือ 103.6 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกในมะกอกน้ำสด 100 กรัม ส่วนในมะกอกน้ำอายุ 5 เดือนมีค่าน้อยกว่ามะกอกน้ำอายุ 6 เดือน คือมีค่าเป็น 94.8 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกในมะกอกน้ำสด 100 กรัม ซึ่งคิดเป็นมีค่าลดลงร้อยละ 8.5 และมะกอกน้ำที่สุกมากขึ้นมีปริมาณกรดแกลลิกลดลง คือมะกอกน้ำอายุ 7 เดือนมีปริมาณกรดแกลลิกเป็น 62.4 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกในมะกอกน้ำสด 100 กรัม มีค่าลดลงจากมะกอกน้ำอายุ 6 เดือนร้อยละ 39.8 และมะกอกน้ำอายุ 8 เดือนมีปริมาณกรดแกลลิกเป็น 67.9 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกในมะกอกน้ำสด 100 กรัม คิดเป็นมีค่าลดลงร้อยละ 34.5 ซึ่งทุกสภาวะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 24 โครมาโทแกรมของมะกอกน้ำอายุ 6 เดือน

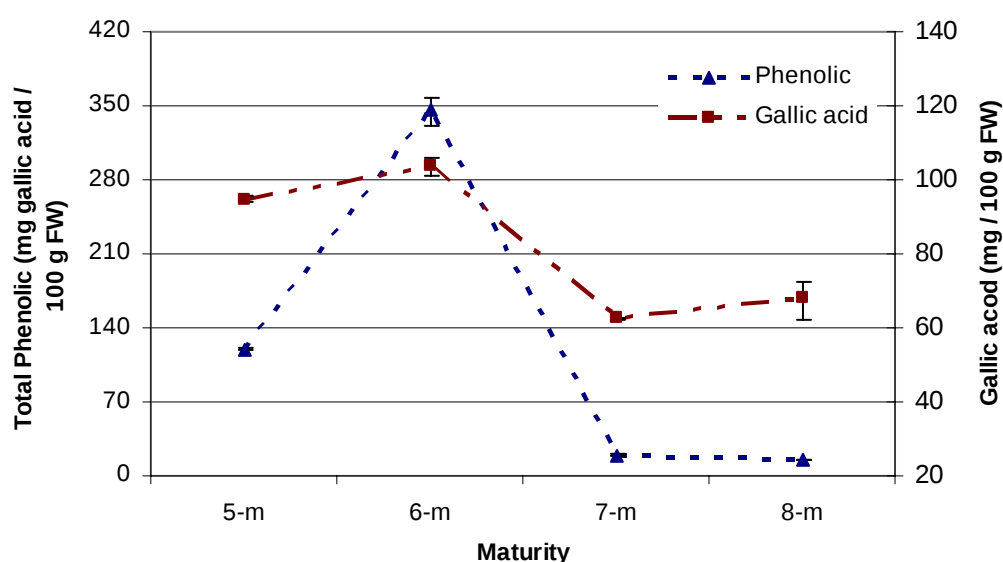
การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแกลลิกในมะกอกน้ำเป็นไปในทิศทางเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ ดังแสดงในภาพที่ 25 คือมีปริมาณน้อยในมะกอกน้ำอายุ 5 เดือน เมื่ออายุ 6 เดือนมีค่ามากที่สุด และมีค่าลดลงอยู่ในระดับที่ต่ำมากเมื่อมะกอกน้ำสุกมากขึ้น คือตั้งแต่อายุ 7 เดือน การลดลงของปริมาณกรดแกลลิกในมะกอกน้ำที่สุกมากขึ้นนั้น เป็นไปตามที่ Macheix *et al.* (1990) ได้กล่าวไว้ว่าปริมาณกรดแกลลิกจะพบได้ตั้งแต่ผลไม้ยังเป็นผลอ่อนอยู่ และเพิ่มจนมีค่าสูงสุดเมื่อสุกขึ้น แต่กรดแกลลิก จะลดปริมาณลงมากอยู่ในระดับที่ต่ำมากเมื่อแก่มากขึ้น การที่กรดแกลลิกลดปริมาณลงอาจเพราะมีการสลายตัวไป หรือเปลี่ยนไปเป็นสารอื่น แต่ไม่ได้เปลี่ยนเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอล เช่นควอเซติน และแคมป์เฟอรอล เนื่องจากเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วไม่พบสารดังกล่าว จากผลการทดลองถึงปริมาณสารต่างๆ ที่

พบในมะกอกน้ำที่ช่วงอายุต่างๆ กัน พบว่ามะกอกน้ำที่อายุ 6 เดือน ซึ่งเป็นช่วงที่ชาวสวนเก็บเกี่ยวมาจำหน่ายเป็นอายุที่มีปริมาณสารต่างๆ ที่มีประโยชน์มากที่สุด แต่ยังคงควรทำการศึกษาถึงคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันต่อไปด้วย

ตารางที่ 17 ปริมาณกรดแกลลิกของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m) และปริมาณที่ลดลง

ตัวอย่าง	กรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด)	ปริมาณกรดแกลลิกที่ลดลง	
		มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด	ร้อยละ
5-m	94.8 ^b	8.8	8.5
6-m	103.6 ^a	-	-
7-m	62.4 ^d	41.2	39.8
8-m	67.9 ^c	35.7	34.5

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่าง
นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 25 การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณกรดแกลลิกของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)

2.5 กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในมะกอกน้ำเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH

นำสารสกัดมะกอกน้ำทั้ง 4 สภาวะ ตามวิธีการทดลองข้อ 5 มาเจือจางให้แต่ละตัวอย่าง มีความเข้มข้นแตกต่างกันแล้วทำการวัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ตามวิธีการทดลองข้อ 10 คำนวณเป็นค่า % radical scavenging activity นำค่าที่ได้ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมในสารสกัดมะกอกน้ำ 1 มิลลิลิตร) ที่สามารถทำให้ค่า % radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) หลังจากนั้นนำค่า IC_{50} ที่ได้มาคำนวณเป็นค่าประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) ดังแสดงในตารางที่ 18

จากผลการทดลองหาประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) ของมะกอกน้ำ พบว่ามะกอกน้ำอายุ 6 เดือนมีค่า AE มากที่สุด ($p < 0.05$) คือมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยมีค่าเป็น 0.0141 รองลงมาเป็นมะกอกน้ำอายุ 5 เดือน มีค่า AE เป็น 0.004 ส่วนมะกอกน้ำอายุ 7 และ 8 เดือนมีประสิทธิภาพน้อยที่สุด คือมีค่า AE เป็น 0.001 เท่ากัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเช่นนี้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ และปริมาณกรดแกลลิก คือมะกอกน้ำปกติมีค่ามากที่สุด รองมาคือมะกอกน้ำอ่อน ส่วนมะกอกน้ำแก่ และแก่มากเป็นกลุ่มที่มีค่าน้อยที่สุด

ตารางที่ 18 ประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)

ตัวอย่าง	ประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน Antiradical Efficiency, AE
5-m	0.004 ^b
6-m	0.014 ^a
7-m	0.001 ^c
8-m	0.001 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Kulkarni and Aradhya (2005) ได้ทำการทดลองในผลทับทิมที่อายุต่างๆ ถึงปริมาณสาร ฟีนอลิกและความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH พบว่าช่วงที่พบว่ามี ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันมากที่สุดเป็นช่วงที่มีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุด ซึ่ง ในกรณีทับทิมเป็นช่วงที่มีปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุด ซึ่งการทดลองครั้งนี้ก็เป็นเช่นเดียวกัน กันคือหากเทียบกับการทดลองในมะกอกน้ำครั้งนี้จะเป็นช่วงที่มะกอกน้ำมีปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และกรดแกลลิกมากที่สุด ซึ่งคือช่วงอายุ 6 เดือน และช่วงนี้เป็นช่วงที่มีความสามารถ ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันมากที่สุดเช่นกัน จากผลการทดลองข้างต้นทำให้ค่อนข้างมั่นใจว่า มะกอกน้ำมีคุณภาพดีในช่วงอายุ 6 เดือน จึงคาดได้ว่าค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันเมื่อวัด ด้วยวิธี DPPH ขึ้นกับปริมาณฟีนอลิก และปริมาณฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในผลไม้ และอายุมีผลทำให้ค่า AE เปลี่ยนแปลงไปได้ แต่ในการหาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันนั้นจำเป็นต้อง วิเคราะห์มากกว่าหนึ่งวิธี เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลอง

2.6 กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในมะกอกน้ำเมื่อวัดด้วยวิธี ORAC

นำสารสกัดมะกอกน้ำทั้ง 4 สภาวะที่ได้จากวิธีการสกัดตามข้อ 11 โดยแยกเป็นส่วนที่ ชอบไขมัน (lipophilic) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) มาสารสกัดทั้งสองส่วนมาวิเคราะห์ตาม วิธีการทดลองข้อ 11 ได้เป็นค่ากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันสองส่วน คือส่วนที่ชอบไขมัน (L-ORAC) และส่วนที่ชอบน้ำ (H-ORAC) เพื่อหากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน และวิเคราะห์ว่า ส่วนที่ชอบไขมันและส่วนที่ชอบน้ำมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในสัดส่วนที่ มากหรือน้อย แตกต่างกันอย่างใด แล้วนำค่าทั้งสองส่วนที่ได้มารวมกันเป็นค่ากิจกรรมของสารต้าน ออกซิเดชันทั้งหมด (Total Antioxidant Capacity : TAC) มีหน่วยเป็นไมโครโมล ของสาร Trolox (TE) ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ดังแสดงในตารางที่ 19

จากผลการทดลองพบว่าค่ากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในส่วนที่ชอบไขมันมีค่า น้อยกว่าในส่วนที่ชอบน้ำ เนื่องมาจากมะกอกน้ำมีไขมันน้อยทำให้มีปริมาณเนื้อสารน้อย และ สาเหตุหลักคือสารที่มีผลต่อความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันเป็นสารที่ละลายได้ในน้ำ เช่นสารในกลุ่มฟอลิฟีนอล โดยผลค่ากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งหมด (TAC) คือมีค่ามาก ที่สุดในมะกอกน้ำอายุ 6 เดือน ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับผลการทดลองส่วนอื่นๆ คือมีค่าเป็น 24.4 ไมโครโมลของสาร Trolox ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ในขณะที่มะกอกน้ำอายุ 5 เดือนมีค่าน้อยกว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ 9.1 ไมโครโมลของสาร Trolox ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ส่วนมะกอกน้ำอายุ 7 และ 8 เดือนมีค่าน้อยที่สุด ($p < 0.05$) คือมีค่าเป็น 6.1 ไมโครโมลของสาร

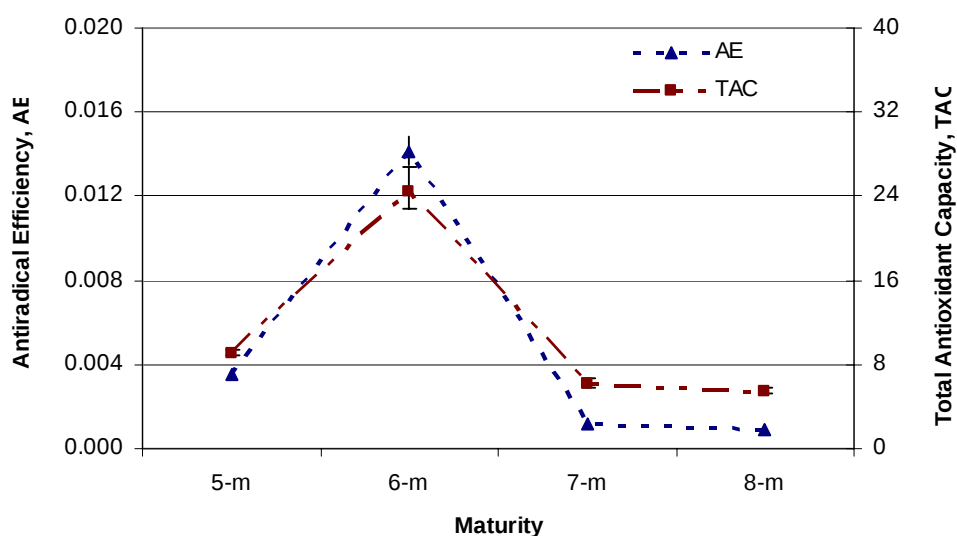
Trolox ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด และ 5.5 ไมโครโมลของสาร Trolox ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ จึงบอกได้ว่ามะกอกน้ำอายุ 6 เดือนมีความเหมาะสมในการเก็บเกี่ยวมาบริโภค หรือแปรรูปมากที่สุด เนื่องจากมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันมากที่สุดทั้งด้วยวิธี DPPH และ ORAC ซึ่งผลการหากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ORAC สอดคล้องกับค่า AE ที่หาได้จากวิธี DPPH ดังแสดงในภาพที่ 26

ตารางที่ 19 ค่า L-ORAC, H-ORAC และ TAC ที่วัดด้วยวิธี ORAC ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)

(หน่วย : ไมโครโมลของสาร Trolox ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด)

ตัวอย่าง	L-ORAC	H-ORAC	TAC
5-m	0.521 ^c	8.5 ^b	9.1 ^b
6-m	0.720 ^a	23.7 ^a	24.4 ^a
7-m	0.642 ^b	5.5 ^c	6.1 ^c
8-m	0.368 ^d	5.1 ^c	5.5 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวดิ่งหมายถึง ค่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 26 การเปลี่ยนแปลงค่า AE ที่วัดได้จากวิธี DPPH และค่า TAC ที่วัดได้จากวิธี ORAC ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)

ค่าประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (AE) เมื่อวัดด้วยวิธี DPPH และค่ากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งหมด (TAC) เมื่อวัดด้วยวิธี ORAC ของมะขามป้อมในสถานะที่ไม่เกิดสีน้ำตาล และมะกอกน้ำอายุ 6 เดือน เปรียบเทียบกับผักและผลไม้ชนิดอื่นที่เคยมีผู้วิเคราะห์มาก่อน แสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ค่า AE เมื่อวัดด้วยวิธี DPPH และค่า TAC เมื่อวัดด้วยวิธี ORAC ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล มะกอกน้ำอายุ 6 เดือน เปรียบเทียบกับผักและผลไม้ชนิดอื่น

ตัวอย่าง	AE	TAC	เอกสารอ้างอิง
มะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล	0.092	78.2	
มะกอกน้ำอายุ 6 เดือน	0.014	24.4	
ลำไย	0.092	-	Rangkadilok <i>et al.</i> (2007)
ถั่วลิ้นเตา (pea)	-	19	Ou <i>et al.</i> (2002)
หัวหอมใหญ่	-	85	Ou <i>et al.</i> (2002)
กะหล่ำดอก	-	102	Ou <i>et al.</i> (2002)
แบล็กเบอร์รี่	-	43	Siriwoharn <i>et al.</i> (2004)
สตอเบอร์รี่	-	16	Aaby <i>et al.</i> (2005)
สตอเบอร์รี่	-	35.8	Wu <i>et al.</i> (2004)
บลูเบอร์รี่	-	62.2	Wu <i>et al.</i> (2004)
ราสเบอร์รี่	-	49.3	Wu <i>et al.</i> (2004)
แตงโม	-	1.4	Wu <i>et al.</i> (2004)
กีวี	-	9.2	Wu <i>et al.</i> (2004)
แครอท	-	12.2	Wu <i>et al.</i> (2004)
มะเขือเทศ	-	3.4	Wu <i>et al.</i> (2004)
บร็อคโคลี่	-	15.9	Wu <i>et al.</i> (2004)

2.7 ผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation analysis) ของปริมาณสาร และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในมะกอกน้ำ

จากผลการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ที่ได้รายงานมาแล้วข้างต้น ได้แก่ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic) ปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid content) ปริมาณกรดแกลลิกที่วัดด้วยวิธี HPLC

และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH (AE) และ ORAC (TAC) นำค่าต่างๆ มาวิเคราะห์สหสัมพันธ์ เพื่อหาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงค่าต่างๆ ในมะกอกน้ำที่มีอายุแตกต่างกัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ตารางค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณกรดแกลลิกที่วัดจากวิธี HPLC และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันของมะกอกน้ำ

	Phenolic	Flavonoid	Gallic acid	AE
Flavonoid	0.999**			
Gallic acid	0.883**	0.880**		
AE	0.992**	0.990**	0.821**	
TAC	0.994**	0.997**	0.859**	0.987**

หมายเหตุ ** หมายความว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นน้อยกว่า 0.05 และ 0.01 ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์พบว่า ทั้งค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ กรดแกลลิก และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งสองวิธี มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันทั้งหมด และมีค่าสหสัมพันธ์ค่อนข้างสูง โดยค่า AE จากวิธี DPPH มีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ($r = 0.992$), ปริมาณฟลาโวนอยด์ ($r = 0.990$), กรดแกลลิก ($r = 0.821$) และค่า TAC ($r = 0.987$) ส่วนค่า TAC จากวิธี ORAC มีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ($r = 0.994$), ปริมาณฟลาโวนอยด์ ($r = 0.977$) และกรดแกลลิก ($r = 0.859$)

จากผลการทดลองข้างต้นทั้งหมดนั้น เป็นที่แน่ชัดแล้วว่ามะกอกน้ำอายุ 6 เดือน ซึ่งเป็นช่วงอายุที่ชาวสวนนิยมเก็บเกี่ยวตามปกติอยู่แล้ว เป็นช่วงอายุที่มีความเหมาะสมทั้งในเชิงปริมาณ คือมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และกรดแกลลิกมากที่สุด และในเชิงคุณภาพคือมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันมากที่สุดเช่นกัน ดังนั้นหากต้องการบริโภคมะกอกน้ำให้ได้ประโยชน์มากที่สุดควรบริโภคในช่วงอายุ 6 เดือน ไม่ควรปล่อยให้สุกมากเกินไปกว่านั้น เพราะจะทำให้คุณค่าทางโภชนาการลดลง

สรุป

1. เมื่อมะขามป้อมเกิดสีน้ำตาลที่เวลา 4 ชั่วโมง พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นร้อยละ 7.4 และเพิ่มขึ้นเป็นลำดับเมื่อเกิดสีน้ำตาลนานขึ้น ส่วนปริมาณกรดแกลลิกเมื่อวัดด้วยวิธี HPLC มีปริมาณลดลงเป็นลำดับ โดยเมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง มีปริมาณลดลงร้อยละ 31

ปริมาณฟลาโวนอยด์ในมะขามป้อมมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่เมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง โดยมีค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 3.6 และมีปริมาณเพิ่มขึ้นมากที่สุดเมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 8 ชั่วโมง คือเพิ่มขึ้นร้อยละ 10.3 และปริมาณควอเซตินเมื่อวัดด้วยวิธี HPLC มีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยเมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 4, 6 และ 8 ชั่วโมง มีปริมาณเพิ่มขึ้นร้อยละ 21.4, 50.0 และ 60.7 ตามลำดับ ส่วนแคมพ์เฟอร์อลพบแค่เพียงในมะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมงเท่านั้น และไม่พบเคทเทคินในทุกสภาวะ

2. ค่าประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) ของมะขามป้อมเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยและเป็นไปในทิศทางเดียวกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแกลลิก คือมีค่าลดลงเป็นลำดับเมื่อเกิดสีน้ำตาลนานขึ้น โดยมีค่าน้อยที่สุดเมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง คือมีค่า AE เป็น 0.080

ค่ากิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งหมด (TAC) ของมะขามป้อมเมื่อวัดด้วยวิธี ORAC มีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณควอเซติน คือมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดสีน้ำตาลนานขึ้น โดยมีค่ามากที่สุดเมื่อเกิดสีน้ำตาลนาน 6 ชั่วโมง คือมีค่า TAC เป็น 98.3 ไมโครกรัม Trolox ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด โดยค่ากิจกรรมส่วนที่ชอบไขมัน (L-ORAC) และส่วนที่ชอบน้ำ (H-ORAC) มีค่า 0.164 และ 98.2 ไมโครกรัม Trolox ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ

3. การเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อมที่เวลาต่างๆ มีค่าสหสัมพันธ์ (correlation) เชิงเส้นตรงที่ดีกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ($r = 0.858$) และปริมาณควอเซติน ($r = 0.977$) ส่วนค่า AE จากวิธี DPPH มีความสัมพันธ์ค่อนข้างดีกับกรดแกลลิก ($r = 0.763$) และค่า TAC จากวิธี ORAC มีความสัมพันธ์ค่อนข้างดีกับควอเซติน ($r = 0.711$)

4. มะขามป้อมที่เกิดสีน้ำตาลส่งผลดีทั้งในเชิงปริมาณคือ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณ ฟลาโวนอยด์ ควอเซติน และในเชิงคุณภาพ คือกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันที่วัดด้วยวิธี ORAC ที่มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดสีน้ำตาลมากขึ้น เนื่องจากฟลาโวนอยด์มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ในร่างกายมากกว่าฟีนอลิก ทำให้เป็นการดีต่อผู้บริโภคหากผลิตผลิตภัณฑ์จากมะขามป้อมโดยมี การทำให้เกิดสีน้ำตาลก่อน

5. มะกอกน้ำอายุ 6 เดือน มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด คือ 345.8 มิลลิกรัมกรด แกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด และปริมาณกรดแกลลิกมากที่สุด คือ 103.6 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด แต่ไม่พบควอเซติน แคมพ์เฟอรอล และเคทเทคิน นอกจากนั้นฟลาโวนอยด์ยังมีปริมาณ มากที่สุด คือ 49.0 มิลลิกรัมเคทเทคินต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด

6. ค่าประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) ของ มะกอกน้ำเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH มีค่ามากที่สุดเมื่ออายุ 6 เดือน คือมีค่าเป็น 0.014 และค่ากิจกรรม ของสารต้านออกซิเดชันทั้งหมด (TAC) ของมะขามป้อมเมื่อวัดด้วยวิธี ORAC มีค่ามากที่สุดเมื่อ อายุ 6 เดือนเช่นกัน คือมีค่า 24.4 ไมโครกรัม Trolox ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด โดยค่ากิจกรรมส่วนที่ ชอบไขมัน (L-ORAC) และส่วนที่ชอบน้ำ (H-ORAC) มีค่า 0.720 และ 24.4 ไมโครกรัม Trolox ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ

7. ค่าต่างๆ ที่วิเคราะห์ในมะกอกน้ำค่อนข้างมีค่าสหสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดีต่อกัน โดยค่า AE จากวิธี DPPH มีความสัมพันธ์ที่ดีกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ($r = 0.992$) และค่า TAC จากวิธี ORAC มีความสัมพันธ์ที่ดีกับปริมาณฟลาโวนอยด์ ($r = 0.997$)

8. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารในมะกอกน้ำอายุต่างๆ จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อถึงอายุ 6 เดือน และมีค่าลดลงเป็นลำดับเมื่อมีอายุ 7 และ 8 เดือน ดังนั้นอายุในการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวมะกอกน้ำ คืออายุ 6 เดือน เนื่องจากให้ผลดีทั้งในแง่ปริมาณสาร และในแง่คุณภาพของสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งอายุ 6 เดือนนี้ เป็นอายุที่ชาวสวนเก็บเกี่ยวมาจำหน่ายตามปกติ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

คณะกรรมการสวัสดิการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. 2545. ตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทย. กรุงเทพฯ.

นันทวัน บุญยะประภัศร. 2539. สมุนไพรไม้พุ่มบ้าน. สำนักงานข้อมูลสมุนไพร กองเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.

นิรนาม. 2549. น้ำมะกอกน้ำ. เครือข่ายสุขภาพเพื่อประชาชน. แหล่งที่มา:

<http://www.healthnet.in.th/text/forum2/juice/juice043.htm>, 3 ตุลาคม 2549.

เนาวรัตน์ ชัชวาลโชคชัย. 2530. อิทธิพลของสัตว์เคี้ยวเอื้องบางชนิดที่มีต่อคุณภาพของเมล็ดมะขามป้อม มะกอกน้ำ มะกอกป่า และสมุนไพร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พร้อมจิต ศรีลัมพ์. 2543. สารานุกรมสมุนไพรไทย เล่ม 1 สมุนไพรสวนสิริรุกขชาติ. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

ไพโรจน์ ผลประสิทธิ์. 2545. ผลไม้ไทยๆ. คณะกรรมการเอกลักษณ์ของชาติ สำนักนายกรัฐมนตรี, กรุงเทพฯ.

วิวัฒน์ พันธุวิธานนท์. 2543. ผลไม้พื้นเมืองภาคใต้ ความสุขที่คุณได้. KU Electronic Magazine. แหล่งที่มา: <http://www.ku.ac.th/e-magazine/december43/agri/fruit.html>, 3 ตุลาคม 2549.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. สารานุกรมสมุนไพรไทย รวมหลักเภสัชกรรมไทย. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

สมสุข มัจฉาชีพ. 2534. พืชสมุนไพรไทย. แพรวพิทยา, กรุงเทพฯ.

ลัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. 2545. มะกอกน้ำ: พืชสะเทินน้ำสะเทินบก. **กลีกร** 75: 94-97.

อรนุช เกษประเสริฐ. 2548. มะขามป้อม ยาและอาหารสุขภาพ. **กลีกร** 78: 75-80.

Aaby, K., G. Skrede and R. E. Wrolstad. 2005. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). **J. Agric. Food Chem.** 53: 4032-4040.

Amiot, M. J., M. Tacchini, S. Aubert and J. Nicolas. 1992. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. **J. Food Sci.** 57: 958-962.

Amiot, M. J., M. Tacchini, S. Y. Aubert and W. Oleszek. 1995. Influence of cultivar, maturity stage, and stage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. **J. Agric. Food Chem.** 43: 1132-1137.

Bergeron, C., S. Gafner, E. Clausen and D. J. Carrier. 2005. Comparison of the chemical composition of extracts from *Scutellaria lateriflora* using accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction versus standard hot water or 70% ethanol extraction. **J. Agric. Food Chem.** 53: 3076-3080.

Breitfellner, F., S. Solar and G. Sontag. 2003. Radiation induced chemical changes of phenolic compounds in strawberries. **Radiat. Phys. Chem.** 67: 497-499.

Choi, Y., S. M. Lee, J. Chun, H. B. Lee and J. Lee. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. **Food Chem.** 99: 381-387.

Dawes, B. 1998. **Color Metric Converter**. Colorpro. Available Source: <http://colorpro.com/info/tools/convert.htm>, October 3, 2006.

- Deepa, N., C. Kaur, B. George, B. Singh and H. C. Kapoor. 2007. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. **LWT** 40: 121-129.
- Del Caro, A., A. Piga, V. Vacca and M. Agabbio. 2004. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. **Food Chem.** 84: 99-105.
- Durmaz, G. and M. Alpaslan. 2007. Antioxidant properties of roasted apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel. **Food Chem.** 100: 1177-1181.
- Häkkinen, S. and S. Auriola. 1998. High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries. **J. Chromatogr. A** 829: 91-100.
- Häkkinen, S. H., S. O. Kärenlampi, I. M. Heionen, H. M. MyKKänen and A. R. Törrönen. 1999. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. **J. Agric. Food Sci.** 47: 2274-2279.
- Heim, K. E., A. R. Tagliaferro and D. J. Bobilya. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships: A reviews. **J. Natr. Biochem.** 13: 572-584.
- Hertog, M. G. L., P. C. H. Hollman and D. P. Venema. 1992a. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. **J. Agric. Food Chem.** 40: 1591-1598.
- Hertog, M. G. L., P. C. H. Hollman and M. B. Katan. 1992b. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. **J. Agric. Food Chem.** 40: 2379-2383.

- Huang, D., B. Ou and R. L. Prior. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.** 53: 1841-1856.
- Huber, U. 1998. Analysis of quercetin and kaempferol an ginkgo extract tablets (*Gingko Biloba*) by HPLC. **Agilent Technologies**. Available Source: <http://www.chem.agilent.com/temp/rad822F9/00015219.pdf>, October 3, 2006.
- Kim, D. and C. Y. Lee. 2002. **Current protocols in food analytical chemistry: Supplement 6**. John Wiley & Son, Inc., New York.
- Kris-Etherton, P. M., K. D. Hecker, A. Bonanome, S. M. Coval, A. E. Binkoski, K. F. Hilpert, A. E. Griel and T. D. Etherton. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **Am. J. Med.** 113 (9B): 71-88.
- Kulkarni, A. P. and S. M. Aradhya. 2005. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. **Food Chem.** 93: 319-324.
- Kurilich, A. C., E. H. Jeffery, J. A. Juvik, M. A. Wallig and B. P. Klein. 2002. Antioxidant capacity of different broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. **J. Agric. Food Chem.** 50: 5053-5057.
- Macheix, J. J., A. Fleuriet and J. Billot. 1990. **Fruit phenolics**. CRC Press, Boca Raton.
- Ou, B., D. Huang, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan and E. K. Deemer. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables empolying oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **J. Agric. Food Chem.** 50: 3122-3128.
- Palou, E., A. Lopez-Malo, G. V. Barbosa-Canovas, J. Welti-Chanes and B. G. Swanson. 1999. Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. **J. Food Sci.** 64: 42-45.

- Pandjaitan, N., L. R. Howard, T. Morelock and M. I. Gil. 2005. Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. **J. Agric. Food Chem.** 53: 8618-8623.
- Payet, B., A. S. C. Sing and J. Smadia. 2005. Assessment of antioxidant activity of cane sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. **J. Agric. Food Chem.** 53: 10074-10079.
- Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidant: A Reviews. **J. Nat. Prod.** 63: 1035-1042.
- Prior, R. L., H. Hoang, L. Gu, X. Wu, M. Bacchiocca, L. Howard, M. Hampsch-Woodill, D. Huang, B. Ou and R. Jacob. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **J. Agric. Food Chem.** 51: 3273-3279.
- Prior, R. L., X. Wu and K. Schaich. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplement. **J. Agric. Food Chem.** 53: 4290-4302.
- Rangkadilok, N., S. Sitthimonchai, L. Worasuttayangkurn, C. Mahidol, M. Ruchirawat and J. Satayavivad. 2007. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. **Food Chem. Toxicol.** 45: 328-336.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller and G. Paganga. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.** 20: 933-956.
- Robards, K., P. D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang and W. Glover. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chem.** 66: 401-436.
- Sánchez-Moreno, C. 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological system. **Food Sci. Technol. Int.** 8 (3): 121-137.

- Singh, R. P., K. N. Chidambara Murthy and G. K. Jayaprakasha. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in Vito models. **J. Agric. Food Chem.** 50: 81-86.
- Siriwoharn, T., R. E. Wrolstad, C. E. Finn and C. B. Pereira. 2004. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus L. Hybrids*) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. **J. Agric. Food Chem.** 52: 8021-8030.
- Termentzi, A., P. Kefalas and E. Kokkalou. 2006. Antioxidant activities of various extracts and fraction of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. **Food Chem.** 98: 599-608.
- ToMas-Barberan, F.A. and R. J. Robins. 1997. **Phytochemistry of fruit and vegetable.** Clarendon Press, Oxford.
- Vina, S. Z. and A. R. Chaves. 2006. Antioxidant responses in minimally processed celery during refrigerated storage. **Food Chem.** 94: 68-74.
- Wang, S. Y., W. Zheng and G. J. Galletta. 2002. Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries. **J. Agric. Food Chem.** 50: 6534-6542.
- Watson, R. R. 2001. **Vegetables, fruits, and herbs in health promotion.** CRC Press, Boca Raton.
- Wolfe, K., X. Wu and R. H. Liu. 2003. Antioxidant activity of apple peels. **J. Agric. Food Chem.** 51: 609-614.
- Wu, X., L. Gu, J. Holden, D. B. Haytowitz, S. E. Gebhardt, G. Beecher and R. L. Prior. 2004. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. **J. Food Comp. Anal.** 17: 407-422.

Zhishen, J., T. Mengcheng and W. Jianming. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chem.** 64: 555-559.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ก1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

1.1.2 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

1.1.3 ถ้วยอะลูมิเนียม (moisture can)

1.1.4 เดสิคเคเตอร์ (desiccator)

1.2 วิธีการวิเคราะห์

อบถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝา ที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นใน เดสิคเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอน 1.0-1.5 กรัม ลงในถ้วย อะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแล้ว ทำแห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 100 °ซ จนน้ำหนักคงที่

1.3 วิธีคำนวณ

สามารถคำนวณหาปริมาณร้อยละของความชื้นในตัวอย่างได้จากสมการด้านล่าง

$$\text{ร้อยละของความชื้น} = \frac{A}{B} \times 100$$

เมื่อ	A	แทน	น้ำหนักของตัวอย่างที่หายไปหลังทำแห้ง (กรัม)
	B	แทน	น้ำหนักของตัวอย่างก่อนทำแห้ง (กรัม)

ก2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Kjeldahl method) (AOAC, 2000)

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 2.1.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 2.1.2 หลอด Kjeldahl
- 2.1.3 ชุดย่อย (Digestion unit model K-435, BÜCHI)
- 2.1.4 ชุดดักจับไอน้ำ (Scrubber model B-414, BÜCHI)
- 2.1.5 ชุดกลั่นอัตโนมิติ (Distillation Unit model B-324, BÜCHI)
- 2.1.6 ขวดรูปชมพู่ (flask)

2.2 สารเคมี

- 2.2.1 กรดซัลฟูริกเข้มข้น
- 2.2.2 สารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล
- 2.2.3 สารละลายกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 2
- 2.2.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 35
- 2.2.5 คอปเปอร์ซัลเฟต
- 2.2.6 โพแตสเซียมซัลเฟต
- 2.2.7 สารละลายอินดิเคเตอร์ผสมระหว่างเมทิลเรดและโบรโมครีซอลกรีน

2.3 วิธีการวิเคราะห์

- 2.3.1 ชั่งตัวอย่าง 0.5- 1.0 กรัม ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ลงในหลอดย่อย
ระวังอย่าให้ติดข้างหลอด
- 2.3.2 ใส่ตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยโพแตสเซียมซัลเฟต 10 กรัม และ
คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม รวมทั้งลูกแก้วกันเดือด (glass bead) 2-3 เม็ด จากนั้นเติมกรดซัลฟูริก
เข้มข้น 20 มิลลิลิตร
- 2.3.3 นำหลอดย่อยต่อเข้ากับชุดย่อย ย่อยจนได้สารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น

2.3.4 นำหลอดย่อยต่อเข้ากับชุดกลั่นอัตโนมัติ เติมน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 จนกว่าสารละลายในหลอดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

2.3.5 กลั่นสารละลายประมาณ 3 นาที และรองรับสารละลายที่กลั่นได้ด้วยขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีสารละลายกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร และอินดิเคเตอร์อยู่

2.3.6 นำไปไตเตรตด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนกระทั่งได้สารละลายสีเทา (จุดยุติ) บันทึกปริมาตรสารละลายกรดที่ใช้เพื่อนำไปคำนวณหาร้อยละของไนโตรเจน และร้อยละของโปรตีน

2.3.7 ทำตัวอย่างควบคุมโดยไม่มีตัวอย่างในหลอดย่อย

2.3.8 หาค่าแฟกเตอร์ของกรดที่ใช้ในการไตเตรต โดยการชั่งทริสบัฟเฟอร์ 120 มิลลิกรัม ให้น้ำหนักที่แน่นอน ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร หยดอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด นำไปไตเตรตด้วยสารละลายกรดที่เตรียมไว้จนเปลี่ยนเป็นสีเทา จดปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรต

2.4 วิธีการคำนวณ

สามารถคำนวณหาร้อยละของไนโตรเจนและร้อยละของโปรตีนในตัวอย่างได้จากสมการด้านล่าง

$$\text{ร้อยละของไนโตรเจน} = \frac{(S - B) \times N \times f \times 1400}{W}$$

$$\text{ร้อยละของโปรตีน} = \text{ร้อยละของไนโตรเจน} \times 5.71$$

เมื่อ S = ปริมาตรของกรดที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของกรดที่ใช้ในการไตเตรตแบลงค์ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (มิลลิกรัม)

f = แฟกเตอร์ของกรดที่ใช้ในการไตเตรต ซึ่งหาได้ดังนี้

$$f = \frac{E}{121.14 \times N \times V}$$

เมื่อ N = ความเข้มข้นของกรดในหน่วยนอร์มัล

V = ปริมาตรของกรดที่ใช้ในการไตเตรตทริสบัฟเฟอร์ (มิลลิลิตร)

E = น้ำหนักของทริสบัฟเฟอร์ (มิลลิกรัม)

ก3. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 ชุดวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Soxtec)

3.1.2 ถ้วยอะลูมิเนียม

3.1.3 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

3.1.4 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.1.5 เดซิเคเตอร์ (desiccator)

3.2 สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเทอร์

3.3 วิธีการวิเคราะห์

3.3.1 ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัมใส่กระดาศกรองเบอร์ 1 หลังจากนั้นนำไปใส่ในทิมเบอร์ (thimber)

3.3.2 เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 50-75 มิลลิลิตร ในถ้วยอะลูมิเนียมซึ่งรู้น้ำหนักแน่นอน (W_2)

3.3.3 นำทิมเบอร์และถ้วยอะลูมิเนียมต่อเข้ากับชุดวิเคราะห์ไขมัน

3.3.4 ทำการสกัดโดยการแช่ตัวอย่างในปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงสกัดด้วยการไซฟอนเป็นเวลา 45 นาที

3.3.5 ระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากถ้วยอะลูมิเนียมโดยการวางในตู้ดูดควันเป็นเวลา 10 นาที

3.3.6 นำตัวอย่างอะลูมิเนียมซึ่งมีน้ำมันไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่ 105 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.3.7 ปลอ่ยให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก (W_1)

3.4 วิธีการคำนวณ

$$\text{ร้อยละของไขมัน} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100$$

เมื่อ W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W_1 = น้ำหนักตัวอย่างอะลูมิเนียม + น้ำมัน (กรัม)

W_2 = น้ำหนักตัวอย่างอะลูมิเนียม (กรัม)

ก4. การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยหยาบ (AOAC, 2000)

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1.1 ชุดวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยหยาบ (Fibertec)

4.1.2 ครูชีเบิล

4.1.3 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

4.1.4 เตาเผา (muffle furnace)

4.1.5 เดซิกเคเตอร์ (desiccator)

4.1.6 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

4.2 สารเคมี

4.2.1 สารละลายกรดซัลฟูริก 0.255 นอร์มัล

4.2.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.313 นอร์มัล

4.2.3 เอทานอลร้อยละ 95

4.3 วิธีการวิเคราะห์

4.3.1 นำครุชิลที่บรรจุตัวอย่างประมาณ 0.5-3 กรัม วางลงในตำแหน่งที่บรรจุครุชิลของเครื่อง Fibertec hot extraction unit

4.3.2 เติมน้ำมันละลายกรดซัลฟูริก 0.255 นอร์มัล ปริมาตร 100-200 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ ทำการสกัดเป็นเวลา 30 นาที

4.3.3 เมื่อครบเวลา ปล่อยสารละลายกรดซัลฟูริกออกจากคอลัมน์ ล้างกรดออกจากตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นเดือด

4.3.4 เติมน้ำมันโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.313 นอร์มัล ปริมาตร 100-200 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ ทำการสกัดเป็นเวลา 30 นาที

4.3.5 เมื่อครบเวลา ปล่อยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ออกจากคอลัมน์ เติมน้ำมันแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เพื่อล้างออกจากตัวอย่าง

4.3.6 นำครุชิลพร้อมตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยกรดและเบสแล้วไปอบที่ 105-110 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก

4.3.7 อบอีก 2 ครั้ง จนน้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม จะได้น้ำหนักครุชิลรวมกับกาก (W_1)

4.3.8 นำเข้าเตาเผา เตาที่อุณหภูมิ 550 °C จนได้เถ้าสีขาวหรือเทา ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก จะได้น้ำหนักครุชิล+เถ้า (W_2)

4.4 วิธีการคำนวณ

$$\text{ร้อยละของเส้นใยหยาบ} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100$$

เมื่อ W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W_1 = น้ำหนักครุชิล + กาก (กรัม)

W_2 = น้ำหนักครุชิล + เถ้า (กรัม)

ก5. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

5.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

5.1.1 ถ้วยกระเบื้องเคลือบ

5.1.2 เตาเผา (muffle furnace)

5.1.3 เดซิเคเตอร์ (desiccator)

5.1.4 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

5.1.5 ตะเกียงบุนเสน

5.2 วิธีการวิเคราะห์

5.2.1 เเผถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก

5.2.2 ชั่งตัวอย่าง 1 กรัมลงในถ้วยกระเบื้อง เเผไล่ควันด้วยตะเกียงบุนเสน

5.2.3 นำเข้าเตาเผา เเผที่อุณหภูมิ 550 °ซ จนได้เถ้าสีขาวหรือเทา ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก

5.3 วิธีการคำนวณ

$$\text{ร้อยละของเถ้า} = \frac{W_2 - W}{W_1 - W} \times 100$$

เมื่อ W = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ (กรัม)

W_1 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)

W_2 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างหลังเผา (กรัม)

ก6. การทำแห้งตัวอย่างมะขามป้อมและมะกอกน้ำแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer)

นำตัวอย่างที่หั่นแล้วมาทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง โดยใช้เครื่องและสภาวะดังนี้

เครื่องทำแห้งเยือกแข็ง ยี่ห้อ FTSSYSTEMS™

ประกอบด้วยส่วนแช่แข็ง รุ่น Dura-Top

ส่วนทำแห้ง รุ่น Dura-DryFD

สภาวะที่ใช้ ได้แก่

Mode	ระบบที่ใช้	Auto
FRTm	เวลาที่ใช้แช่แข็ง (นาทิจ)	60
PT#	จำนวนหัววัดอุณหภูมิ (หัว)	3
Tfc	อุณหภูมิขณะแช่แข็ง (°ซ)	-18
STf	อุณหภูมิขณะทำแห้ง (°ซ)	20
PRTm	ความถี่ในการพิมพ์ผล (นาทิจ)	3

ก7. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Content)

7.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 7.1.1 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- 7.1.2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- 7.1.3 คิวเวต
- 7.1.4 หลอดทดลอง
- 7.1.5 ไมโครปิเปตขนาดช่วง 40-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร
- 7.1.6 ขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

7.2 สารเคมี

- 7.2.1 สารฟอลิน-ซีโอเคาเทล (Folin-Ciocalteu reagen)
- 7.2.2 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7
- 7.2.3 สารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid)

7.3 วิธีการวิเคราะห์

7.3.1 สร้างกราฟมาตรฐานกรดเกลือระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (แกน X) และความเข้มข้นของกรดเกลือ (แกน Y) โดยความเข้มข้นของกรดเกลืออยู่ในช่วง 4-14 ไมโครกรัม ได้กราฟมาตรฐานดังภาพผนวกที่ ก1

7.3.2 ปิเปตสารสกัด 125 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นอยู่ 500 ไมโครลิตร

7.3.3 เติมน้ำกลั่น 1000 ไมโครลิตร

7.3.4 เติมน้ำกลั่น 1000 ไมโครลิตร

7.3.5 เติมน้ำกลั่น 1000 ไมโครลิตร

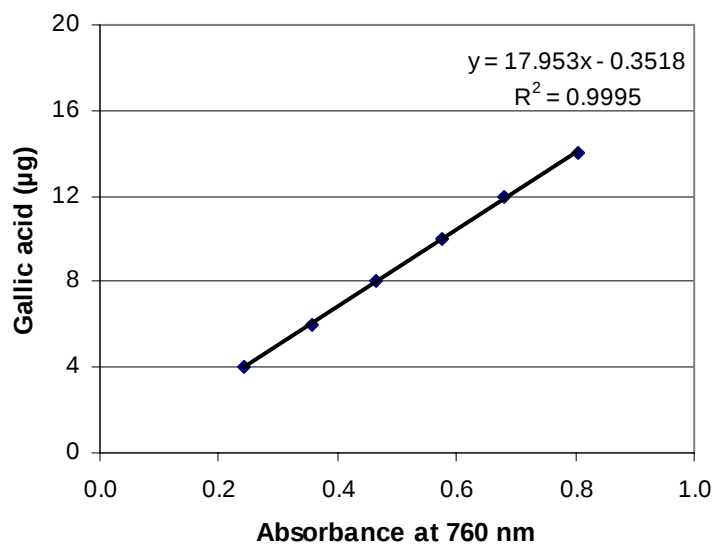
7.3.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

7.3.7 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

7.3.8 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยทำตามขั้นตอน 7.3.2-7.3.6 แต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด

7.4 วิธีการคำนวณ

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดคำนวณได้โดยแทนค่าความยาวคลื่นที่วัดได้ลงในสมการจากกราฟมาตรฐาน



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร และความเข้มข้นของกรดแกลลิก

ก8. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (Flavonoid content)

8.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 8.1.1 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- 8.1.2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- 8.1.3 คิวเวต
- 8.1.4 หลอดทดลอง
- 8.1.5 ไมโครปิเปตขนาดช่วง 40-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร
- 8.1.6 ขวดปรับปริมาตรขนาด 25 และ 50 มิลลิลิตร

8.2 สารเคมี

- 8.2.1 สารละลายโซเดียมไนไตรท์เข้มข้นร้อยละ 5
- 8.2.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์
- 8.2.3 สารมาตรฐานแคเทคิน ((+)- catechin)

8.3 วิธีการวิเคราะห์

8.3.1 สร้างกราฟมาตรฐานแคเทชินระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (แกน X) และความเข้มข้นของแคเทชิน (แกน Y) โดยความเข้มข้นของแคเทชินอยู่ในช่วง 20-50 ไมโครกรัม ได้กราฟมาตรฐานดังภาพผนวกที่ ก2

8.3.2 ปิเปตสารสกัด 250 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 1250 ไมโครลิตร

8.3.3 เติมน้ำกลั่นโซเดียมไนไตรท์เข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ปลอ่ยไว้ 5 นาที

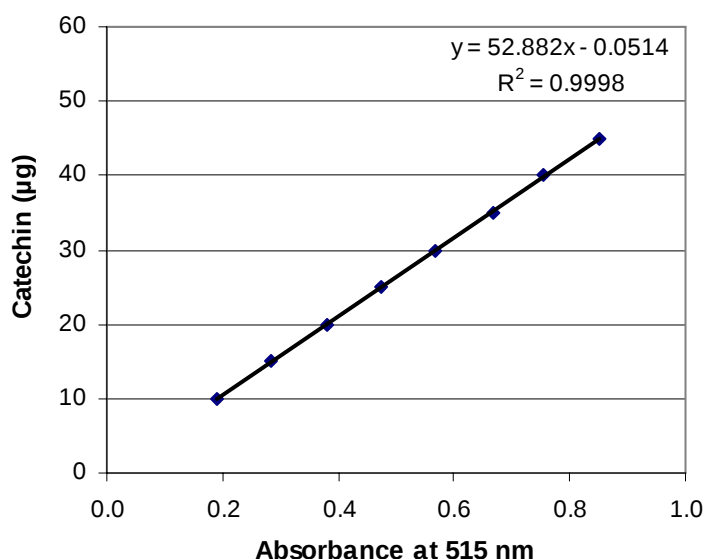
8.3.4 เติมน้ำกลั่นโซเดียมไนไตรท์เข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ปลอ่ยทิ้งไว้ 6 นาที

8.3.5 เติมน้ำกลั่นโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

8.3.6 เติมน้ำกลั่น 275 ไมโครลิตร

8.3.7 วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงทันที ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

8.3.8 วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงควบคุมโดยทำตามขั้นตอน 8.3.2-8.3.7 แต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด



ภาพผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และความเข้มข้นของแคเทชิน

8.4 วิธีการคำนวณ

ปริมาณฟลาโวนอยด์คำนวณได้โดยแทนค่าความยาวคลื่นที่วัดได้ลงในสมการจากกราฟมาตรฐาน

ก9. สภาพะการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง HPLC

9.1 สภาพะในการวิเคราะห์

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง HPLC (HP 1100)

Column	Hypersil ODS 4x125 mm, 5 μ m
Mobile phases	A = 0.5% H_3PO_4 in water B = methanol
Detector	UV, 280 และ 370 nm
Column temperature	25 °C
Stop time	35 min
Post time	5 min
Injection volume	20 μ l
Max pressure	300 bar
Gradient system	ดังแสดงในตารางที่ 5

9.2 สารเคมี

- 9.2.1 สารละลายกรดฟอสฟอริกร้อยละ 5
- 9.2.2 เมทานอลบริสุทธิ์ เกรดสำหรับ HPLC
- 9.2.3 สารมาตรฐานควอเซติน
- 9.2.4 สารมาตรฐานแคมป์เฟอรอล
- 9.2.5 สารมาตรฐานเคทเทคิน
- 9.2.6 สารมาตรฐานกรดแกลลิก

9.3 วิธีการวิเคราะห์

9.3.1 นำสารสกัดมากรองผ่านตัวกรองชนิด regenerated cellulose ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

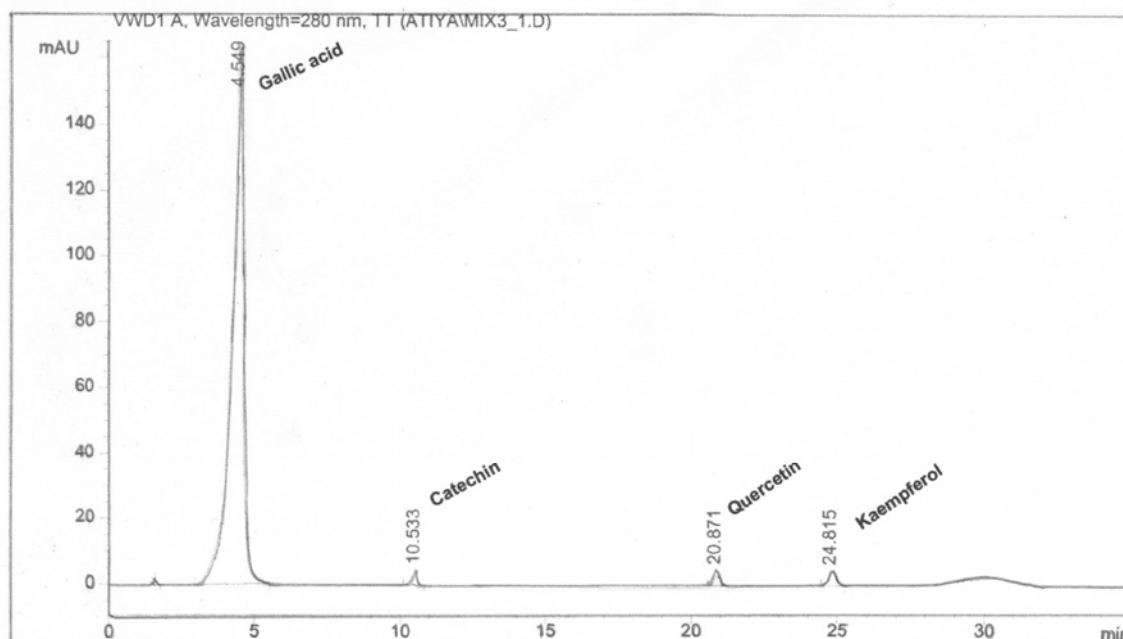
9.3.2 ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC เพื่อทำการวิเคราะห์

9.3.3 สร้างกราฟมาตรฐานผสม (mix standard) คิวเซติน : แคมป์เฟอร์อล : เกทเทกิน : และกรดแกลลิก เตรียมสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 320 : 40 : 8 : 8 ถึง 20 : 2.5 : 0.5 : 0.5 โดยกรองสารมาตรฐาน ตามข้อ 9.3.1 ได้โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานดังแสดงในภาพผนวกที่ ก3 และได้กราฟมาตรฐานของสารดังกล่าวภาพผนวกที่ ก4-ก7

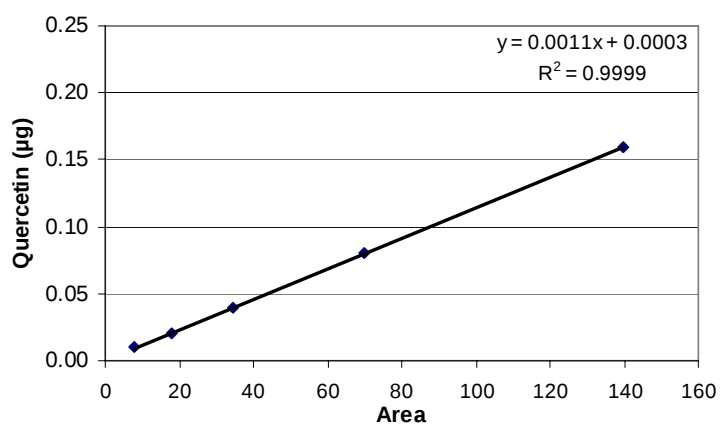
9.4 วิธีการคำนวณ

9.4.1 อ่านค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารที่เวลาที่พบ (retention time) ตรงกับเวลาของสารมาตรฐาน โดยพื้นที่ใต้กราฟถูกคำนวณออกมาจากโปรแกรม

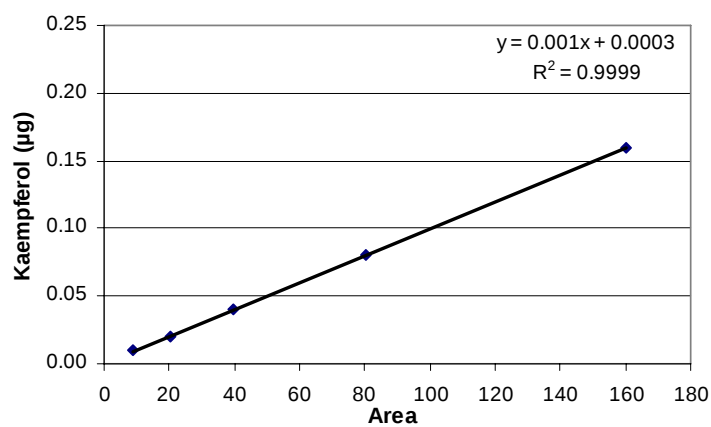
9.4.2 ปริมาณสารต่างๆ ที่พบในตัวอย่างคำนวณได้โดยแทนที่พื้นที่ใต้กราฟลงในสมการจากกราฟมาตรฐาน



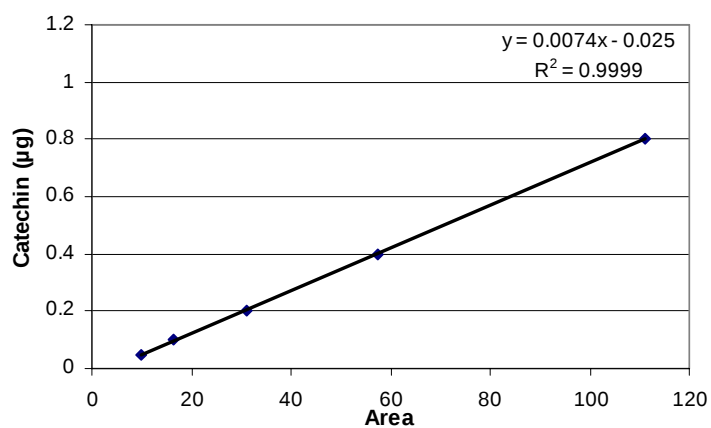
ภาพผนวกที่ ก3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสม



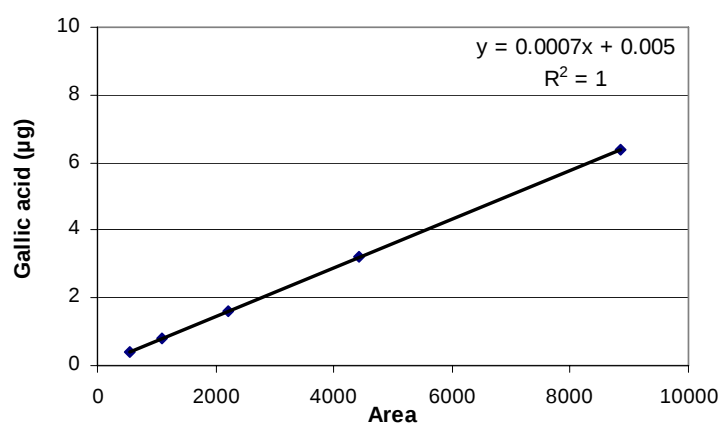
ภาพผนวกที่ ก4 กราฟมาตรฐานของควอเซติน



ภาพผนวกที่ ก5 กราฟมาตรฐานของแคมพ์เฟอร์อล



ภาพผนวกที่ ก6 กราฟมาตรฐานของเคทเทคิน



ภาพผนวกที่ ก7 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน

ข1. การวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH) assay (ดัดแปลงจาก Singh *et al.*, 2002)

1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 1.1.2 เครื่องทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenizer)
- 1.1.3 เครื่องสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียง (sonicator)
- 1.1.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerate centrifuge)
- 1.1.5 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- 1.1.6 ขวดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร
- 1.1.7 หลอดทดลอง
- 1.1.8 ปิเปตขนาด 5 มิลลิลิตร

1.2 สารเคมี

- 1.2.1 เมทานอลเข้มข้นร้อยละ 80
- 1.2.2 สารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

1.3 วิธีการสกัด

- 1.3.1 นำตัวอย่างแห้งซึ่งให้น้ำหนักที่แน่นอน 2.000 กรัม
- 1.3.2 เติมนิเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
- 1.3.3 ปั่นด้วยเครื่องทำให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 1 นาที
- 1.3.4 นำไปเข้าเครื่องสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียงที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 20 นาที
- 1.3.5 หมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °ซ ด้วยความเร็วรอบ 6000

รอบต่อนาที ด้วยหัว rotor F28/36 (ประมาณ 4598 xg) นาน 20 นาที

- 1.3.6 แยกส่วนใส่ไว้ และนำส่วนตะกอนไปสกัดอีกครั้งหนึ่งตั้งแต่ข้อ 1.3.2 -
 1.3.5 นำส่วนใสมารวมกัน ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 ให้ได้ 50 มิลลิลิตร

1.4 วิธีการวิเคราะห์

- 1.4.1 นำสารสกัดมาเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ ด้วยเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 80
- 1.4.2 นำสารสกัด 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรุนแรง ปั่นไว้นาน 20 นาที
- 1.4.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร
- 1.4.4 วัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงควบคุม (control OD) โดยทำตามข้อ 1.4.2-1.4.3 แต่ใช้สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 แทนสารสกัด

1.5 วิธีการคำนวณ

- 1.5.1 นำค่าการดูดกลืนคลีนแสงมาคำนวณค่า % radical scavenging activity ดังสมการที่ 21 เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง % radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดดังแสดงในภาพผนวกที่ ข1 และภาพผนวกที่ ข2
- 1.5.2 หาปริมาณของสารสกัดที่ทำให้ค่า % radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50 ได้เป็นค่า IC_{50}
- 1.5.3 นำค่า IC_{50} มาคำนวณเป็นค่าประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) ด้วยสูตรดังสมการที่ 22

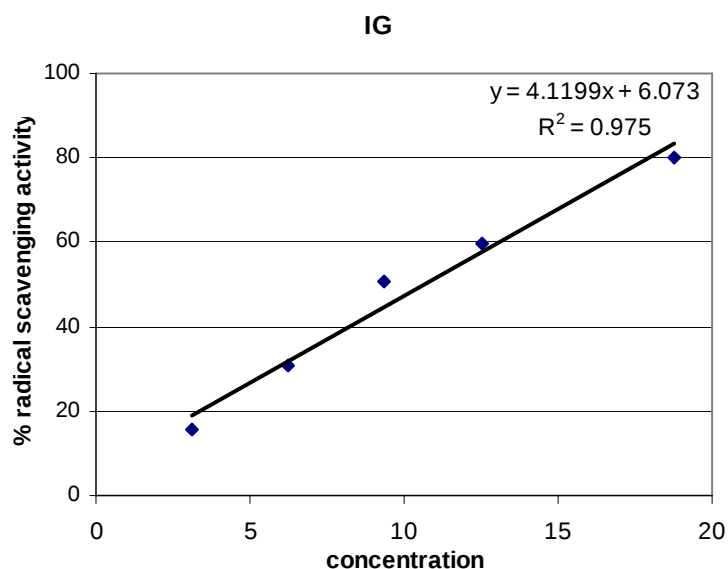
$$\% \text{ radical scavenging activity} = \frac{(\text{control OD} - \text{sample OD})}{\text{control OD}} \times 100 \text{ ---- สมการที่ 21}$$

$$\begin{aligned} \text{เมื่อ } \text{control OD} &= \text{ค่าการดูดกลืนแสงควบคุม} \\ \text{sample OD} &= \text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} \end{aligned}$$

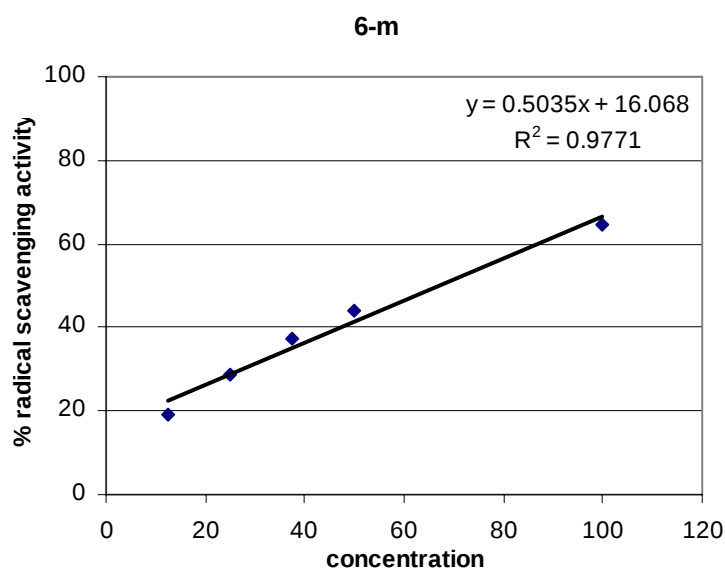
$$AE = \frac{1}{IC_{50}}$$

สมการที่ 22

เมื่อ AE = Antiradical Efficiency
 IC_{50} = ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถทำให้ค่า % radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานระหว่าง % radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานระหว่าง % radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดมะกอกน้ำอายุ 6 เดือน

ข2. การวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ORAC

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay (ดัดแปลงจาก Prior *et al.*, 2003)

2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

2.1.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

2.1.2 เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ

2.1.3 ตู้ดูดควัน

2.1.4 เครื่องผสมสาร (vortex mixer)

2.1.5 เครื่องสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียง

2.1.6 เครื่องวัดการดูดกลืนกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence spectrophotometer) พร้อม well plate สีดำ

2.1.7 ไมโครปิเปตขนาดช่วง 5-20, 40-200 และ 100-1000

2.1.8 ขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

2.2 สารเคมี

2.2.1 เฮกเซน

2.2.2 แก๊สไนโตรเจน

2.2.3 สารละลายอะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติก สัดส่วน 70/29.5/0.5 (v/v/v)

2.2.4 อะซิโตน

2.2.5 สารละลาย RMCD เข้มข้นร้อยละ 7 ในสารละลายอะซิโตน/น้ำ 50/50

2.2.6 สารละลายฟลูออเรสซิน

2.2.7 สารละลาย AAPH

2.2.8 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0

2.2.9 สารมาตรฐาน Trolox

2.3 วิธีการเตรียมสารเคมี

2.3.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0

ชั่งโซเดียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (มวลโมเลกุล 137.99) 4.00 กรัม รวมกับ ไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต (มวลโมเลกุล 141.96) 6.53 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับให้ได้ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร วัดพีเอชและปรับให้ได้ 7.0

2.3.2 สารละลายฟลูออเรสซิน

FL #1 ชั่งสารฟลูออเรสซิน 0.0225 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0

FL #2 ปิเปต FL #1 มา 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0

FL working solution

ปิเปต FL #2 มา 320 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0

2.3.3 สารมาตรฐาน Trolox (ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0)

Stock standard

ชั่ง Trolox 0.0062 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร

Trolox เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (T50)

ปิเปต Stock standard มา 1 มิลลิลิตร เติมละลายในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 9 มิลลิลิตร

Trolox เข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (T25)

ปิเปต T50 มา 5 มิลลิลิตร เติมละลายในสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร

Trolox เข้มข้น 12.5 ไมโครโมลาร์ (T12.5)

ปิเปต T50 มา 5 มิลลิลิตร เติมละลายในสารละลายฟอสเฟต
บัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร

Trolox เข้มข้น 6.25 ไมโครโมลาร์ (T6.25)

ปิเปต T50 มา 5 มิลลิลิตร เติมละลายในสารละลายฟอสเฟต
บัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร

2.3.4 สารละลาย AAPH

ชั่งสาร AAPH 0.1720 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความ
เข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ

2.4 วิธีการสกัด

2.4.1 ชั่งตัวอย่างแห้งมา 0.500 กรัม เติมเฮกเซน 10 มิลลิลิตร

2.4.2 หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที ด้วยหัว rotor F28/36 (ประมาณ
1565 xg) นาน 15 นาที

2.4.3 แยกส่วนเฮกเซนออกมา แล้วนำส่วนตะกอนไปสกัดอีกครั้ง แล้วนำส่วนเฮกเซน
มารวมกัน ได้เป็นสารสกัดส่วนชอบไขมัน (lipophilic)

2.4.4 ระเหยเฮกเซนออกจากส่วนตะกอนด้วยแก๊สไนโตรเจนภายใต้สุญญากาศ

2.4.5 เติมสารละลายอะซิโตน/น้ำ/กรดอะซิติก 10 มิลลิลิตร

2.4.6 ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) นาน 30 วินาที

2.4.7 นำไปปั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียงนาน 15 นาที โดยมีการเขย่าหลอดเป็นครั้ง
คราว ปล่อยให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที และมีการเขย่าหลอดเป็นครั้งคราว

2.4.8 หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที ด้วยหัว rotor F28/36 (ประมาณ
1565 xg) นาน 15 นาที

2.4.9 แยกส่วนใสออกมา ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตรด้วยสารละลายอะซิโตน/
น้ำ/กรดอะซิติก ได้เป็นสารสกัดส่วนชอบน้ำ (hydrophilic)

2.5 วิธีการเตรียมสารสกัด

2.5.1 วิธีการเตรียมสารสกัดส่วนขอบไข่ม้วน นำสารสกัดมาระเหยเหวกลงให้แห้ง เติมอะซิโตน 250 ไมโครลิตร และสารละลาย RMCD 750 ไมโครลิตร เขย่าตัวอย่างจนละลายหมด เจือจางตัวอย่างใหม่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วย สารละลาย RMCD

2.5.2 วิธีการเตรียมสารสกัดส่วนที่ขอบน้ำ เจือจางสารสกัดด้วยสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ พีเอช 7.0

2.6 วิธีการวิเคราะห์

2.6.1 นำสารสกัด 20 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลต

2.6.2 อุ่นสารละลายฟลูออเรสซินที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 15 นาที แล้วเติมลงใน ไมโครเพลตหลุมละ 200 ไมโครลิตร

2.6.3 ใส่ไมโครเพลตลงในเครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสงฟลูออเรสเซนซ์

2.6.4 กำหนดให้เครื่องเติมสารละลาย AAPH หลุมละ 37.5 และ 75 ไมโครลิตร สำหรับส่วนขอบน้ำและส่วนขอบไข่ม้วนตามลำดับ โดยเริ่มเติมสาร AAPH ที่รอบที่ 4

2.6.5 อ่านค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ทันที โดยมีการตั้งค่าได้แก่

No. of cycles	50
Cycle time (s)	65
No. of flashes	10
Excitation filter	480 nm
Emission filter	520 nm
Positioning delay (s)	0.2
Shaking width (mm)	3
Shaking mode	ordital
Additional shaking	8 s after injection cycle
Injection speed (µl/s)	310
Injection cycle	4
Injection start time (s)	0.0
Target temperature	37.0

2.6.6 เติมสารฟลูออเรสซิน 200 ไมโครลิตรลงในไมโครเพลตเพื่อให้เครื่องอ่านค่า gain adjustment

2.6.7 วัดค่าความเข้มแสงควบคุมโดยใช้ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนสารสกัด

2.6.8 สร้างกราฟมาตรฐานของ Trolox ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของ Trolox โดยใช้สารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์

2.7 วิธีการคำนวณ

2.7.1 คำนวณพื้นที่ใต้กราฟสุทธิ (net AUC) ของตัวอย่าง ดังแสดงในสมการที่ 23 และ 24

2.7.2 นำค่าพื้นที่ใต้กราฟสุทธิแทนที่ในสมการของกราฟมาตรฐานของ Trolox แล้วนำมาคำนวณเป็นปริมาณของ Trolox ในหน่วยไมโครโมลต่อต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด โดยกราฟมาตรฐานของส่วนขอบไข่ม้วน แสดงในภาพผนวกที่ ข3 และส่วนขอบน้ำแสดงในภาพผนวกที่ ข4

$$AUC = (0.5 + f_5/f_4 + f_6/f_4 + f_7/f_4 + \dots + f_i/f_4) \times CT \quad \text{--- สมการที่ 23}$$

$$net\ AUC = AUC_{sample} - AUC_{blank} \quad \text{-----สมการที่ 24}$$

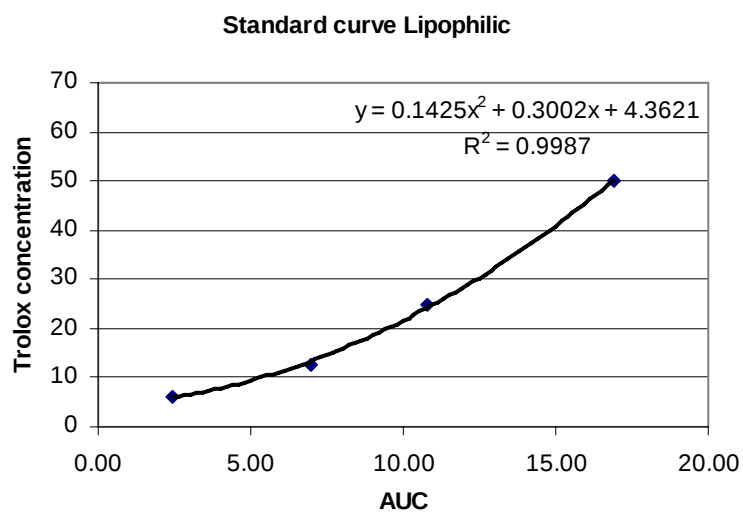
เมื่อ AUC = พื้นที่ใต้กราฟ (Area Under Curve)

f_4 = ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์เริ่มต้นโดยเริ่มอ่านที่รอบที่ 4

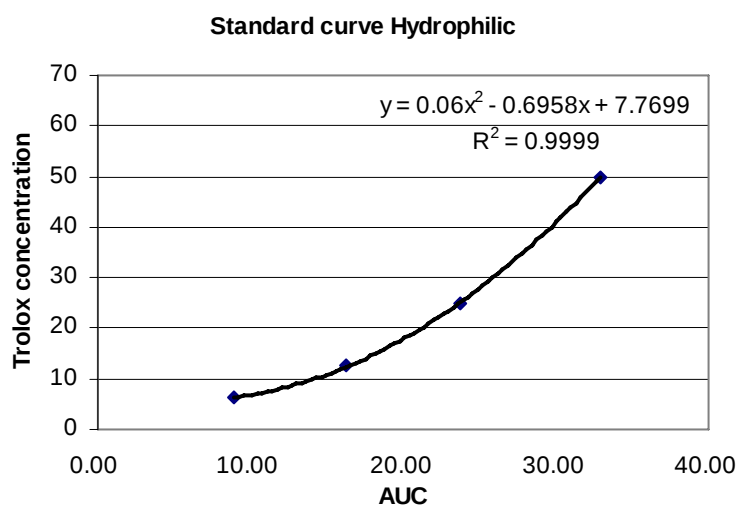
(initial fluorescence reading at cycle 4)

f_i = ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่ออ่านที่รอบที่ i
(fluorescence reading at cycle i)

CT = เวลาที่ใช้ต่อรอบ มีหน่วยเป็นนาทีก (Cycle time)



ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานของส่วนชอบไขมัน



ภาพผนวกที่ ข4 กราฟมาตรฐานของส่วนชอบน้ำ

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางผนวกที่ ค1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	204,265.0	68,088.3	21.334	0.000
Error	12	38,297.8	3,191.5		
total	15	242,562.8			

ตารางผนวกที่ ค2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณฟลาโวนอยด์ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	624.4	208.148	31.919	0.000
Error	12	78.2	6.521		
total	15	702.7			

ตารางผนวกที่ ค3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกรดแกลลิกเมื่อวัดด้วยวิธี HPLC ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	368,736.1	122,912.0	531.195	0.000
Error	12	2,776.6	231.4		
total	15	371,512.8			

ตารางผนวกที่ ค4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของควอเซตินเมื่อวัดด้วยวิธี HPLC ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	7.175	2.392	161.859	0.000
Error	12	0.175	0.015		
total	15	7.352			

ตารางผนวกที่ ค5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) เมื่อวัดด้วยวิธี DPPH ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	2.238×10^{-4}	7.460×10^{-5}	10.444	0.000
Error	4	2.857×10^{-5}	7.143×10^{-6}		
total	7	2.524×10^{-4}			

ตารางผนวกที่ ค6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในส่วนขอบใบมัน (L-ORAC) เมื่อวัดด้วยวิธี ORAC ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	0.514	0.171	197.484	0.000
Error	20	0.017	8.652×10^{-4}		
total	23	0.531			

ตารางผนวกที่ ค7 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในส่วนชอบน้ำ (H-ORAC) เมื่อวัดด้วยวิธี ORAC ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	1,552.4	517.463	21.879	0.000
Error	20	473.0	23.651		
total	23	2,025.4			

ตารางผนวกที่ ค8 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งหมด (TAC) เมื่อวัดด้วยวิธี ORAC ของมะขามป้อมที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (IG), เกิดสีน้ำตาลนาน 4 ชั่วโมง (IB4), 6 ชั่วโมง (IB6) และ 8 ชั่วโมง (IB8)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	1,563.9	521.303	21.887	0.000
Error	20	476.4	23.818		
total	23	2,040.3			

ตารางผนวกที่ ค9 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	287,164.8	95,721.6	2,964.292	0.000
Error	12	387.5	32.3		
total	15	287,552.3			

ตารางผนวกที่ ค10 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณฟลาโวนอยด์ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	5,098.12	1,699.372	10,532.52	0.000
Error	12	1.94	0.161		
total	15	5,100.05			

ตารางผนวกที่ ค11 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกรดแกลลิกเมื่อวัดด้วยวิธี HPLC ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	4,835.468	1,611.823	300.440	0.000
Error	12	64.378	5.365		
total	15	4,899.847			

ตารางผนวกที่ ค12 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) เมื่อวัดด้วยวิธี DPPH ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	2.343×10^{-4}	7.810×10^{-5}	320.923	0.000
Error	4	9.735×10^{-7}	2.434×10^{-7}		
total	7	2.353×10^{-4}			

ตารางผนวกที่ ค13 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในส่วนขอบไขมัน (L-ORAC) เมื่อวัดด้วยวิธี ORAC ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	0.423	0.141	210.044	0.000
Error	20	0.013	6.712×10^{-4}		
total	23	0.436			

ตารางผนวกที่ ค14 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในส่วนขอบน้ำ (H-ORAC) เมื่อวัดด้วยวิธี ORAC ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	1,386.414	462.138	827.486	0.000
Error	20	11.170	0.558		
total	23	1,397.584			

ตารางผนวกที่ ค15 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันทั้งหมด (TAC) เมื่อวัดด้วยวิธี ORAC ของมะกอกน้ำอ่อน (5-m), มะกอกน้ำปกติ (6-m), มะกอกน้ำแก่ (7-m) และมะกอกน้ำแก่มาก (8-m)

Source	Degree of Freedom (df)	Sum of Squares (SS)	Mean Squares (MS)	F	Sig
treatment	3	1,420.406	473.469	815.881	0.000
Error	20	11.606	0.580		
total	23	1,432.012			

ประวัติการศึกษา

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวอริยา เรืองจักรเพชร
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 9 กันยายน 2523
สถานที่เกิด	เขตดอนเมือง จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2545)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนบัณฑิตศึกษา โครงการพัฒนานักบัณฑิตศึกษาและวิจัย เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2547)