



การศึกษาด้านอนุมูลอิสระในลูกหว่า

โดย

นางสาวนิตยา เขียวอ่อน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีศึกษา

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การศึกษาด้านอนุมูลิสรະในลูกหัว

โดย

นางสาวนิตยา เขียวอ่อน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีศึกษา

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT IN *SYZYGium CUMINI* FRUIT

By

Nittaya Kheaw-on

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Department of Chemistry

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2007

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “ การศึกษาด้าน
อนุมูลิสระในลูกหว่า ” เสนอโดย นางสาวนิตยา เขียวอ่อน เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะดังกูร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรนาถ สุนทรวัฒน์
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัศมี ชัยสุขสันต์

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. สุภชัย สุภลักขณ์นารี)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธิติรัตน์ เอกสิทธิกุล)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดลฤดี นิยมพาลี)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรนาถ สุนทรวัฒน์)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัศมี ชัยสุขสันต์)

...../...../.....

46301302 : สาขาวิชาเคมีศึกษา

คำสำคัญ : ลูกหว่า/สารต้านอนุมูลอิสระ

นิตยา เขียวอ่อน : การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในลูกหว่า. อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.อรนาถ สุนทรวัฒน์ และ ผศ.ดร.รัสมิ ชัยสุขสันต์. 116 หน้า.

การศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากลูกหว่า (*Syzygium cumini* Skeels) โดยทำการศึกษาส่วนเนื้อกับเปลือก และเมล็ดของลูกหว่าในระยะผลอ่อน ผลแก่ และผลสุก จากลูกหว่า 2 ลักษณะคือลูกหว่าสดและอบแห้ง การสกัดตัวอย่างสดและแห้งของเนื้อกับเปลือก และเมล็ดจากผลลูกหว่าระยะต่าง ๆ ด้วย เมทานอล และ เมทานอลที่เป็นกรดเล็กน้อย ได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) ทำการแยกแวนโทไซยานินจากสารสกัดหยาบของเนื้อกับเปลือกลูกหว่าสดในระยะผลสุกโดยอาศัยคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20 นำสารสกัดหยาบและสารที่เก็บจากคอลัมน์มาทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และปริมาณแวนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential พบว่า สารสกัดจากตัวอย่างสดจะให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่าตัวอย่างที่อบแห้ง เมื่อใช้เมทานอลที่มีความเป็นกรดเล็กน้อยจะได้ปริมาณสารสกัดหยาบ ปริมาณสารประกอบฟีนอลและปริมาณแวนโทไซยานินมากกว่าเมทานอล สารสกัดหยาบจากเมล็ดมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดจากส่วนเนื้อกับเปลือกของลูกหว่า อีกทั้งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงกว่าด้วย จากการเปรียบเทียบลูกหว่าในระยะต่าง ๆ พบว่า สารสกัดหยาบจากผลอ่อนมีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าระยะผลแก่และผลสุก สารสกัดหยาบจากเนื้อกับเปลือกลูกหว่าสดในระยะผลสุกที่สกัดด้วยเมทานอลที่มีความเป็นกรดเล็กน้อยมีปริมาณแวนโทไซยานินสูงกว่าเนื้อกับเปลือกลูกหว่าสดในระยะผลแก่และผลอ่อน (ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเดียวกัน)

ภาควิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. 2.

46301302 : MAJOR : CHEMICAL STUDIES

KEY WORD : BLACK PLUM/ANTIOXIDANT

NITTAYA KHEAW-ON : DETERMINATION OF ANTIOXIDANT IN *SYZYGIUM CUMINI* FRUIT. THESIS ADVISORS : ASST. PROF. ORANART SUNTORNWAT, Ph.D. AND ASST. PROF. RASAMEE CHAISUKSANT, Ph.D. 116 pp.

Antioxidant activities of crude extracts from different stages of “Wa” or black blum (*Syzygium cumini* Skeels) were studied. Methanolic and acidified methanolic extracts (crude extracts) from flesh (pulp and peel) and seeds of green, light-magenta and dark purple fruits were prepared from both fresh and dried plant materials. Anthocyanin from crude extracts of fresh dark purple fruit were purified by passing through Amberlite XAD-7 and Sephadex LH-20 columns. The crude extracts and fractions obtained from column chromatography were analyzed for antioxidant activity using DPPH, ABTS and FRAP methods. Total phenolic content and total monomeric anthocyanin content were determined by Folin-Ciocalteu and spectrophotometric pH-differential method respectively. The amount of crude extract from fresh plant materials was higher than the dried one. The amount of crude extract, total phenolic content and total monomeric anthocyanin obtained from acidified methanolic extracts were significantly higher than the methanolic extract. The crude extracts from seed had higher levels of antioxidant capacities and phenolic content than the pulp. Extracts from green fruit had stronger antioxidant capacities than the light-magenta and dark purple fruits. Extraction with acidified methanol also resulted in higher amount of anthocyanin than extraction with methanol.

Department of Chemistry Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2007

Student's signature

Thesis Advisors' signature 1. 2.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ที่สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้ทำวิจัยต้องขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรนาถ สุนทรวัฒน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัศมี ชัยสุขสันต์ อาจารย์ผู้ควบคุมงานวิจัยที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา แนวคิด คำแนะนำ ตลอดจนการตรวจและแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ด้วยความดูแลเอาใจใส่ตลอดงานวิจัย

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คลฤดี นิมพาลี และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธิดารัตน์ เอกสิทธิกุล กรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาตรวจแก้ไข และให้แนวคิดรวมทั้งคำแนะนำอันมีคุณค่าแก่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่มอบทุนอุดหนุนงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านสารเคมีและอุปกรณ์การทดลองต่าง ๆ ตลอดงานวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
สารประกอบแอนโทไซยานิน (anthocyanin).....	12
ข้อมูลทั่วไปของลูกหว้า.....	20
วิธีทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	24
Free radical scavenging method	24
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay	24
2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)cation radical scavenging assay	25
Reducing power method	27
Ferric reducing antioxidant power	27
การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยวิธี Folin-Ciocalteu	27
หาปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานิน	28
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	30
2 เครื่องมือและสารเคมี.....	31
เครื่องมือ / อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	31
สารเคมี.....	32
การเตรียมสารละลาย.....	33
ตัวอย่าง.....	35
3 การทดลองและผลการทดลอง	36

บทที่	หน้า
ขั้นตอนการสกัดลูกหว้าสดและลูกหว้าอบแห้ง	36
การสกัดลูกหว้าสด.....	36
การสกัดลูกหว้าอบแห้ง.....	37
ผลการทดลอง.....	43
การศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH.....	44
การศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS.....	54
การศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP	63
การศึกษาการหาปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยใช้ Folin-Ciocalteu method..	69
การศึกษาการหาปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานิน	75
การแยกสาร ในกลุ่มแอนโทไซยานินจากสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสด ในระยะผลสุกโดยใช้ Column Chromatography	78
Amberlite XAD-7 Column Chromatography	78
Sephadex LH-20 Column Chromatography	81
การนำสารที่ผ่านคอลัมน์ทั้งสองชนิดมาทดสอบความสามารถในการเป็น สารต้านอนุมูลอิสระ	84
วิธี DPPH.....	84
วิธี ABTS	85
วิธี FRAP.....	86
การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล	87
การศึกษาการหาปริมาณแอนโทไซยานิน.....	88
4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	91
บรรณานุกรม.....	104
ภาคผนวก.....	109
ประวัติผู้วิจัย.....	116

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอล	3
2	อนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล	4
3	โครงสร้างของคูมาริน	5
4	โครงสร้างของลิกแนน	6
5	โครงสร้างของแทนนิน	8
6	โครงสร้างของโทโคเฟอรอล และ โทโคไตรอีนอล	9
7	ขั้นตอนการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์	10
8	โครงสร้างของสารประกอบฟลาโวนอยด์	11
9	โครงสร้างหลักของ flavylum cation	12
10	ขั้นตอนการสังเคราะห์ p-coumaroyl-CoA (phenylpropanoid metabolism)	13
11	ขั้นตอนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอล	14
12	การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน	15
13	โครงสร้างของแอนโทไซยานินที่พบทั่วไปในพืช โดยที่ R คือโมเลกุลของน้ำตาล	17
14	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานินเมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH	19
15	สเปกตรัมของแอนโทไซยานิน	20
16	ภาพของต้นลูกหว้า ดอกหว้า และผลลูกหว้าในระยะต่าง ๆ	21
17	โครงสร้างของ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	24
18	โครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)	25
19	โครงสร้างของ ABTS ^{•+}	26
20	ลูกหว้าในระยะต่าง ๆ ดอก ผลอ่อน ผลแก่ ผลสุก และเมล็ดหว้า	29
21	แผนผังแสดงผลการสกัดลูกหว้าระยะต่าง ๆ รวมไปถึงส่วนต่าง ๆ ของลูกหว้าที่นำมา สกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ เมทานอล (MeOH) และ 0.1% HCl ในเมทานอล (HMeOH)	40
22	แผนผังสรุปของการสกัดลูกหว้าด้วย เมทานอล / 0.1% HCl ใน เมทานอล	40
23	แผนผังการนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลกับ หาปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานิน	41

รูปที่		หน้า
24	แผนผังการนำสารสกัดของเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดระยะผลสุกมาทำการแยกและทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ หาปริมาณสารประกอบฟีนอล และหาปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานิน	42
25	Kinetic curve ของDPPH [•] ผสมกับเมทานอล สารตัวอย่าง และ สารละลายมาตรฐาน Trolox.....	45
26	การหาค่า EC ₅₀ ของสารละลายมาตรฐาน Trolox ด้วยวิธี DPPH.....	46
27	การหาค่า EC ₅₀ ของสารละลายมาตรฐาน Vitamin C ด้วยวิธี DPPH	47
28	การหาค่า EC ₅₀ ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่สกัดด้วยเมทานอล (FBP-MeOH) ด้วยวิธี DPPH.....	47
29	การหาค่า EC ₅₀ ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่สกัดด้วย 0.1% HCl ในเมทานอล (FBP-HMeOH) ด้วยวิธี DPPH	48
30	การหาค่า EC ₅₀ ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสุกด้วยเมทานอล (FBS-MeOH) ด้วยวิธี DPPH.....	48
31	การหาค่า EC ₅₀ ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสุกด้วย 0.1% HCl ในเมทานอล (FBS-HMeOH) ด้วยวิธี DPPH	49
32	โครงสร้างของ trolox และ Vitamin C	49
33	กราฟแสดงค่า EC ₅₀ ของสารสกัดลูกหว้า ทั้ง 24 ตัวอย่างและสารมาตรฐาน Trolox และ Vitamin C ด้วยวิธี DPPH	52
34	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า EC ₅₀ ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดและอบแห้งและสารมาตรฐาน Trolox และ Vitamin C ด้วยวิธี DPPH.....	53
35	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า EC ₅₀ ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสดและอบแห้งและสารมาตรฐาน Trolox และVitamin C ด้วยวิธี DPPH.....	53
36	Kinetic curve ของABTS ^{•+} ผสมกับเมทานอล สารตัวอย่าง และ สารละลายมาตรฐาน Trolox	55
37	การหาค่า EC ₅₀ ของสารละลายมาตรฐาน Trolox ด้วยวิธี ABTS.....	56
38	การหาค่า EC ₅₀ ของสารละลายมาตรฐาน Vitamin C ด้วยวิธี ABTS.....	56
39	การหาค่า EC ₅₀ ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่สกัดด้วย เมทานอล (FBP-MeOH) ด้วยวิธี ABTS.....	57

รูปที่		หน้า
40	การหาค่า EC_{50} ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่สกัดด้วย 0.1% HCl ใน เมทานอล (FBP-HMeOH) ด้วยวิธี ABTS	57
41	การหาค่า EC_{50} ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสุกด้วย เมทานอล (FBS-MeOH) ด้วย วิธี ABTS.....	58
42	การหาค่า EC_{50} ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสุกด้วย 0.1% HCl ใน เมทานอล (FBS-HMeOH) ด้วยวิธี ABTS	58
43	กราฟแสดงค่า EC_{50} ของสารสกัดลูกหว้า ทั้ง 24 ตัวอย่างและสารมาตรฐาน Trolox และ Vitamin C ด้วยวิธี ABTS	61
44	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า EC_{50} ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดและ อบแห้งและสารมาตรฐาน Trolox และ Vitamin C ด้วยวิธี ABTS.....	62
45	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า EC_{50} ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสดและอบแห้ง และสารมาตรฐาน Trolox และ Vitamin C ด้วยวิธี ABTS.....	62
46	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ กับค่าการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 593 nm	65
47	กราฟแสดงค่า FRAP values ของสารสกัดลูกหว้า ทั้ง 24 ตัวอย่าง ด้วยวิธี FRAP.....	67
48	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า FRAP values (mmol Fe^{2+} /g exctrat) ของ สารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดและอบแห้งด้วยวิธี FRAP	68
49	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า FRAP values (mmol Fe^{2+} /g exctrat) ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสดและอบแห้งด้วยวิธี FRAP	68
50	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 760 nm	71
51	กราฟแสดงค่า gallic acid equivalent (GAE) ของสารสกัดลูกหว้า ทั้ง 24 ตัวอย่าง	73
52	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g exctrat) ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดและเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้ง	74
53	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g exctrat) ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสดและสารสกัดเมล็ดลูกหว้าอบแห้ง	74

รูปที่	หน้า
54	ปริมาณแอนโทไซยานิน(mg ในเทอมของ PGD-3-glu /g extract) ของสารสกัดเนื้อ กับเปลือกลูกหว้าสดและอบแห้งด้วยเมทานอล และ 0.1% HCl ในเมทานอล ... 78
55	โครมาโตแกรมของการแยกสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน ของสารสกัดจาก เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่สกัดด้วย เมทานอล ด้วยคอลัมน์ Amberlite XAD-7. 79
56	โครมาโตแกรมของการแยกสารในกลุ่มแอนโทไซยานินของสารสกัดจาก เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่สกัดด้วย 0.1% HCl ใน เมทานอลด้วยคอลัมน์ Amberlite XAD-7 80
57	โครมาโตแกรมของการแยกขนาดของสารในกลุ่มแอนโทไซยานินของสารสกัด เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก (ที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite เป็นสารที่สกัดจาก เมทานอล) ด้วยคอลัมน์ Sephadex LH-20 82
58	โครมาโตแกรมของการแยกขนาดของสารในกลุ่มแอนโทไซยานินของสารสกัด เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก (ที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite เป็นสารที่สกัดจาก 0.1% HCl ใน เมทานอล) ด้วยคอลัมน์ Sephadex LH-20 82
59	ค่า EC ₅₀ จากวิธี DPPH ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก ก่อนและหลังผ่าน คอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20..... 85
60	ค่า EC ₅₀ จากวิธี ABTS ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก ก่อนและหลังผ่าน คอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20..... 86
61	ค่า FRAP values ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก ก่อนและหลังผ่าน คอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20..... 87
62	ค่า Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g exctrat) ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้า สุกก่อนและหลังผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20 88
63	ปริมาณแอนโทไซยานิน (mg PGD-3-glu /g extract) ของสารสกัดเนื้อกับเปลือก ลูกหว้าสุกก่อนและหลังผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และSephadex LH-20 89

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลในผลไม้	3
2 แอนโทไซยานิน ที่พบในธรรมชาติ.....	16
3 สารอาหาร ของหัวส่วนที่กินได้ (ต่อ 100 กรัม)	22
4 ค่าน้ำหนักโมเลกุล Molar Extinction Coefficient และความยาวคลื่นที่ pH 1 ของ แอนโทไซยานิน	29
5 รายชื่อสารเคมี บริษัทผู้ผลิต และเกรด	32
6 แสดงชื่อที่ใช้เรียกลูกหว้าระยะต่างรวมสัญลักษณ์ที่ใช้แทนชื่อนั้น	39
7 น้ำหนักสารสกัด mg / g น้ำหนักตัวอย่างสดที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอล	43
8 น้ำหนักสารสกัด mg / g น้ำหนักตัวอย่างสดที่สกัดด้วย 0.1% HCl ใน เมทานอล	44
9 ค่า EC ₅₀ , Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และ Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC)ของสารสกัดเนื้อกับเปลือก ลูกหว้าสดและ เนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้งจากวิธี DPPH.....	50
10 ค่า EC ₅₀ , Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และ Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสด และเมล็ดลูกหว้าอบแห้งจากวิธี DPPH.	51
11 ค่า EC ₅₀ , Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)และ Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC)ของสารสกัดเนื้อกับเปลือก ลูกหว้าสดและ เนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้งจากวิธี ABTS.....	59
12 ค่า EC ₅₀ ,Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)และ Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC)ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสดและ เมล็ดลูกหว้าอบแห้ง จากวิธี ABTS	60
13 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ FeSO ₄ .7H ₂ O กับค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 593 nm.....	64
14 ค่า FRAP values ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดและของสารสกัด เนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้ง	65
15 ค่า FRAP values ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสด และ ของสารสกัดเมล็ด ลูกหว้าอบแห้ง	66

ตารางที่	หน้า
16	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Gallic acid (mg/mL) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm.....
17	ค่า Gallic acid equivalent (GAE) ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดและของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้ง
18	ค่า Gallic acid equivalent (GAE) ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสด และ ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าอบแห้ง
19	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 nm ของสารละลาย pH 1.0 กับ buffer pH 4.5
20	ค่าความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน และปริมาณแอนโทไซยานิน (mg/g extract) [ในเทอมของ PGD-3-glu และ malvidin-3,5-diglucoside(Mvd-3,5-diglu)] ...
21	น้ำหนักสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกก่อนและหลังผ่านคอลัมน์AmberliteXAD-7
22	น้ำหนักสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกก่อนและหลังผ่านคอลัมน์Sephadex LH-20
23	ค่า EC ₅₀ จากวิธี DPPH ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20.....
24	ค่า EC ₅₀ จากวิธี ABTS ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20.....
25	ค่า FRAP values ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20
26	ค่า Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g extract) ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20
27	ความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน และปริมาณแอนโทไซยานิน (mg/g extract) ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20 [ในเทอมของ pelargonidin-3-glucoside (PGD-3-glu) (mg/L) และ malvidin-3,5-diglucoside(Mvd-3,5-diglu)]
28	เปอร์เซ็นต์สารสกัดของเนื้อกับเปลือก และเมล็ดลูกหว้าสดและอบแห้ง
29	ค่า EC ₅₀ ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกและเมล็ด ลูกหว้าสดและอบแห้งด้วยวิธี DPPH และ วิธี ABTS.....
30	ค่า FRAP values ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกและเมล็ดลูกหว้า

ตารางที่		หน้า
31	ปริมาณสารประกอบฟีนอล ของสารสกัดเนื้อมะเขือเทศและอบแห้ง	96
32	ปริมาณแอนโทไซยานิน ของสารสกัดเนื้อมะเขือเทศและอบแห้ง 97	
33	ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลและปริมาณแอนโทไซยานิน โดยวิธีต่าง ๆ ของสารสกัดมะเขือเทศตัวอย่าง	98
34	เปรียบเทียบวิธีทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด เนื้อมะเขือเทศ(ผลสุก) ก่อนและหลังผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20	103

บทที่ 1

บทนำ

ในอุตสาหกรรมอาหารมักจะมีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) ลงในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อยืดอายุของผลิตภัณฑ์ (shelf life) ให้ยาวนานขึ้น ลดการสูญเสียคุณค่าทางอาหาร และยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ในผลิตภัณฑ์ สารสังเคราะห์ดังกล่าวอาจมีผลข้างเคียงที่อาจสร้างปัญหาสุขภาพให้ผู้บริโภคโดยเฉพาะอาจกระตุ้นให้เกิดโรคมะเร็ง หรืออาการแพ้สารเคมี ทำให้เกิดความต้องการสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติมาทดแทนสารสังเคราะห์ ส่งผลให้ทีมงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดแยก วิเคราะห์โครงสร้าง และศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารธรรมชาติหลายชนิด (Tsuda et al. 1994 : 2407)

แหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ คือสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) ที่พบในทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็น ผัก ผลไม้ ถั่ว ใบ เมล็ด เปลือก และราก (Pratt and Hudson 1990) สารประกอบฟีนอลอาจมีหน้าที่หลายอย่าง เช่น การเป็นตัวรีดิวส์ ตัวจับโลหะ รวมถึงเป็น singlet oxygen quencher ด้วย จากการศึกษาพบว่าสารประกอบฟีนอลในอาหารและเครื่องดื่มที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงจะมีส่วนช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจ และมะเร็งได้ (Tsuda et al. 1994 : 2407)

สารประกอบฟีนอล ในพืชจัดเป็น secondary metabolite ที่มีความสำคัญ ต่อพืชมาก โดยทำหน้าที่หลากหลาย เช่น การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) สารต้านจุลชีพ (antimicrobial) ตัวรับพลังงานแสง (photoreceptor) ช่วยเพิ่มสีส้มสวยงามให้กับพืช เพื่อดึงดูดแมลงหรือแมลงวันช่วยป้องกันหรือขับไล่การรบกวนของแมลงศัตรูพืช (feeding repellants) เป็นต้น (Pietta 2000 : 1035) สำหรับมนุษย์เราการบริโภค พืชผักและผลไม้เหล่านี้เป็นประจำนอกจากจะเป็นแหล่งใยอาหารสำคัญแล้วยังได้รับสารประกอบฟีนอลเหล่านั้นด้วย (Cao and Cao 1999 : 381) ซึ่งร่างกายเราก็จะได้รับประโยชน์จากคุณสมบัติเด่นของสารประกอบฟีนอลเหล่านั้นด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ สารเคมีที่มีความสามารถในการรับอิเล็กตรอนโคเดียว ซึ่งทำให้อิเล็กตรอนโคเดียวนั้นเสถียร และหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ โมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโคเดียว อยู่รอบนอกจัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี ซึ่งโมเลกุลหรือไอออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยา

ลูกโซ่ ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ superoxide anion radical(O_2^-) hydroxyl radical($HO^\cdot$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) (Gulcin et al. 2002 : 325-329; Yildirim et al. 2000 : 5030-5034)

แหล่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ

1. เกิดจากปฏิกิริยาภายในร่างกาย เช่นจากการทำงานของเอนไซม์ oxidases cyclooxygenase lipooxygenase และ peroxidase ปฏิกิริยา autoxidation ของ โมเลกุลขนาดเล็ก การทำงานของ Cytochrome P₄₅₀ และกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) เป็นต้น

2. เกิดจากปัจจัยภายนอก เช่น การสูบบุหรี่ การได้รับสารที่เป็นมลภาวะ การรับรังสีอัลตราไวโอเล็ตโดยตรง รวมถึงอาหารที่รับประทานเข้าไป เป็นต้น (Mazza and Miniati 1993)

อนุมูลอิสระนี้เกิดขึ้นในร่างกายมีประโยชน์ในการทำลายแบคทีเรียและไวรัส ส่งเสริมการทำงานของเม็ดเลือดขาว (macrophages และ neutrophils) ให้ทำลายเซลล์ที่ตายแล้ว และส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย

ร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้หลายวิธี

1. โดยการทำงานของเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase catalase และ glutathione peroxidase
2. สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย เช่น glutathione lipoic acid albumin cysteine และ สอร์โบินต่าง ๆ เช่น estrogen angiotensin melatonin
3. สารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร เช่น วิตามิน เอ(vitamin A) วิตามิน อี(vitamin E) วิตามิน ซี (vitamin C) แทนนิน(tanins) และสารประกอบฟีนอล เช่น กรดซินนามิก (cinnamic acid) ฟลาโวนอยด์(flavonoids) แอนโทไซยานิน(anthocyanin)

อนุมูลอิสระนั้นถึงจะมีประโยชน์ต่อร่างกายอย่างมากและร่างกายมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระที่มากเกินไปก็จริงแต่ถ้าร่างกายอยู่ในภาวะผิดปกติหรืออยู่ในภาวะเป็นโรค ซึ่งส่งผลให้ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระลดลงทำให้ร่างกายมีอนุมูลอิสระส่วนเกินที่อาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อร่างกายได้ เนื่องจากอนุมูลอิสระเหล่านี้ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเป็นอย่างมากมันจึงสามารถทำปฏิกิริยากับ คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) โปรตีน (proteins) ไขมัน(lipids) และ ดีเอ็นเอ (DNA) (Kellog and Fridovich 1975 : 8812-8817; Lai and Piette 1977 : 51-59; Wiseman and Halliwell 1996 : 17-29) ทำให้โมเลกุลต่าง ๆ เสียหายซึ่งส่งผลเสียต่อร่างกาย เช่นเกิดโรคชนิดต่าง ๆ ได้ แก่เร็วขึ้น หลอดเลือดแดงอุดตัน ต้อกระจก และมะเร็ง เป็นต้น จากข้อมูลต่าง ๆ ดังที่กล่าวมานี้ ทำให้การบริโภคอาหารจำพวกผักและผลไม้ ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่เป็นเรื่องจำเป็นเพื่อความสะดวกของร่างกาย

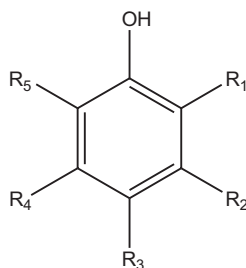
สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผักและผลไม้ ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีนอล ปริมาณสารประกอบฟีนอลที่พบจะขึ้นอยู่กับชนิด และประเภทของผักและผลไม้ (ตารางที่ 1.1)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลในผลไม้ (Wang and Lin ; Prior et al.)

ผลไม้	ปริมาณสารประกอบฟีนอล(mg GA/g puree)
Blueberries	1810 – 4580
black raspberry	2670
blackberry	2260
red raspberry	2340
strawberry	1030
carambola	2208
white guava	1589
lychee	770
longon	482
ripe mango	509
green mango	506

ที่มา : Wang, S. Y., and H-S. Lin. “Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage.” Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48 (2000): 140-146. ; Prior, R. L. et al. “Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species.” Journal of Agricultural and Food Chemist. 46 (1998): 2686-2693.

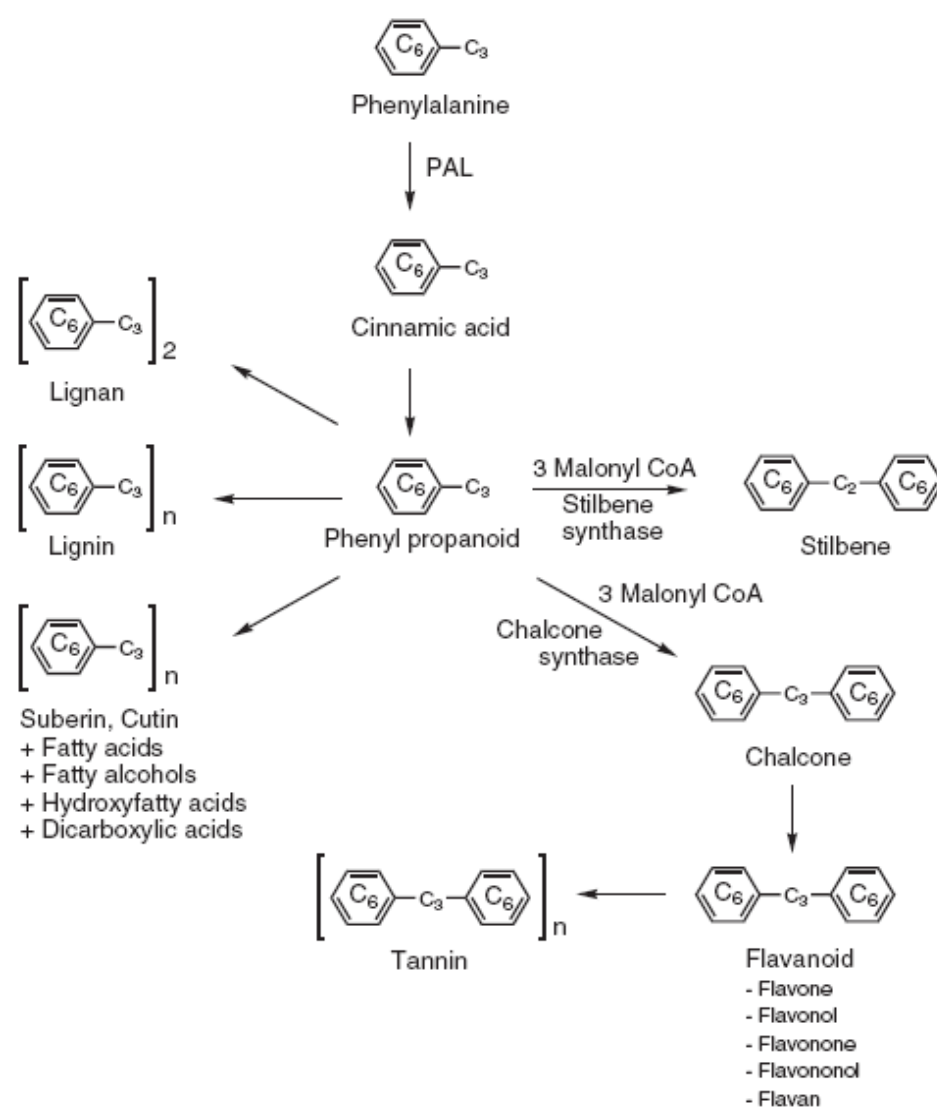
สารประกอบฟีนอล เป็นอนุพันธ์ของเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่เป็นหลัก และอาจมีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง ortho meta หรือ para ได้อีก ดังรูป 1



รูปที่ 1 โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอล

R₁-R₅ เป็นหมู่แทนที่การแทนที่ตำแหน่งต่าง ๆ ทำให้สารประกอบมีโครงสร้างแตกต่างกันไป ในพืชผักผลไม้

สารประกอบฟีนอล (Shahidi and Naczk 2004) เป็น secondary metabolites ในพืชที่สำคัญสังเคราะห์จากกรดอะมิโน phenylalanine เป็นหลักและยังสามารถสังเคราะห์ได้จาก tyrosine อนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลที่พบในพืช ได้แก่ phenols, phenylpropanoids, benzoic acid derivatives, flavonoids, stilbenes, tannins, lignins และ lignans ดังแสดงในรูปที่ 2 สารประกอบฟีนอลที่มีโครงสร้างหลากหลายนี้มีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของพืช นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการป้องกันการคุกคามจากแมลงศัตรูพืชและเชื้อโรคอีกด้วย



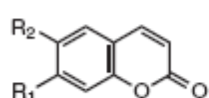
รูปที่ 2 อนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล

คุณสมบัติหลายประการในผลิตภัณฑ์จากพืชจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลที่พบในพืชชนิดนั้นๆ เช่น แอนโทไซยานิน (anthocyanins) เป็นสารประกอบฟีนอลในกลุ่มของ ฟลาโวนอยด์ที่สำคัญชนิดหนึ่งพบมากในส่วนใบ ดอกและผลของพืชที่มีสีม่วงแดงไปจนถึงน้ำเงิน มีการสกัดและนำมาใช้ประโยชน์มากมายในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ช่วยในเรื่องสีส่นของอาหาร และยังมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย

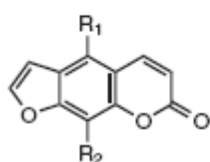
สารประกอบฟีนอลที่ได้จากพืชแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มใหญ่ คือ

1. คูมาริน (Coumarins)

คูมาริน เป็นสารประกอบแลคโตน (lactone) ของสารอนุพันธ์ *cis-O*-hydroxycinnamic acids สามารถพบได้ในอาหารบางชนิด และมักอยู่ในรูปอิสระไม่มีโมเลกุลของน้ำตาลมาเกาะ coumarins ที่สำคัญและพบบ่อย ได้แก่ simple coumarins furanocoumarins (หรือที่เรียกว่า psoralene) และ pyronocoumarins ดังแสดงตัวอย่างโครงสร้างในรูปที่ 3



Simple coumarins	R ₁	R ₂
Coumarin	H	H
Umbelliferone	OH	H
Aesculetin	OH	OH
Scopoletin	OH	OCH ₃

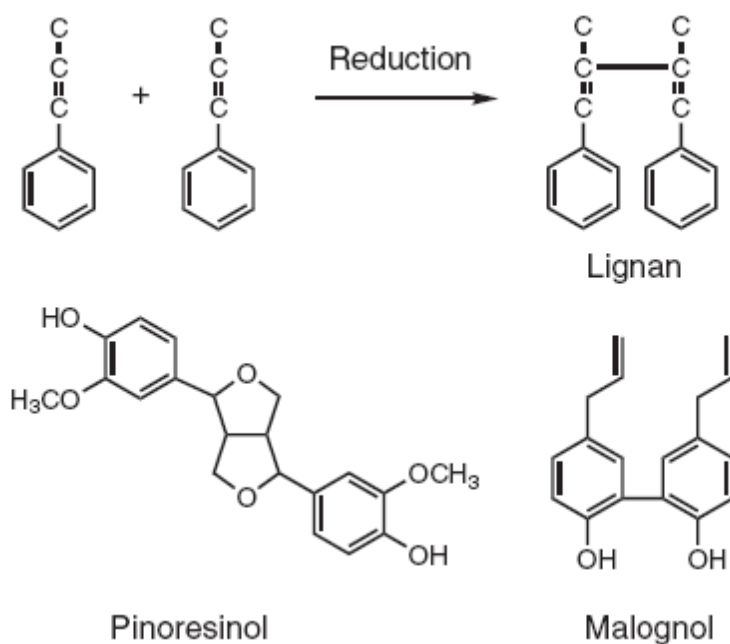


Furanocoumarins	R ₁	R ₂
Psoralen	H	H
Xanthoxin	H	OCH ₃
Bergapten	OCH ₃	H
Bergaptol	OH	H

รูปที่ 3 โครงสร้างของคูมาริน

2. ลิกแนน (Lignans) และลิกนิน (Lignins)

ลิกแนน เกิดจากการเชื่อมต่อกันของ phenylpropanoids (C6-C3) 2 หน่วย เกิดเป็น dimer ขึ้น ดังแสดงโครงสร้างในรูปที่ 4



รูปที่ 4 โครงสร้างของลิกแนน

ในพืชลิกแนนมีบทบาทในการปกป้องอันตรายให้กับพืช เช่น กรณีที่พืชเกิดบาดแผล pinoresinol จะถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในบริเวณบาดแผลนั้น หรือ malagnol ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อรา และในทางเภสัชวิทยาพบว่าลิกแนนมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านไวรัสด้วย (Davin and Lewis 1992 : 325-375)

ส่วนลิกนินนั้นเกิดจากกระบวนการโพลีเมอไรเซชัน (polymerization) ของ monolignols 3 ชนิดด้วยกัน คือ p-coumaryl sinapyl และ coniferyl alcohols องค์ประกอบของลิกนินจะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของพืช เช่น ลิกนินของพืชในกลุ่ม conifer จะมีประมาณของ coniferyl alcohol ในระดับสูงเป็นต้น นอกจากนี้ลิกนินยังสร้างพันธะโควาเลนต์กับเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืชได้ด้วย ทำให้พืชมีความแข็งแรงและย่อยสลายได้ยากสำหรับสัตว์กินพืช (herbivores) ทั่วไป

3. ซูเบอร์อิน (Suberins) และ คิวติน (Cutin)

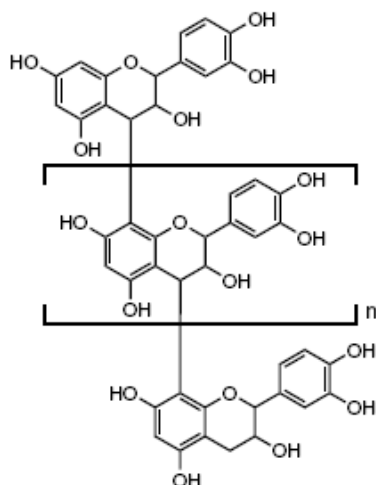
ซูเบอร์อิน คือ กลุ่มของสารประกอบโพลีเมอร์ของ phenyl propanoids มีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 14 จนถึง 30 อะตอม ภายในโมเลกุล มักพบเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช

คิวติน ก็เป็นสารประกอบโพลีเมอร์ เช่นเดียวกันกับซูเบอร์อินแต่จะมีสัดส่วนของ phenylpropanoid และ dicarboxylic acids ในปริมาณที่น้อยกว่า มักพบเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในส่วนของใบและยอด

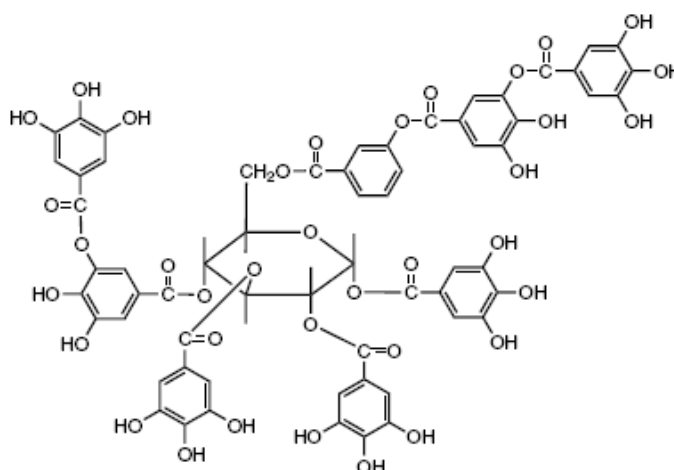
4. แทนนิน (Tannins)

แทนนินเป็นสารประกอบโพลีเมอร์ของฟีนอล (polyphenols) ที่พบโดยทั่วไปในพืช มีความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนในสารละลายได้ พบมากในส่วนเปลือกไม้ (bark) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเปลือกต้นโอ๊ค (oak)

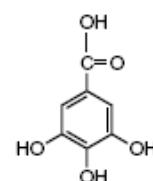
แทนนิน สามารถสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับ polysaccharides nucleic acids และ alkaloids บางชนิดได้ (Ozawa et al. 1987 : 2937-2942) เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างสามารถแบ่งแทนนินออกเป็น 2 กลุ่ม ได้ คือ hydrolysable tannins และ condensed tannins หรือที่รู้จักกันในชื่อ proanthocyanidin ดังแสดงในรูปที่ 5



Condensed Tannin



Hydrolyzable Tannin



Gallic Acid

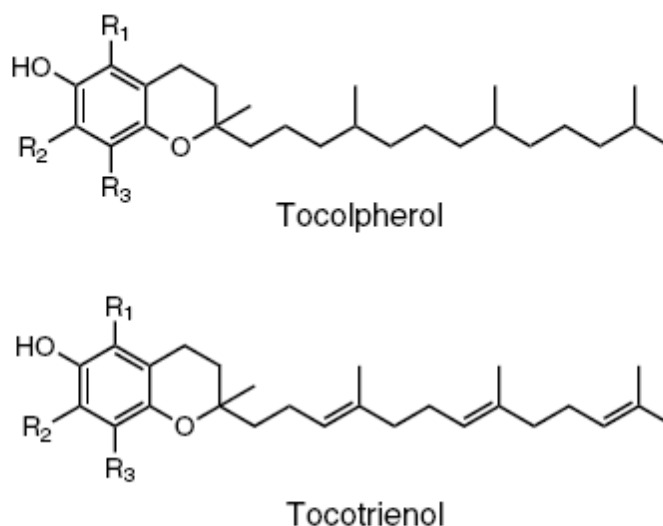
รูปที่ 5 โครงสร้างของแทนนิน

Proanthocyanidins เป็นสารประกอบโพลีเมอร์ของฟลาโวนอยด์ เช่น flavan-3-ols ในขณะที่ hydrolysable tannins นั้นมักจะเป็น gallic acids ที่เชื่อมต่อกับโมเลกุลของน้ำตาล เป็นต้น (Ferreira and Li 2000 : 193-212; Khanbabaee and Van Ree 2001 : 641-649)

และเนื่องจากส่วนของ phenolic groups ของ tannins สามารถจับกับหมู่อะมิโน (-NH) ของสายเปปไทด์และโปรตีนได้เป็นอย่างดี จึงทำให้สามารถป้องกันการถูก hydrolysis และการย่อยจากกระเพาะอาหารของสัตว์ได้ อีกทั้งยังมีบทบาทในการปกป้องพืชจากการรุกรานของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย

5. โทโคเฟอรอล (tocopherol) และ โทโคไตรอีนอล (tocotrienols)

โทโคเฟอรอล และ โทโคไตรอีนอลเป็นสารประกอบฟีนอลอีกกลุ่มหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อของพืช ถูกแบ่งออกเป็น α, β, γ และ δ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่เมทิลบน chromane ring ดังแสดงในรูปที่ 6

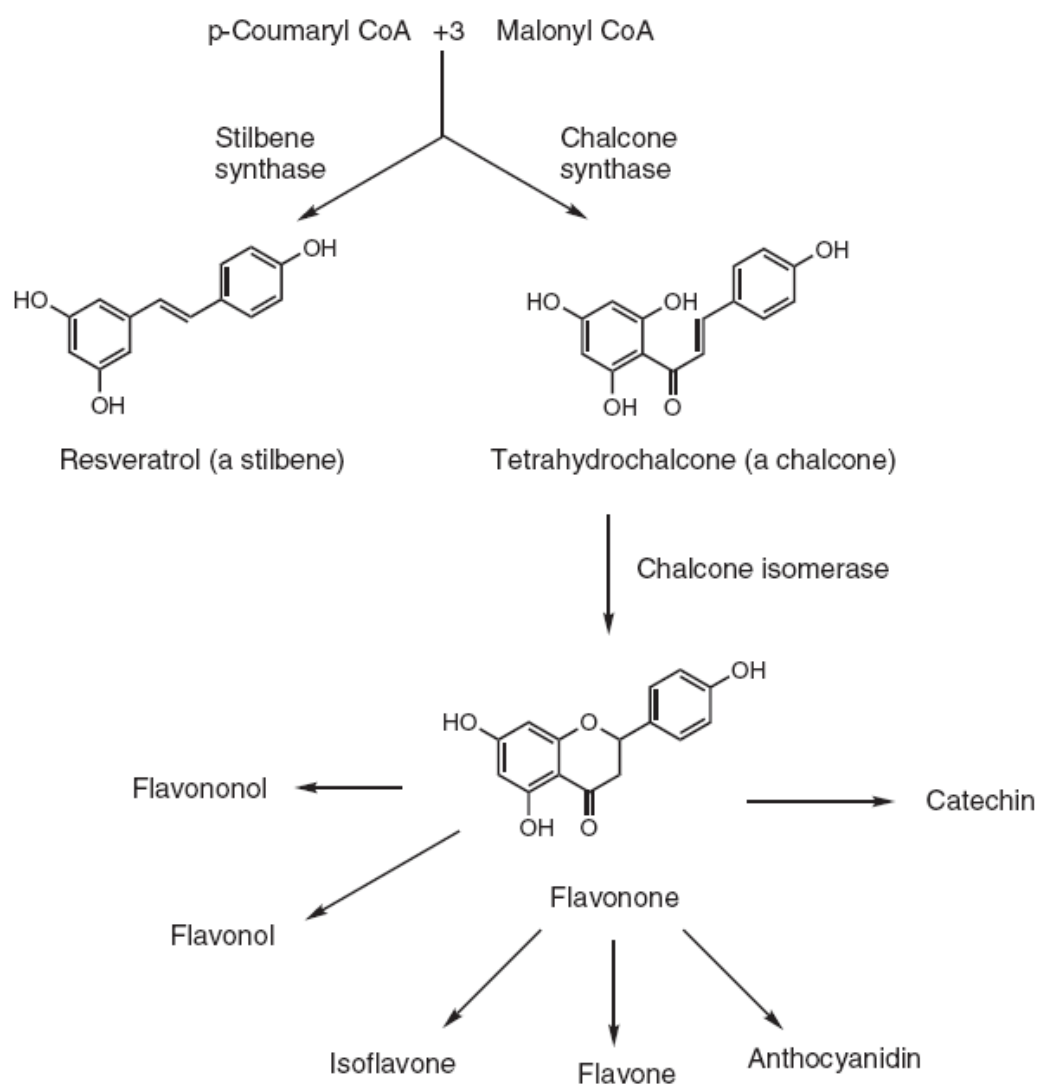


	R ₁	R ₂	R ₃
α	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H	CH ₃
γ	H	CH ₃	CH ₃
δ	H	H	CH ₃

รูปที่ 6 โครงสร้างของโทโคเฟอรอล และ โทโคไตรอีนอล

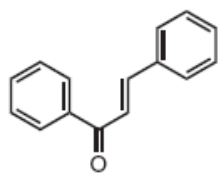
6. ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และ สติลเบิน (stilbene)

สารประกอบฟลาโวนอยด์เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง p-coumaryl CoA (C6-C3) กับ malonyl CoA 3 โมเลกุล ได้เป็น chalcones แล้วทำการปิดวงในสภาวะที่เป็นกรด ดังนั้นโครงสร้างหลักของสารในกลุ่มของฟลาโวนอยด์จึงเป็น diphenylpropane (C6-C3-C6) ความแตกต่างของสารในกลุ่มนี้จะขึ้นอยู่กับหมู่แทนที่และความไม่อิ่มตัวของสารแต่ละชนิด ได้แก่ flavones flavonones flavonols chalcones anthocyanins และ isoflavonoids ดังแสดงในรูปที่ 7 และรูปที่ 8

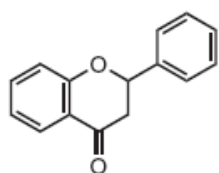


รูปที่ 7 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

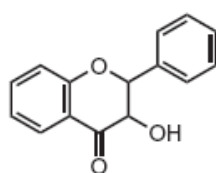
สตีลบินเป็นสารประกอบฟีนอลอีกชนิดหนึ่งที่พบในพืช มีการสังเคราะห์จากสารตั้งต้นเช่นเดียวกันกับสารประกอบฟลาโวนอยด์ แต่ใช้เอนไซม์คนละชนิดกัน ดังรูปที่ 7 สตีลบินมีบทบาทในการป้องกันโรคพืช เช่น viniferin มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา (fungicides) ที่พบในต้นองุ่น (grape vine)



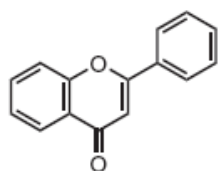
Chalcone



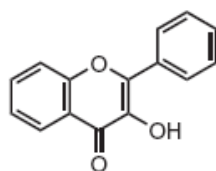
Flavonone



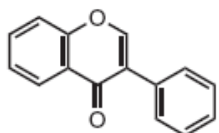
Flavononol



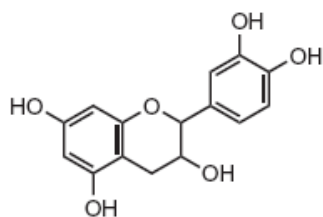
Flavone



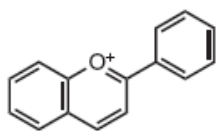
Flavonol



Isoflavone



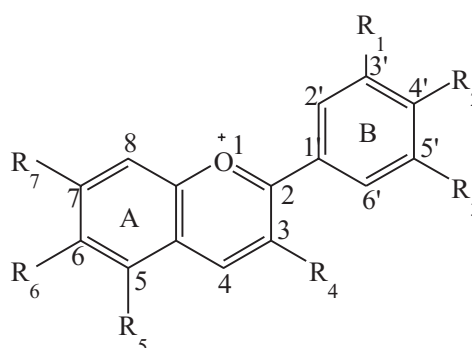
Catechin

Anthocyanidin
(Flavylium cation)

รูปที่ 8 โครงสร้างของสารประกอบฟลาโวนอยด์

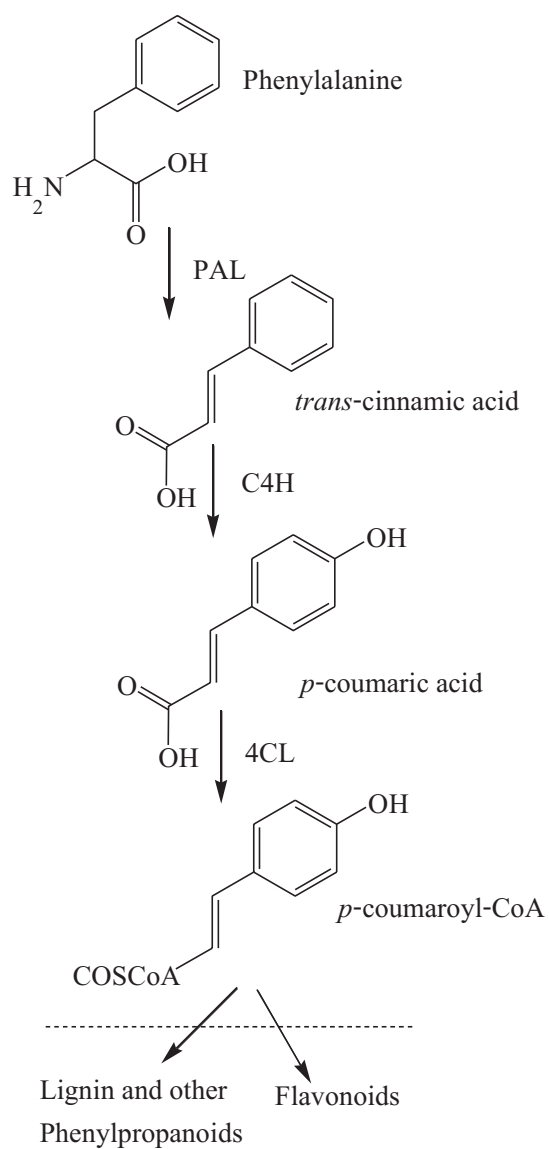
1.1. สารประกอบแอนโทไซยานิน (anthocyanin)

แอนโทไซยานิน (anthocyanin) (มาจากภาษา Greek anthos หมายถึง ดอกไม้ และ kyanos หมายถึง สีน้ำเงิน) เป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำและให้สีในช่วงแดง ม่วง จนถึงสีน้ำเงิน ในผลไม้ ผัก รั้วพืช และดอกไม้หลายชนิด ปัจจุบันความสนใจในรงควัตถุชนิดนี้เพิ่มขึ้นอย่างมากเนื่องจาก ประโยชน์เชิงสุขภาพในรูปของสารต้านอนุมูลอิสระจากอาหาร แอนโทไซยานิน เป็นสารประกอบ ฟีนอล ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ มักพบอยู่ในรูปของ glycoside ของ polyhydroxy และ polymethoxy เป็นอนุพันธ์ของ 2-phenylbenzopyrylium หรือ flavylium salts (รูปที่ 9) (Chia et al. 2003 : 923-933)



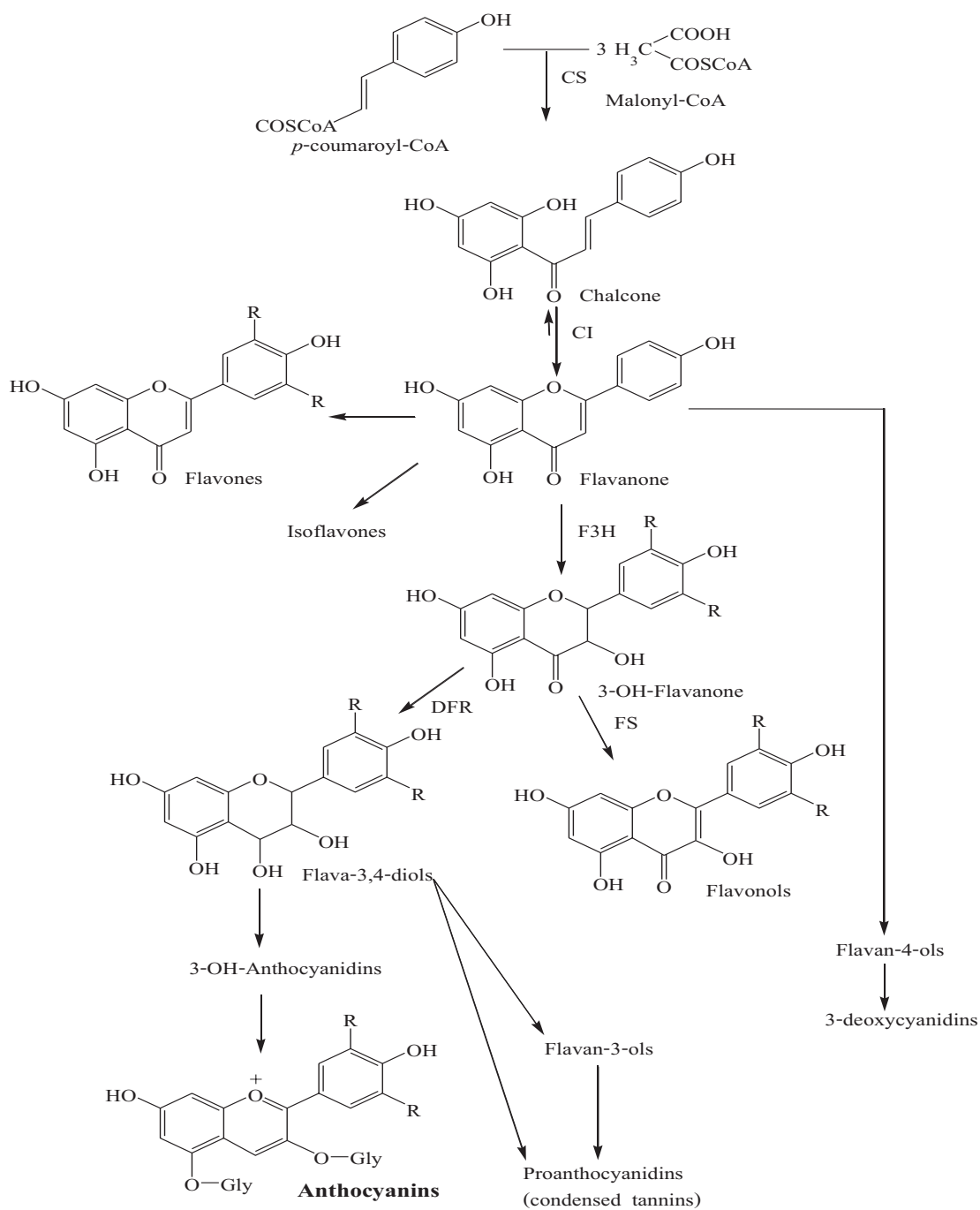
รูปที่ 9 โครงสร้างหลักของ flavylium cation ตำแหน่ง R_1 และ R_3 คือ H, OH หรือ OCH_3 ; R_4 คือ โมเลกุลของน้ำตาล หรือ H; R_2, R_5 และ R_7 คือ โมเลกุลของน้ำตาล หรือ OH และ R_6 คือ H หรือ OH

กระบวนการชีวสังเคราะห์ของแอนโทไซยานิน (biosynthesis pathway of anthocyanins) แบ่งออกเป็นสองส่วนใหญ่ ๆ คือ 1. ขั้นตอนการสังเคราะห์ p-coumaroyl CoA จาก phenylalanine (รูปที่ 10) 2. ขั้นตอนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินจาก p-coumaroyl CoA กับ 3 โมเลกุลของ malonyl CoA โดยการทำงานของเอนไซม์ chalcone synthase (CS) ได้เป็น tetrahydroxychalcone (ดังรูปที่ 11) จากนั้นใช้เอนไซม์ chalcone isomerase (CI) จะเปลี่ยน tetrahydroxychalcone ไปเป็น flavanones ซึ่ง flavanones ที่เกิดขึ้นเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอล เช่น flavones isoflavones และ 3-OH flavanones หรือ dihydroflavonols ซึ่ง dihydroflavonols เป็นสารตัวกลางหลักที่ใช้ในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (รูปที่ 12)



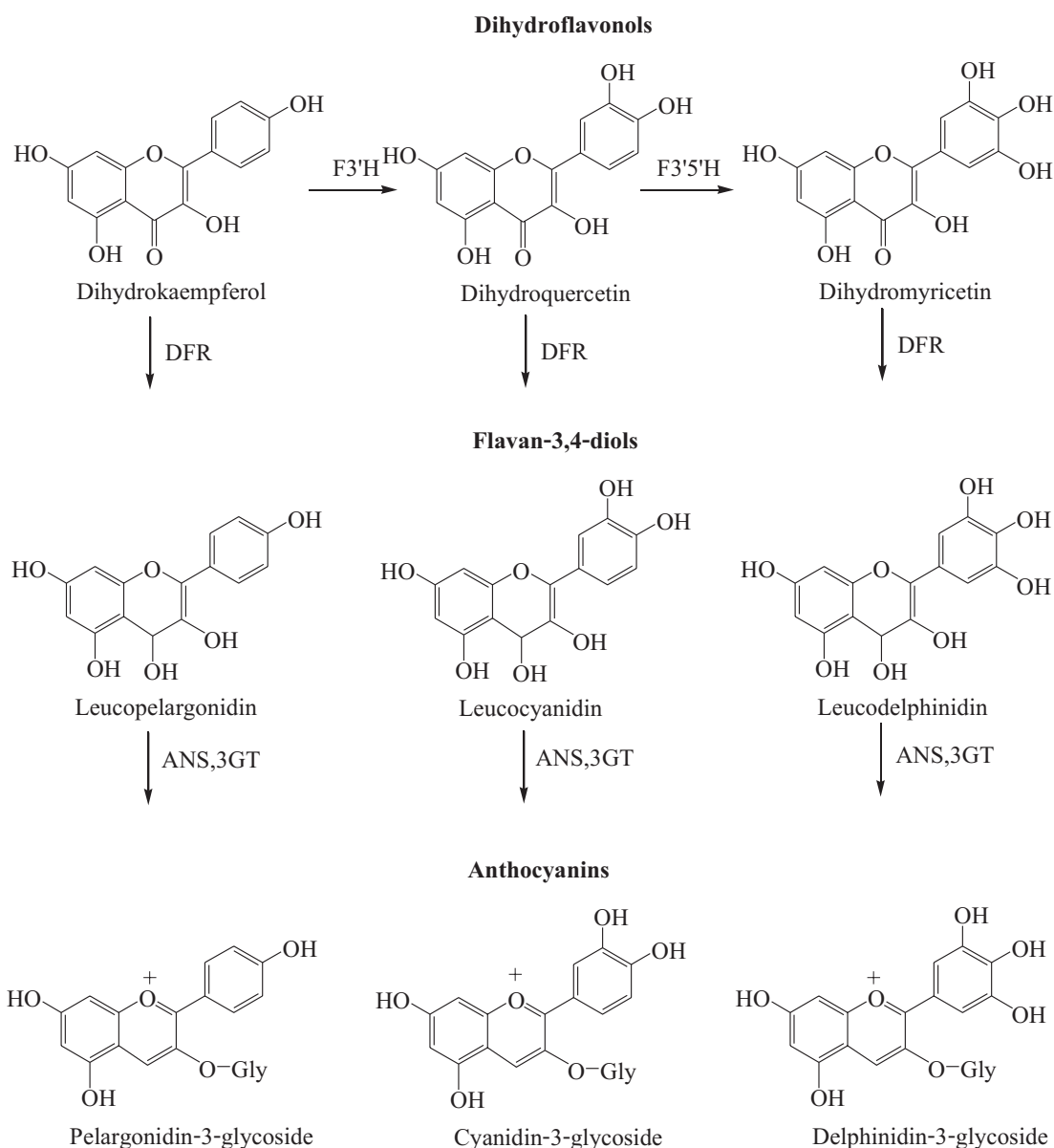
รูปที่ 10 ขั้นตอนการสังเคราะห์ p-coumaroyl-CoA (phenylpropanoid metabolism) โดยเอนไซม์ที่ใช้ คือ PAL = phenylalanine ammonia lyase C4H = cinnamate-4-hydroxylase และ 4CL = 4-coumaroyl:CoA ligase (ดัดแปลงจาก Harborne ; Holton and Cornish ; Mol)

ที่มา : Harborne 1988 : 298-343; Holton and Cornish 1995 : 1071-1083; Mol 1993 : 87-98



รูปที่ 11 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลโดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องดังนี้ CS = chalcone synthase CI = chalcone isomerase F3H = flavanone 3-hydroxylase DFR = dihydroflavonol reductase และ FS = flavanol synthase (ดัดแปลงจาก Cooper-Driver and Bhattearcharya)

ที่มา : Cooper-Driver and Bhattearcharya 1998 : 1165-1174



รูปที่ 12 การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง F3'H = flavonoid 3'-hydroxylase F3'5'H = flavonoid 3',5'-hydroxylase DFR = dihydroflavonol reductase ANS = anthocyanidin synthase และ 3GT = anthocyanin glucosyltransferase (ดัดแปลงจาก Holton and Cornish)

ที่มา : Holton and Cornish 1995 : 1071-1083

ความแตกต่างของแอนโทไซยานินแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับ จำนวนของหมู่ hydroxyl จำนวน และชนิดของโมเลกุลน้ำตาล (น้ำตาลในธรรมชาติที่พบ ได้แก่ glucose , rhamnose , xylose , galactose , arabinose และ fructose) ตำแหน่งของการเกาะและจำนวนของ organic acid (เกิด acylation กับ anthocyanin โดย acyl group ที่พบในธรรมชาติเช่น coumaric , caffeic , ferulic , p-hydroxy benzoic , synapic , malonic , acetic , succinic , oxalic และ malic) ที่อยู่บนโครงสร้าง

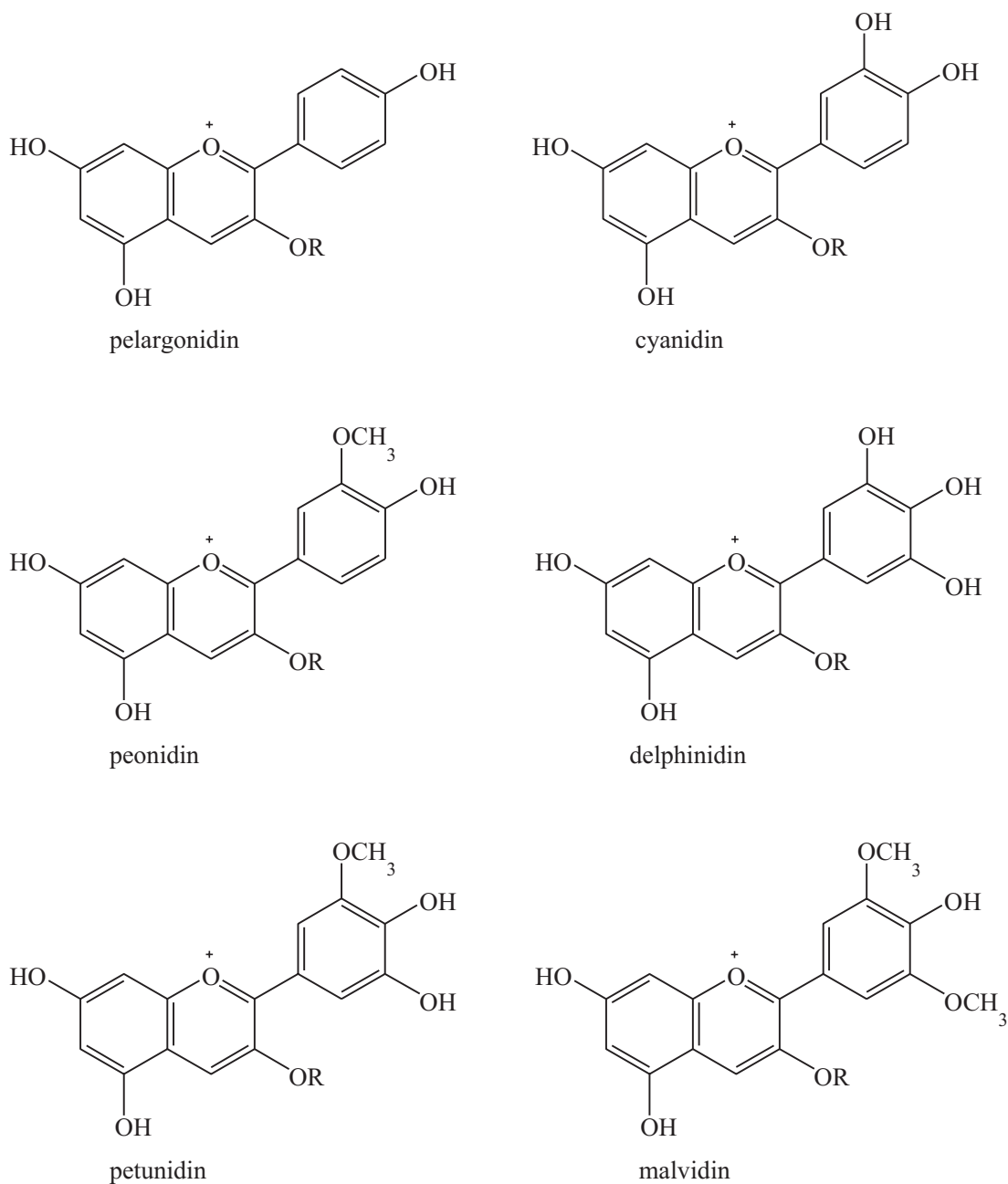
โมเลกุล ถ้าในโครงสร้างมีจำนวนหมู่แทนที่เป็น hydroxyl มากจะเป็นสีน้ำเงิน และถ้าหมู่แทนที่เป็น methoxyl มากกว่าจะเป็นสีแดง (Harborne 1998) แอนโทไซยานินมีมากมายหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แอนโทไซยานิน ที่พบในธรรมชาติ

ชื่อของ anthocyanin	ตัวอักษรย่อ	ตำแหน่งหมู่แทนที่บน flavylum cation							สีของสาร
		3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigeninidin	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	Orange
Aurantidin	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Orange
Capensinidin	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Bluish-red
<u>Cyanidin</u>	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
<u>Delphinidin</u>	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Bluish-red
Europinidin	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Bluish-red
Hirsutidin	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Bluish-red
6-Hydroxycanidin	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	Red
Luteolinidin	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange
<u>Malvidin</u>	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Bluish-red
5-Methylcyanidin	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
<u>Pelargonidin</u>	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Orange
<u>Peonidin</u>	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Orange-red
<u>Petunidin</u>	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Bluish-red
Pulchellidin	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Bluish-red
Rosinidin	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Red
Tricetinidin	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Red

แอนโทไซยานินที่พบทั่วไปในพืชมี 6 ชนิด ได้แก่ pelargonidin (Pg) , peonidin (Pn) , cyaniding (Cy) , malvidin (Mv) , petunidin (Pt) และ delphinidin (Dp) (รูปที่ 13) ตัวอย่างของผักและผลไม้ที่มีแอนโทไซยานินเพียงหนึ่งชนิดคือ แอปเปิล พริกเชอร์รี่ พริก และ พืชซึ่งจะพบเพียง cyanidin ส่วนในมะเขือม่วง และ ทับทิมจะพบ delphinidin พืชที่มีแอนโทไซยานินสองชนิด

ได้แก่ เซอร์รี่หวาน และ แครนเบอร์รี่ (มี cyanidin และ peonidin) ส่วนที่มีแอนโทไซยานินมากกว่าสองชนิด ได้แก่ องุ่น (cyanidin- , pelargonidin- , delphinidin- , petunidin- และ malvidin- เป็น glucoside และ di-glucoside) โดยพบมากที่สุดในรูปแบบของ cyanidin 3- glucoside



รูปที่ 13 โครงสร้างของแอนโทไซยานินที่พบทั่วไปในพืช โดยที่ R คือโมเลกุลของน้ำตาล

แอนโทไซยานินในพืช มีหน้าที่หลัก 2 ประการ

1. ให้สีกับพืช ช่วยในการดึงดูดแมลงให้มาผสมเกสร

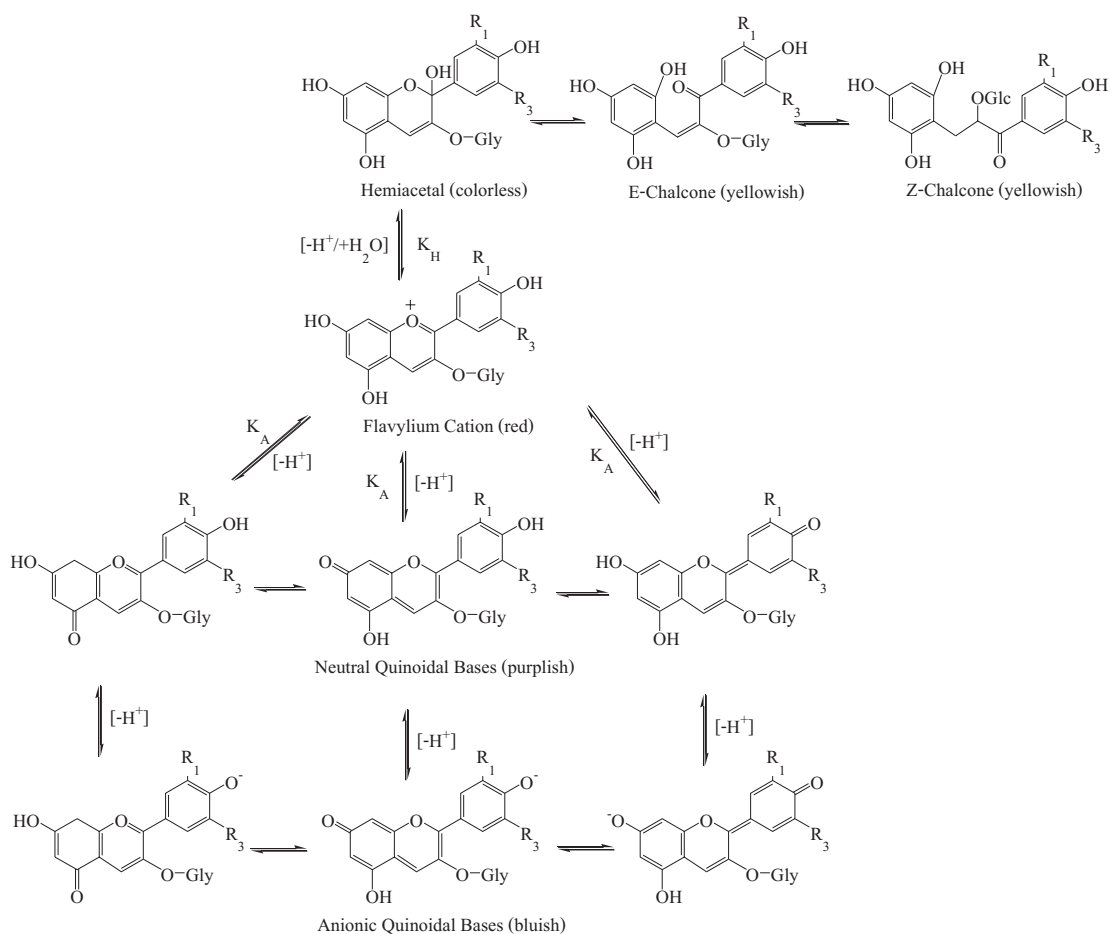
2. UV screen จะมีการสังเคราะห์ขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการที่พืชได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต (UV ray) เพื่อป้องกันไม่ให้ DNA ของพืชถูกทำลายจากรังสีอัลตราไวโอเลต

นอกจากนี้แอนโทไซยานินยังทำหน้าที่ขับไล่ศัตรูที่จะมากัดกิน (anti-feedants) และ เป็น สารต้านอนุมูลอิสระ

การนำแอนโทไซยานินมาใช้ประโยชน์นั้นเนื่องจากแอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ดี ให้สีในช่วงแดง ม่วง จนถึงสีน้ำเงิน จึงใช้เป็นสีผสมอาหาร เติมน้ำดื่ม สีที่ปรากฏให้เห็นนั้นแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการเช่น pH เป็นต้น แอนโทไซยานิน มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน ซึ่งสารละลายเปลี่ยนสีได้ตามค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 1 – 5 ดังเช่น flavylum cation (สารละลายสีแดง)เมื่อได้ปฏิกิริยา hydroxylation จะอยู่ในรูปของ pseudobase form(สารละลายไม่มีสี)ซึ่งมี pH ประมาณ 5 ถ้ามี pH มากกว่า 5 เล็กน้อย จะเปลี่ยนจาก pseudobase form ไปเป็น chalcone ซึ่งมีสีเหลืองอ่อนหรือไม่มีสี แต่เมื่ออยู่ในสารละลายที่ pH สูง จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ quinodal base ซึ่งมีสีน้ำเงิน (Stintzing and Carle 2004 : 6172-6181)(รูปที่ 14) นอกจากนี้ pH แล้วยังมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อสีของแอนโทไซยานินด้วยได้แก่ อุณหภูมิ ออกซิเจน รังสีอัลตราไวโอเลต(UV) และ co-factor อื่น ซึ่งล้วนเป็นข้อจำกัดในการนำแอนโทไซยานินมาใช้ในการเป็นสารเติมแต่งสีในอาหาร

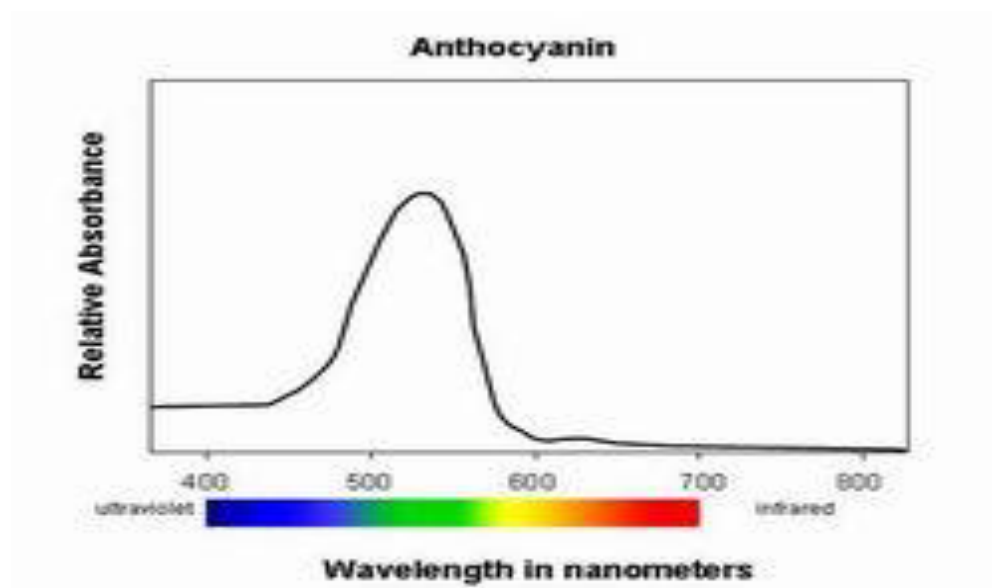
แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว การสกัดแยกแอนโทไซยานิน ออกมาจึงทำได้โดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วเช่น เมทานอล (methanol) หรือ เอทานอล (ethanol) ที่มีความเป็นกรดเล็กน้อย (ระหว่าง 0.1 ถึง 1.0% ของ Hydrochloric acid (HCl) , formic acid หรือ trifluoroacetic acid (TFA)) โดยที่กรดจะช่วยป้องกันการสลายตัวของแอนโทไซยานิน เมื่อได้สารสกัดหยาบมาแล้วเราสามารถใช้นิเทศทางโครมาโตกราฟี (chromatography) เช่น paper chromatography thin-layer chromatography (TLC) และ column chromatography

คอลัมน์ที่นิยมใช้ในการแยกแอนโทไซยานิน คือ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20 ทำได้โดยการนำสารสกัดหยาบที่ได้มาผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 (ใช้ในการแยก anthocyanin ออกจากสารกลุ่มอื่น) แล้วนำ สารที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 มาผ่านคอลัมน์ Sephadex LH-20 อีกครั้งเพื่อแยกตามขนาดของโมเลกุล



รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานินเมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH

แอนโทไซยานิน เป็นสารที่มีสีจึงสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค UV - visible spectrophotometry โดยที่แอนโทไซยานินจะดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 250 – 270 nm และ 520 – 560 nm (รูปที่ 15) (Francis 1989 : 273-314) ตัวอย่างเช่น pelargonidin 3 – glucoside (ละลายใน 0.01% HCl ใน เมทานอล) จะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 nm cyanidin กับ peonidin 3 – glucoside ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง 520 – 526 nm (Harborne 1967) เป็นต้น



รูปที่ 15 สเปกตรัมของแอนโทไซยานิน

1.2. ข้อมูลทั่วไปข้อมูลหว่า (Morton 1987 : 375-378)

หว่า(black plum หรือ Indian black plum หรือ Java plum) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Syzygium cumini* Skeels มีชื่อเหมือนคือ *Syzygium jambolanum* DC.หรือ *Eugenia cumini* Druce อยู่ในวงศ์ ชมพู่ (Myrtaceae) ชื่อสามัญคือ Bo Tree , Sacred Fig Tree , Pipal Tree หรือ Peepul tree ชื่ออื่น ๆ เช่น ในประเทศไทยเรียกว่า หว่า หรือ ห่าจี้แพะ ในประเทศ Jamaica เรียกว่า purple plum ในประเทศอินเดียและมาเลเซีย เรียกว่า jambolan หรือ Indian blackberry เป็นต้น หว่ามีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ อินเดียจนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพบทั่วไปตามป่าดิบชื้นและป่าผลัดใบ หว่าเป็น ไม้ยืนต้นไม่ผลัดใบ ขนาดใหญ่ ต้นสูง 10 – 35 เมตร เปลือกก่อนข้างเรียบสีน้ำตาลเปลือกหลุดลอก เล็กน้อยเปลือกชั้นในสีแดง ลำต้นเหนียวดินแตกกิ่งก้านสาขามาก ใบเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้ามกัน ใบ เป็นรูปไข่หรือรูปรี กว้าง 3-7 cm ยาว 8 – 14 cm มีจุดน้ำมันที่บริเวณขอบใบ ออกดอกเป็นช่อที่ซอก ใบหรือปลายยอด ดอกสีขาวหรือครีม ฐานรองดอกเป็นรูปกรวย กลีบเลี้ยง 4 กลีบ กลีบดอก 4 กลีบ มี เกสรตัวผู้จำนวนมาก ออกดอกและติดผลราวเดือน ธันวาคม – มิถุนายน ดังรูป 16



รูปที่ 16 ภาพของต้นลูกหว้า ดอกหว้า และผลลูกหว้าในระยะต่าง ๆ

ผลมีขนาด 0.8 – 2.0 cm รูปไข่ หรือรูปรี ผลอ่อนมีสีเขียว พอเริ่มแก่จะมีสีชมพู แล ละเมื่อแก่จัดจะเป็นสีแดงเข้ม ม่วงดำ ผลน้ำน้ำผิวมันรับประทานได้ ผลจะแก่จัดราวเดือนพฤษภาคม (ดังรูป 16)

หว้าขึ้นได้ดีในที่ชื้น ดินอุดมสมบูรณ์ด้วยปุ๋ยธรรมชาติ การขยายพันธุ์ส่วนใหญ่ใช้เพาะเมล็ด และตัดชำพวง นกและค้างคาว ช่วยในการแพร่พันธุ์ โดยนำเมล็ดที่กินเข้าไปถ่ายในที่อื่น นอกจากนี้ยังใช้ การตอนหรือทาบกิ่งก็ได้

ประโยชน์ของหว้าที่ใช้โดยทั่วไป

ดอกหว้า ใช้เป็นอาหารเลี้ยงผึ้ง ใบหว้า ใช้เลี้ยงสัตว์ สามารถนำไปมากลั่นเป็นน้ำมันหอมระเหยได้ เปลือกต้นหว้า สามารถนำมาทำเป็นสีย้อมผ้า และใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง เนื้อไม้ของต้นหว้า ใช้ทำสิ่งปลูกสร้างที่อยู่ในที่ร่ม

ประโยชน์ของหว้าในทางอาหาร

ลูกหว้ามีรสหวานอมเปรี้ยวและมีรสฝาดเล็กน้อย จึงนิยมนำมาทำ ใส้ของขนมอบ ซอส แยมผลไม้และใช้ทำเครื่องดื่ม ทำน้ำผลไม้ ไวน์ เป็นเครื่องดื่มที่ให้สีม่วง เนื้อของลูกหว้ามีเพคตินอยู่มากจึงสามารถนำมาทำเจลลี่ ได้ด้วย หว้าในส่วนที่กินได้จะมีสารอาหารดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สารอาหาร ของหัวส่วนที่กินได้ (ต่อ 100 กรัม) (Morton)

สารอาหาร	ปริมาณที่พบ	สารอาหาร	ปริมาณที่พบ
Moisture	83.7 – 85.8 g	Potassium	55 mg
Protein	0.7 - 0.129 g	Copper	0.23 mg
Fat	0.15 – 0.3 g	Sulfur	13 mg
Crude Fiber	0.3 – 0.9 g	Chlorine	8 mg
Carbohydrates	14.0 g	Vitamin A	80 I.U.
Ash	0.32 -0.4 g	Thiamine	0.008 – 0.03 mg
Calcium	8.3 -15 mg	Riboflavin	0.009 – 0.01 mg
Magnesium	35 mg	Niacin	0.2 – 0.29 mg
Phosphorus	15 16.2 mg	Ascorbic acid	5.7 18 mg
Iron	1.2 – 1.62 mg	Choline	7 mg
Sodium	26.2 mg	Folic acid	3 mg

ที่มา : Morton, Julia F. Fruits of warm climates. Miami: B&W photographs, 1987 375-378.

นอกจากนี้ยังมี gallic acid, tannin, oxalic acid และ แอนโทไซยานินเช่น cyanidin- petunidin-malvidin-glucoside (Martinez and Del Valle 1981) อยู่ด้วย

ประโยชน์ของหัวในทางยา

เปลือกต้นหัว แก้วบีด ต้มอมแก้ปากเปื่อย คอเปื่อย แก้อาหารอาหารไม่ย่อย ท้องร่วง ใบ แก้วบีด ลดน้ำตาลในเลือด (ในคนเป็นเบาหวาน) ใช้พอกรักษาโรคผิวหนัง ผล แก้ว ท้องร่วง เมล็ด แก้ว ท้องร่วง แก้วบีด ช่วยลดน้ำตาลในเลือด

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับลูกหัว

มีการรายงานการนำส่วนต่าง ๆ ของหัวมาศึกษาในทางเภสัชวิทยาอย่างมากมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน โดย Warrier (1996 : 273-275) ได้รวบรวมข้อมูลการใช้ประโยชน์จากส่วนต่าง ๆ ของหัวที่ใช้ประโยชน์ทางยาแผนโบราณ เช่น เปลือก มีสรรพคุณเป็นยาฝาดสมาน มีรสหวานเย็น บรรเทาอาการไข้ ขับลม ขับปัสสาวะ ยาถ่ายพยาธิ แก้วท้องผูก ผลและเมล็ด ใช้ในการรักษาเบาหวาน หลอดลมอักเสบ ขับพยาธิตัวกลม โรคที่เกี่ยวข้องกับม้าม โรคจากทางเดินปัสสาวะ (urethrorrhea) ใบมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ใช้ในการเสริมสร้างความแข็งแรงให้แก่เหงือกและฟัน นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ใบในการรักษาโรคเบาหวาน (Bhandary 1995 : 149-158) รักษาอาการเป็นไข้ โรคกระเพาะ ช่วยห้ามเลือด รักษาโรคผิวหนังได้ (Warrier 1996 : 273-275) และ สารสกัด

จากใบหว่า ช่วยลด radiation -induced DNA damage ใน cultured human peripheral blood (Jageti and Baliga 2002 : 19-25)

Rastogi and Mehrotra (1990 : 388-389) รายงานว่าสารประกอบที่พบในหว่า ได้แก่ acetyl oleanolic acid, triterpenoids , ellagic acid , isoquercetin , quercetin , kaempferol และ myricetin ในส่วนของผลึกหว่ามีรายงานวิจัยระบุว่ามียาค์ประกอบของ วิตามินซี gallic acid แทนนิน แอนโทไซยานิน (cyanidin delphinidin-3-gentiobioside malvidin-3-laminaribioside และ petunidin-3-gentiobioside) (Martinez and Del Valle 1981; Venkateswarlu 1952 : 434-437) ต่อมา มีรายงานวิจัยพบว่าสารประกอบเหล่านี้มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Korina and Afanaev 1997 : 151-163; Tanaka 1994 : 1139-1155) ด้วย

ในปี 2005 De และ คณะ ได้ทำการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกหว่า (Wild Indian *Syzygium cumini*(L.) Skeels) พบว่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 168 $\mu\text{g/mL}$ และ รายงานค่า Ascorbic acid equivalents เป็น 0.179 mg/mg น้ำหนักเปลือกแห้งและ ค่า Gallic acid equivalents เป็น 0.047 mg/mg น้ำหนักเปลือกแห้ง

Bahorun et al. (2006 : 787-799) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของพืชในวงศ์ Rubiaceae และ Myrtaceae หลายสปีชีส์ พบว่า พืชในสปีชีส์ *Syzygium* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลอยู่สูงและมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี

Neelwarne (2007 : 619-627) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี ความเสถียร และ ประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของเปลือกผลหว่าพบว่า มีปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินในระดับสูง (total anthocyanin content มีค่าเป็น 216 mg / 100 mL ของสารสกัดหยาบ) อีกทั้ง องค์ประกอบทางเคมี (anthocyanins) ที่พบยังแสดงลักษณะของการเป็นรงควัตถุที่มีความเสถียรอีกด้วย ซึ่งน่าจะเป็นแหล่งของสีธรรมชาติที่สมควรได้รับการพัฒนาไปใช้ในทางอุตสาหกรรมต่อไป

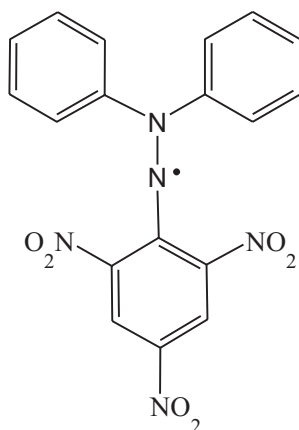
1.3. วิธีทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

1.3.1. Free radical scavenging method

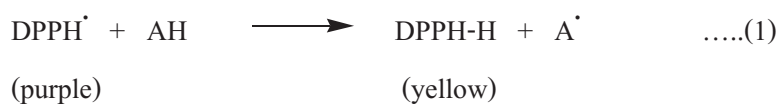
1.3.1.1. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay หรือ

DPPH assay (Brand-William et al. 1995 : 25-30)

DPPH assay เป็นวิธีการตรวจสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging) อาศัย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) โดยมีโครงสร้างแสดงดังรูป 17 เป็น free radical ที่มีสีม่วงและมีความเสถียรในตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งดูดกลืนแสง สูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยสารต้านอนุมูลอิสระ(antioxidant) (AH) หรือ radical species (R[•]) จะทำปฏิกิริยากับ DPPH[•] ซึ่ง DPPH[•] จะถูก reduce ด้วย antioxidant (AH) หรือ radical species (R[•]) กลายเป็น DPPH-H หรือ DPPH-R ดังสมการที่ 1-2



รูปที่ 17 โครงสร้างของ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•])

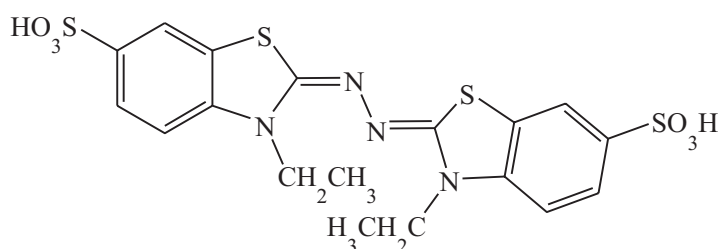


จากปฏิกิริยาความเข้มข้นของสารละลายสีม่วงของ DPPH[•] ลดลงกลายเป็นสารละลายสีเหลือง ถ้าตัวอย่างที่เราทดสอบ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูง จะทำให้ปริมาณ DPPH[•] ลดลงได้มาก การรายงานผลจะแสดงเป็นค่า EC₅₀ ซึ่งหมายถึงปริมาณ antioxidant ที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH[•] ลดลง 50%

หรือใช้การเปรียบเทียบหาความสามารถในการเป็น antioxidant กับสารมาตรฐานเช่น Trolox เป็น TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) หรือ vitamin C เป็น VCEAC (Vitamin C equivalent antioxidant capacity) ข้อดีของ DPPH assay คือ เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้อง (accuracy) และ reproducibility ที่สูง แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถใช้วิธีนี้ ในการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ในบางตัวอย่าง เช่น serum เพราะ DPPH ละลายอยู่ในแอลกอฮอล์ จะทำให้โปรตีนตกตะกอนได้

1.3.1.2. 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical scavenging assay หรือ ABTS assay (Rice-Evans et al. 1999 : 152-159; Lo and Cheung 2005 : 533-539)

ABTS assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดย reagent คือ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) ซึ่งเมื่อละลายน้ำจะได้สารละลายสีเขียวอ่อน โครงสร้างของ ABTS แสดงดังรูปที่ 18 เมื่อทำให้เกิดเป็น stable radical ในตัวทำละลายน้ำ สารละลายจะมีสีเขียวเข้มของ ABTS^{•+} (รูปที่ 19) ซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 414 nm และในช่วงการดูดกลืนแสงรองลงมาที่ความยาวคลื่น 645, 734 และ 815 nm ในการทดลองจะวัดค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS^{•+} ที่ความยาวคลื่น 734 nm ซึ่งความยาวคลื่นนี้ จะมีการรบกวนต่าง ๆ น้อยมาก ปฏิกิริยาของ ABTS^{•+} กับสารต้านอนุมูลอิสระดังสมการที่ 3



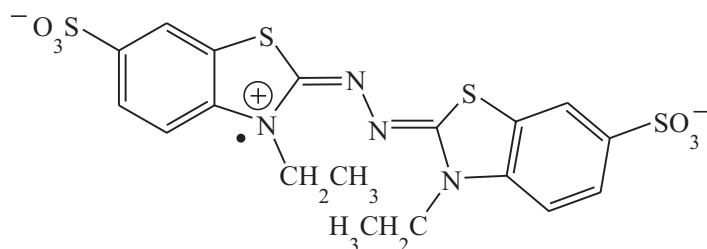
รูปที่ 18 โครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)



การทำให้เกิด ABTS radical นั้นทำได้ 2 วิธีคือ

1. Enzymatic reaction คือ ใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เกิด ABTS radical เช่น เอนไซม์ peroxidase เป็นต้น

2. Chemical reaction คือ ใช้ปฏิกิริยาเคมีทำให้เกิด ABTS radical เช่น manganese dioxide, potassium persulfate เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ potassium persulfate เป็นตัวที่ทำให้เกิด ABTS radical ดังสมการที่ 4



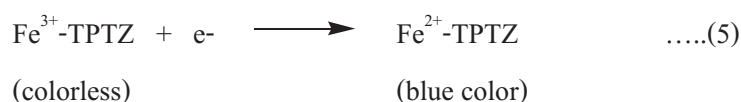
รูปที่ 19 โครงสร้างของ ABTS^{++}

ถ้าสารตัวอย่างที่ทดสอบมีความสามารถในการ จับกับอนุมูลอิสระได้สูง ความเข้มของสีเขียวก็จะลดลง โดยจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า IC_{50} ซึ่งหมายถึง ปริมาณของ สารต้านอนุมูลอิสระ ที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS^{++} เหลือ อยู่ 50% หรือรายงานผลโดยเปรียบเทียบหาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ กับ สารต้านอนุมูลอิสระ มาตรฐานเช่น trolox ก็จะได้เป็น TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) หรือ vitamin C ได้เป็น VCEAC (Vitamin C equivalent antioxidant capacity)

1.3.2. Reducing power method

Ferric reducing antioxidant power หรือ FRAP assay (Benzi and Strain 1996 : 70-76)

หลักการของ FRAP assay จะเป็นการหาปริมาณ total antioxidant concentration โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยา reduction ของ Fe^{3+} ซึ่งอยู่ในรูปของ Ferric tripyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ) complex ซึ่งเป็นสารละลายไม่มีสีถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระกลายเป็น Ferrous tripyridyltriazine(Fe^{2+} -TPTZ) complex ซึ่งเป็นสารละลายสีฟ้าเข้มหรือสีน้ำเงินในสารละลายที่มี pH ต่ำ ดังสมการที่ 5 ซึ่ง Fe^{2+} -TPTZ สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 593 nm



สารตัวอย่างที่เป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีจะหมายถึง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี จะเกิด Fe^{2+} -TPTZ มากและสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ได้สูงมากขึ้น FRAP assay เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาปรับใช้กับตัวอย่างที่เป็นของเหลวทางชีวภาพ เช่น น้ำเลือด อาหาร สารสกัดจากพืช และน้ำผลไม้ เป็นต้น (Antolovich et al. 2002 : 183-198)

1.4. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยวิธี Folin-Ciocalteu (Škerget et al. 2005 : 191-198)

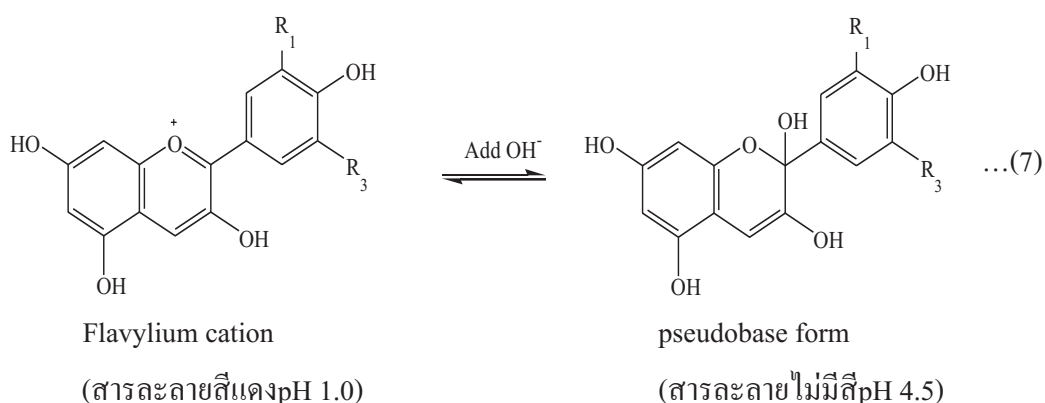
Folin- Ciocalteu reagent (FCR) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการหาปริมาณ สารประกอบฟีนอล ในสารสกัดจากพืช โดยอาศัยปฏิกิริยาของ Folin-Ciocalteu reagent (FCR) เป็นสารละลายสีเหลือง ทำปฏิกิริยากับ สารประกอบ ฟีนอล หรือ สารต้านอนุมูลอิสระ จะเกิดปฏิกิริยา รีดักชัน สารละลายจะกลายเป็นสีเขียว โดยคาดว่าเกิดจากปฏิกิริยา รีดักชัน ของ Mo(VI) ดังสมการที่ 6 (ปฏิกิริยารีดักชันที่เกิดขึ้นเกี่ยวข้องกับการรับอิเล็กตรอน 1 ตัวหรือ 2 ตัว) เมื่อเติม NaHCO_3 ลงไปทำให้สารละลายมี pH ประมาณ 10 สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งสารประกอบสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นน่าจะเป็น $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$



ถ้ามีปริมาณ phenolic หรือสารต้านอนุมูลอิสระอยู่มากการเกิดสารประกอบสีน้ำเงินก็จะเข้มข้นและสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ได้มากขึ้น Folin-Ciocalteu reagent จะไม่ทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงกับสารประกอบฟีนอล เท่านั้น แต่ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอลได้ด้วย เช่น วิตามินซี หรือ ไอออนของโลหะทองแดง (Cu(I)) เป็นต้น โดยที่ Folin-Ciocalteu reagent จะทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลในสภาวะที่เป็นเบส เมื่อสารประกอบฟีนอลสูญเสียโปรตอนจะกลายเป็น phenolate anion ที่สามารถรีดิวซ์ Folin-Ciocalteu reagent ได้ จากที่กล่าวมาแล้วเป็นเหตุผลสนับสนุนว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นมีการถ่ายเทอิเล็กตรอน

1.5. การหาปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินโดยวิธี pH differential (Wrolstad 1976 : 621)

แอนโทไซยานินมีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง 520 nm และเมื่อ pH เปลี่ยนสีของสารละลายแอนโทไซยานินก็เปลี่ยนด้วย ดังสมการที่ 7



ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm และ 700 nm ของแอนโทไซยานิน ที่สารละลาย pH 1.0 จะมีค่าการดูดกลืนแสงมาก แต่ถ้าวัดที่สารละลาย pH 4.5 จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นทั้งสองต่ำมาก แล้วหลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของแอนโทไซยานินในเทอมของ pelargonidin-3-glucoside (PGD-3-glu) ซึ่งเป็นแอนโทไซยานินที่พบมากในผลไม้ หรือสามารถคำนวณในเทอมอื่น ๆ ได้โดยใช้ค่าในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 คำนวณน้ำหนักโมเลกุล Molar Extinction Coefficient และความยาวคลื่นที่ pH 1 ของ แอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานิน	น้ำหนักโมเลกุล	Molar Extinction Coefficient	ความยาวคลื่น (nm) pH 1
Cyd -3-gal(Idaein)	445.2	32,200	530
Cyd-3-rut	595.2	28,800	541
Cyd-3-glu (Chrysanthemin or Asterin)	445.2	26,900	510
Mvd-3-glu(Oenin)	493.5	28,000	520
Mvd-3,5-diglu(Malvin)	655.5	37,700	520

ในการศึกษาในครั้งนี้จะมุ่งเน้นการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลโดยเฉพาะสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน โดยจะทำการศึกษาในส่วนเปลือกกับเนื้อ และเมล็ดของลูกหว้าในระยะผลอ่อน (immature green) ผลแก่ (mature) และผลสุก (ripe)



รูปที่ 20 ลูกหว้าในระยะต่าง ๆ ดอก ผลอ่อน ผลแก่ ผลสุก และเมล็ดหว้า

1.6. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. สกัดผลลูกหว้าโดยใช้เมทานอล และ 0.1 % HCl ในเมทานอล ให้ได้ สารสกัดหยาบ (crude extract)
2. ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด หยาบด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP
3. หาปริมาณ สารประกอบฟีนอล จากสารสกัดหยาบด้วยวิธี Folin-Ciocalcu reagent
4. หาปริมาณแอนโทไซยานิน จากสารสกัดหยาบด้วยวิธี pH differential
5. ทำการแยกแอนโทไซยานิน ออกจากสารอื่นโดย ใช้คอลัมน์ Amberlite XAD-7 และคอลัมน์ sephadex LH-20 ตามลำดับ (เฉพาะสารสกัดหยาบจากเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสด)
6. ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของที่ แยกได้จาก คอลัมน์ทั้งสอง ด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP
7. หาปริมาณ สารประกอบฟีนอล ของสารที่แยกได้จาก คอลัมน์ ทั้งสองด้วยวิธี Folin-Ciocalcu reagent
8. หาปริมาณแอนโทไซยานิน ของสาร ที่แยกได้จาก คอลัมน์ ทั้งสองด้วย วิธี pH differential

บทที่ 2

เครื่องมือและสารเคมี

2.1. เครื่องมือ / อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1.1. Analytical balance (Mettler)
- 2.1.2. Aspirator A-3S (EYELA)
- 2.1.3. Electric Food Dehydrator (Nenon)
- 2.1.4. Megnetic stirrer MR 3001 (Heidelphe)
- 2.1.5. Micropipette
- 2.1.6. pH meter Delta 320 (Mettler)
- 2.1.7. Quartz cell 1 คู่
- 2.1.8. Rotary Evaporator Rotavapor R-114 (Buchi)
- 2.1.9. Super Blender (Mitsumaru)
- 2.1.10. Thermo IEC Mutti RF Multipurpose centrifuge
- 2.1.11. Thermometer
- 2.1.12. Top loading balance (Sartorius)
- 2.1.13. UV/Vis spectrometer HP 8453 (Hewlett Packard)
- 2.1.14. UV/Vis spectrometer Lambda 35 (Perkin Elmer)
- 2.1.15. Vortex mixer
- 2.1.16. Waterbath
- 2.1.17. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

2.2. สารเคมี

ตารางที่ 5 รายชื่อสารเคมี บริษัทผู้ผลิต และเกรด

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	เกรด
1. Methanol	โรงงานสุรา องค์การสุรา กรมสรรพสามิต	กลั่นซ้ำ 1 ครั้ง
2. Hydrochloric acid	Mreck	Fuming 37%
3. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)	Fluka	purum
4. ()-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchromane-2-carboxylic acid (Trolox)	Fluka	purum
5. Ascorbic acid (Vitamin C)	Fluka	puriss
6. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, Diammonium salt (ABTS)	Fluka	purum
7. Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$)	Fluka	purum
8. Sodium acetate trihydrate	Fluka	purum
9. Acetic acid	BDH	AnalaR
10. Ferric chloride hexahydrate	Fluka	puriss
11. 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ)	Fluka	puriss
12. Deionized Water	ภาควิชาเคมี	-
13. Ferrous sulfate Heptahydrate($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	Fluka	purum
14. Folin-Ciocalteu's phenol reagent	Fluka	-
15. Sodium carbonate	Riedel-de Haen	puriss
16. Gallic acid	Riedel-de Haen	purum
17. Potassium Chloride	Fluka	purum
18. Formic acid	CARLO ERBA	For analysis
19. Amberlite XAD-7	Fluka	20 – 50 mesh
20. Sephadex LH 20	Amersham Biosciences	For research

2.3. การเตรียมสารละลาย

2.3.1. วิธี DPPH

- สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 2.4×10^{-4} M
ชั่ง DPPH 24.0 mg ละลายใน MeOH ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 250 mL ปรับปริมาตรด้วย MeOH และนำสารละลายที่เตรียมได้วัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 515 nm ให้ได้ Absorbance 1.100
- สารละลายมาตรฐาน (Trolox และ Vitamin C) ที่ความเข้มข้น 0.03 -0.30 (mg / mL) และสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

2.3.2. วิธี ABTS

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน (Trolox และ Vitamin C) ที่ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.25 – 0.35 mg/mL และสารตัวอย่างความเข้มข้นต่าง ๆ กัน
- เตรียมสารละลาย 7 mM ABTS
ชั่ง ABTS 0.1 g ละลายด้วยน้ำกลั่น ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น
- เตรียมสารละลาย 140 mM potassium persulfate ($K_2S_2O_8$)
ชั่ง 1.9 g ละลายด้วยน้ำกลั่นถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น
- การเตรียมสารละลาย $ABTS^{++}$ reagent
ผสมสารละลาย ABTS 5 mL กับ สารละลาย $K_2S_2O_8$ 88 μ L ในขวดสีชาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสารละลาย $ABTS^{++}$ reagent มาเจือจาง และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.70 ± 0.05

2.3.3. วิธี FRAP

- เตรียมสารละลาย 300 mM acetate buffer pH 3.6
ชั่ง sodium acetate trihydrate 1.58 g เติมน้ำ deionized water 400 mL เติมน้ำ acetic acid 5.0 mL นำสารละลายที่เตรียมได้ไปวัดค่า pH ให้ได้ 3.6 โดยใช้ acetic acid เป็นตัวปรับ เมื่ออ่านค่าได้แล้วถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 500 mL ปรับปริมาตรด้วย deionized water
- เตรียมสารละลาย TPTZ
ชั่ง TPTZ 93.7 mg ละลายด้วย สารละลาย 40 mM HCl 10 mL

- เตรียมสารละลาย 20 mM ferric chloride (FeCl_3)
ชั่ง ferric chloride 0.2700 g ปรับปริมาตรเป็น 100 mL
- เตรียมสารละลายมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 100 – 1000 μM

2.3.4. หาปริมาณสารประกอบฟีนอล

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.01 – 0.10 (mg/mL)
เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันด้วย Methanol
- เตรียมสารละลาย 7.5 % (w/v) sodium carbonate (Na_2CO_3)
ชั่ง 18.75 g ปรับปริมาตร 250 mL ในขวดปริมาตร
- เตรียมสารละลาย Folin Ciocalteu reagent (เจือจาง 10 เท่า)
เปิดสารละลาย Folin Ciocalteu reagent 25.00 mL ปรับปริมาตร 250 mL ในขวดปริมาตรด้วย deionized water

2.3.5. การหาปริมาณแอนโทไซยานิน

- เตรียมสารละลาย KCl-HCl buffer pH 1
เตรียมสารละลาย 0.2 M potassium chloride (KCl) และ เตรียมสารละลาย 0.2 M Hydrochloric acid (HCl)
ผสม สารละลาย 0.2 M KCl 125 mL กับสารละลาย 0.2 M HCl 250 mL ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 500 mL นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่า pH
- เตรียมสารละลาย acetate buffer pH 4.5
เตรียมสารละลาย 0.2 M acetic acid (CH_3COOH) และ เตรียมสารละลาย 0.2 M sodium acetate (CH_3COONa)
ผสม สารละลาย 0.2 M CH_3COOH 160 mL กับสารละลาย 0.2 M CH_3COONa 100 mL ใส่ บีกเกอร์ขนาด 600 mL เติม deionized water 140 mL นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่า pH ให้ได้ค่าเท่ากับ 4.5 โดยใช้สารละลาย 0.2 M CH_3COOH เป็นตัวปรับ เมื่อได้ค่า pH ที่ต้องการถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 500 mL นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่า pH อีกครั้ง

2.4. ตัวอย่าง

ตัวอย่างลูกหว้าเก็บจากบริเวณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ทำการเก็บผลเป็นสามระยะคือ ผลอ่อนลักษณะเปลือกเป็นสีเขียว เนื้อในสีเขียว และเมล็ดเป็นเขียว และผลแก่ลักษณะเปลือกนอกเป็นสีชมพู เนื้อในสีขาว และเมล็ดสีเขียว และผลสุกลักษณะเปลือกเป็นสีม่วงดำ เนื้อในเป็นสีขาว และเมล็ดเป็นสีเขียว

ตัวอย่างที่นำมาทดลองมี 2 ลักษณะ

1. ตัวอย่างลูกหว้าสด
2. ตัวอย่างลูกหว้าอบแห้ง

บทที่ 3

การทดลองและผลการทดลอง

3.1. ขั้นตอนการสกัดลูกหว้าสดและลูกหว้าอบแห้ง

ลูกหว้าที่นำมาทดลองนั้นทำการเก็บ 3 ระยะคือระยะผลอ่อน (เปลือกลูกหว้าสีเขียว) ระยะผลแก่ (เปลือกลูกหว้าสีชมพู) และระยะผลสุก (เปลือกสีม่วงดำ) โดยนำลูกหว้าทั้ง 3 ระยะมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย รวมทั้งยังแบ่งลูกหว้าทั้ง 3 ระยะออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เป็นลูกหว้าสดและอีกส่วนนำมาอบแห้งโดยให้อักษรย่อแทนลูกหว้าระยะต่าง ๆ ดังตารางที่ 6 และแผนผังการนำลูกหว้าระยะต่าง ๆ มาทำการสกัดดังรูปที่ 21

3.1.1. การสกัดลูกหว้าสด

3.1.1.1. การเตรียมตัวอย่างเนื้อกับเปลือกลูกหว้า

นำตัวอย่างลูกหว้าสดทั้งสามระยะมาล้างทำความสะอาด นำมาผ่าเอาเมล็ดออก นำส่วนเนื้อกับเปลือกที่แยกได้ไปชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน หลังจากนั้นนำเนื้อกับเปลือกลูกหว้ามานวดให้ละเอียด

3.1.1.2. การสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าด้วย เมทานอล

นำเนื้อกับเปลือกลูกหว้าที่บดละเอียดแล้วในข้อ 3.1.1.1 ถ่ายใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 1000 mL เติม เมทานอล ปริมาตร 800 mL อัตราส่วนเนื้อกับเปลือกลูกหว้าต่อตัวทำละลายต่อที่ใช้เป็น 1:3 แล้วนำไปสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองแยกส่วนสารละลายสีชมพูแดงเก็บไว้ แล้วนำส่วนที่เป็น residue มาสกัดซ้ำอีกครั้งด้วย เมทานอล ปริมาตร 800 mL สกัดสารละลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองสารละลายรวมกับที่สกัดได้ครั้งแรก นำ residue มาสกัดซ้ำจนกระทั่งตัวทำละลายเกือบไม่มีสีจึงหยุดทำการสกัด นำสารละลายที่กรองได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ที่อุณหภูมิ 40°C ชั่งน้ำหนักของสารที่สกัดได้ดังแผนผังการสกัดในรูปที่ 22

3.1.1.3. การสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าด้วย 0.1 % HCl ใน เมทานอล

ทำการสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าเหมือนข้อ 3.1.1.2 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น 0.1 % HCl ในเมทานอล แทน

3.1.1.4. การสกัดเมล็ดลูกหว้าด้วย เมทานอล

นำเมล็ดลูกหว้าที่แกะได้จากข้อ 3.1.1.1. มาชั่งน้ำหนัก หลังจากนั้นนำเมล็ดลูกหว้ามานวดให้ละเอียด แล้วทำการสกัดเหมือนการสกัดเนื้อเปลือกลูกหว้าในข้อ 3.1.1.2

3.1.1.5. การสกัดเมล็ดลูกหว้าด้วย 0.1 % HCl ใน เมทานอล

ทำการสกัดเมล็ดลูกหว้าเหมือนข้อ 3.1.1.4 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น 0.1 % HCl ใน เมทานอล แทน

3.1.2. การสกัดลูกหว้าอบแห้ง

3.1.2.1. การเตรียมตัวอย่างเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้ง

นำลูกหว้าทั้งสามระยะมาล้างทำความสะอาด นำมาผ่าเอาเมล็ดออก นำส่วนเนื้อกับเปลือกที่แยกได้ไปซังให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน หลังจากนั้นนำมาอบด้วยเครื่อง Electric Food Dehydrator ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนเนื้อกับเปลือกลูกหว้าที่ได้ใส่ใน desiccator จนเย็นถึงอุณหภูมิห้องแล้วนำเนื้อกับเปลือกลูกหว้าไปซังน้ำหนัก นำเนื้อกับเปลือกลูกหว้าที่ซังน้ำหนักแล้วกลับไปอบอีกครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเมื่อครบเวลา นำเนื้อกับเปลือกลูกหว้าที่อบแล้วใส่ใน desiccator แล้วนำไปซังน้ำหนัก เปรียบเทียบน้ำหนักที่ได้จากการซังครั้งแรก ทำการอบซ้ำจนกว่าน้ำหนักเนื้อกับเปลือกลูกหว้าที่บันทึกได้จะคงที่

3.1.2.2. การเตรียมตัวอย่างเมล็ดลูกหว้าอบแห้ง

นำเมล็ดลูกหว้าที่แยกได้จากข้อ 3.1.2.1 ไปซังให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน หลังจากนั้นนำมาอบด้วยเครื่อง Electric Food Dehydrator ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเมล็ดลูกหว้าที่ได้ใส่ใน desiccator จนเย็นถึงอุณหภูมิห้องแล้วนำเมล็ดลูกหว้า ไปซังน้ำหนัก นำเมล็ดลูกหว้าที่ซังน้ำหนักแล้วกลับไปอบอีกครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเมื่อครบเวลา นำเมล็ดลูกหว้าที่อบได้ใส่ใน desiccator แล้วนำไปซังน้ำหนัก เปรียบเทียบน้ำหนักที่ได้จากการซังครั้งแรก ทำการอบซ้ำจนกว่าน้ำหนักเมล็ดลูกหว้าที่บันทึกได้จะคงที่

3.1.2.3. การสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้งด้วย เมทานอล

นำเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้งมาซังให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน บดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้งให้ละเอียด ถ่ายใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 1000 mL เติม เมทานอล ปริมาตร 800 mL อัตราส่วนเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้งต่อตัวทำละลายที่ใช้เป็น 1:3 แล้วนำไปสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองแยกส่วนสารละลายสีน้ำตาลเก็บไว้ แล้วนำส่วนที่เป็น residue มาสกัดซ้ำอีกครั้งด้วย เมทานอล ปริมาตร 800 mL สกัดสารละลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองสารละลายรวมกับที่สกัดได้ครั้งแรก นำ residue มาสกัดซ้ำจนกระทั่งตัวทำละลายเกือบไม่มีสีจึงหยุดทำการสกัด นำสารละลายที่กรองได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ที่อุณหภูมิ 40 °C บันทึกน้ำหนักของสารที่สกัดได้

3.1.2.4. การสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้งด้วย 0.1 % HCl ใน เมทานอล

ทำการสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้งเหมือนข้อ 3.1.2.3 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น 0.1 % HCl ใน เมทานอล แทน

3.1.2.5. การสกัดเมล็ดลูกหว้าอบแห้งด้วย เมทานอล

นำเมล็ดลูกหว้าอบแห้งที่ได้จากข้อ 3.1.2.2. มาชั่งน้ำหนัก หลังจากนั้นนำเมล็ดลูกหว้าอบแห้งมาบดให้ละเอียด แล้วทำการสกัดเหมือนการสกัดเนื้อเปลือกลูกหว้าอบแห้งในข้อ 3.1.2.3

3.1.2.6. การสกัดเมล็ดลูกหว้าอบแห้งด้วย 0.1 % HCl ใน เมทานอล

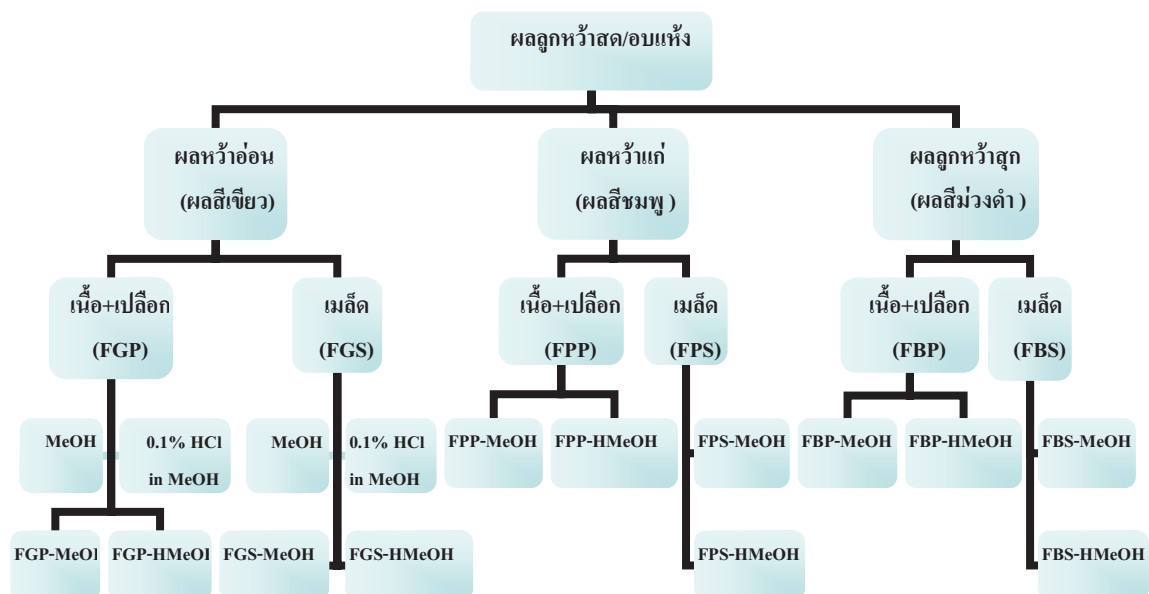
ทำการสกัดเมล็ดลูกหว้าอบแห้งเหมือนข้อ 3.1.2.5 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น 0.1 % HCl ใน เมทานอล แทน

แบ่งสารที่สกัดได้มาละลายด้วยเมทานอลได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) เพื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และหาปริมาณสารประกอบฟีนอล ส่วนสารสกัดเนื้อเปลือกลูกหว้าที่ได้จะนำมาหาปริมาณแอนโทไซยานิน ดังรูปที่ 23

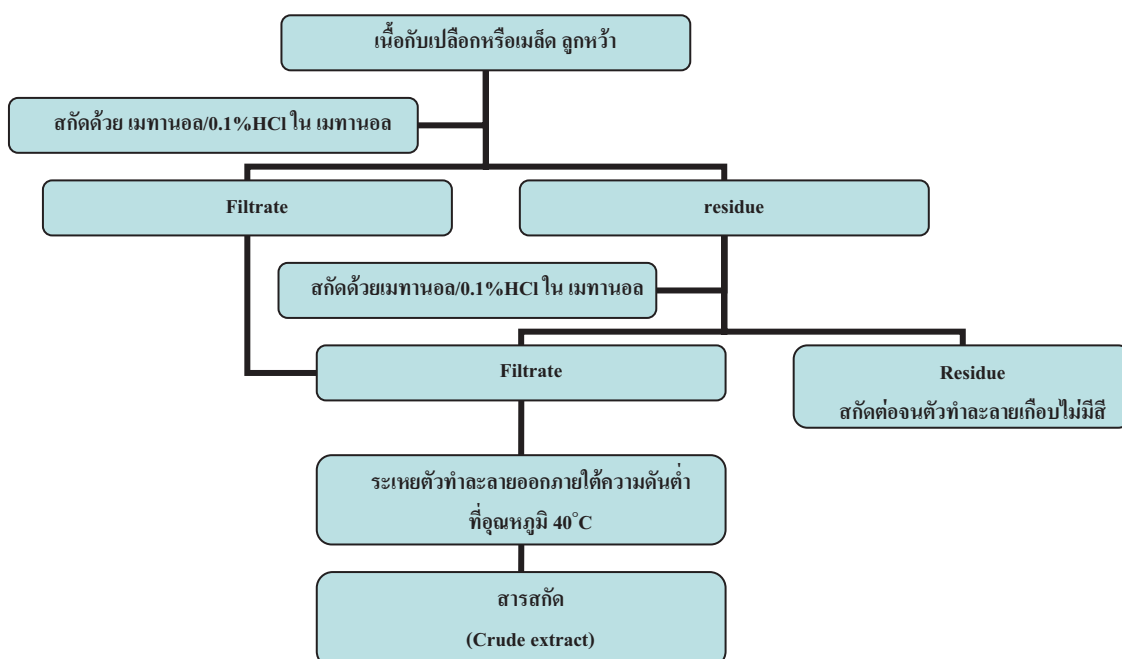
นำสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดสีม่วงดำมาทำการแยก สารในกลุ่มแอนโทไซยานิน ออกโดยนำสารสกัดที่ได้มาผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และแยกขนาดแอนโทไซยานินด้วย คอลัมน์ Sephadex LH-20 นำสารสกัดที่ได้จากคอลัมน์มาทำการวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ หาปริมาณสารประกอบฟีนอล และหาปริมาณแอนโทไซยานินดังรูปที่ 24

ตารางที่ 6 ชื่อที่ใช้เรียกลูกหว้าระยะต่างรวมสัญลักษณ์ที่ใช้แทนชื่อนั้น

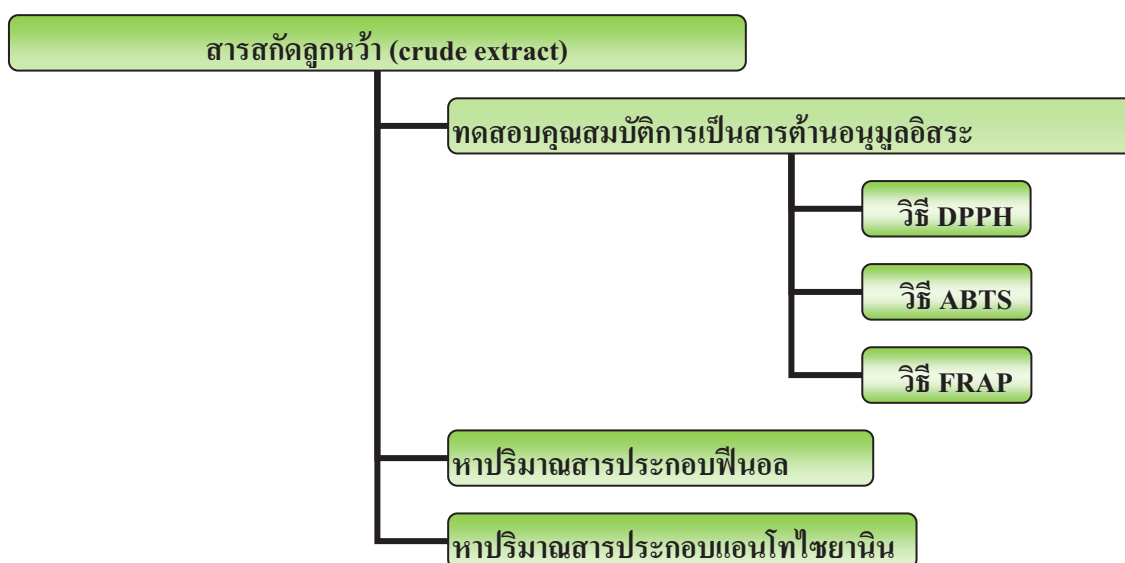
ตัวอย่างลูกหว้า	อักษรย่อ	สัญลักษณ์ที่ใช้เมื่อสกัดด้วยเมทานอล	สัญลักษณ์ที่ใช้เมื่อสกัดด้วย 0.1% HCl ในเมทานอล
ตัวอย่างสด			
เนื้อกับเปลือกลูกหว้าอ่อน	FGP	FGP-MeOH	FGP-HMeOH
เนื้อกับเปลือกลูกหว้าแก่	FPP	FPP-MeOH	FPP-HMeOH
เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก	FBP	FBP-MeOH	FBP-HMeOH
เมล็ดลูกหว้าอ่อน	FGS	FGS-MeOH	FGS-HMeOH
เมล็ดลูกหว้าแก่	FPS	FPS-MeOH	FPS-HMeOH
เมล็ดลูกหว้าสุก	FBS	FBS-MeOH	FBS-HMeOH
ตัวอย่างอบแห้ง			
เนื้อกับเปลือกลูกหว้าอ่อน	DGP	DGP-MeOH	DGP-HMeOH
เนื้อกับเปลือกลูกหว้าแก่	DPP	DPP-MeOH	DPP-HMeOH
เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก	DBP	DBP-MeOH	DBP-HMeOH
เมล็ดลูกหว้าอ่อน	DGS	DGS-MeOH	DGS-HMeOH
เมล็ดลูกหว้าแก่	DPS	DPS-MeOH	DPS-HMeOH
เมล็ดลูกหว้าสุก	DBS	DBS-MeOH	DBS-HMeOH



รูปที่ 21 แผนผังแสดงผลลูกหว้าระยะต่าง ๆ รวมไปถึงส่วนต่าง ๆ ของลูกหว้าที่นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ เมทานอล (MeOH) และ 0.1% HCl ใน เมทานอล (HMeOH)

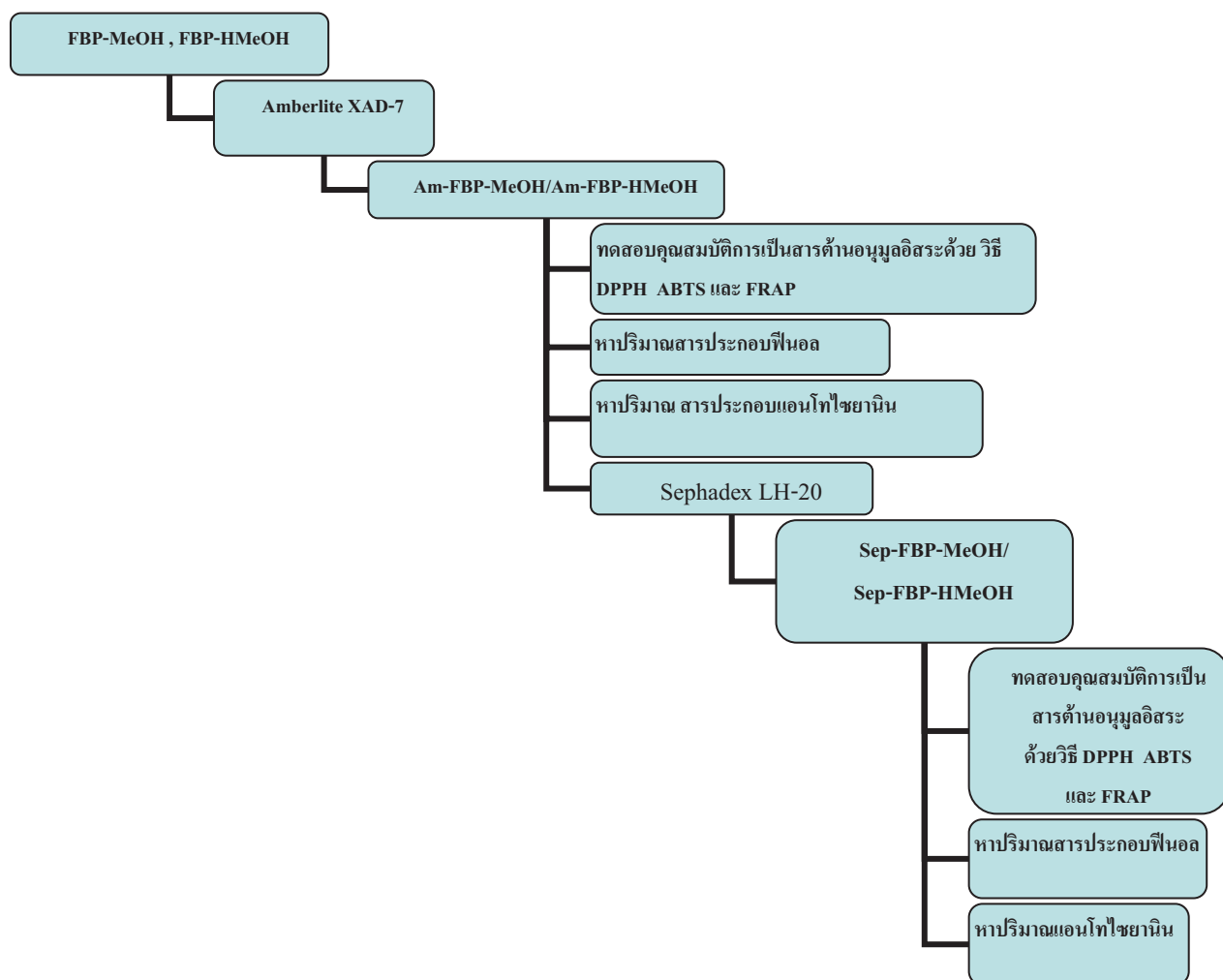


รูปที่ 22 แผนผังสรุปของการสกัดลูกหว้าด้วย เมทานอล /0.1% HCl ใน เมทานอล



** สารสกัดส่วนเมล็ดของลูกหว้าทั้ง 3 ระยะไม่นำมาหาปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานิน

รูปที่ 23 แผนผังการนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลกับ หาปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานิน



รูปที่ 24 แผนผังการนำสารสกัดของเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสละระยะผลสุกมาทำการแยกและทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ หาปริมาณสารประกอบฟีนอล และหาปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานิน

3.1.2 ผลการทดลอง

ตารางที่ 7 น้ำหนักสารสกัด mg / g น้ำหนักตัวอย่างสดที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอล

ตัวอย่างลูกหว้า	น้ำหนักสารสกัด mg / g น้ำหนักตัวอย่าง*
ลูกหว้าสด	
1. เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสีเขียว (FGP-MeOH)	59.3
2. เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสีชมพู (FPP-MeOH)	95.7
3. เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสีม่วงดำ (FBP-MeOH)	137.0
4. เมล็ดลูกหว้าสีเขียว (FGS-MeOH)	96.5
5. เมล็ดลูกหว้าสีชมพู (FPS-MeOH)	107.3
6. เมล็ดลูกหว้าสีม่วงดำ (FBS-MeOH)	114.9
ลูกหว้าอบแห้ง	
1. เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสีเขียว (DGP-MeOH)	31.8 (137.5)
2. เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสีชมพู (DPP-MeOH)	62.5 (386.0)
3. เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสีม่วงดำ (DBP-MeOH)	114.9 (537.4)
4. เมล็ดลูกหว้าสีเขียว (DGS-MeOH)	65.5 (136.3)
5. เมล็ดลูกหว้าสีชมพู (DPS-MeOH)	49.9 (112.5)
6. เมล็ดลูกหว้าสีม่วงดำ (DBS-MeOH)	59.4 (157.5)

หมายเหตุ * ค่าในเครื่องหมายวงเล็บคือ mg น้ำหนักสารสกัด / g น้ำหนักสารตัวอย่างอบแห้ง

ตารางที่ 8 น้ำหนักสารสกัด mg / g น้ำหนักตัวอย่างสดที่สกัดด้วย 0.1% HCl ใน เมทานอล

ตัวอย่างลูกหว้า	น้ำหนักสารสกัด mg / g น้ำหนักตัวอย่าง*
ลูกหว้าสด	
1. เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสีเขียว (FGP-HMeOH)	129.8
2. เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสีชมพู(FPP-HMeOH)	140.3
3. เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสีม่วงดำ(FBP-HMeOH)	186.7
4. เมล็ดลูกหว้าสีเขียว(FGS-HMeOH)	165.5
5. เมล็ดลูกหว้าสีชมพู(FPS-HMeOH)	169.0
6. เมล็ดลูกหว้าสีม่วงดำ(FBS-HMeOH)	175.8
ลูกหว้าอบแห้ง	
1. เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสีเขียว (DGP-HMeOH)	96.6 (467.1)
2. เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสีชมพู(DPP-HMeOH)	116.9 (700.0)
3. เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสีม่วงดำ(DBP-HMeOH)	176.0 (822.4)
4. เมล็ดลูกหว้าสีเขียว(DGS-HMeOH)	133.8 (297.2)
5. เมล็ดลูกหว้าสีชมพู(DPS-HMeOH)	117.6 (265.0)
6. เมล็ดลูกหว้าสีม่วงดำ(DBS-HMeOH)	121.2 (322.4)

หมายเหตุ * ค่าในเครื่องหมายวงเล็บคือ mg น้ำหนักสารสกัด / g น้ำหนักสารตัวอย่างอบแห้ง

3.2. การศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

3.2.1. วิธีการทดลอง

ทำการศึกษา kinetic behaviors ของสารมาตรฐาน (Trolox) และสารตัวอย่าง โดยทำการผสมสารละลาย DPPH[•] ที่เตรียมได้ 950 μ L กับสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง 50 μ L ทำการบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm เทียบกับเวลาผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 25 จากผลการทดลองข้างต้นจึงเลือกใช้เวลาที่ 60 นาที สำหรับตรวจวัด % remaining DPPH[•] หลังจากการทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง

ปีเปิดสารตัวอย่างมา 50 μ L ผสมกับสารละลาย DPPH[•] ที่เตรียมได้ 950 μ L เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 60 นาที นำของผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm

หลอดควบคุม (control) ใช้ เมทานอล แทนสารตัวอย่าง

ใช้เมทานอล แทนสารละลาย DPPH[•] วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm ให้ได้ Absorbance เท่ากับ 0.00 ก่อนวัดสารตัวอย่าง (เป็น Blank)

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟระหว่าง % remaining DPPH[•] กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานและสารตัวอย่างแล้วรายงานผลการทดลองเป็นค่า EC₅₀

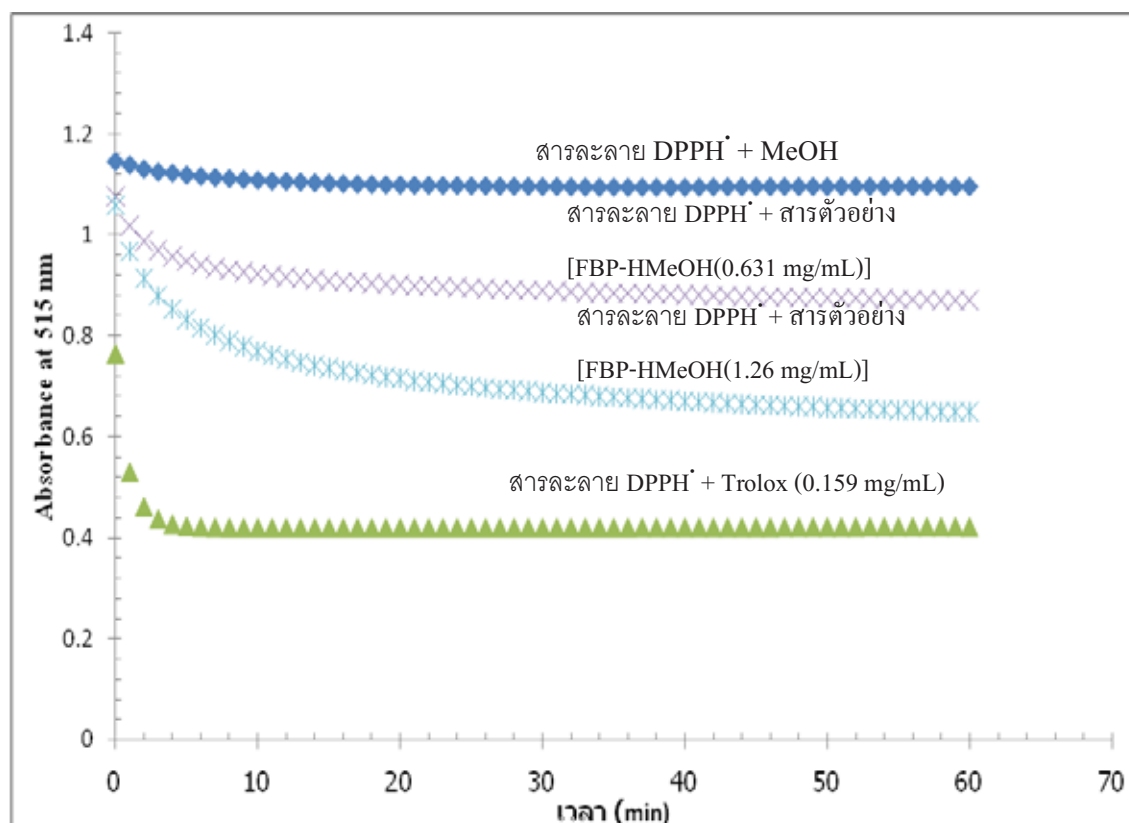
$$\% \text{ Remaining DPPH}^{\bullet} = (\text{Abs sample} / \text{Abs control}) \times 100$$

หมายเหตุ

Abs sample = Absorbance ของสารละลาย DPPH[•] + สารมาตรฐานหรือสารตัวอย่างที่วัดได้

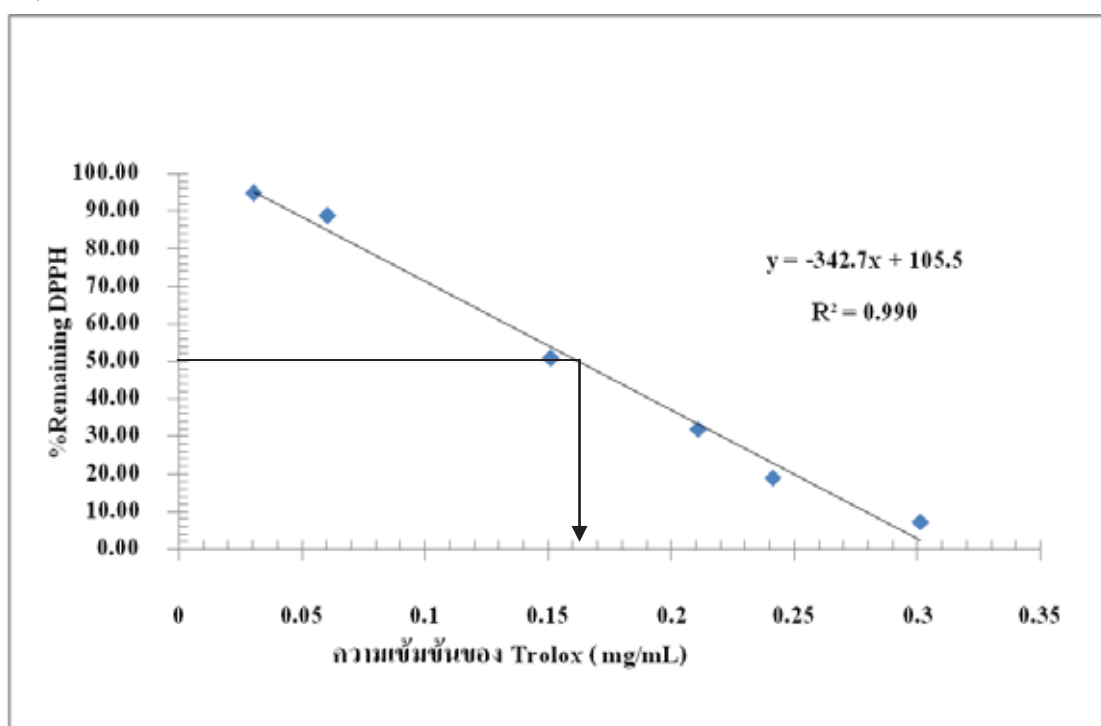
Abs control = Absorbance ของสารละลาย DPPH[•] + MeOH

3.2.2. ผลการทดลอง

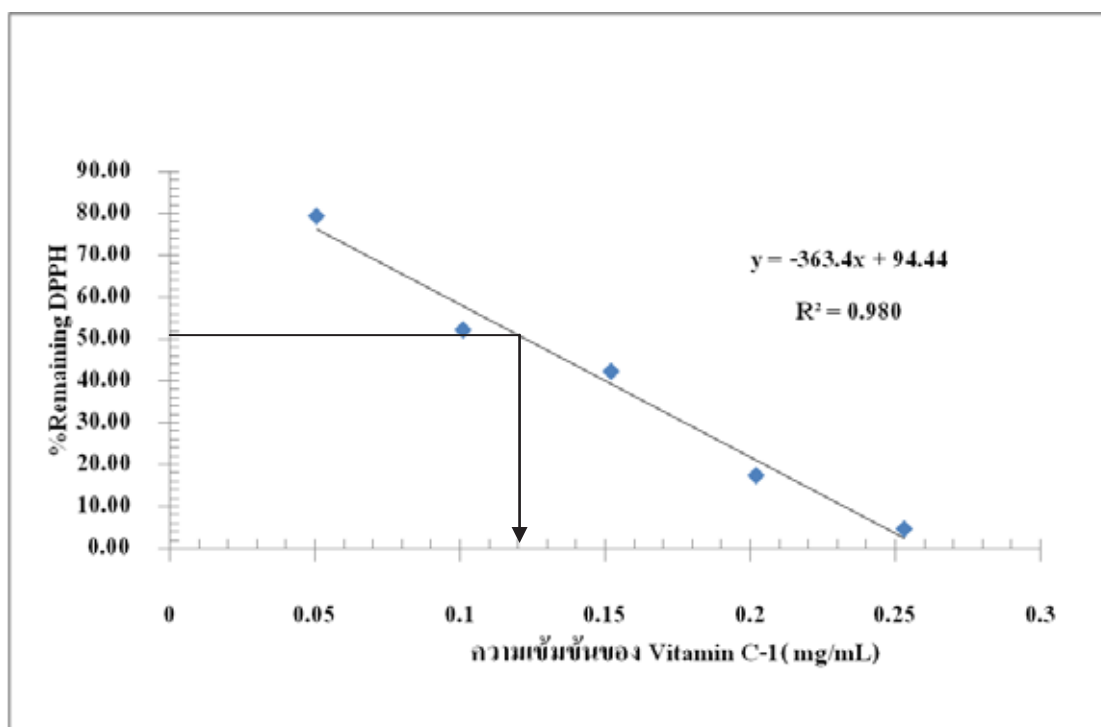


รูปที่ 25 Kinetic curve ของDPPH[•] ผสมกับเมทานอล สารตัวอย่าง และ สารละลายมาตรฐาน Trolox

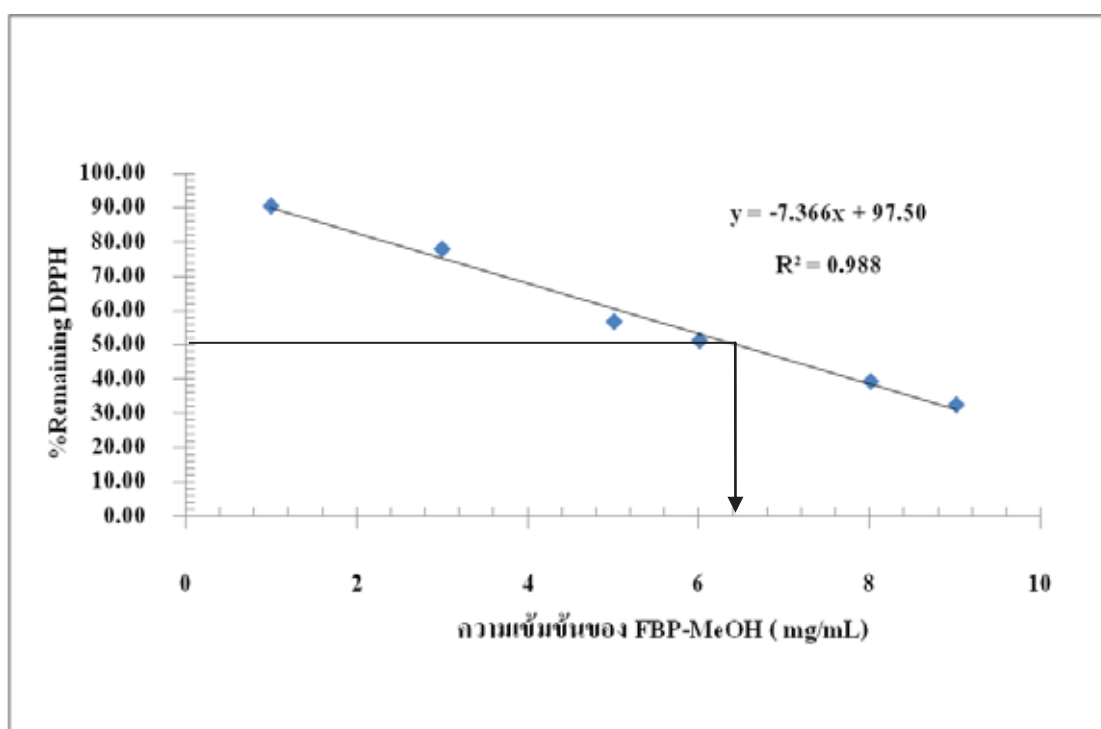
ในการทดลองนี้จะรายงานผลการทดลองเป็นค่า EC_{50} ซึ่งหมายถึง ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระ (DPPH) ลดลง 50% ซึ่งในการทดลองนี้เราจะใช้ Trolox และ Vitamin C เป็นสารมาตรฐาน โดยนำสารมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH[•] ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงแล้ววัดค่า A_{515} ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 26 , 27, 28, 29, 30, 31 และค่า EC_{50} , TEAC, VCEAC ของตัวอย่างต่างๆ แสดงในตารางที่ 9 , 10 และกราฟรูปที่ 33 , 34, 35



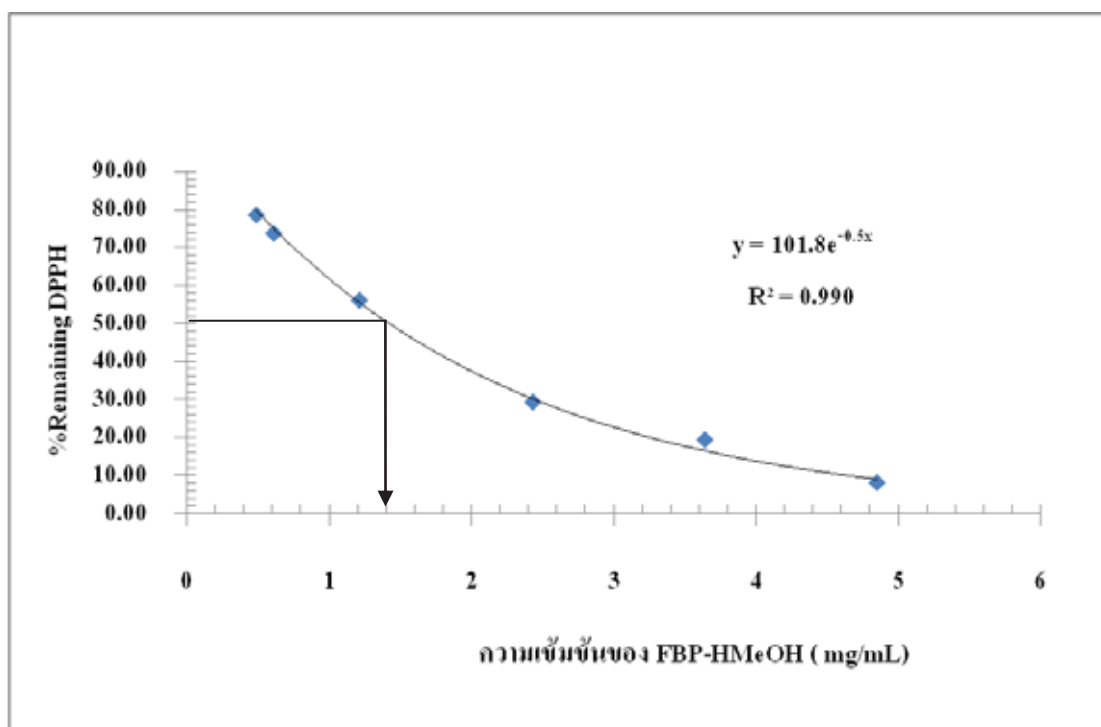
รูปที่ 26 การหาค่า EC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Trolox ด้วยวิธี DPPH



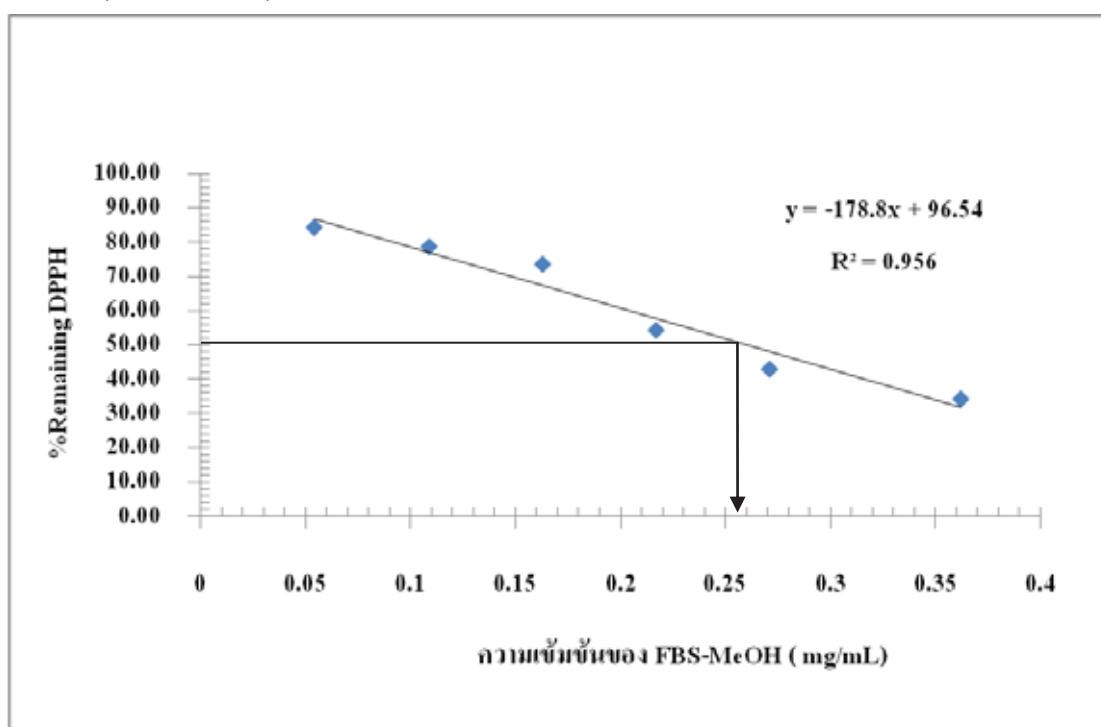
รูปที่ 27 การหาค่า EC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Vitamin C ด้วยวิธี DPPH



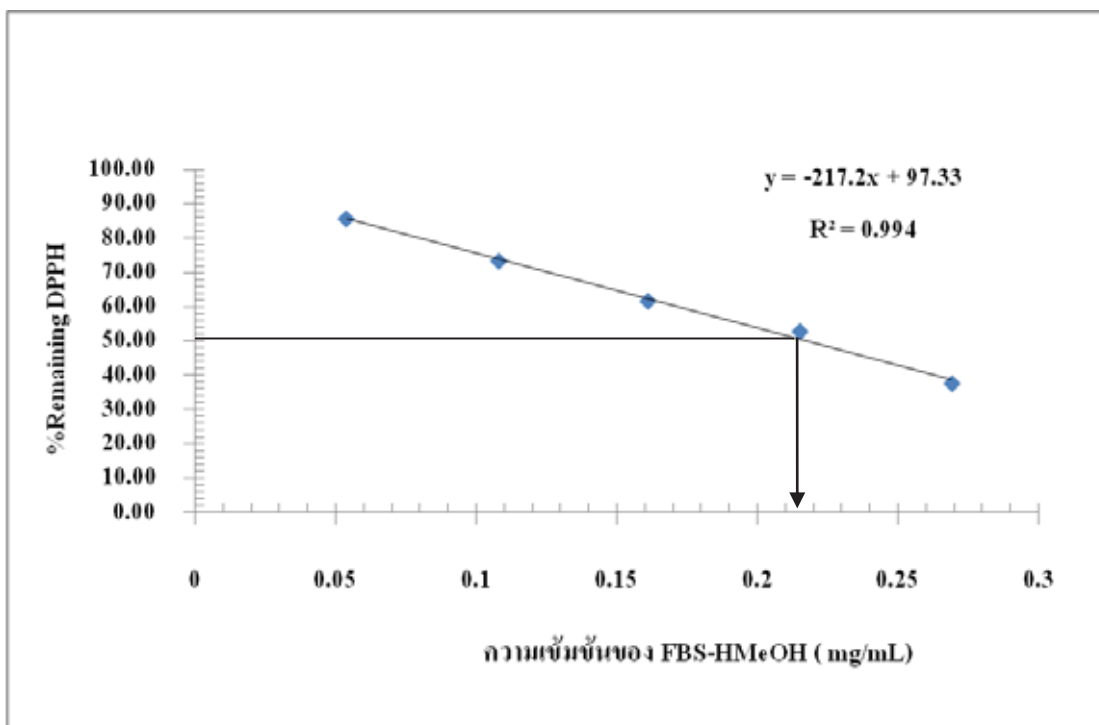
รูปที่ 28 การหาค่า EC_{50} ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่สกัดด้วยเมทานอล (FBP-MeOH) ด้วยวิธี DPPH



รูปที่ 29 การหาค่า EC_{50} ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่สกัดด้วย 0.1% HCl ใน เมทานอล (FBP-HMeOH) ด้วยวิธี DPPH

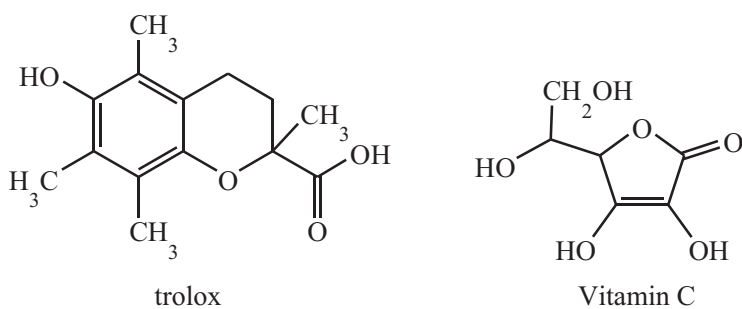


รูปที่ 30 การหาค่า EC_{50} ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสุกด้วยเมทานอล (FBS-MeOH) ด้วย วิธี DPPH



รูปที่ 31 การหาค่า EC_{50} ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสุกด้วย 0.1% HCl ในเมทานอล (FBS-HMeOH) ด้วยวิธี DPPH

ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ (crude extract) จากลูกหว้าด้วยวิธี DPPH โดยเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานคือ Trolox และ Vitamin C โครงสร้างดังรูปที่ 32 ซึ่งสารทั้งสองตัวนี้มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี



รูปที่ 32 โครงสร้างของ trolox และ Vitamin C

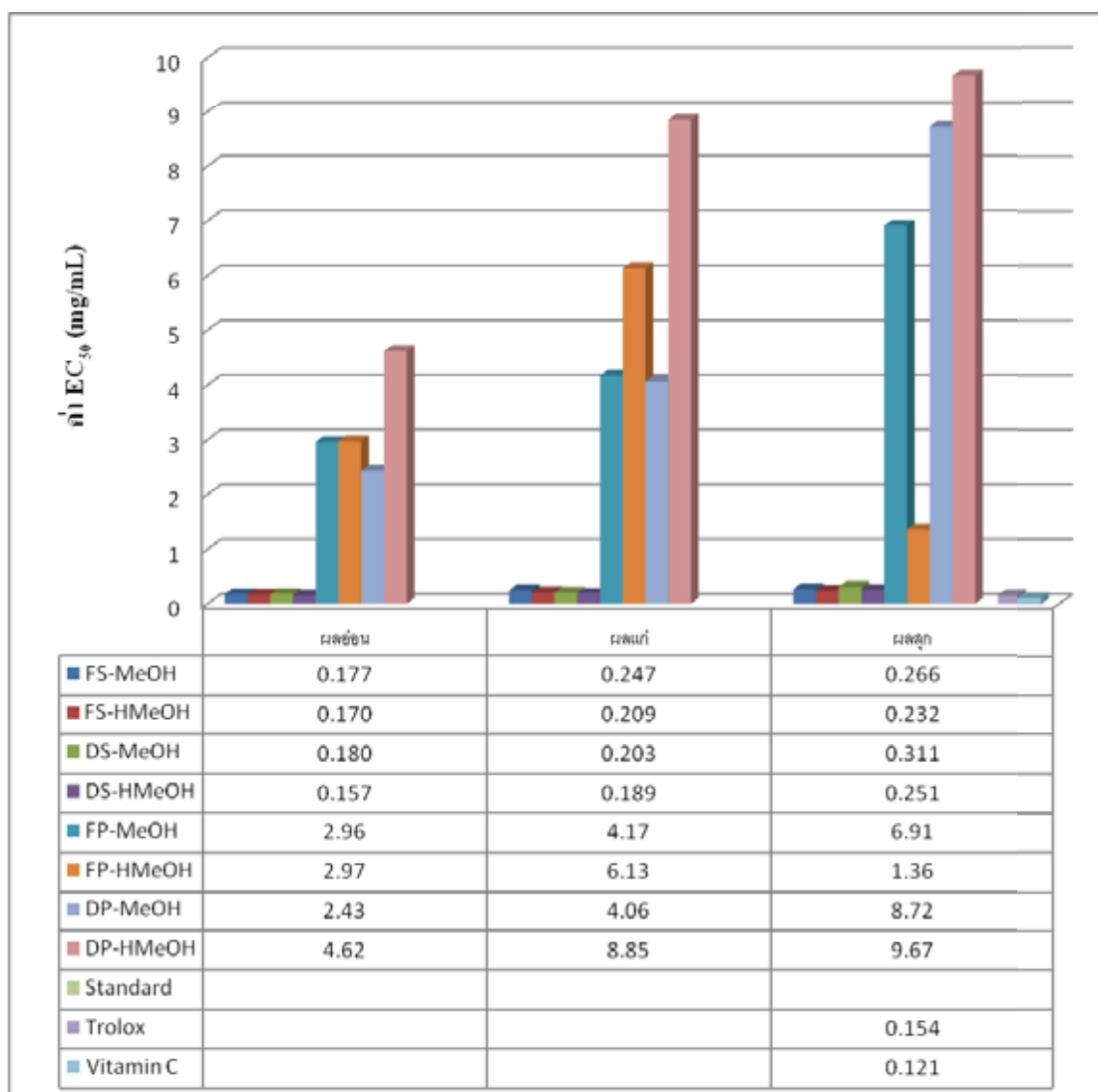
จากค่า EC_{50} สามารถคำนวณหาค่า Trolox equivalent และ Vitamin C equivalent ของสารตัวอย่างได้ดังนี้

ตารางที่ 9 ค่า EC_{50} Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และ Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดและเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้ง (ค่า EC_{50} หมายถึง ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระ (DPPH $\cdot$) ลดลง 50%) [ข้อมูลที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (n = 3)]

ตัวอย่างลูกหว้า	ค่า EC_{50} (mg/mL)	TEAC (mg trolox/ g extract)	VCEAC (mg vitamin C/ g extract)
Trolox	0.154 ± 0.012	-	-
Vitamin C	0.121 ± 0.001	-	-
FGP-MeOH	2.96 ± 0.12	54.5 ± 2.2	41.0 ± 1.6
FPP-MeOH	4.17 ± 0.25	38.7 ± 2.4	29.1 ± 1.8
FBP-MeOH	6.91 ± 0.59	23.4 ± 1.9	17.6 ± 1.4
FGP-HMeOH	2.97 ± 0.19	53.5 ± 3.6	40.9 ± 2.8
FPP-HMeOH	6.13 ± 0.31	25.9 ± 1.3	19.8 ± 1.0
FBP-HMeOH	1.36 ± 0.07	116.5 ± 6.1	89.0 ± 4.7
DGP-MeOH	2.43 ± 0.06	63.6 ± 1.5	49.9 ± 1.2
DPP-MeOH	4.06 ± 0.08	37.9 ± 0.8	29.8 ± 0.6
DBP-MeOH	8.72 ± 0.28	17.7 ± 0.6	13.9 ± 0.4
DGP-HMeOH	4.62 ± 0.52	30.9 ± 3.3	26.4 ± 2.8
DPP-HMeOH	8.85 ± 0.55	16.1 ± 1.0	13.7 ± 0.8
DBP-HMeOH	9.67 ± 0.74	14.7 ± 1.2	12.6 ± 1.0

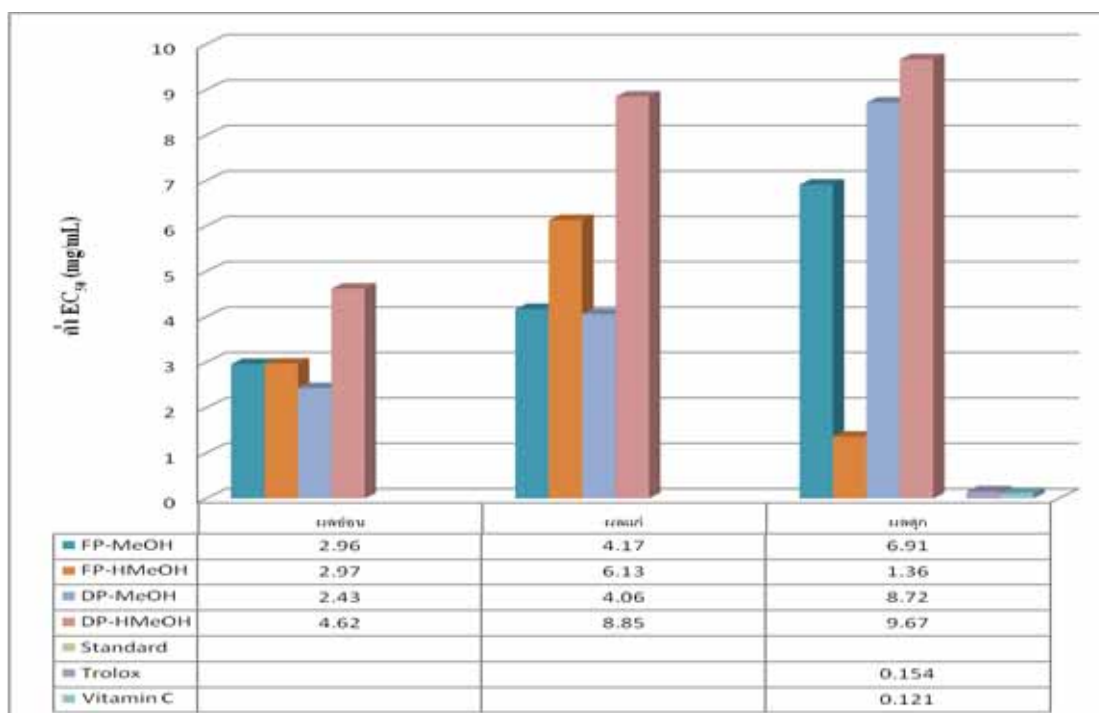
ตารางที่ 10 ค่า EC_{50} , Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และ Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสดและเมล็ดลูกหว้าอบแห้ง
[mean $\pm$ SD (n = 3)]

ตัวอย่างลูกหว้า	ค่า EC_{50} (mg/mL)	TEAC (mg trolox/ g extract)	VCEAC (mg vitamin C/ g extract)
FGS-MeOH	0.177 $\pm$ 0.013	760.1 $\pm$ 57.8	686.3 $\pm$ 52.2
FPS-MeOH	0.247 $\pm$ 0.013	542.7 $\pm$ 28.1	490.1 $\pm$ 25.4
FBS-MeOH	0.266 $\pm$ 0.006	503.3 $\pm$ 10.5	454.5 $\pm$ 9.5
FGS-HMeOH	0.170 $\pm$ 0.008	911.2 $\pm$ 45.9	714.4 $\pm$ 36.0
FPS-HMeOH	0.209 $\pm$ 0.004	738.6 $\pm$ 14.1	579.1 $\pm$ 11.1
FBS-HMeOH	0.232 $\pm$ 0.014	666.8 $\pm$ 39.2	522.8 $\pm$ 30.7
DGS-MeOH	0.180 $\pm$ 0.004	777.6 $\pm$ 17.5	671.2 $\pm$ 15.1
DPS-MeOH	0.203 $\pm$ 0.019	692.3 $\pm$ 61.5	598.4 $\pm$ 53.1
DBS-MeOH	0.311 $\pm$ 0.025	451.7 $\pm$ 37.7	390.4 $\pm$ 32.6
DGS-HMeOH	0.157 $\pm$ 0.005	664.2 $\pm$ 19.20	772.8 $\pm$ 22.3
DPS-HMeOH	0.189 $\pm$ 0.012	550.8 $\pm$ 34.8	648.8 $\pm$ 40.5
DBS-HMeOH	0.251 $\pm$ 0.004	414.4 $\pm$ 6.6	482.6 $\pm$ 7.7

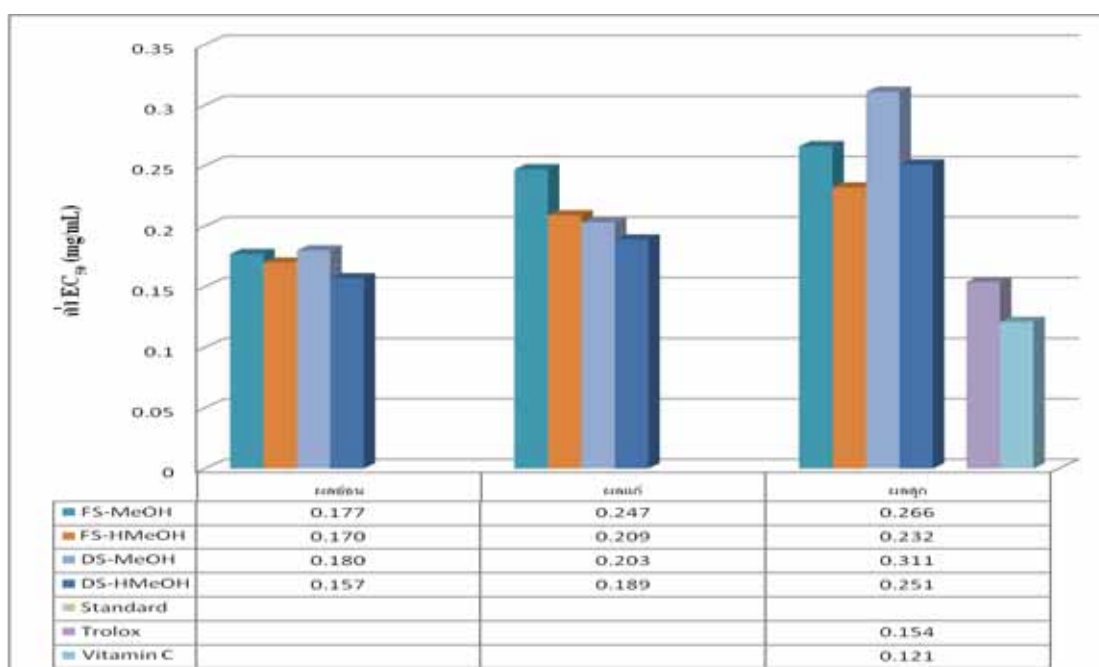


รูปที่ 33 กราฟแสดงค่า EC_{50} ของสารสกัดลูกหว้า ทั้ง 24 ตัวอย่างและสารมาตรฐาน Trolox, Vitamin C ด้วยวิธี DPPH

ผลการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 24 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดที่ได้จากเมล็ดทั้งสดและอบแห้งของลูกหว้าทั้งสามระยะให้ค่า EC_{50} น้อยกว่าสารสกัดในส่วนเนื้อกับเปลือก ถ้าพิจารณาลูกหว้าในระยะผลอ่อนด้วยกันสารสกัดส่วนเนื้อกับเปลือกลูกหว้าจะมีค่า EC_{50} สูงกว่าสารสกัดในส่วนเมล็ด ถึงประมาณ 16 เท่า (รูปที่ 33)



รูปที่ 34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า EC_{50} ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสด, ลูกหว้าอบแห้ง และสารมาตรฐาน Trolox, Vitamin C ด้วยวิธี DPPH



รูปที่ 35 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า EC_{50} ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสด, ลูกหว้าอบแห้ง และสารมาตรฐาน Trolox, Vitamin C ด้วยวิธี DPPH

เมื่อเทียบสารสกัดจากเมล็ดของลูกหว้าไม่ว่าจะสกัดด้วยเมทานอล หรือ 0.1 % HCl ในเมทานอล พบว่าค่า EC_{50} ในระยะผลอ่อน < ระยะผลแก่ < ระยะผลสุก หรือ สารสกัดจากเมล็ดในระยะผลอ่อนมีค่า EC_{50} ใกล้เคียงค่า EC_{50} ของ trolox แต่มากกว่าค่า EC_{50} ของ Vitamin C อยู่ประมาณ 1.5 เท่า (รูปที่ 35)

สารสกัดในส่วนของเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดที่สกัดด้วยเมทานอล และสารสกัดของเนื้อกับเปลือกของลูกหว้าอบแห้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิดนั้น พบว่าค่า EC_{50} ระยะผลอ่อน < ระยะผลแก่ < ระยะผลสุก แต่สารสกัดส่วนเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดที่สกัดด้วย 0.1 % HCl ในเมทานอล ผลแตกต่างออกไป นั่นคือ ค่า EC_{50} ในระยะผลสุก < ระยะผลอ่อน < ระยะผลแก่ สารสกัดจากเนื้อกับเปลือกในระยะผลอ่อน (สกัดด้วยเมทานอล) มีค่า EC_{50} มากกว่าค่า EC_{50} ของ trolox และ Vitamin C อยู่ 19 และ 24 เท่า ตามลำดับ และสารสกัดจากเนื้อกับเปลือกในระยะผลสุก (สกัดด้วย 0.1 % HCl ใน เมทานอล) มีค่า EC_{50} มากกว่าค่า EC_{50} ของ trolox และ Vitamin C อยู่ประมาณ 9 และ 11 เท่าตามลำดับ (รูปที่ 34)

3.3. การศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

3.3.1. วิธีการทดลอง

ทำการศึกษา kinetic behaviors ของสารมาตรฐาน (Trolox) และสารตัวอย่าง โดยทำการผสมสารละลาย ABTS^{•+} ที่เตรียมได้ 980 μ L กับสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง 20 μ L ทำการบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm เทียบกับเวลาผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 36 จากผลการทดลองข้างต้นจึงเลือกใช้เวลาที่ 60 นาที สำหรับตรวจวัด % Remaining ABTS^{•+} หลังจากการทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง

ผสมสารละลาย ABTS^{•+} reagent ที่เจือจางแล้ว 980 μ L กับสารละลายมาตรฐาน หรือ สารละลายตัวอย่าง 20 μ L เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 60 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm

Control : ผสมสารละลาย ABTS^{•+} reagent ที่เจือจางแล้ว 980 μ L กับ เมทานอล 20 μ L

Blank : เมทานอล

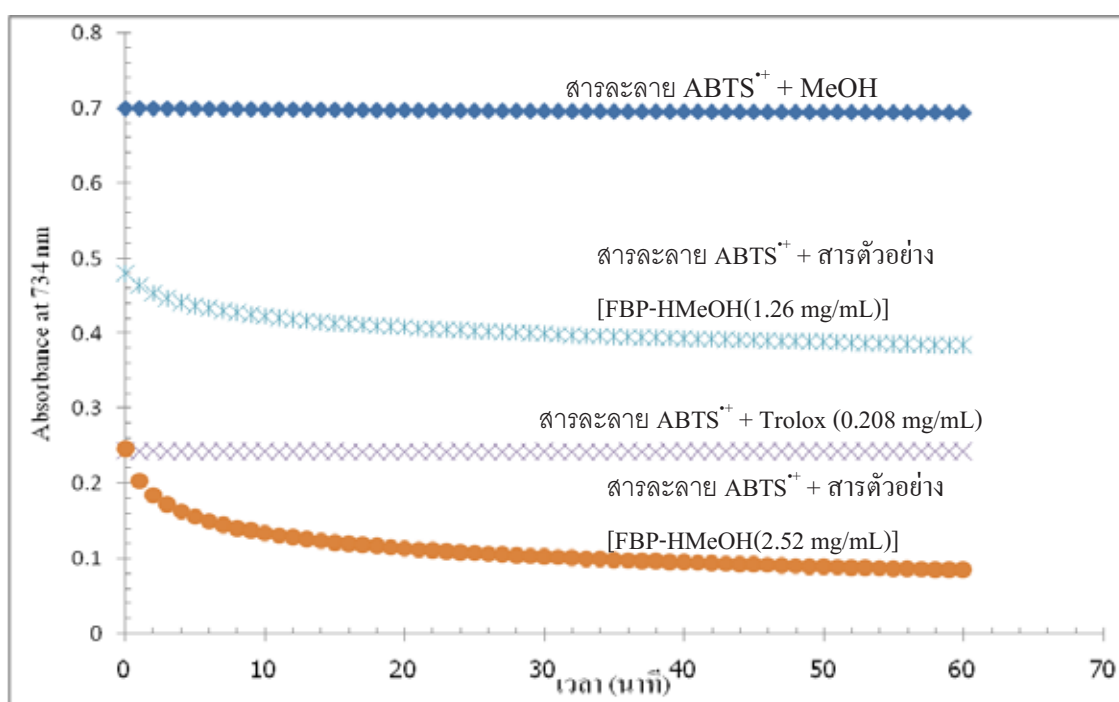
สร้างกราฟของความสัมพันธ์ระหว่าง % Remaining ABTS^{•+} กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน trolox และ Vitamin C โดยรายงานผลการทดลองเป็นค่า EC_{50} , Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และ Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC)

$$\% \text{ Remaining ABTS}^{\bullet+} = (\text{Abs sample}/\text{Abs control}) \times 100$$

Abs sample = Absorbance ของสารละลาย ABTS^{•+} + สารมาตรฐานหรือสารตัวอย่างที่วัดได้

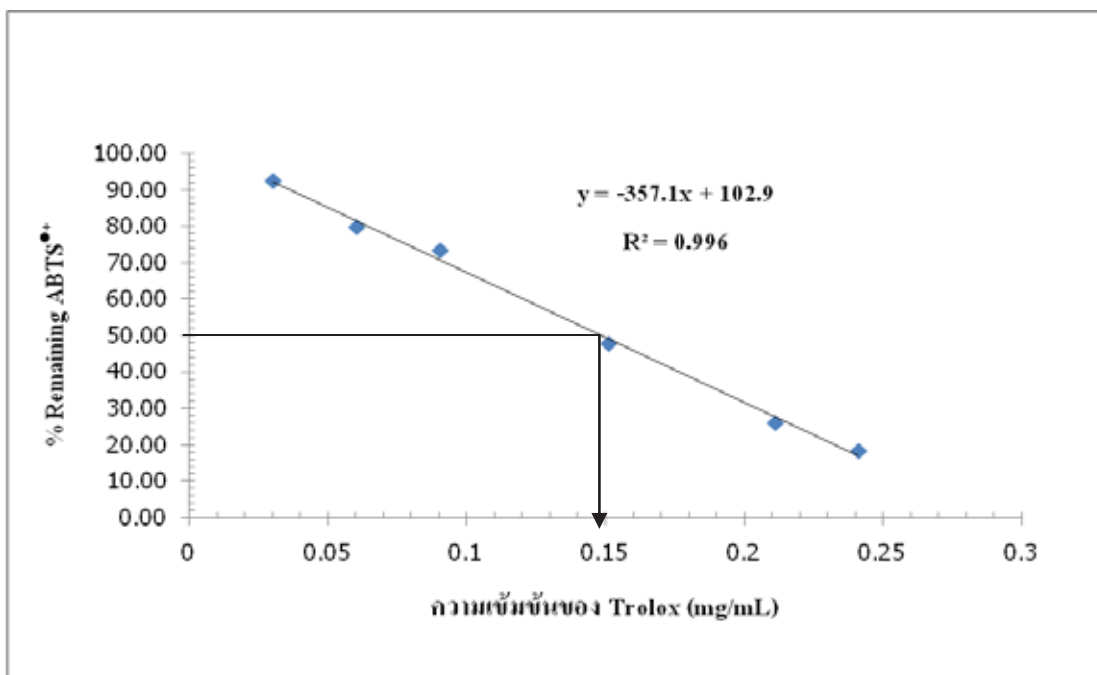
Abs control = Absorbance ของสารละลาย ABTS^{•+} + MeOH

3.3.2. ผลการทดลอง

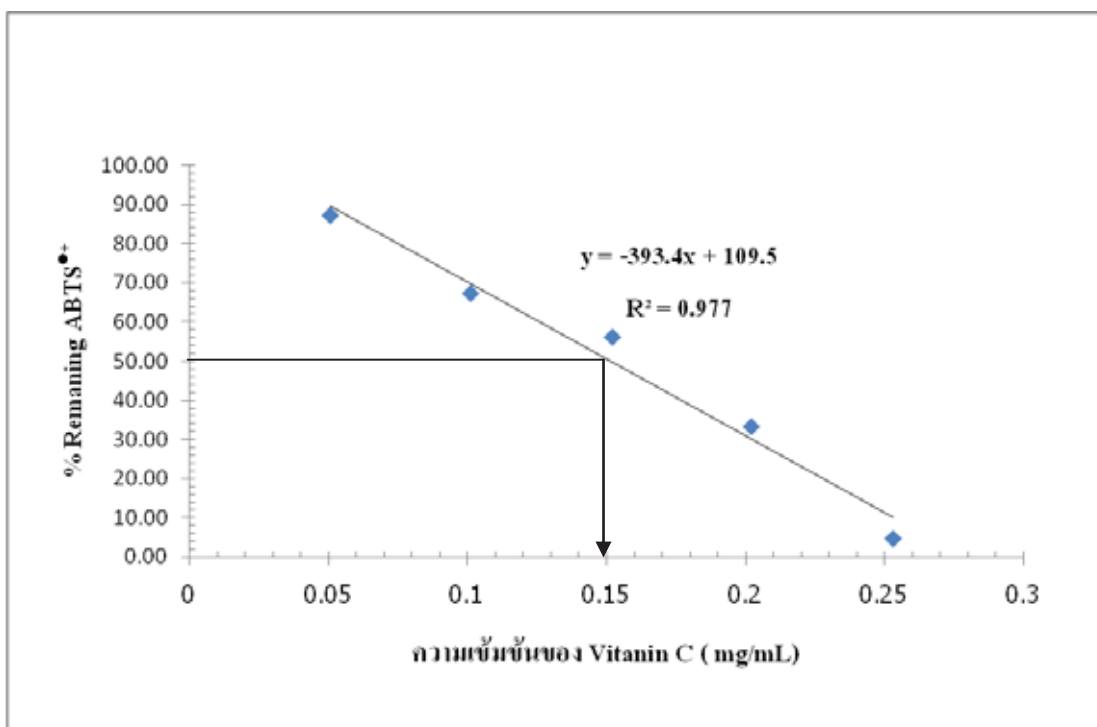


รูปที่ 36 Kinetic curve ของ ABTS^{•+} ผสมกับเมทานอล สารตัวอย่าง และ สารละลายมาตรฐาน Trolox

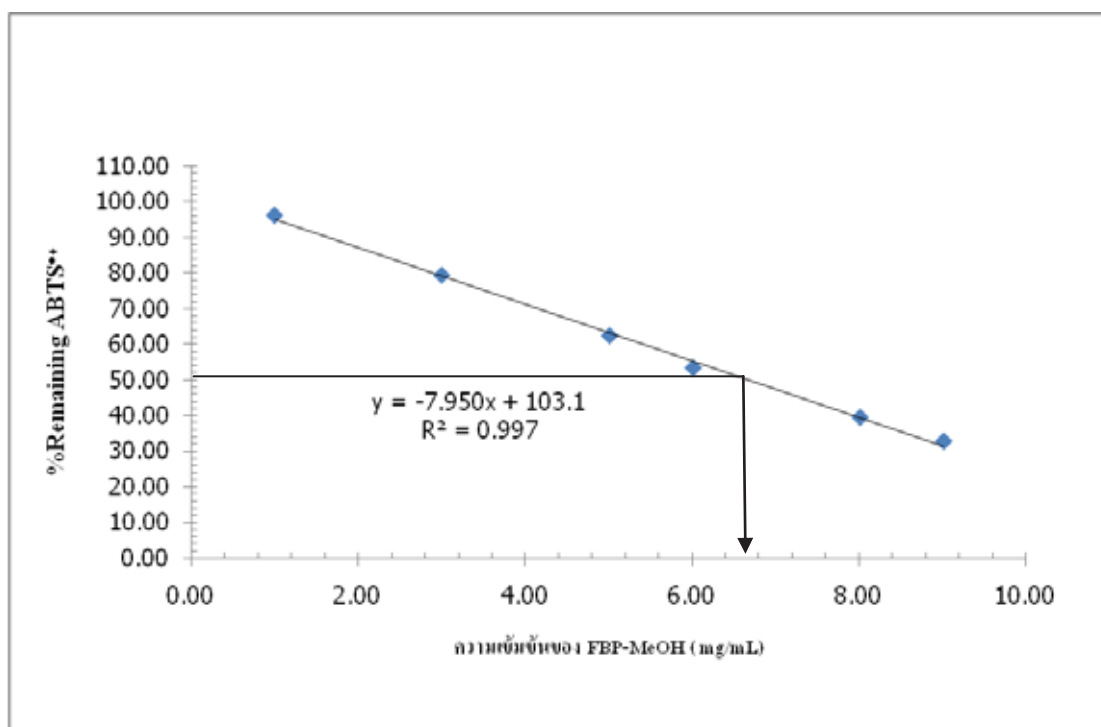
ในการทดลองนี้จะรายงานผลการทดลองเป็นค่า EC_{50} ซึ่งหมายถึง ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระ (ABTS^{•+}) ลดลง 50% ซึ่งในการทดลองนี้เราจะใช้ Trolox และ Vitamin C เป็นสารมาตรฐาน โดยนำสารมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย ABTS^{•+} ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 37, 38, 39, 40, 41, 42 และค่า EC_{50} , TEAC, VCEAC ของตัวอย่างต่างๆ แสดงในตารางที่ 11, 12 และกราฟรูปที่ 43, 44, 45



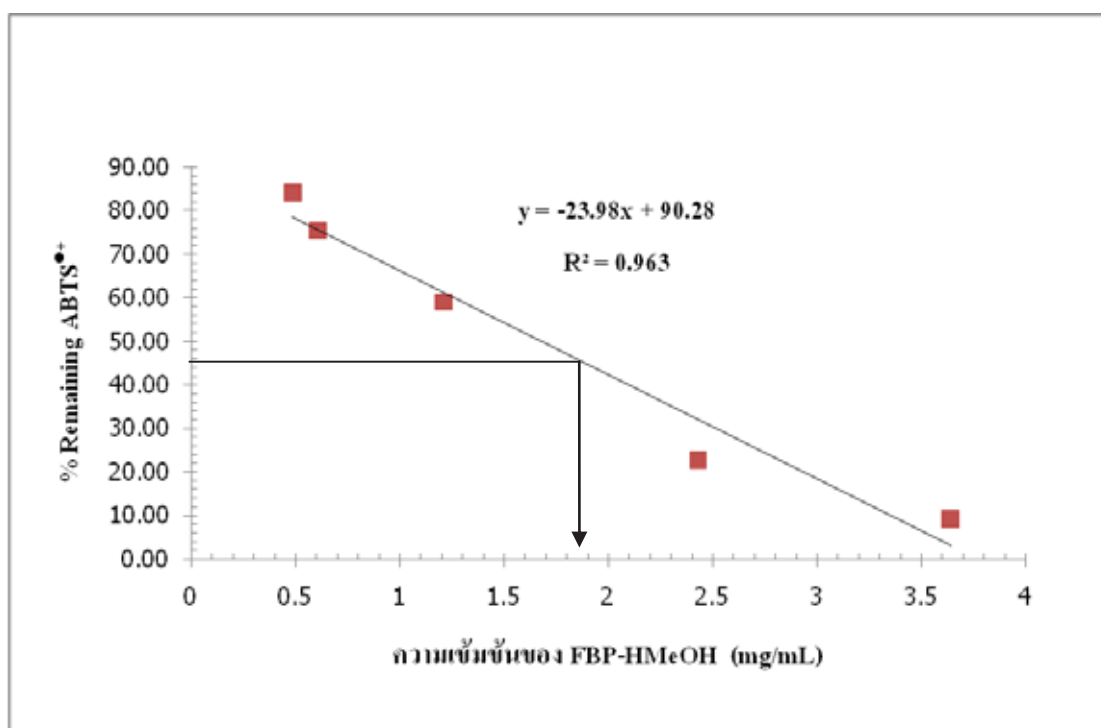
รูปที่ 37 การหาค่า EC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Trolox ด้วยวิธี ABTS



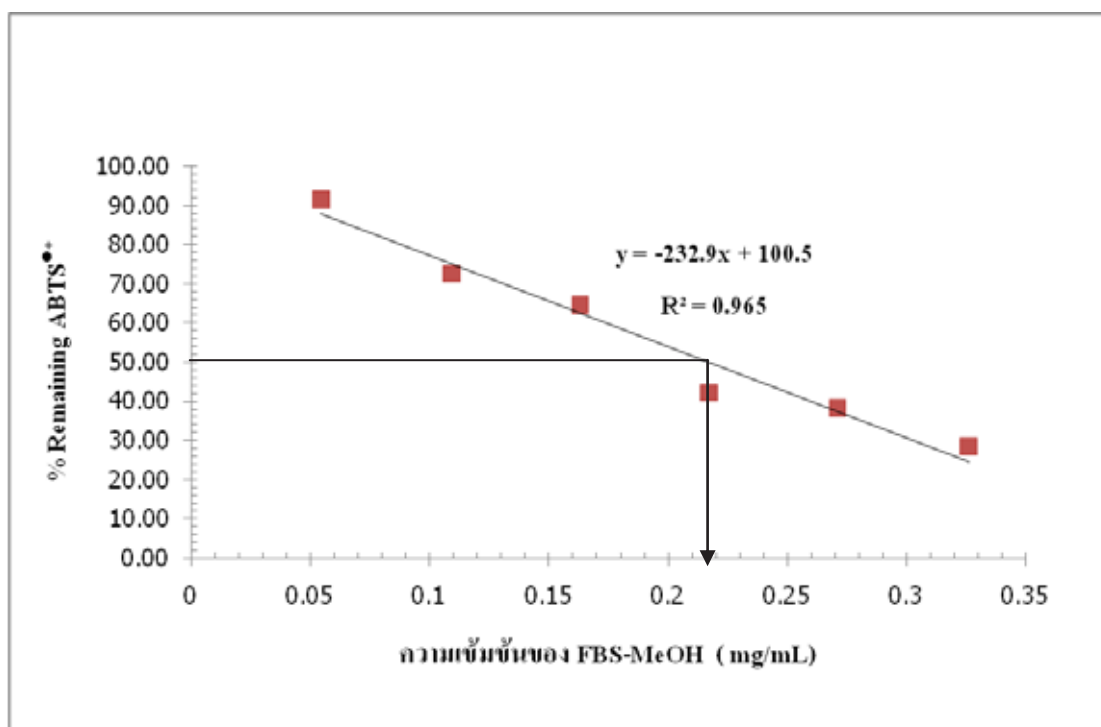
รูปที่ 38 การหาค่า EC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Vitamin C ด้วยวิธี ABTS



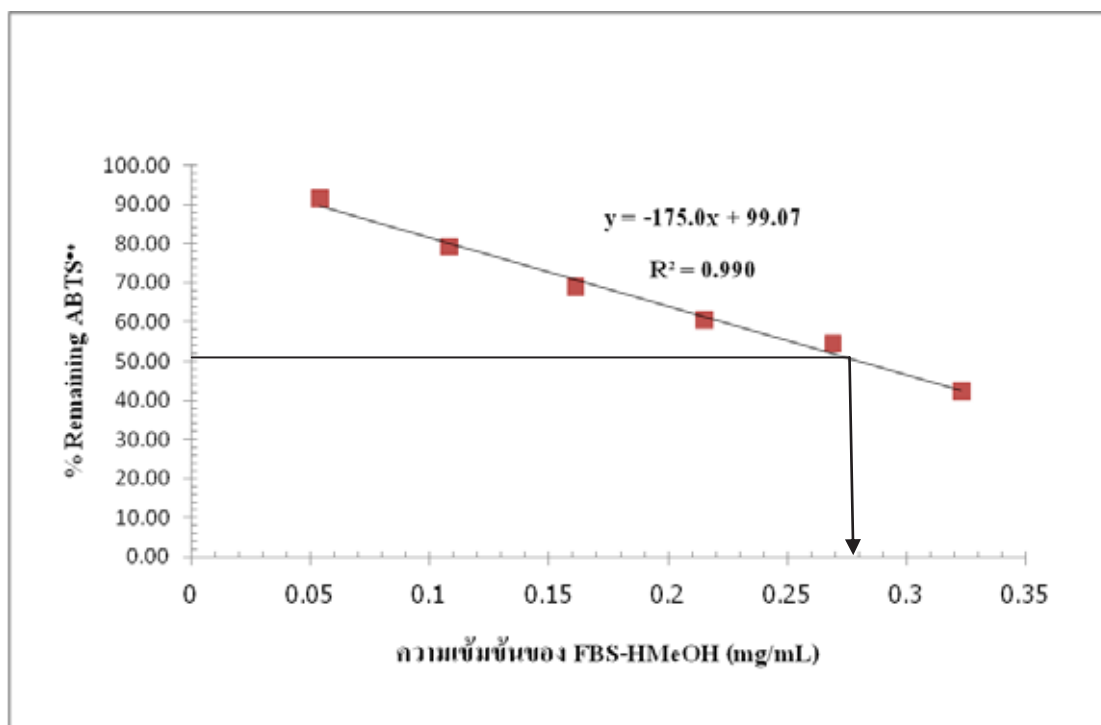
รูปที่ 39 การหาค่า EC₅₀ ของสารสกัดเนื้อมะเขือเทศที่สกัดด้วย เมทานอล (FBP-MeOH) ด้วยวิธี ABTS



รูปที่ 40 การหาค่า EC₅₀ ของสารสกัดเนื้อมะเขือเทศที่สกัดด้วย 0.1% HCl ใน เมทานอล (FBP-HMeOH) ด้วยวิธี ABTS



รูปที่ 41 การหาค่า EC_{50} ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสุกด้วย เมทานอล (FBS-MeOH) ด้วยวิธี ABTS



รูปที่ 42 การหาค่า EC_{50} ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสุกด้วย 0.1% HCl ใน เมทานอล (FBS-HMeOH) ด้วยวิธี ABTS

ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ (crude extract) จากลูกหว้าด้วยวิธี ABTS โดยใช้ Trolox และ Vitamin C เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานเช่นเดียวกับวิธี DPPH

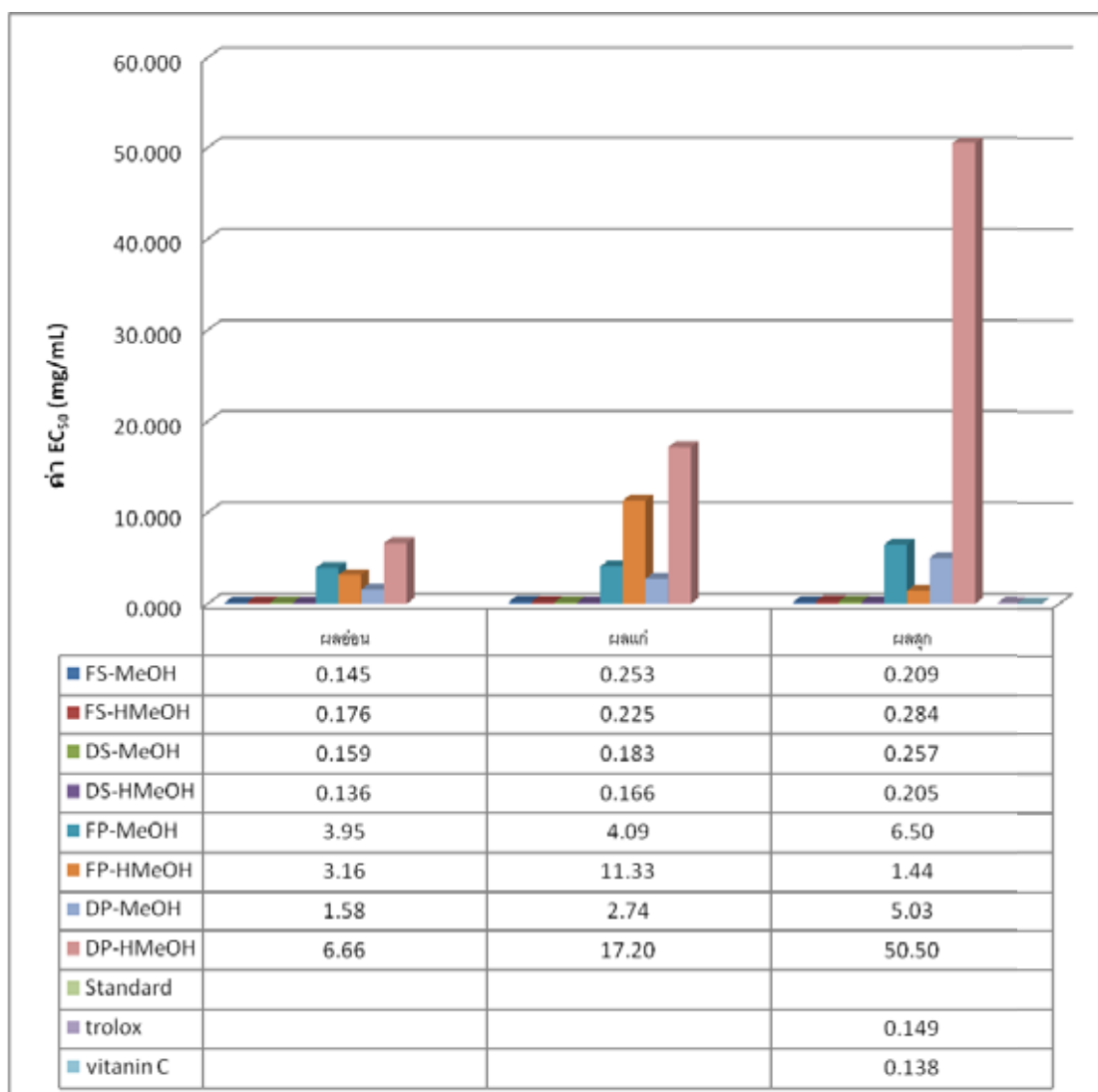
ค่า EC_{50} สามารถนำไปคำนวณหาค่า Trolox equivalent และ Vitamin C equivalent ของสารตัวอย่างได้ดังนี้

ตารางที่ 11 ค่า EC_{50} , Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และ Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดและเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้ง (ค่า EC_{50} หมายถึง ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระ (ABTS^{•+}) ลดลง 50%) [mean $\pm$ SD (n = 3)]

ตัวอย่างลูกหว้า	ค่า EC_{50} (mg/mL)	TEAC (mg trolox/ g extract)	VCEAC (mg vitamin C/ g extract)
Trolox	0.149 $\pm$ 0.002	-	-
Vitamin C	0.138 $\pm$ 0.020	-	-
FGP-MeOH	3.95 $\pm$ 0.20	61.9 $\pm$ 3.1	35.0 $\pm$ 1.7
FPP-MeOH	4.09 $\pm$ 0.39	60.1 $\pm$ 5.5	34.0 $\pm$ 3.1
FBP-MeOH	6.51 $\pm$ 0.32	37.6 $\pm$ 1.9	21.2 $\pm$ 1.1
FGP-HMeOH	3.16 $\pm$ 0.20	58.7 $\pm$ 3.7	43.8 $\pm$ 2.8
FPP-HMeOH	11.33 $\pm$ 0.87	7.5 $\pm$ 0.6	12.2 $\pm$ 1.0
FBP-HMeOH	1.44 $\pm$ 0.21	130.3 $\pm$ 17.5	97.2 $\pm$ 13.0
DGP-MeOH	1.58 $\pm$ 0.12	94.9 $\pm$ 7.5	87.7 $\pm$ 6.9
DPP-MeOH	2.74 $\pm$ 0.02	54.3 $\pm$ 0.5	50.2 $\pm$ 0.5
DBP-MeOH	5.03 $\pm$ 0.33	29.8 $\pm$ 2.0	27.5 $\pm$ 1.9
DGP-HMeOH	6.66 $\pm$ 0.27	30.3 $\pm$ 1.2	20.7 $\pm$ 0.8
DPP-HMeOH	17.18 $\pm$ 0.37	11.8 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.1
DBP-HMeOH	50.49 $\pm$ 2.61	4.0 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.2

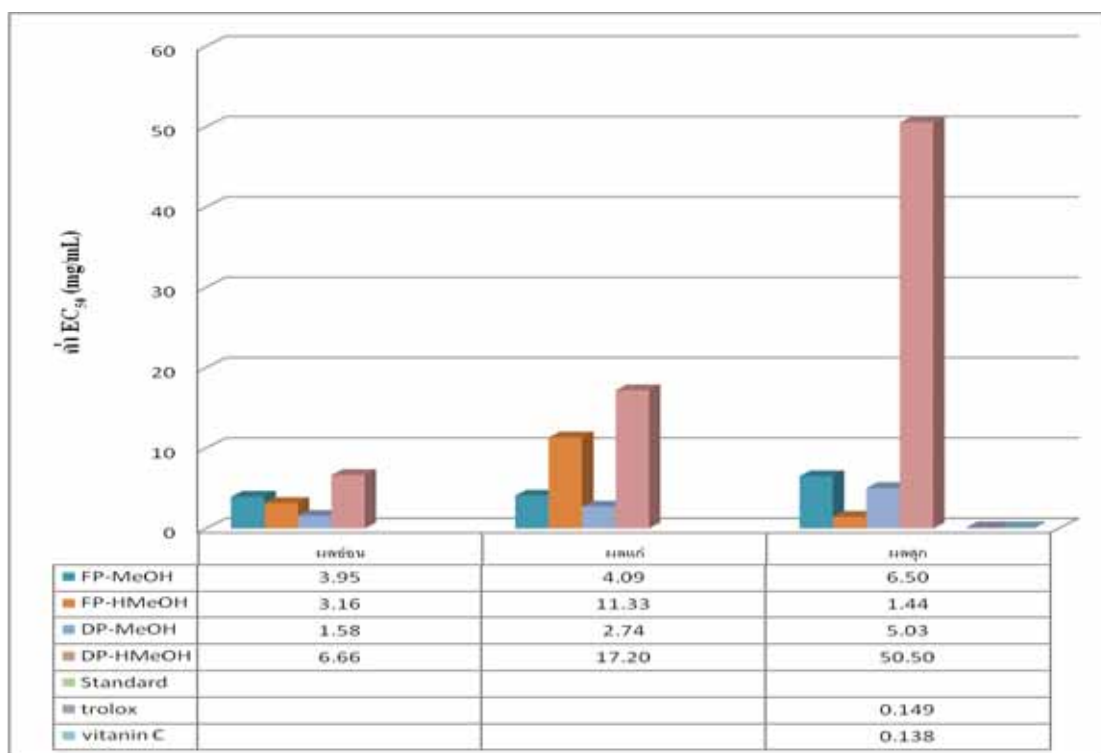
ตารางที่ 12 ค่า EC_{50} , Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และ Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสดและเมล็ดลูกหว้าอบแห้ง
[mean $\pm$ SD (n = 3)]

ตัวอย่างลูกหว้า	ค่า EC_{50} (mg/mL)	TEAC (mg trolox/ g extract)	VCEAC (mg vitamin C/ g extract)
FGS-MeOH	0.145 $\pm$ 0.016	819.8 $\pm$ 83.3	958.7 $\pm$ 97.4
FPS-MeOH	0.253 $\pm$ 0.021	468.6 $\pm$ 38.6	548.1 $\pm$ 45.1
FBS-MeOH	0.209 $\pm$ 0.012	566.8 $\pm$ 33.4	662.8 $\pm$ 39.1
FGS-HMeOH	0.176 $\pm$ 0.007	1046.6 $\pm$ 41.7	784.9 $\pm$ 31.2
FPS-HMeOH	0.225 $\pm$ 0.010	818.8 $\pm$ 35.2	614.1 $\pm$ 26.4
FBS-HMeOH	0.284 $\pm$ 0.003	649.5 $\pm$ 7.0	487.1 $\pm$ 5.3
DGS-MeOH	0.159 $\pm$ 0.005	886.1 $\pm$ 27.4	867.2 $\pm$ 26.8
DPS-MeOH	0.183 $\pm$ 0.009	772.8 $\pm$ 36.6	756.3 $\pm$ 35.8
DBS-MeOH	0.257 $\pm$ 0.023	550.6 $\pm$ 50.3	538.9 $\pm$ 49.2
DGS-HMeOH	0.136 $\pm$ 0.005	947.1 $\pm$ 35.2	1013.2 $\pm$ 37.6
DPS-HMeOH	0.166 $\pm$ 0.012	779.8 $\pm$ 56.9	834.2 $\pm$ 60.9
DBS-HMeOH	0.205 $\pm$ 0.007	630.9 $\pm$ 23.6	674.9 $\pm$ 25.3

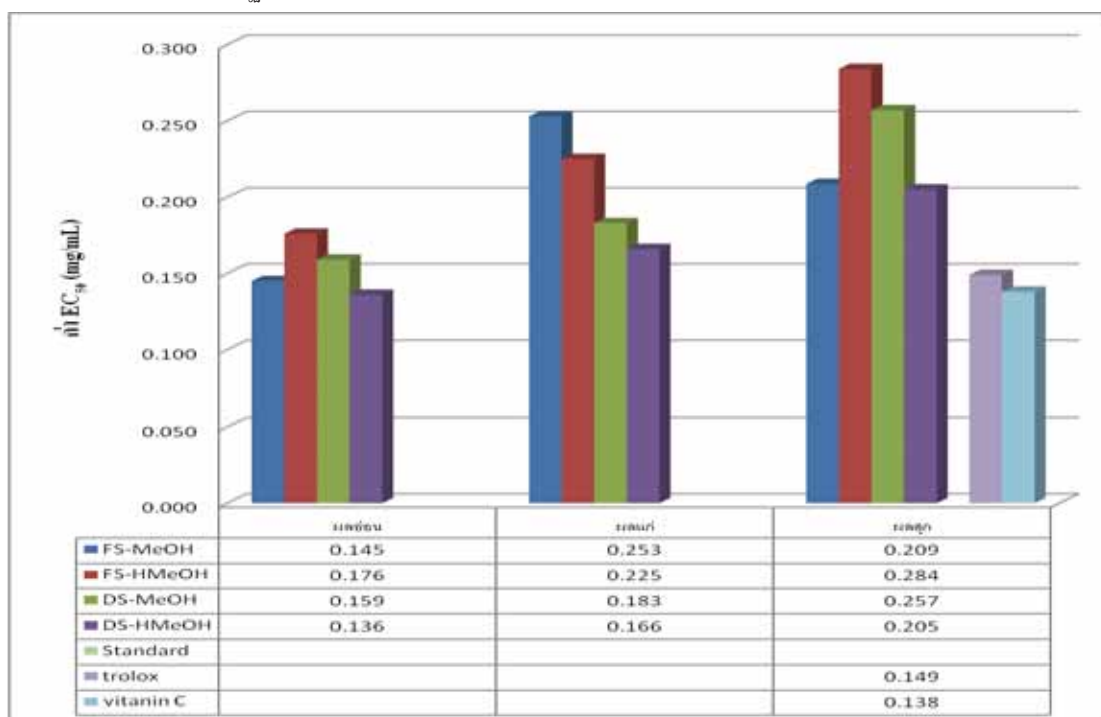


รูปที่ 43 กราฟแสดงค่า EC_{50} ของสารสกัดลูกหว้า ทั้ง 24 ตัวอย่างและสารมาตรฐาน Trolox, Vitamin C ด้วยวิธี ABTS

เมื่อเทียบสารสกัดที่ได้จากเมล็ดทั้งสดและอบแห้งของลูกหว้าทั้งสามระยะให้หา EC_{50} น้อยกว่าสารสกัดส่วนเนื้อกับเปลือก ถ้าพิจารณาสารสกัดลูกหว้าในระยะเดียวกันพบว่าสารสกัดส่วนเนื้อกับเปลือกลูกหว้าจะมีค่า EC_{50} มากกว่าสารสกัดในส่วนเมล็ด ถึงประมาณ 27 เท่า (รูปที่ 43)



รูปที่ 44 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า EC_{50} ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสด, ลูกหว้าอบแห้งและสารมาตรฐาน Trolox, Vitamin C ด้วยวิธี ABTS



รูปที่ 45 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า EC_{50} ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสด, ลูกหว้าอบแห้งและสารมาตรฐาน Trolox, Vitamin C ด้วยวิธี ABTS

เมื่อเทียบสารสกัดจากเมล็ดลูกหว้าสดและอบแห้ง(สกัดด้วยเมทานอลและ 0.1 % HCl ในเมทานอล) พบว่าค่า EC_{50} ในระยะผลอ่อน < ระยะผลแก่ < ระยะผลสุก สารสกัดจากเมล็ดลูกหว้าสดและอบแห้งในระยะเดียวกันจะให้ค่า EC_{50} ใกล้เคียงกัน สารสกัดจากเมล็ดในระยะผลอ่อนมีค่า EC_{50} ใกล้เคียงค่า EC_{50} ของ trolox แต่มากกว่าค่า EC_{50} ของ Vitamin C อยู่ประมาณ 1 เท่า (รูปที่ 45)

สารสกัดจากเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดที่สกัดด้วยเมทานอล และ สารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้ง(ที่สกัดด้วยเมทานอล และ 0.1% HCl ใน เมทานอล) พบว่าค่า EC_{50} ในระยะผลอ่อน < ระยะผลแก่ < ระยะผลสุก แต่สารสกัดส่วนเนื้อกับเปลือกลูกหว้าที่สกัดด้วย 0.1 % HCl ใน เมทานอลให้ผลการทดลองที่แตกต่างออกไปคือ ค่า EC_{50} ในระยะผลสุก < ระยะผลอ่อน < ระยะผลแก่ สารสกัดจากเนื้อกับเปลือก (สกัดด้วยเมทานอล)ในระยะผลอ่อน มีค่า EC_{50} ของ สารสกัดมากกว่า EC_{50} ของ trolox และ Vitamin C ประมาณ 26 และ 27 เท่า ตามลำดับ สารสกัดจากเนื้อกับเปลือก (สกัดด้วย 0.1 % HCl ใน เมทานอล) ในระยะผลสุก มีค่า EC_{50} ของสารสกัดมากกว่า trolox และ Vitamin C ประมาณ 10 เท่า(รูปที่ 44)

3.4. การศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

3.4.1. วิธีการทดลอง

เตรียมสารละลาย FRAP โดยผสมสารละลาย acetate buffer 250 mL กับ ferric chloride 25 mL และ สารละลาย TPTZ 25 mL (ผสมสารละลายตามลำดับและควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำ การทดลอง) นำสารละลายที่เตรียมได้ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที

ผสมสารละลาย FRAP ที่เตรียมได้ 950 μ L กับสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 50 μ L ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm โดยการวัดสารละลาย acetate buffer pH 3.6 เป็น blank และใช้สารละลาย FRAP 950 μ L กับเมทานอล 50 μ L เป็น control

สร้างกราฟของความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm กับ ปริมาณของสารละลายมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (mM) โดยรายงานผลการทดลองเป็นค่า FRAP value

3.4.2. ผลการทดลอง

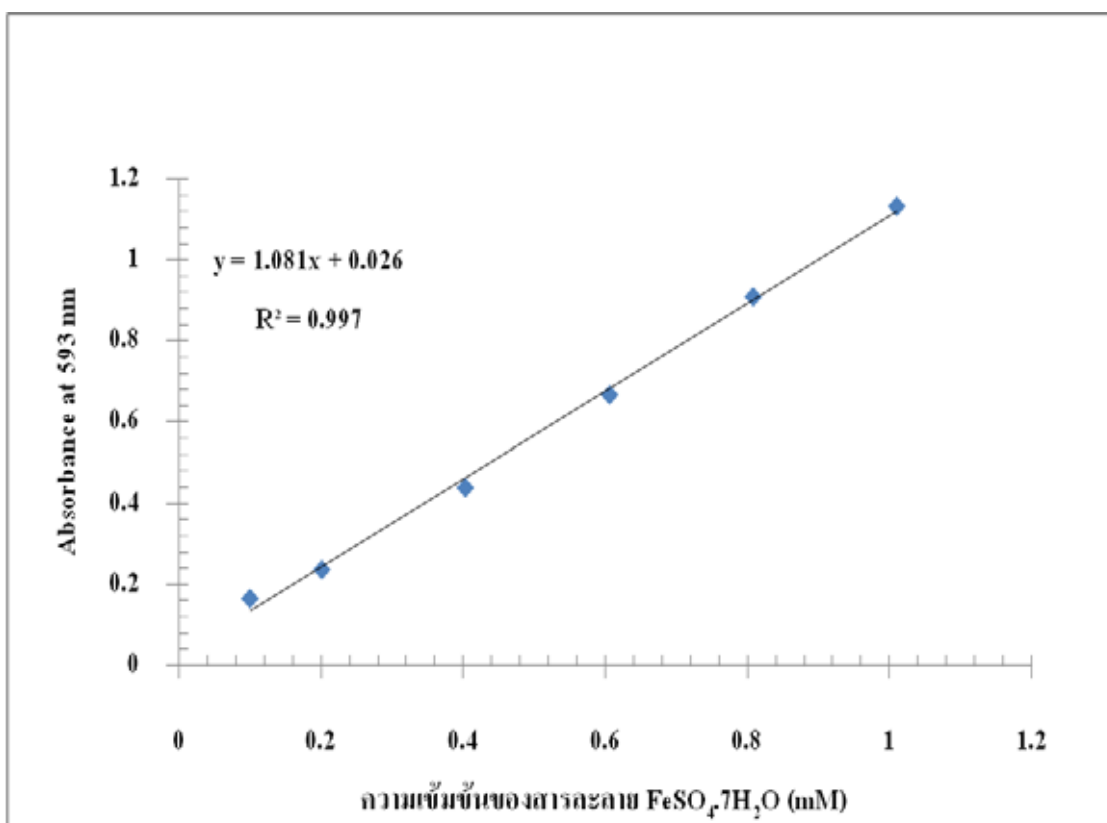
3.4.2.1. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการหาค่า FRAP values

ในการทดลองจะรายงานผลการทดลองที่ได้เป็นค่า FRAP values โดยการเตรียมสารมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับสารละลาย FRAP ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 13 กราฟมาตรฐานรูปที่ 46 และค่า FRAP ของตัวอย่างต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 14, 15 และรูปที่ 47, 48, 49

ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm [ข้อมูลที่แสดงคือ mean (n = 3)]

ความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mM)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm (Abs ที่วัดได้ – Abs control)
0.101	0.1657
0.202	0.2366
0.404	0.4389
0.607	0.6668
0.809	0.9090
1.011	1.1321

จากข้อมูลที่ได้สามารถนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mM) กับผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm



รูปที่ 46 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm

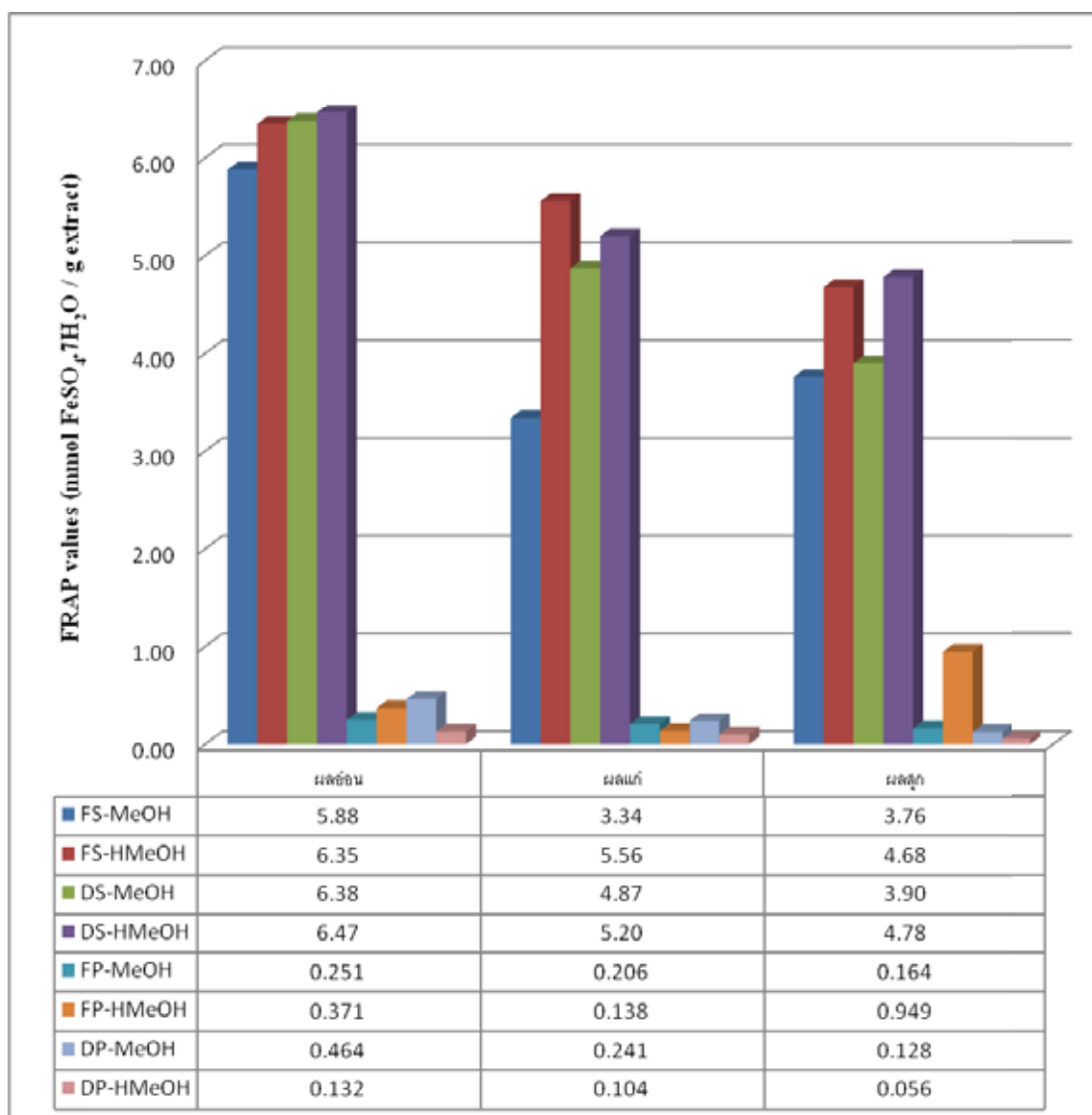
จากกราฟที่ได้สามารถหาค่า FRAP values ของสารตัวอย่างได้ดังนี้

ตารางที่ 14 ค่า FRAP values ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดและของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้ง [mean $\pm$ SD (n = 3)]

ตัวอย่างลูกหว้า	FRAP values (mmol Fe^{2+} /g extract)	ตัวอย่างลูกหว้า	FRAP values (mmol Fe^{2+} /g extract)
FGP-MeOH	0.232 $\pm$ 0.012	DGP-MeOH	0.393 $\pm$ 0.053
FPP-MeOH	0.199 $\pm$ 0.004	DPP-MeOH	0.242 $\pm$ 0.005
FBP-MeOH	0.152 $\pm$ 0.007	DBP-MeOH	0.127 $\pm$ 0.006
FGP-HMeOH	0.342 $\pm$ 0.007	DGP-HMeOH	0.128 $\pm$ 0.023
FPP-HMeOH	0.149 $\pm$ 0.005	DPP-HMeOH	0.101 $\pm$ 0.006
FBP-HMeOH	0.949 $\pm$ 0.015	DBP-HMeOH	0.054 $\pm$ 0.004

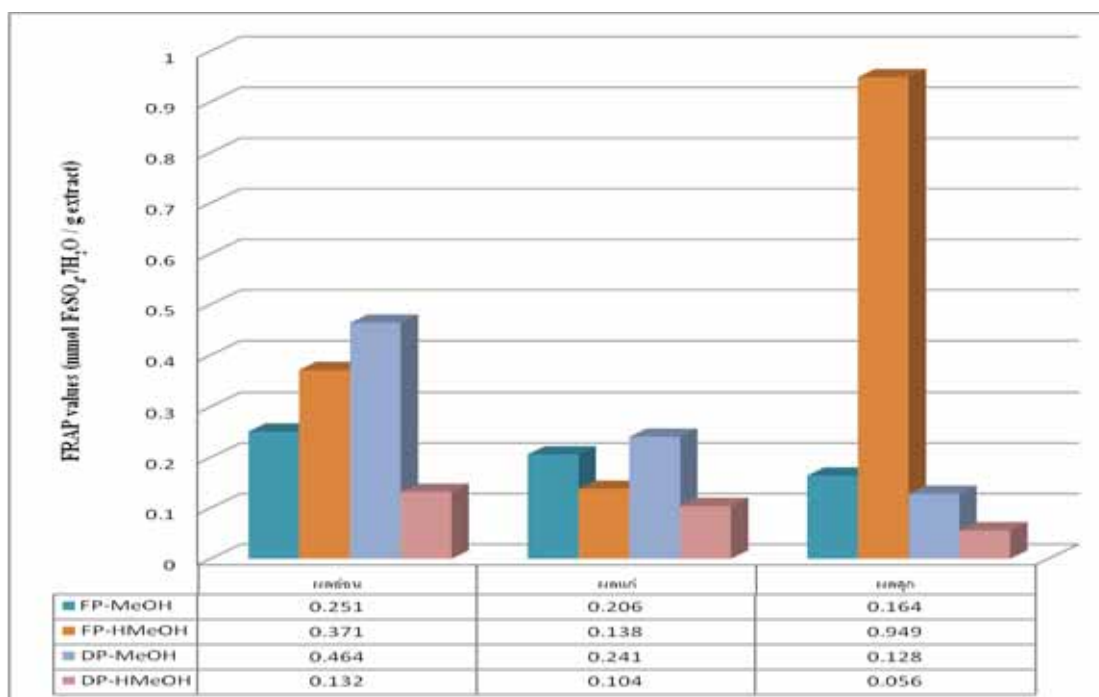
ตารางที่ 15 แสดงค่า FRAP values ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสด และ ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้า
อบแห้ง [mean $\pm$ SD (n = 3)]

ตัวอย่างลูกหว้า	FRAP values (mmol Fe ²⁺ /g extract)	ตัวอย่างลูกหว้า	FRAP values (mmol Fe ²⁺ /g extract)
FGS-MeOH	5.76 $\pm$ 0.43	DGS-MeOH	5.73 $\pm$ 0.05
FPS-MeOH	3.27 $\pm$ 0.18	DPS-MeOH	4.37 $\pm$ 0.17
FBS-MeOH	3.76 $\pm$ 0.09	DBS-MeOH	3.50 $\pm$ 0.33
FGS-HMeOH	6.16 $\pm$ 0.36	DGS-HMeOH	6.18 $\pm$ 0.48
FPS-HMeOH	5.40 $\pm$ 0.47	DPS-HMeOH	4.97 $\pm$ 0.22
FBS-HMeOH	4.55 $\pm$ 0.18	DBS-HMeOH	4.57 $\pm$ 0.20

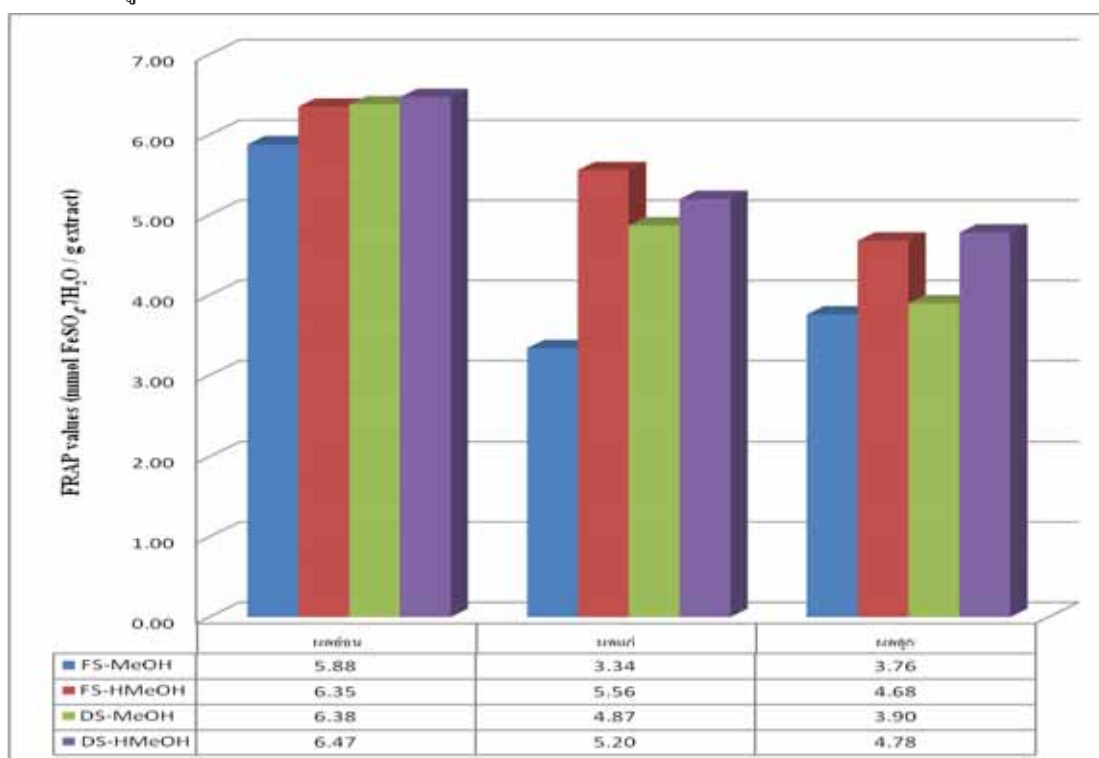


รูปที่ 47 กราฟแสดงค่า FRAP values ของสารสกัดลูกหว้า ทั้ง 24 ตัวอย่าง ด้วยวิธี FRAP

สารสกัดจากเมล็ดทั้งสดและอบแห้งของลูกหว้าทั้งสามระยะมีค่า FRAP values มากกว่าสารสกัดจากส่วนเนื้อกับเปลือก หรือมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวส์ที่ดีกว่าเนื้อกับเปลือกนั่นเอง สารสกัดจากเมล็ด (สกัดด้วยเมทานอล เหมือนกัน) ในระยะผลอ่อน มีค่า FRAP values มากกว่าสารสกัดจากเนื้อเปลือกประมาณ 23 เท่า (รูปที่ 47)



รูปที่ 48 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า FRAP values ($\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g extract}$) ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดและอบแห้งด้วยวิธี FRAP



รูปที่ 49 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า FRAP values ($\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g extract}$) ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสดและอบแห้งด้วยวิธี FRAP

สารสกัดจากเมล็ดของลูกหว้าสดและอบแห้ง(สกัดด้วยเมทานอล และ 0.1 % HCl ในเมทานอล) มีค่า FRAP values ในระยะผลอ่อน > ระยะผลแก่ > ระยะผลสุก สารสกัดจากเมล็ดลูกหว้าในระยะผลอ่อนมีค่า FRAP มากกว่า ระยะผลแก่และผลสุก ประมาณ 1.5 เท่า จากค่า FRAP values ของสารสกัดจากเมล็ดลูกหว้าในระยะผลอ่อนมีค่ามากแสดงว่าสารสกัดจากเมล็ดลูกหว้าในระยะผลอ่อนมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีกว่าสารสกัดจากเมล็ดลูกหว้าในระยะผลแก่และผลสุก (รูปที่ 49)

สารสกัดจากเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสด(สกัดด้วยเมทานอล) และสารสกัดจากเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้ง(สกัดด้วย เมทานอล และ 0.1% HCl ใน เมทานอล) มีค่า FRAP values ในระยะผลอ่อน > ระยะผลแก่ > ระยะผลสุก แต่สารสกัดจากเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสด (สกัดด้วย 0.1 % HCl ในเมทานอล) ให้ผลการทดลองที่แตกต่างดังนี้คือ ค่า FRAP values ในระยะผลสุก > ระยะผลอ่อน > ระยะผลแก่ (รูปที่ 48)

3.5. การศึกษาการหาปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยใช้ Folin-Ciocalteu method

3.5.1. วิธีการทดลอง

ผสมสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง 0.5 mL กับสารละลาย Folin Ciocalteu reagent 2.5 mL ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาเติมสารละลาย 7.5 % (w/v) sodium carbonate 2.0 mL ผสมให้เข้ากันนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm

Blank : ใช้ เมทานอล 0.5 mL แทนสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm กับปริมาณของสารมาตรฐาน gallic acid (mg/mL) โดยรายงานผลการทดลองเป็นค่า gallic acid equivalent เทียบกับปริมาณตัวอย่าง (mg gallic acid / g extract)

3.5.2. ผลการทดลอง

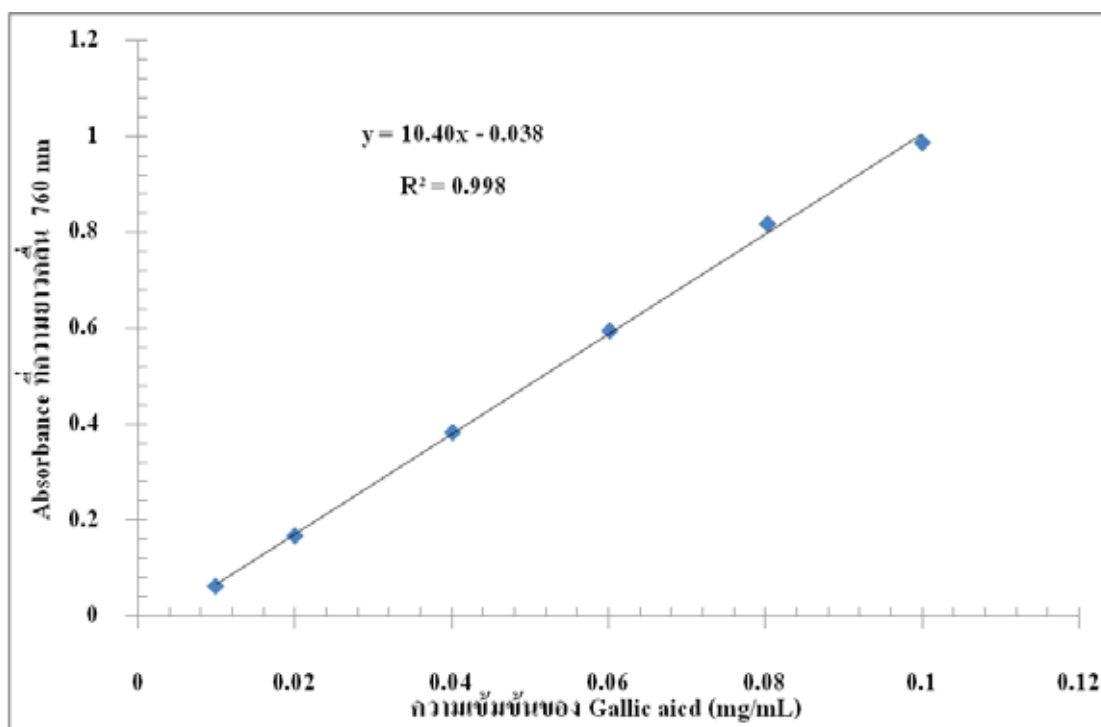
3.5.2.1. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการหาค่า Gallic acid equivalent (GAE)

ในการทดลองจะรายงานผลการทดลองที่ได้เป็นค่า Gallic acid equivalent โดยการเตรียมสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับสารละลาย Folin Ciocalteu reagent ทิ้งไว้ 10 นาที และ สารละลาย 7.5% (w/v) Na_2CO_3 อุณหภูมิ 50 °C) 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 16 กราฟมาตรฐานรูปที่ 50 และค่า GEA ของตัวอย่างต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 17, 18 และกราฟรูปที่ 51, 52, 53

ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Gallic acid (mg/mL) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm [ข้อมูลที่แสดงคือ mean (n = 3)]

ความเข้มข้นของ Gallic acid (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm
0.0100	0.0621
0.0201	0.1669
0.0402	0.3823
0.0602	0.5938
0.0803	0.8160
0.1000	0.9850

จากข้อมูลที่ได้สามารถนำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Gallic acid (mg/mL) กับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm



รูปที่ 50 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm

จากกราฟที่ได้สามารถหาค่า Gallic acid equivalent (GAE) ของสารตัวอย่างได้ดังตารางที่ 17

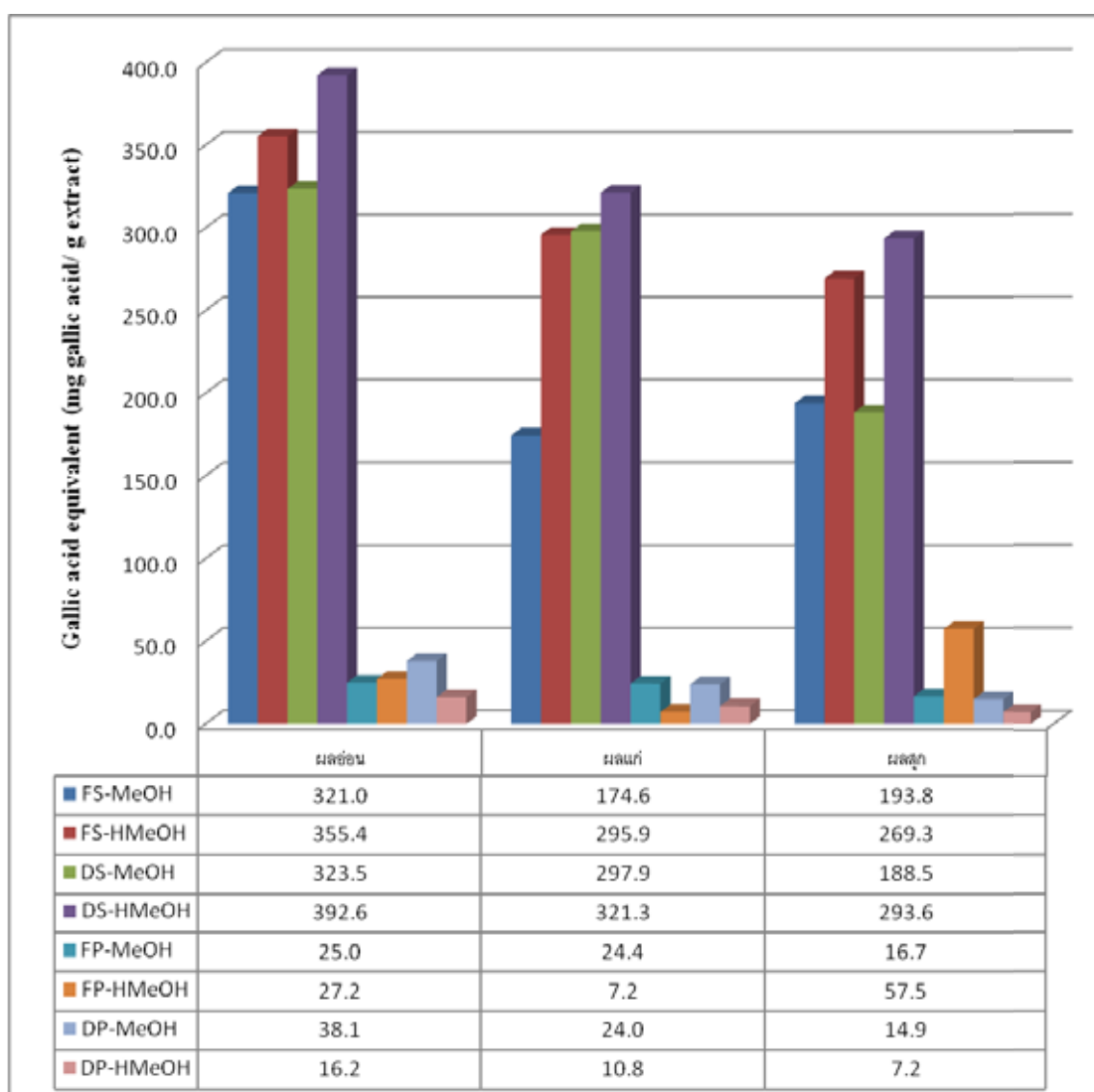
ตารางที่ 17 ค่า Gallic acid equivalent (GAE) ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดและของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้ง [mean $\pm$ SD (n = 3)]

ตัวอย่างลูกหว้า	Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g extract)	ตัวอย่างลูกหว้า	Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g extract)
FGP-MeOH	25.0 $\pm$ 2.2	DGP-MeOH	38.1 $\pm$ 0.7
FPP-MeOH	24.4 $\pm$ 3.8	DPP-MeOH	24.0 $\pm$ 0.5
FBP-MeOH	16.7 $\pm$ 1.7	DBP-MeOH	14.9 $\pm$ 0.5
FGP-HMeOH	27.2 $\pm$ 2.4	DGP-HMeOH	16.2 $\pm$ 0.4
FPP-HMeOH	7.2 $\pm$ 0.4	DPP-HMeOH	10.8 $\pm$ 0.3
FBP-HMeOH	57.5 $\pm$ 1.0	DBP-HMeOH	7.2 $\pm$ 0.6

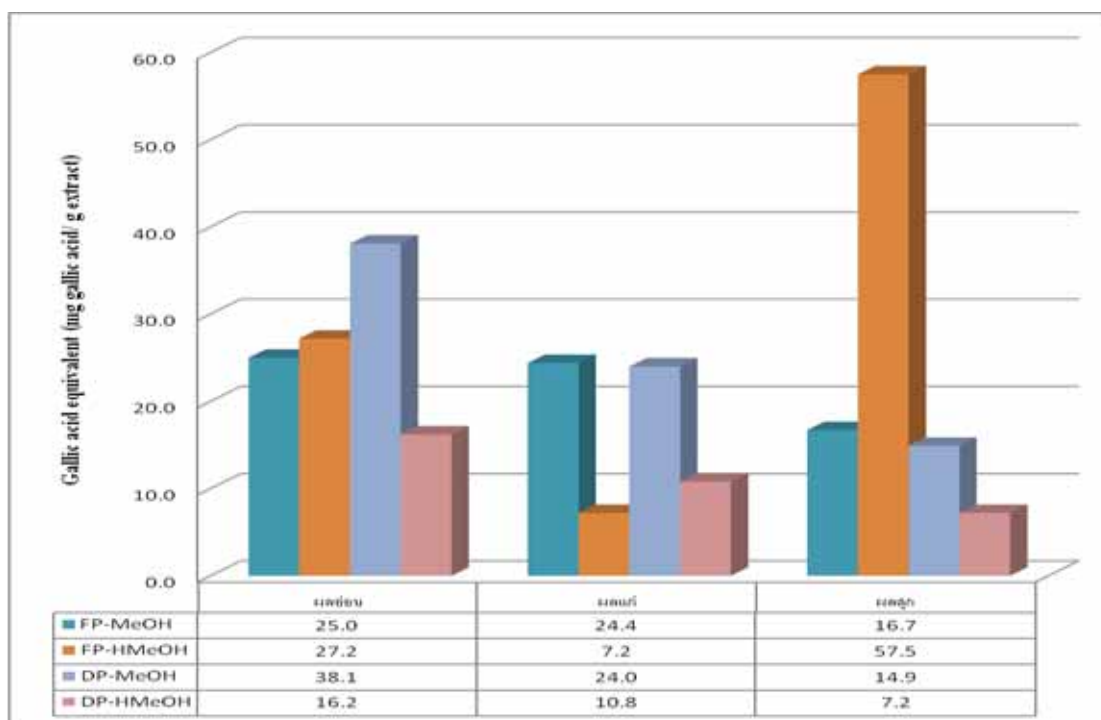
ตารางที่ 18 ค่า Gallic acid equivalent (GAE) ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสด และ ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าอบแห้ง [ข้อมูลที่แสดงคือ mean $\pm$ sd (n = 3)]

ตัวอย่างลูกหว้า	Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g extract)	ตัวอย่างลูกหว้า	Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g extract)
FGS-MeOH	321.0 $\pm$ 9.8	DGS-MeOH	323.5 $\pm$ 13.3
FPS-MeOH	174.6 $\pm$ 31.9	DPS-MeOH	297.9 $\pm$ 22.2
FBS-MeOH	193.8 $\pm$ 20.9	DBS-MeOH	188.5 $\pm$ 13.3
FGS-HMeOH	355.4 $\pm$ 14.4	DGS-HMeOH	392.6 $\pm$ 18.4
FPS-HMeOH	295.9 $\pm$ 27.5	DPS-HMeOH	321.3 $\pm$ 12.9
FBS-HMeOH	269.3 $\pm$ 18.1	DBS-HMeOH	293.6 $\pm$ 21.8

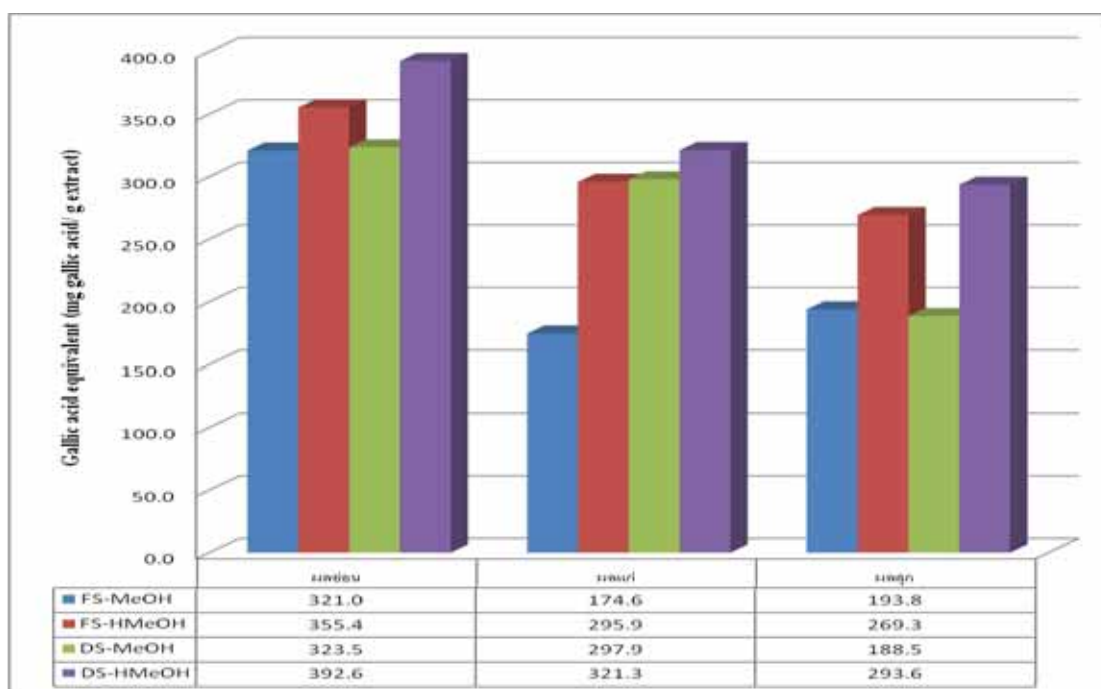
สารสกัดจากเมล็ดลูกหว้าทั้งสดและอบแห้ง (สกัดด้วยเมทานอล และ 0.1% HCl ใน เมทานอล) ของลูกหว้าทั้งสามระยะให้ค่า Gallic acid equivalent (GAE) มากกว่าสารสกัดจากเนื้อกับเปลือก สารสกัดจากเมล็ดลูกหว้าสด (สกัดด้วยเมทานอล) มีค่า GAE มากกว่าสารสกัดจากเนื้อกับเปลือกประมาณ 13 เท่า จากค่า GAE แสดงว่าสารสกัดจากเมล็ดลูกหว้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลมากกว่าสารสกัดจากเนื้อกับเปลือกลูกหว้า (รูปที่ 51) สารสกัดจากเมล็ดลูกหว้าสดและอบแห้ง (สกัดด้วยเมทานอล และ 0.1% HCl ใน เมทานอล) มีค่า GAE ในระยะผลอ่อน > ระยะผลแก่ > ระยะผลสุก สารสกัดจากเมล็ดลูกหว้าในระยะผลอ่อนมีค่า GAE มากกว่า ระยะผลแก่และผลสุกประมาณ 1.5 เท่า จากค่า GAE ดังกล่าวแสดงว่าสารสกัดจากเมล็ดลูกหว้าในระยะผลอ่อนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลอยู่มากกว่าระยะผลแก่และระยะผลสุก (รูปที่ 53) สารสกัดจากเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสด (สกัดด้วยเมทานอล) และสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้ง (สกัดด้วย เมทานอล และ 0.1% HCl ใน เมทานอล) มีค่า GAE ในระยะผลอ่อน > ระยะผลแก่ > ระยะผลสุก แต่สารสกัดจากเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสด (สกัดด้วย 0.1 % HCl ใน เมทานอล) ให้ผลการทดลองที่แตกต่างดังนี้คือ ค่า GAE ในระยะผลสุก > ระยะผลอ่อน > ระยะผลแก่ (รูปที่ 52)



รูปที่ 51 กราฟแสดงค่า gallic acid equivalent (GAE) ของสารสกัดลูกหว้า ทั้ง 24 ตัวอย่าง



รูปที่ 52 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g extract) ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสดและเนื้อกับเปลือกลูกหว้าอบแห้ง



รูปที่ 53 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g extract) ของสารสกัดเมล็ดลูกหว้าสดและสารสกัดเมล็ดลูกหว้าอบแห้ง

3.6. การศึกษาการหาปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินโดยวิธี pH differential

3.6.1. วิธีการทดลอง

ชั่งสารสกัดตัวอย่างมา 1 g ละลายใน deionized water 10.00 mL นำสารละลายที่ได้ไปเหวี่ยงที่ 10000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที **นำสารละลายส่วนบนที่ได้ (supernatant) มา 1.00 mL ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 5 mL ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย KCl-HCl pH 1 ได้เป็นสารละลาย A ทำเช่นเดียวกันกับสารละลายส่วนบนอีก 1.00 mL แต่ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย acetate buffer pH 4.5 ได้เป็นสารละลาย B นำสารละลาย A และ สารละลาย B ที่เตรียมได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายทั้งสองไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm และ 700 nm โดยใช้ deionized water เป็น blank

หมายเหตุ : การเตรียมสารละลายตัวอย่าง FBP-MeOH ทำการเจือจาง 20 เท่าแล้วนำมาทำการทดลองเหมือน** การเตรียมสารละลายตัวอย่าง FBP-HMeOH ทำการเจือจาง 50 เท่าแล้วนำมาทำการทดลองเหมือน**

3.6.2. ผลการทดลอง

สารสกัดเนื้อกับเปลือกถูกหว่าตัวอย่างที่ละลายด้วย deionized water ใส่ลงในสารละลาย buffer pH 1.0 และ pH 4.5 แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 nm ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 19 และ รูปที่ 54

ตารางที่ 19 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 nm ของสารละลาย pH 1.0 กับ pH 4.5

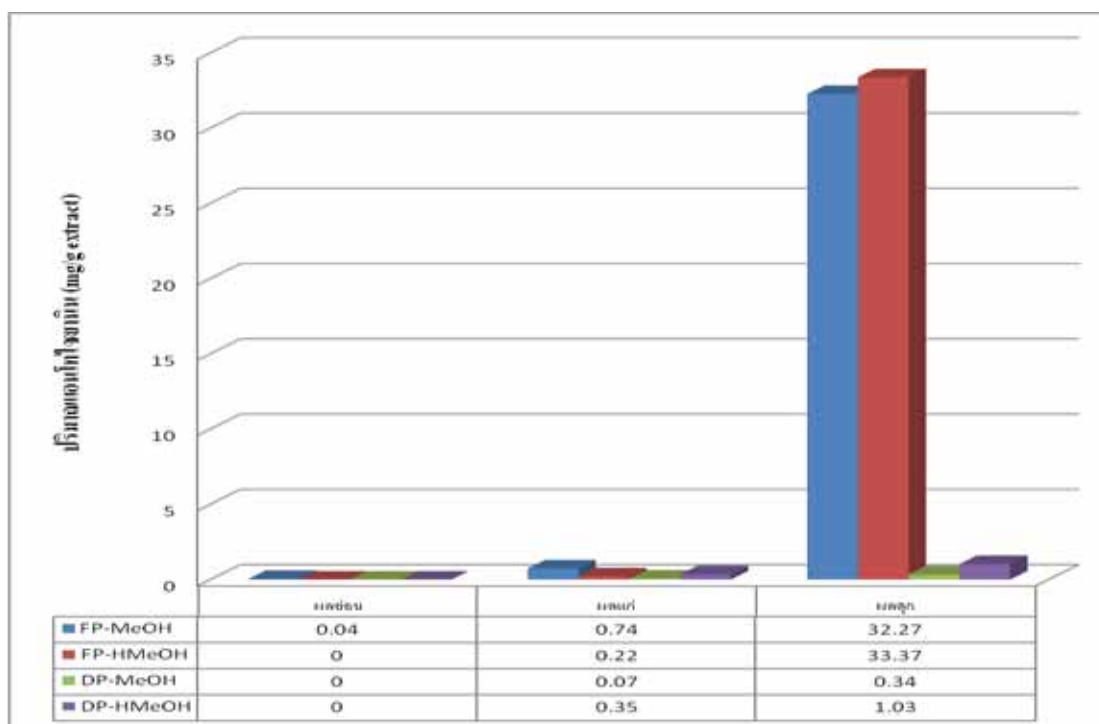
สารสกัด ตัวอย่าง	pH 1.0		Buffer pH 4.5	
	A ₅₂₀	A ₇₀₀	A ₅₂₀	A ₇₀₀
FGP-MeOH	0.7786	0.0551	0.0715	0.0615
FPP-MeOH	0.2127	0.0051	0.0992	0.0541
FBP-MeOH	0.4068	0.0322	0.0159	0.0077
FGP-HMeOH	0.1008	0.0884	0.2377	0.0186
FPP-HMeOH	0.1534	0.0913	0.1038	0.0909
FBP-HMeOH	0.2652	0.0907	0.0637	0.0553
DGP-MeOH	0.0452	0.0212	0.0314	0.0052
DPP-MeOH	0.1301	0.0506	0.0788	0.0161
DBP-MeOH	0.2789	0.0864	0.1593	0.0426
DGP-HMeOH	0.0162	0.0076	0.0309	0.0196
DPP-HMeOH	0.1221	0.0191	0.0171	0.0064
DBP-HMeOH	0.3915	0.0657	0.0888	0.0359

จากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เราสามารถนำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน (mg/L) และปริมาณแอนโทไซยานิน (mg/g extract) ในเทอมของ pelargonidin-3-glucoside (PGD-3-glu) และ malvidin-3,5-diglucoside(Mvd-3,5-diglu) ดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ค่าความเข้มข้นของแอนโทไซยานินในเทอมของ pelargonidin-3-glucoside (PGD-3-glu)(mg/L) และปริมาณแอนโทไซยานิน (mg/g extract) [ในเทอมของ PGD-3-glu และ malvidin-3,5-diglucoside(Mvd-3,5-diglu)] [mean $\pm$ SD(n = 3)]

สารสกัดตัวอย่าง	ความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน (mg/L)	ปริมาณแอนโทไซยานิน (PGD-3-glu mg/g extract)	ปริมาณแอนโทไซยานิน (Mvd-3,5-diglu mg /g extract)
FGP-MeOH	0.76 $\pm$ 0.47	0.04 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02
FPP-MeOH	16.07 $\pm$ 0.31	0.74 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.003
FBP-MeOH	35.41 $\pm$ 0.18	32.27 $\pm$ 0.16	29.01 $\pm$ 0.14
FGP-HMeOH	-	-	-
FPP-HMeOH	4.71 $\pm$ 0.09	0.22 $\pm$ 0.004	0.20 $\pm$ 0.004
FBP-HMeOH	16.11 $\pm$ 0.08	33.37 $\pm$ 0.16	30.00 $\pm$ 0.14
DGP-MeOH	-	-	-
DPP-MeOH	1.44 $\pm$ 0.25	0.07 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01
DBP-MeOH	7.13 $\pm$ 0.76	0.34 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.03
DGP-HMeOH	-	-	-
DPP-HMeOH	10.15 $\pm$ 2.16	0.35 $\pm$ 0.08	0.32 $\pm$ 0.07
DBP-HMeOH	26.28 $\pm$ 0.39	1.03 $\pm$ 0.02	0.92 $\pm$ 0.01

สารสกัดเนื้อกับเปลือกหัวสาค และอบแห้ง(สกัดด้วยเมทานอล และ 0.1% HCl ใน เมทานอล) มีปริมาณของแอนโทไซยานินในระยะผลสุก >ระยะผลแก่ >ระยะผลอ่อน ปริมาณของแอนโทไซยานิน ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหัวสาค > สารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหัวอบแห้งเมื่อพิจารณาในระยะเดียวกัน (รูปที่ 54)



รูปที่ 54 ปริมาณแอนโทไซยานิน (mg ในเทอมของ PGD-3-glu /g extract) ของสารสกัดเนื้อมะเขือเทศแปรรูปด้วยกรดและอบแห้งด้วยเมทานอล และ 0.1% HCl ใน เมทานอล

3.7. การแยกสารในกลุ่มแอนโทไซยานินจากสารสกัดเนื้อมะเขือเทศแปรรูปด้วยกรดในระยผลสุก โดยใช้ Column Chromatography

3.7.1. Amberlite XAD-7 Column Chromatography

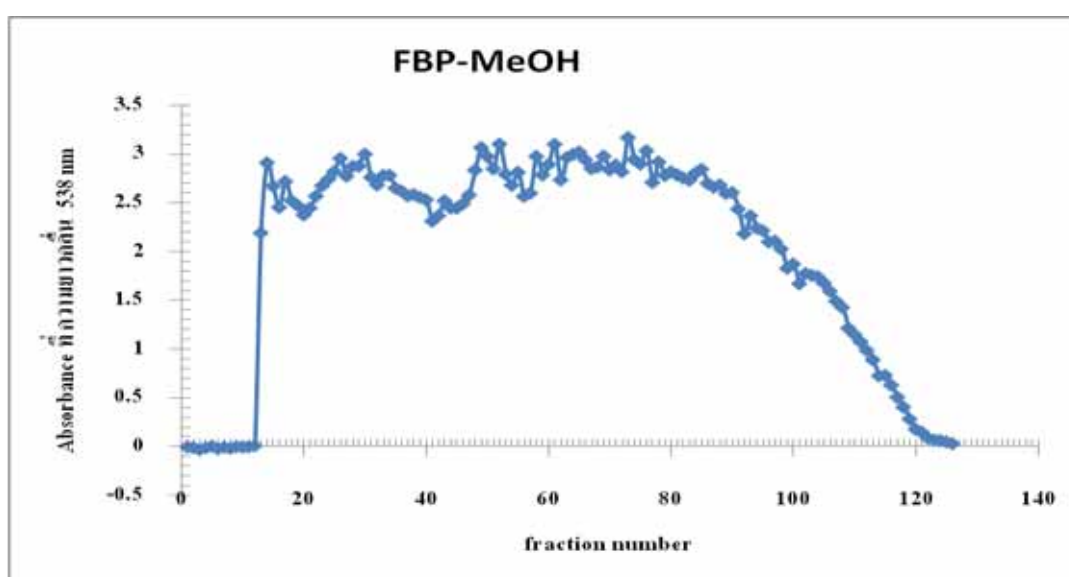
3.7.1.1. วิธีการทดลอง

นำสารสกัดสารสกัดเนื้อมะเขือเทศแปรรูปด้วยกรดระยผลสุก (ที่สกัดด้วย เมทานอล หรือ 0.1% HCl ใน เมทานอล) มาผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7

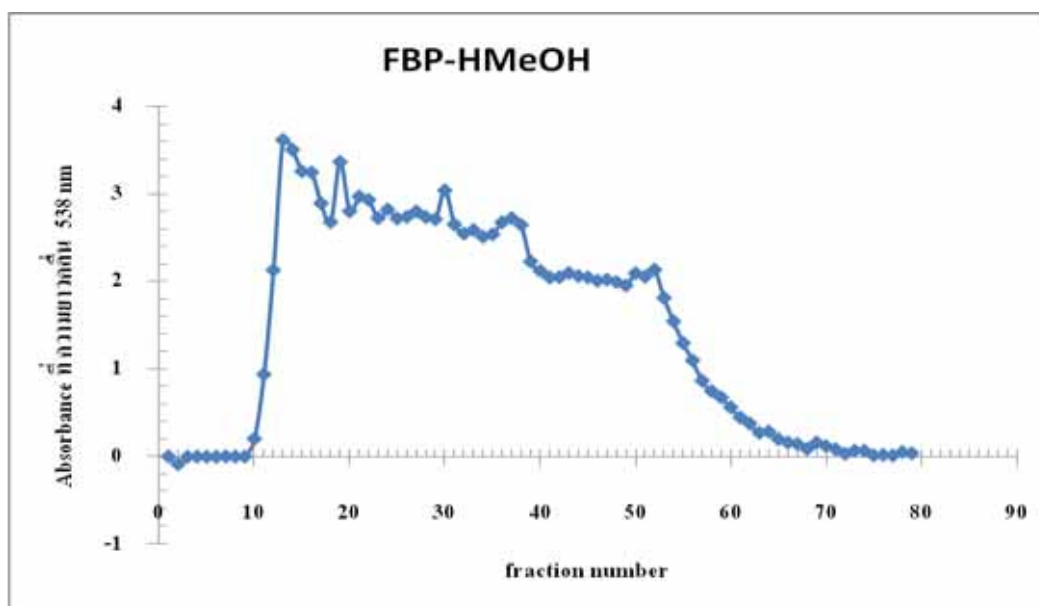
ซึ่ง Amberlite XAD-7 100.0 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 mL เติมน้ำ deionized water 300 mL ค่อย ๆ เทส่วนที่ผสมได้ลงในคอลัมน์อย่างต่อเนื่อง เปิดคอลัมน์ให้ของเหลวไหลออกมา พร้อมทั้งนำสายยางเคาะเพื่อให้ Amberlite XAD-7 เรียงตัวอย่างเป็นระเบียบในคอลัมน์(คอลัมน์ที่ใช้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.00 cm เมื่อเตรียมคอลัมน์เสร็จแล้วมีความสูง 30 cm) ซึ่งสารสกัดเนื้อมะเขือเทศแปรรูปด้วยกรด (เนื้อมะเขือเทศแปรรูปด้วยกรด (FBP-MeOH)) 10 g ละลายด้วย 0.1 % HCl ในเมทานอล ค่อย ๆ เติมสารละลายลงบนผิวหน้าของคอลัมน์ ทำการชะคอลัมน์ด้วย 0.1% HCl ในเมทานอล และทำการเก็บสารละลายจากคอลัมน์ fraction ละ 5 mL จากนั้นนำ fraction ที่เก็บได้ไปวัดค่าการดูดกลืน

แสง(Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 538 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟกับ fraction number จากนั้นทำการรวม fraction ที่ได้ตั้งแต่ fraction ที่ 13 ถึง 120 แล้วนำไปประเหยตัวทำละลาย ออกภายใต้ความดันต่ำ ที่อุณหภูมิ 40 °C ซึ่งน้ำหนักของสารสกัดที่ผ่านคอลัมน์มาได้ นำสารสาร สกัดเนื้อมกับเปลือกลูกหว้าสุกที่สกัดด้วย 10 % HCl ใน เมทานอล (FBP-HMeOH) ลงคอลัมน์ทำนอง เดียวกับของตัวอย่างที่สกัดด้วย เมทานอล

3.7.1.2. ผลการทดลอง



รูปที่ 55 โครมาโตแกรมของการแยกสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน ของสารสกัดจากเนื้อมกับเปลือกลูกหว้าสุกที่สกัดด้วย เมทานอล ด้วยคอลัมน์ Amberlite XAD-7 โดยบันทึกความสัมพันธ์ระหว่าง fraction number กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 nm



รูปที่ 56 โครมาโตแกรมของการแยกสารในกลุ่มแอนโทไซยานินของสารสกัดจากเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่สกัดด้วย 0.1% HCl ใน เมทานอล ด้วยคอลัมน์ Amberlite XAD-7 โดยบันทึกความสัมพันธ์ระหว่าง fraction number กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 nm

ตารางที่ 21 น้ำหนักสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกก่อนและหลังผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7

ตัวอย่าง	น้ำหนักสารสกัดก่อนลงคอลัมน์ (g)	น้ำหนักสารสกัดหลังผ่านคอลัมน์ (g)
1. เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก (FBP-MeOH)	10.3902	9.5689
2. เนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก (FBP-HMeOH)	10.2383	9.9032

3.7.2 Sephadex LH-20 Column Chromatography

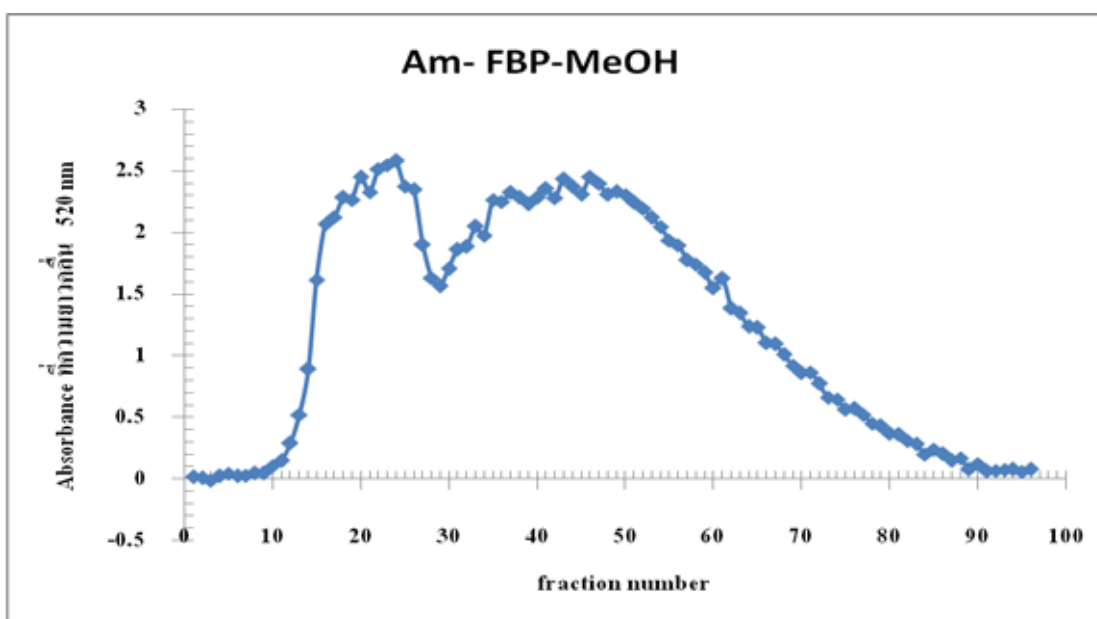
3.7.2.1. วิธีทดลอง

นำสารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 (ทั้ง Am-FBP-MeOH และ Am-FBP-HMeOH) มาทำการแยกตามขนาดด้วยคอลัมน์ Sephadex LH-20 โดยใช้อัตราส่วนของน้ำหนักสารสกัดต่อน้ำหนักคอลัมน์เป็น 1:10

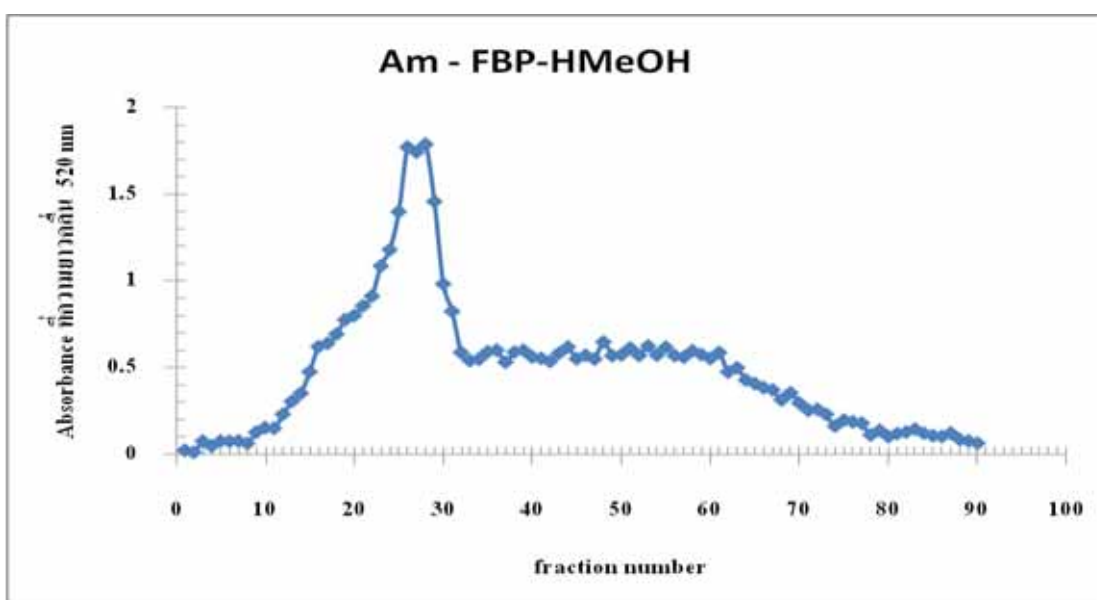
ซึ่ง Sephadex LH-20 15.0 g ใส่ลงในขนาด 250 mL เติม 1% formic acid 100 mL เขย่าเป็นครั้งคราวจนครบเวลา 3 ชั่วโมง (ห้ามใช้เครื่องกวน เพราะจะทำให้เจลแตก) นำเจลที่ได้ค่อยๆ เทลงในคอลัมน์อย่างต่อเนื่อง พร้อมทั้งนำสายยางเคาะเพื่อให้เจลในคอลัมน์เรียงตัวกันเป็นระเบียบ (คอลัมน์ที่ใช้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.00 cm เมื่อเตรียมคอลัมน์เสร็จแล้วมีความสูง 30 cm) ซึ่งสารสกัดที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 (เนื่อกับเปลือกลูกหว้าสุก (Am-FBP-MeOH)) 1.5 g ละลายด้วย 1% formic acid ให้สารสกัดละลายหมด ค่อย ๆ เติมสารละลายลงบนผิวหน้าของคอลัมน์ ทำการชะคอลัมน์ด้วย 1% formic acid และทำการเก็บสารละลายจากคอลัมน์ fraction ละ 2 mL จากนั้นนำ fraction ที่เก็บได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟกับ fraction number จากนั้นทำการรวม fraction ที่ได้ นำ fraction ที่รวมได้จาก fraction ที่ 10 ถึง 28 และ fraction ที่ 29 ถึง 90 แล้วไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 40 °C ซึ่งน้ำหนักของสารสกัดที่ผ่านคอลัมน์มาได้

นำสารสารสกัดเนื่อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 (Am-FBP-HMeOH) ซึ่งได้จากเนื่อกับเปลือกลูกหว้าสุกที่ผ่านการสกัดด้วย 0.1% HCl ในเมทานอล ลงคอลัมน์แทน

3.7.2.2. ผลการทดลอง



รูปที่ 57 โครมาโตแกรมของการแยกขนาดของสารในกลุ่มแอนโทไซยานินของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก(ที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 เป็นสารที่สกัดจาก เมทานอล) ด้วยคอลัมน์ Sephadex LH-20 โดยบันทึกความสัมพันธ์ระหว่าง fraction number กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm



รูปที่ 58 โครมาโตแกรมของการแยกขนาดของสารในกลุ่มแอนโทไซยานินของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก (ที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 เป็นสารที่สกัดจาก 0.1% HCl ใน เมทานอล) ด้วยคอลัมน์ Sephadex LH-20 โดยบันทึกความสัมพันธ์ระหว่าง fraction number กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

ตารางที่ 22 นำนักสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุกก่อนและหลังผ่านคอลัมน์ Sephadex LH-20

คอลัมน์ Sephadex LH-20	เนื้อกับเปลือกลูกหว้า สุก (Am-FBP-MeOH)	คอลัมน์ Sephadex LH-20	เนื้อกับเปลือกลูกหว้า สุก (Am-FBP-HMeOH)
นำสารสกัดก่อนลงคอลัมน์ (g)	1.5083	นำสารสกัดก่อนลงคอลัมน์ (g)	1.4892
นำนักสารสกัดหลังผ่าน คอลัมน์ (g) - Fraction ที่ 10 -28 - Fraction ที่ 29 - 90	1.2583 0.0624	นำนักสารสกัดหลังผ่าน คอลัมน์ (g) - Fraction ที่ 12 -31 - Fraction ที่ 32 - 89	0.9426 0.0219

การนำสารสกัดหยาบของเนื้อกับเปลือกลูกสดในระยะผลสุกมาทำการผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 เพื่อกำจัดโมเลกุลชนิดอื่น ๆ ออกจากสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน หลังจากนั้นนำสารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 มาผ่านคอลัมน์ Sephadex LH-20 เพื่อทำการแยกตามขนาดโมเลกุล พบว่า สารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 เป็นฟิคเดียว เมื่อนำมาผ่านคอลัมน์ Sephadex LH-20 แล้วพบว่า สารที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex LH-20 แยกได้ 2 ฟิค นำสารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 กับ สารที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex LH-20 ในฟิคแรก มาทำการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP หาปริมาณสารประกอบฟีนอล และหาปริมาณแอนโทไซยานิน ส่วนสารที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex LH-20 ในฟิคที่สองนั้น นำมาหาปริมาณแอนโทไซยานินเพียงอย่างเดียว

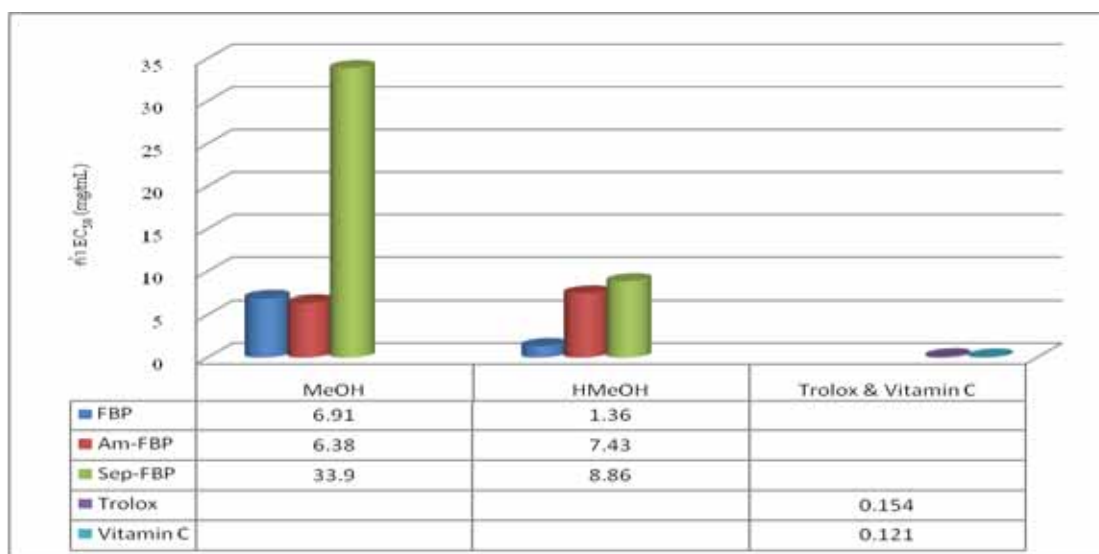
3.7.3. การนำสารที่ผ่านคอลัมน์ทั้งสองชนิดมาทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

3.7.3.1. วิธี DPPH

การนำสารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และคอลัมน์ Sephadex LH-20 มาทำการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ค่า EC_{50} จากวิธี DPPH ของสารสกัดเนื้อมะเขือเทศที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20 [mean $\pm$ SD (n = 3)]

ตัวอย่างลูกหว่า	ค่า EC_{50} (mg/mL)	TEAC (mg trolox/ g extract)	VCEAC (mg vitamin C/ g extract)
Trolox	0.154 ± 0.012	-	-
Vitamin C	0.121 ± 0.001	-	-
FBP-MeOH	6.91 ± 0.59	23.4 ± 1.9	17.6 ± 1.4
Am-FBP-MeOH	6.38 ± 0.15	24.6 ± 0.6	18.9 ± 0.4
Sep-FBP-MeOH	33.91 ± 1.02	4.6 ± 0.1	3.6 ± 0.1
FBP-HMeOH	1.36 ± 0.07	116.5 ± 6.1	89.0 ± 4.7
Am-FBP-HMeOH	7.43 ± 0.37	20.7 ± 1.0	16.3 ± 0.8
Sep-FBP-HMeOH	8.86 ± 0.77	17.8 ± 1.6	13.7 ± 1.3



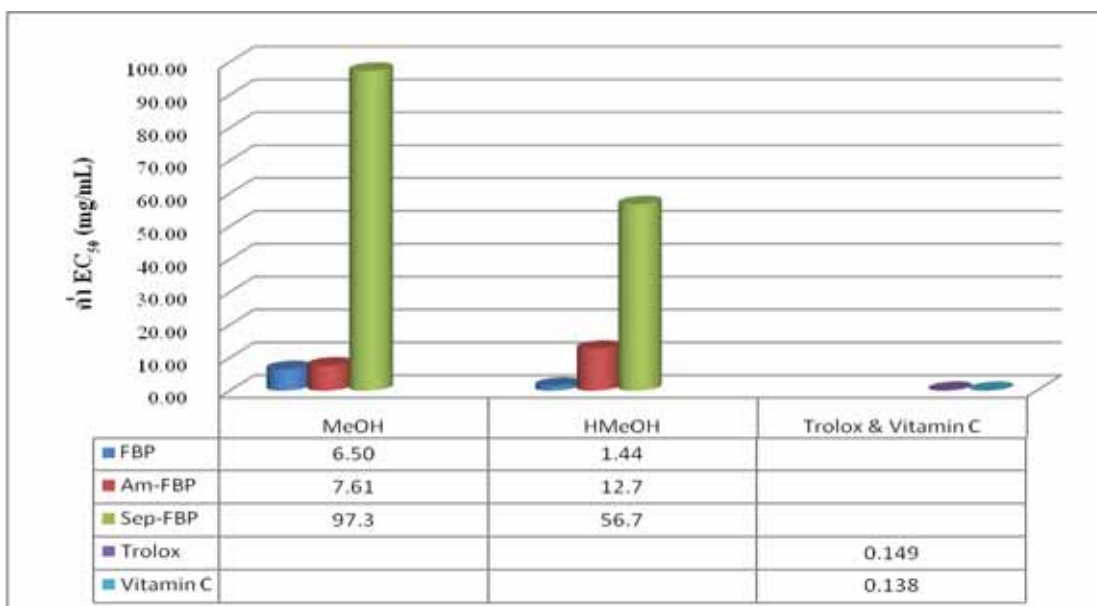
รูปที่ 59 ค่า EC_{50} จากวิธี DPPH ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก ที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20

3.7.3.2. วิธี ABTS

การนำสารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และคอลัมน์ Sephadex LH-20 มาทำการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 24

ตารางที่ 24 ค่า EC_{50} จากวิธี ABTS ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก ที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20 [mean $\pm$ SD (n = 3)]

ตัวอย่างลูกหว้า	ค่า EC_{50} (mg/mL)	TEAC (mg trolox/ g extract)	VCEAC (mg vitamin C/ g extract)
Trolox	0.149 $\pm$ 0.002	-	-
Vitamin C	0.138 $\pm$ 0.020	-	-
FBP-MeOH	6.51 $\pm$ 0.32	37.6 $\pm$ 1.9	21.2 $\pm$ 1.1
Am-FBP-MeOH	7.61 $\pm$ 0.10	28.7 $\pm$ 0.4	18.1 $\pm$ 0.2
Sep-FBP-MeOH	97.33 $\pm$ 12.14	2.3 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.2
FBP-HMeOH	1.44 $\pm$ 0.21	130.3 $\pm$ 17.5	97.2 $\pm$ 13.0
Am-FBP-HMeOH	12.70 $\pm$ 1.07	17.4 $\pm$ 1.4	10.9 $\pm$ 0.9
Sep-FBP-HMeOH	56.68 $\pm$ 12.44	4.0 $\pm$ 0.9	2.5 $\pm$ 0.6



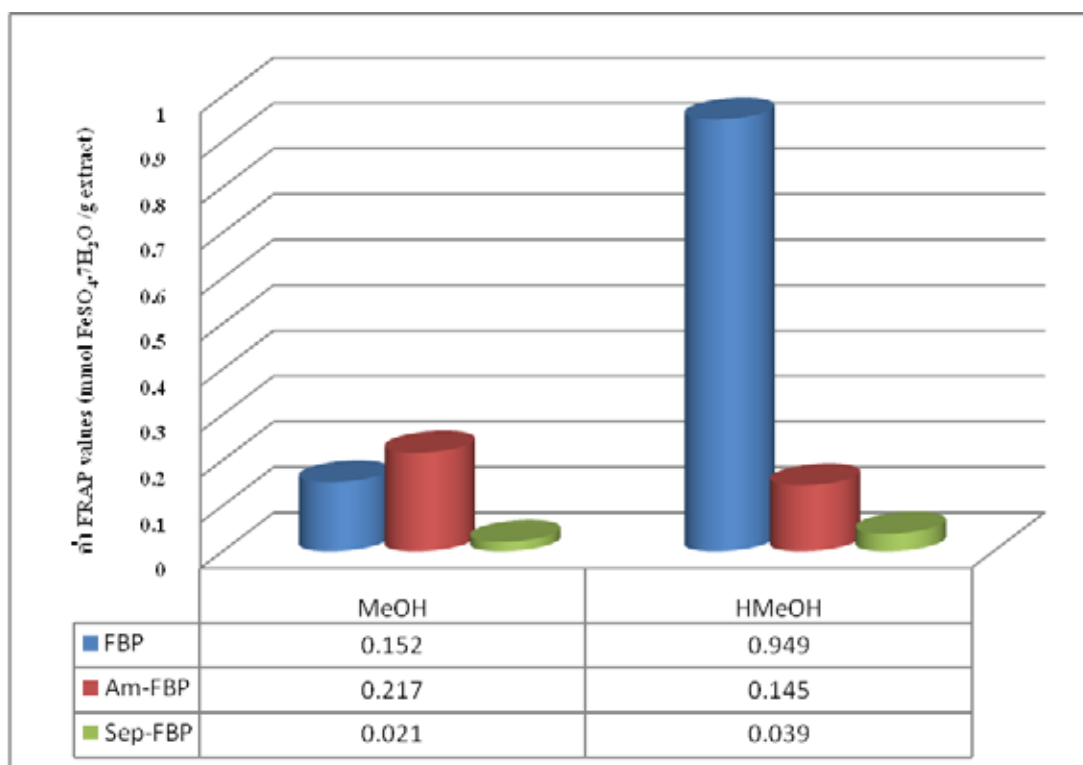
รูปที่ 60 ค่า EC_{50} จาวิธี ABTS ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก ที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20

3.7.3.2. วิธี FRAP

การนำสารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และคอลัมน์ Sephadex LH-20 มาทำการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 ค่า FRAP values สารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก ที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20 [mean $\pm$ SD (n = 3)]

ตัวอย่างลูกหว้า	FRAP values (mmol Fe ²⁺ /g extract)	ตัวอย่างลูกหว้า	FRAP values (mmol Fe ²⁺ /g extract)
FBP-MeOH	0.152 $\pm$ 0.007	FBP-HMeOH	0.949 $\pm$ 0.015
Am-FBP-MeOH	0.217 $\pm$ 0.026	Am-FBP-HMeOH	0.145 $\pm$ 0.009
Sep-FBP-MeOH	0.021 $\pm$ 0.001	Sep-FBP-HMeOH	0.039 $\pm$ 0.004



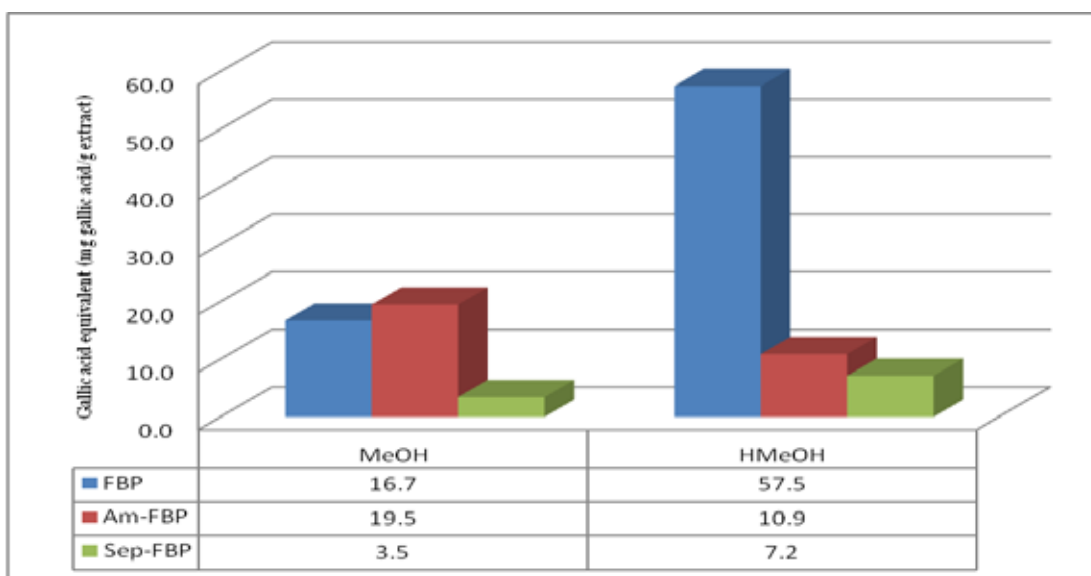
รูปที่ 61 ค่า FRAP values ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก ที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20

3.7.4. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล

การนำสารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และคอลัมน์ Sephadex LH-20 มาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 26

ตารางที่ 26 ค่า Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g extract) ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก ที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20 [mean $\pm$ SD (n = 3)]

ตัวอย่างลูกหว้า	Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g extract)	ตัวอย่างลูกหว้า	Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g extract)
FBP-MeOH	16.7 $\pm$ 1.7	FBP-HMeOH	57.5 $\pm$ 1.0
Am-FBP-MeOH	19.5 $\pm$ 0.7	Am-FBP-HMeOH	10.9 $\pm$ 0.3
Sep-FBP-MeOH	3.5 $\pm$ 0.2	Sep-FBP-HMeOH	7.2 $\pm$ 0.3



รูปที่ 62 ค่า Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g extract) ของสารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก ที่ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20

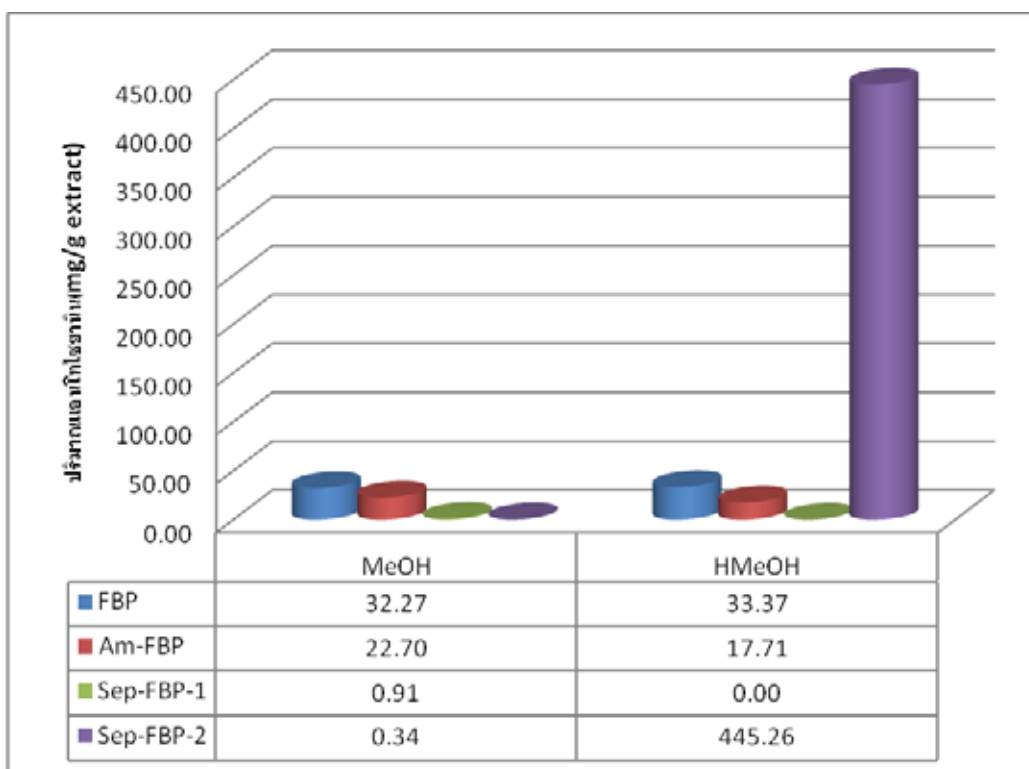
3.7.5 การศึกษาการหาปริมาณแอนโทไซยานิน

การนำสารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และคอลัมน์ Sephadex LH-20 มาหาปริมาณแอนโทไซยานิน ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 ความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน และปริมาณแอนโทไซยานิน (mg/g extract)

ที่คำนวณได้ในเทอมของ pelargonidin-3-glucoside (PGD-3-glu)(mg/L) และ malvidin-3,5-diglucoside(Mvd-3,5-diglu)[mean $\pm$ SD (n = 3)]

สารสกัดตัวอย่าง	ความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน(mg/L)	ปริมาณแอนโทไซยานิน (PGD-3-glu mg/g extract)	ปริมาณแอนโทไซยานิน (Mvd-3,5-deglu mg/g extract)
FBP-MeOH	35.41 $\pm$ 0.18	32.27 $\pm$ 0.16	29.01 $\pm$ 0.14
Am -FBP-MeOH	24.37 $\pm$ 0.18	22.70 $\pm$ 0.17	20.41 $\pm$ 0.15
Sep-FBP-MeOH-1	11.86 $\pm$ 0.14	0.91 $\pm$ 0.01	0.82 $\pm$ 0.010
Sep-FBP-MeOH-2	0.34 $\pm$ 0.16	0.34 $\pm$ 0.16	0.30 $\pm$ 0.15
FBP-HMeOH	16.11 $\pm$ 0.08	33.37 $\pm$ 0.16	30.00 $\pm$ 0.14
Am-FBP-HMeOH	18.75 $\pm$ 0.20	17.71 $\pm$ 0.19	15.93 $\pm$ 0.17
Sep-FBP-HMeOH-1	-	-	-
Sep-FBP-HMeOH-2	23.15 $\pm$ 0.05	445.26 $\pm$ 0.95	400.32 $\pm$ 0.85



รูปที่ 63 ปริมาณแอนโทไซยานิน (mg PGD-3-glu /g extract) ของสารสกัดเนื้อมะเขือเทศที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิด ผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20

เมื่อนำสารสกัดเนื้อมะเขือเทศในระยะเวลาผลสุกที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิด นำมาผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 และนำมาแยกขนาดด้วยคอลัมน์ Sephadex LH-20 แล้วนำสารที่ได้จากคอลัมน์ทั้งสองมาศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP พบว่า ในกรณีที่สารสกัดหยาบสกัดด้วย 0.1% HCl ในเมทานอล ค่า EC_{50} (วิธี DPPH และ ABTS) ของสารสกัดหยาบ < สารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 < สารที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex LH-20 และ ค่า FRAP values ของสารสกัดหยาบ > สารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 > สารที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex LH-20 ส่วนในกรณีที่สารที่สกัดด้วยเมทานอลนั้น ได้ผลการทดลองดังนี้ ค่า EC_{50} (วิธี DPPH และ ABTS) ของสารสกัดหยาบมีค่าใกล้เคียงกับสารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 < สารที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex LH-20 และค่า FRAP values ของสารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 > สารสกัดหยาบ > สารที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex LH-20 แสดงว่าสารที่ได้จากคอลัมน์มีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระได้ลดลงและมีค่า FRAP values ลดลงกว่าสารสกัดหยาบด้วย (รูปที่ 59 รูปที่ 60 และ รูปที่ 61) การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล พบว่า ในกรณีที่สารสกัดหยาบสกัดด้วย 0.1% HCl ในเมทานอล ค่า GAE ของสารสกัดหยาบ > สาร

ที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 > สารที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex LH-20 ส่วนในกรณีของ สารที่สกัดด้วยเมทานอล ค่า GAE ของสารสกัดหยาบมีค่าใกล้เคียงกับสารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 > สารที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex LH-20 (รูปที่ 62) การหาปริมาณแอนโทไซยานิน พบว่า ในกรณีสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอล มีปริมาณแอนโทไซยานินดังนี้ สารสกัดหยาบ > สารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 > สารที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex LH-20 fraction 10 – 28 (พีคแรก) > สารที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex LH-20 fraction 29 – 90 (พีคสอง) ส่วนสารสกัดหยาบที่ สกัดด้วย 0.1% HCl ในเมทานอล มีปริมาณแอนโทไซยานินดังนี้ สารที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex LH-20 fraction 32 – 89 (พีคสอง) > สารสกัดหยาบ > สารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 > สารที่ได้ จากคอลัมน์ Sephadex LH-20 fraction 12 – 31 (พีคแรก) (รูปที่ 63)

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ตัวอย่างของหว่าที่ทำการศึกษาแบ่งเป็นผลสด และผลอบแห้ง โดยจะเก็บตัวอย่างผล 3 ระยะ คือ ผลอ่อนสีเขียว ผลแก่สีชมพู และผลสุกสีม่วงดำ แล้วแยกส่วนของผลออกเป็นเปลือกกับเนื้อ และเมล็ด การสกัดแอนโทไซยานินจากตัวอย่างผลสดและผลแห้งจะใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เมทานอล และ 0.1 % HCl ใน เมทานอล ได้เป็นสารสกัดหยาบ นำสารสกัดหยาบที่ได้ทั้งหมด มาทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP assay หาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent และ หาปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH-differential

จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการทดลองซึ่งอาจส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระพบว่า

1. การเก็บตัวอย่างลูกหว่าสด และอบแห้ง เมื่อนำตัวอย่างลูกหว่ามาสกัดพบว่าตัวอย่างลูกหว่าสดให้น้ำหนักสารสกัด มากกว่า ตัวอย่างลูกหว่าอบแห้ง (ดังตารางที่ 7 และ 8) ทั้งสองตัวทำละลายที่ใช้ และในลูกหว่าทั้ง 3 ระยะด้วย ทั้งนี้ในระหว่างกระบวนการอบแห้งอาจทำให้มีการสลายตัวของสารบางชนิดไปซึ่งส่งผลให้ได้ปริมาณสารสกัดน้อยลง
2. ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัด เมื่อทำการสกัดลูกหว่าด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เมทานอลและ 0.1% HCl ในเมทานอล พบว่า เมื่อใช้ 0.1 % HCl ในเมทานอลให้น้ำหนักสารสกัดมากกว่าสกัดด้วยเมทานอล (ตารางที่ 7 และ 8) ทั้งตัวอย่างสดและอบแห้งของตัวอย่างทั้ง 3 ระยะ และจะเห็นว่าในระยะผลสุกจะมีปริมาณสารสกัดสูงสุดด้วย ในระหว่างการสกัดนั้นถ้าใช้ 0.1 % HCl ในเมทานอลจะเห็นสีสารละลายเป็นสีชมพูแดงที่เข้มมากกว่า สกัดด้วยเมทานอล คาดว่าน่าจะเป็นแอนโทไซยานิน เพราะมีรายงานว่า ผลของลูกหว่ามีแอนโทไซยานินเป็นองค์ประกอบ (Venkateswarlu 1952 : 434-435) สารในกลุ่มนี้สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายแอลกอฮอล์ที่มีความกรดเล็กน้อย (Chiriboga and Francis 1970 : 233-234 ; Bronnum-Hansen et al. 1985 : 703-704)

จากผลการศึกษาข้างต้นทำให้สรุปได้ว่าถ้าต้องการสกัดให้ได้สารสกัดในปริมาณมากนั้น ควรจะใช้ตัวอย่างสด และใช้ตัวทำละลายเป็น 0.1 % HCl ในเมทานอล หรือ ใช้แอลกอฮอล์ที่มีความเป็นกรดเล็กน้อย

ตารางที่ 28 เปอร์เซ็นต์สารสกัดเนื้อกับเปลือก และเมล็ดของลูกหว้าสดและลูกหว้าอบแห้ง

สารตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์สารสกัด (สกัดด้วยเมทานอล)		เปอร์เซ็นต์สารสกัด (สกัดด้วย 0.1% HCl ในเมทานอล)	
	ตัวอย่างสด	ตัวอย่างอบแห้ง	ตัวอย่างสด	ตัวอย่างอบแห้ง
เนื้อกับเปลือก				
ระยะผลอ่อน	5.93	3.18	12.98	9.66
ระยะผลแก่	9.57	6.25	14.03	11.69
ระยะผลสุก	13.70	11.49	18.67	17.60
เมล็ด				
ระยะผลอ่อน	9.65	6.55	16.55	13.38
ระยะผลแก่	10.73	4.99	16.90	11.76
ระยะผลสุก	11.49	5.94	17.58	12.12

3. ส่วนเนื้อกับเปลือก และเมล็ดลูกหว้า พบว่า ส่วนเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์สารสกัดมากกว่า ส่วนเนื้อกับเปลือก ยกเว้น ส่วนเนื้อกับเปลือกของลูกหว้าในระยะผลสุกที่สกัดด้วย 0.1% HCl ในเมทานอล เท่านั้นที่มีเปอร์เซ็นต์สารสกัดมากกว่า (ตารางที่ 28) และ เมื่อนำสารสกัดเนื้อกับเปลือก และเมล็ดลูกหว้าไปทำการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP หาปริมาณสารประกอบฟีนอล และ ปริมาณแอนโทไซยานิน (ตารางที่ 29, 30, 31 และ 32) พบว่า สารสกัดจากเมล็ดลูกหว้า มีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดจากเนื้อกับเปลือกลูกหว้า และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงกว่าด้วย เนื่องจากในส่วนเมล็ดนั้นมีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลในกลุ่มอื่น ที่ไม่ใช่สารกลุ่มเดียวกันกับในส่วนเนื้อกับเปลือก เมล็ดมีปริมาณ โพรแอนโทไซยานิดิน และ แทนนิน อยู่ในปริมาณมาก สารเหล่านี้มีหน้าที่ปกป้องต้นอ่อนจากการถูกทำลายจากศัตรูที่จะมาทำลายต้นอ่อนก่อนถึงเวลาในการงอกของต้นอ่อนเพื่อการกระจายพันธุ์พืชต่อไป (Hopkins 2004 : 296-297, 508-510 ; Anderson and Markham 2006 : 423) แต่ส่วนของเปลือกนั้นเป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน ซึ่งให้สีส้มเพื่อช่วยดึงดูดแมลงสำหรับการกระจายพันธุ์ ส่วนเนื้อมีองค์ประกอบของสารประกอบอื่นเช่น เซลลูโลส แปกติน และน้ำตาลผลไม้ต่าง ๆ เป็นต้น (Jongen 2002) จากองค์ประกอบที่แตกต่างกันนี้ จะเห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดมีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดเนื้อกับเปลือก

4. ช่วงระยะการพัฒนาของผลลูกหว้า พบว่า ในระยะผลสุกส่วนเนื้อกับเปลือก ของลูกหว้า จะได้ สารสกัดหยาบมากกว่า ในระยะผลแก่ และผลอ่อน ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่ได้จากเมล็ดของลูกหว้า นั้นได้นำนักสารสกัดหยาบใกล้เคียงกัน ในทั้ง 3 ระยะ (ตารางที่ 28) เมื่อนำสารสกัดหยาบมาทำการ ทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP หาปริมาณสารประกอบฟีนอล และ ปริมาณแอนโทไซยานิน (ตารางที่ 29, 30, 31, 32 และ 33) สาร สกัดลูกหว้าในระยะผลอ่อนยังมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงกว่าระยะผลแก่และผลสุกอีกด้วย ยกเว้น สารสกัดจากเนื้อเปลือกสดที่สกัดด้วย 0.1% HCl ในเมทานอล เท่านั้นที่ให้ผลการทดลองที่ แตกต่าง คือ สารสกัดจากเนื้อเปลือกในระยะผลสุก มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ ดีกว่าในระยะผลอ่อน และระยะผลแก่ ตามลำดับ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงกว่าระยะผลอ่อน และระยะผลสุก และมีปริมาณแอนโทไซยานินอยู่สูงกว่าในระยะผลแก่และผลอ่อนด้วย สาเหตุที่ ระยะผลอ่อนมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าในระยะผลแก่และผลสุกนั้น เนื่องจากในระยะผลอ่อนมีแทนนินปรากฏเป็นรสฝาด สารนี้มีปริมาณสูงในระยะผลอ่อนเพื่อทำ หน้าที่ปกป้องผลอ่อนจากการรบกวนของแมลงและสัตว์ แต่เมื่ออยู่ในระยะผลแก่และผลสุกนั้นพืช ต้องการดึงดูดแมลงและสัตว์เพื่อช่วยในการกระจายพันธุ์ จึงมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อเพิ่มสีน้ำตาล ของผลรวมไปถึงรสชาติซึ่งสังเกตได้ว่าในระยะผลแก่ของลูกหว้าจะมีสีชมพูและในระยะผลสุกจะมีสีม่วง ดำ รวมทั้งยังมีรสหวานเพิ่มขึ้นอีกด้วยในระยะผลแก่และระยะผลสุกลูกหว้าจะมีการสร้างสารในกลุ่ม แอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น (Seymour 1993 : 189-221) จึงทำให้เมื่อสกัดด้วย 0.1% HCl ในเมทานอล แอนโทไซยานินจะละลายออกมาได้มากซึ่งอาจจะมีส่วนช่วยเสริมให้มีความสามารถในการเป็นสาร ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าในระยะผลอ่อนและผลแก่ รวมทั้งปริมาณสารประกอบฟีนอลให้สูงขึ้นกว่า ในระยะผลอ่อนด้วย

จากการศึกษาข้างต้นทำให้สรุปได้ว่าเมล็ดของลูกหว้ามีความสามารถในการเป็นสารต้าน อนุมูลอิสระได้ดีกว่าส่วนเนื้อกับเปลือก และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงกว่าด้วย พบแอนโทไซ- ยานินเฉพาะในส่วนเนื้อกับเปลือกของลูกหว้า ส่วนระยะการพัฒนาของผลลูกหว้า ในระยะผลอ่อน จะมีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าระยะผลแก่และผลสุก มีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลอยู่สูงกว่าด้วย ระยะที่มีปริมาณแอนโทไซยานินอยู่มากเป็นระยะผลสุก เมื่อต้องการสกัด แอนโทไซยานินออกมาได้มากควรใช้เมทานอลที่มีความเป็นกรดเล็กน้อย

ตารางที่ 29 ค่า EC_{50} ของสารสกัดเนือเปลือกและเมล็ด ลูกหว้าสดและลูกหว้าอบแห้ง ด้วยวิธี DPPH และ ABTS [mean $\pm$ SD (n=3)]

ตัวอย่าง	วิธี DPPH				วิธี ABTS			
	ค่า EC_{50} (mg/mL)				ค่า EC_{50} (mg/mL)			
	ตัวอย่างสด		ตัวอย่างอบแห้ง		ตัวอย่างสด		ตัวอย่างอบแห้ง	
	เมทานอล	0.1%HCl ในเมทานอล	เมทานอล	0.1%HCl ในเมทานอล	เมทานอล	0.1%HCl ในเมทานอล	เมทานอล	0.1%HCl ในเมทานอล
เนือเปลือก								
ระยะผลอ่อน	2.96 ± 0.12	2.97 ± 0.19	2.43 ± 0.06	4.62 ± 0.52	3.95 ± 0.20	3.16 ± 0.20	1.58 ± 0.12	6.66 ± 0.27
ระยะผลแก่	4.17 ± 0.25	6.13 ± 0.31	4.06 ± 0.08	8.85 ± 0.55	4.09 ± 0.39	11.3 ± 0.87	2.74 ± 0.02	17.18 ± 0.37
ระยะผลสุก	6.91 ± 0.59	1.36 ± 0.07	8.72 ± 0.28	9.67 ± 0.74	6.50 ± 0.32	1.44 ± 0.21	5.03 ± 0.33	50.50 ± 2.61
เมล็ด								
ระยะผลอ่อน	0.177 ± 0.013	0.170 ± 0.008	0.180 ± 0.004	0.157 ± 0.005	0.145 ± 0.016	0.176 ± 0.007	0.159 ± 0.005	0.136 ± 0.005
ระยะผลแก่	0.247 ± 0.013	0.209 ± 0.004	0.203 ± 0.019	0.189 ± 0.012	0.253 ± 0.021	0.225 ± 0.010	0.183 ± 0.009	0.166 ± 0.012
ระยะผลสุก	0.266 ± 0.006	0.232 ± 0.014	0.311 ± 0.025	0.251 ± 0.004	0.209 ± 0.012	0.284 ± 0.003	0.257 ± 0.023	0.205 ± 0.008
Trolox	0.154 ± 0.012				0.149 ± 0.002			
วิตามิน ซี	0.121 ± 0.001				0.138 ± 0.020			

ตารางที่ 30 ค่า FRAP values ของสารสกัดเนื้อเปลือกและเมล็ดลูกหว้า [mean $\pm$ SD (n=3)]

ตัวอย่าง	FRAP values (mmol Fe ²⁺ /g extract)			
	ตัวอย่างสด		ตัวอย่างอบแห้ง	
	เมทานอล	0.1% HCl ในเมทานอล	เมทานอล	0.1% HCl ในเมทานอล
เนื้อเปลือก				
ระยะผลอ่อน	0.232 $\pm$ 0.012	0.342 $\pm$ 0.007	0.393 $\pm$ 0.053	0.128 $\pm$ 0.023
ระยะผลแก่	0.199 $\pm$ 0.004	0.149 $\pm$ 0.005	0.242 $\pm$ 0.005	0.101 $\pm$ 0.006
ระยะผลสุก	0.152 $\pm$ 0.007	0.949 $\pm$ 0.015	0.127 $\pm$ 0.006	0.054 $\pm$ 0.004
เมล็ด				
ระยะผลอ่อน	5.76 $\pm$ 0.43	6.16 $\pm$ 0.36	5.73 $\pm$ 0.05	6.18 $\pm$ 0.48
ระยะผลแก่	3.27 $\pm$ 0.18	5.40 $\pm$ 0.47	4.37 $\pm$ 0.17	4.97 $\pm$ 0.22
ระยะผลสุก	3.76 $\pm$ 0.09	4.55 $\pm$ 0.18	3.50 $\pm$ 0.33	4.57 $\pm$ 0.20

ตารางที่ 31 ปริมาณสารประกอบฟีนอล ของสารสกัดเนื้อเปลือกลูกหว้าสดและลูกหว้าอบแห้ง
[mean $\pm$ SD (n=3)]

ตัวอย่าง	ปริมาณสารประกอบฟีนอล (gallic acid mg/g extract)			
	ตัวอย่างสด		ตัวอย่างอบแห้ง	
	เมทานอล	0.1% HCl ในเมทานอล	เมทานอล	0.1% HCl ในเมทานอล
เนื้อกับเปลือก				
ระยะผลอ่อน	25.0 $\pm$ 2.2	27.2 $\pm$ 2.4	38.1 $\pm$ 0.7	16.2 $\pm$ 0.4
ระยะผลแก่	24.4 $\pm$ 3.8	7.24 $\pm$ 0.4	24.0 $\pm$ 0.5	10.8 $\pm$ 0.3
ระยะผลสุก	16.7 $\pm$ 1.7	57.5 $\pm$ 1.0	14.9 $\pm$ 0.5	7.2 $\pm$ 0.6
เมล็ด				
ระยะผลอ่อน	321.0 $\pm$ 9.8	355.4 $\pm$ 14.4	323.5 $\pm$ 13.3	392.6 $\pm$ 18.4
ระยะผลแก่	174.6 $\pm$ 31.9	295.9 $\pm$ 27.5	297.9 $\pm$ 22.2	321.3 $\pm$ 12.9
ระยะผลสุก	193.8 $\pm$ 20.9	269.3 $\pm$ 18.1	188.5 $\pm$ 13.3	293.6 $\pm$ 21.8

ตารางที่ 32 ปริมาณแอนโทไซยานิน ของสารสกัดเนื้อเปลือกและเมล็ด ลูกหว้าสดและลูกหว้าอบแห้ง [mean $\pm$ SD (n=3)]

ตัวอย่าง	ปริมาณแอนโทไซยานิน (PGD 3-glu mg/g extract)			ปริมาณแอนโทไซยานิน (Mvd 3,5-diglu mg/g extract)		
	ตัวอย่างสด		ตัวอย่างอบแห้ง	ตัวอย่างสด		ตัวอย่างอบแห้ง
	เมทานอล	0.1% HCl ในเมทานอล		เมทานอล	0.1% HCl ในเมทานอล	
เนื้อเปลือก						
ระยะผลอ่อน	0.04 $\pm$ 0.02	-	-	-	-	-
ระยะผลแก่	0.74 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.004	0.33 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.08	0.22 $\pm$ 0.004	0.07 $\pm$ 0.01
ระยะผลสุก	32.27 $\pm$ 0.16	33.37 $\pm$ 0.16	1.03 $\pm$ 0.02	1.03 $\pm$ 0.02	33.37 $\pm$ 0.16	0.34 $\pm$ 0.04
เมล็ด						
ระยะผลอ่อน	-	-	-	-	-	-
ระยะผลแก่	-	-	-	-	-	-
ระยะผลสุก	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 33 ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลและปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธีต่างๆ
ของสารสกัดลูกหว้าตัวอย่าง

ตัวอย่าง(ตัวทำละลายที่สกัด)	วิธี DPPH	วิธี ABTS	วิธี FRAP assay	ปริมาณสารประกอบฟีนอล	ปริมาณแอนโทไซยานิน
เมล็ดลูกหว้าสด(MeOH)	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลสุก > ผลแก่	ผลอ่อน > ผลสุก > ผลแก่	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	-
เมล็ดลูกหว้าสด(HMeOH)	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	-
เมล็ดลูกหว้าอบแห้ง(MeOH)	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	-
เมล็ดลูกหว้าอบแห้ง(HMeOH)	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	-
เนื้อเปลือกลูกหว้าสด(MeOH)	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน = ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลสุก > ผลแก่ > ผลอ่อน
เนื้อเปลือกลูกหว้าสด(HMeOH)	ผลสุก > ผลอ่อน > ผลแก่	ผลสุก > ผลอ่อน > ผลแก่	ผลสุก > ผลอ่อน > ผลแก่	ผลสุก > ผลอ่อน > ผลแก่	ผลสุก > ผลแก่ > ผลอ่อน
เนื้อเปลือกลูกหว้าอบแห้ง(MeOH)	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลสุก > ผลแก่ > ผลอ่อน
เนื้อเปลือกลูกหว้าอบแห้ง(HMeOH)	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลอ่อน > ผลแก่ > ผลสุก	ผลสุก > ผลแก่ > ผลอ่อน

5. วิธีวิเคราะห์

ในการศึกษาหาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดลูกหว้าในส่วนเนื้อกับเปลือก และเมล็ด จากผลลูกหว้าทั้งสามระยะ (ผลอ่อน ผลแก่ และผลสุก) ใช้ 2 วิธีคือ radical scavenging method (วิธี DPPH และ ABTS) และ reducing power method (FRAP assay) วิธี radical scavenging method คือ การทดสอบความสามารถในการเป็นตัวจับอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งได้ทำการทดลองนี้ใช้ 2 วิธี คือ DPPH assay และ ABTS assay โดยทั้งสองวิธีจะมีสถานะทางการทดลองต่างกัน ในกรณี วิธี DPPH อนุมูลอิสระที่ใช้ nitrogen radical มีสีม่วงเข้ม ไม่ต้องมีการ generate radical DPPH[•] ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมทานอล) ไม่ละลายน้ำ มีความเสถียรสูง ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm เพราะฉะนั้นวิธีนี้จึงมีข้อจำกัดในการวิเคราะห์เพราะจะใช้ได้ในเฉพาะตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic antioxidant) เท่านั้นไม่สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ชอบน้ำ (hydrophilic antioxidant) ได้ ข้อจำกัดอีกประการหนึ่งคือ จากความยาวคลื่นที่ใช้ถ้าสารตัวอย่างสามารถดูดกลืนแสงในช่วงที่ DPPH[•] ดูดกลืนได้ จะทำให้ผลการทดลองที่ได้ผิดพลาด เช่นสารในกลุ่ม แคโรทีนอยด์ ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นใกล้เคียงกับ DPPH[•] ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้น้อยลง (Arnao 2000 : 419) ส่วนวิธี ABTS อนุมูลอิสระที่ใช้เป็น cation radical ก่อนนำมาใช้ต้องมีการ generate radical ก่อน โดยอาศัยเอนไซม์เช่น peroxidase หรือปฏิกิริยาเคมี เช่น potassium persulfate เป็นต้น ปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับ ABTS^{•+} เกิดได้รวดเร็วภายใน 30 นาที ใช้ได้ในช่วง pH เป็นกรดหรือเป็นกลาง ABTS^{•+} ละลายได้ทั้งในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย และตัวทำละลายอินทรีย์ จึงสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic antioxidant) และ สารต้านอนุมูลอิสระที่ชอบน้ำ (hydrophilic antioxidant) ได้ ABTS^{•+} สามารถดูดกลืนแสงได้หลายความยาวคลื่น ดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 414 752 และ 842 nm ละลายในน้ำ และ 414 730 และ 873 nm ในเอทานอล จากการที่สามารถดูดกลืนแสงได้หลายตำแหน่งนี้ส่วนใหญ่ความยาวคลื่นที่ใช้ประมาณ 734 nm เพื่อลดการเกิดการ overlap กับตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ (Arnao 2000 : 419)

วิธี reducing power method หรือการทดสอบความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ ใช้วิธี FRAP โดยจะแสดงผลการทดลองในรูปของ FRAP values ถ้าค่า FRAP values มีค่าสูงแสดงว่ามีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว วิธี FRAP อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน ของ Ferroin analog (Fe^{3+} complex ของ tripyridyltriazine $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$) ไปเป็น Fe^{2+} complex สีฟ้า ปฏิกิริยานี้เกิดในสถานะของสารละลายที่เป็นกรด (pH 3.6) โดยสารต้าน

อนุมูลอิสระที่ทดสอบ complex ที่เกิดขึ้นสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 593 nm reducing power มีความสัมพันธ์กับ degree of hydroxylation และ extent of conjugation ในสารประกอบฟีนอล สามารถใช้วิธีนี้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลากหลาย เช่น ในอาหาร สารสกัดจากพืช น้ำผลไม้ ของเหลวทางชีวภาพเช่นน้ำเลือด แต่ไม่สามารถ ทำปฏิกิริยากับสารที่มีกลไกการทำงานโดยการจับ radical ได้ (Robards et al. 2002 : 183 ; Perkampus 1991 : 1139 ; Benzie and Strain 1996 : 70-76 ; Pulido et al. 2000 : 3396-3398)

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลด้วย Folin Ciocalteu method นั้นมีหลักการคล้ายกับวิธี reducing power คือ อาศัยคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารประกอบฟีนอลที่สามารถรีดิวซ์ Mo(VI) ให้เปลี่ยนเป็น Mo(V) ได้ ผลการทดลองแสดงในรูปของค่า Gallic acid equivalent โดยใช้ gallic acid เป็นสารประกอบฟีนอลมาตรฐาน สารละลายมี pH ประมาณ 10 เป็นวิธีที่สะดวกง่าย แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่ได้เฉพาะเจาะจงกับสารประกอบฟีนอลเพียงอย่างเดียว ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มอื่นได้ด้วย เช่น Vitamin C Cu(I) เป็นต้น เนื่องจากสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบด้วยวิธีนี้ ส่วนใหญ่เป็น ตัวอย่างสารสกัดจากพืช ผัก หรือผลไม้ ซึ่งมีสารประกอบฟีนอลเป็นองค์ประกอบอยู่มาก จึงนิยมใช้วิธีนี้เป็นวิธีหาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยรวม (Huang et al. 2005 : 1841-1845 ; Folin and Ciocalteu 1927 : 627 ; Singleton and Rossi 1965 : 144-158)

การหาปริมาณแอนโทไซยานินในเนื้อเปลือกของลูกหว้าระยะต่าง ๆ โดยใช้วิธี pH differential โดยทำการวัดความค่าการดูดกลืนแสงที่สองความยาวคลื่นคือ 520 และ 700 nm ในสารละลาย pH 1.0 และ 4.5 ความยาวคลื่นที่เลือกใช้คือ ที่ 520 nm เป็นความยาวคลื่นที่แอนโทไซยานินดูดกลืนได้มากที่สุด ส่วนที่ความยาวคลื่น 700 nm เป็นความยาวคลื่นที่ใช้ในการลดการรบกวนจากสารอื่นและเป็นความยาวคลื่นที่แอนโทไซยานินดูดกลืนได้น้อยมาก ส่วน pH ที่เลือกใช้นั้น ที่ pH 1.0 เป็น pH ที่แอนโทไซยานินอยู่ในรูป Flavylium cation เป็นสารสีแดงที่เสถียร ดูดกลืนแสงได้ดี แต่ที่ pH 4.5 นั้นแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนรูปไปอยู่ในรูปของ pseudobase เป็นสารที่ไม่มีสี ไม่เสถียร ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ได้น้อย (Wrolstad 1967 : 621) ในการทดลองจะรายงานปริมาณ ของแอนโทไซยานินในเทอมของ pelargonidin-3-glucoside (PGD-3-glu) และ malvidin-3,5-diglucosid (Mvd-3,5-diglu) เนื่องจากสารชนิดนี้พบทั่วไปในผักและผลไม้ และมีรายงานว่าพบแอนโทไซยานิน 3 ชนิดคือ delphinidin-diglucoside petunidin-diglucoside และ malvidin-diglucoside ในเปลือกลูกหว้าโดยใช้ HPLC-ESI-MS (Neelwarne et al. 2007 : 619) จากผลการทดลองพบว่าในระยะผลสุกมีปริมาณของแอนโทไซยานินอยู่ในปริมาณสูงกว่าระยะผลแก่ และผลอ่อนตามลำดับ

(ในตัวทำลายทั้งสองชนิด) ถ้าศึกษาในระยะเดียวกันระหว่างผลสดและผลอบแห้ง ผลสดจะให้ปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าถึงประมาณ 33 เท่า (เมื่อสกัดด้วย 0.1% HCl ใน เมทานอล)

6. จากการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี (วิธี DPPH วิธี ABTS และ วิธี FRAP) การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล และ ปริมาณแอนโทไซยานิน ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกันคือ เมื่อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลอยู่สูง พบว่ามีความสามารถในการเป็นตัวจับอนุมูลอิสระและเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีด้วย เช่น สารสกัดจากเมล็ดลูกหว้า (แต่ในส่วนนี้ไม่มีแอนโทไซยานิน) และถ้ามีปริมาณแอนโทไซยานินอยู่สูง ปริมาณสารประกอบฟีนอลที่สูงด้วยรวมทั้งยังมีความสามารถเป็นตัวจับอนุมูลอิสระและเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีด้วยเช่นกัน เช่น สารสกัดจากเนื้อเปลือกลูกหว้าในระยะผลสุกที่สกัดด้วย 0.1% HCl ในเมทานอล จะมีปริมาณแอนโทไซยานินอยู่ 33.37 mg/g extract ปริมาณสารประกอบฟีนอล มีค่า GAE เป็น 57.5 mg gallic acid/ g extract ค่า FRAP values 0.949 mmol/ g extract ค่า EC_{50} 1.44 mg/mL (วิธีABTS) และค่า EC_{50} 1.36 mg/mL (วิธีDPPH) กับในระยะผลอ่อนที่สกัดด้วยตัวทำลายชนิดเดียวกันแต่เป็นระยะที่ไม่มีแอนโทไซยานินนั้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอล มีค่า GAE เป็น 21.2 mg gallic acid/ g extract ค่า FRAP values 0.342 mmol/ g extract ค่า EC_{50} 3.16 mg/mL (วิธีABTS) และค่า EC_{50} 2.97 mg/mL (วิธีDPPH) จะเห็นได้ว่าเมื่อมีปริมาณแอนโทไซยานินอยู่สูง ปริมาณสารประกอบฟีนอลก็จะมีค่าสูงเช่นกันรวมทั้งมีความสามารถในการเป็นตัวจับอนุมูลอิสระและเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีด้วย

เมื่อนำสารสกัดเนื้อและเปลือกลูกหว้าในระยะผลสุก (เป็นระยะที่มีปริมาณแอนโทไซยานินอยู่สูง)มาทำการผ่านคอลัมน์ Amberlite XAD-7 เพื่อแยกสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน จากสารประกอบฟีนอลอื่น และแยกขนาดโมเลกุลของแอนโทไซยานินโดยใช้คอลัมน์ Sephadex LH-20 พบว่า คอลัมน์ Amberlite XAD-7 แยกสารได้หนึ่งฟีด แล้วนำสารที่ได้จากคอลัมน์ Amberlite XAD-7 มาผ่านคอลัมน์ Sephadex LH-20 พบว่า ได้สารออกมาสองฟีด แต่ยังไม่ทราบว่าเป็นแอนโทไซยานินชนิดใด มีรายงานวิจัยการศึกษาองค์ประกอบสารสกัดจากเปลือกหว้าพบแอนโทไซยานิน 3 ชนิดคือ delphinidin-diglucoside petunidin-diglucoside และ malvidin-diglucoside โดยใช้ HPLC-ESI-MS (Neelwarne et al. 2007 : 619) เมื่อนำสารที่ได้คอลัมน์ทั้งสองมาทำการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ(ด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP) หาปริมาณสารประกอบฟีนอล และปริมาณแอนโทไซยานิน (ตารางที่ 34) พบว่า เมื่อทำการผ่านคอลัมน์แล้วความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารสกัดหยาบ เนื่องจากการผ่านคอลัมน์เป็นการกำจัดสารในกลุ่มอื่น ๆ ออกไป เหลือเพียงสารในกลุ่มแอนโทไซยานินเพียงอย่างเดียว จึงส่งผลให้มีความสามารถในการ

การเป็นตัวจับกับอนุมูลอิสระและเป็นตัวรีดิวซ์ได้ลดลง และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลและปริมาณแอนโทไซยานิน ลดลงด้วย ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Southon and Faulks (2002 : 5-22) กับ Vinson et al. (2001 : 5315-5321) ที่กล่าวว่าสารสกัดหยาบจะมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าการแยกสารมาวิเคราะห์เพียงกลุ่มเดียว และ Stintzing et al. (2002 : 6172-6181) กล่าวว่าแอนโทไซยานินที่อยู่ร่วมกันหลายชนิดมีความสามารถจับกับอนุมูลอิสระได้ดีกว่าการทำงานของแอนโทไซยานินเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง

หวั่นเป็นพืชที่พบมากในประเทศไทย เป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์ในทางยาแทบทุกส่วนของต้น เช่น ใบใช้รักษาอาการท้องร่วง ลดน้ำตาลในเลือด เมล็ดใช้รักษาโรคเบาหวาน เป็นต้น เมื่อผลสุกสามารถนำมารับประทานได้หรือใช้ทำเป็นน้ำผลไม้บ้างแต่ส่วนใหญ่ถูกทิ้งให้สูญหายไปโดยเปล่าประโยชน์ จากการนำผลของลูกหว่ามาทำการศึกษาพบว่า สารสกัดจากเมล็ดของลูกหว่ามีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี มีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูง ในส่วนสารสกัดจากเนื้อกับเปลือกในระยะผลสุกมีปริมาณแอนโทไซยานินอยู่สูง ลูกหว่าจึงเป็นแหล่งของรงควัตถุและสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติที่สมควรนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางได้ต่อไป

ตารางที่ 34 เปรียบเทียบวิธีทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัดเนื้อเปลือกลูกหว้าสด (ผลสุก) ก่อนและหลังผ่านคอลัมน์
Amberlite XAD-7 และ Sephadex LH-20 [mean $\pm$ SD (n=3)]

สารสกัดตัวอย่าง	วิธี DPPH		วิธี ABTS		วิธี FRAP ^c	ปริมาณสารประกอบฟีนอล (GAE ^d)	ปริมาณแอนโทไซยานิน (mg/g extract) ^e
	TEAC ^a	VCEAC ^b	TEAC ^a	VCEAC ^b			
FBP-MeOH	23.4 $\pm$ 1.9	17.6 $\pm$ 1.4	37.6 $\pm$ 1.9	21.2 $\pm$ 1.1	0.152 $\pm$ 0.007	16.7 $\pm$ 1.7	32.27 $\pm$ 0.16
Am -FBP-MeOH	24.6 $\pm$ 0.6	19.0 $\pm$ 0.4	28.7 $\pm$ 0.4	18.0 $\pm$ 0.2	0.217 $\pm$ 0.026	19.5 $\pm$ 0.7	22.70 $\pm$ 0.17
Sep-FBP-MeOH-1	4.6 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.2	0.021 $\pm$ 0.001	3.5 $\pm$ 0.2	0.91 $\pm$ 0.01
Sep-FBP-MeOH-2	-	-	-	-	-	-	0.34 $\pm$ 0.16
FBP-HMeOH	116.5 $\pm$ 6.1	89.0 $\pm$ 4.7	130.3 $\pm$ 17.5	97.2 $\pm$ 13.0	0.949 $\pm$ 0.015	57.5 $\pm$ 1.0	33.37 $\pm$ 0.16
Am-FBP-HMeOH	20.7 $\pm$ 1.0	16.3 $\pm$ 0.8	17.4 $\pm$ 1.4	10.9 $\pm$ 0.9	0.145 $\pm$ 0.009	10.9 $\pm$ 0.3	17.71 $\pm$ 0.19
Sep-FBP-HMeOH-1	17.8 $\pm$ 1.6	13.7 $\pm$ 1.3	4.0 $\pm$ 0.9	2.5 $\pm$ 0.6	0.039 $\pm$ 0.004	7.2 $\pm$ 0.3	-
Sep-FBP-HMeOH-2	-	-	-	-	-	-	445.26 $\pm$ 0.95

^a ค่า TEAC (mg trolox/g extract) , ^b VCEAC(mg vitamin C/ g extract)

^c ค่า FRAP values (mmol ของ FeSO₄.7H₂O /g extract) , ^d Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g extract)

^e (mg/g extract) ในเทอมของ pelargonidin-3-glucoside (PGD-3-glu)

บรรณานุกรม

- Anderson, O. M., and K. R. Markham. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Florida: Taylor & Francis, 2006.
- Antolovich, M. et al. "Methods for testing antioxidant activity." The Analyst. 127 (2002): 183-198.
- Arnao, M. B. "Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case." Trends in Food Science and Technology. 11(2000): 419-421.
- Bahorun, T. et al. "Characterization of the phenolic constituents in Mauritian endemic plants as determinants of their antioxidant activities in vitro." Journal of Plant Physiology. 163 (2006): 787-799.
- Benzie, Iris F. F., and J. J. Strain. "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay." Analytical Biochemistry. 239 (1996): 70-76
- Bhandary, M. J., K. R. Chandrashekar, and K. M. Kaveriappa. "Medical ethnobotany of the Siddis of Uttara Kannada district, Karnataka, India." Journal of Ethnopharmacology. 47 (1995): 149-158.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." Food Science and Technology. 28 (1995): 25-30.
- Bronnum-Hansen, K., F. Jacobsen, and J. M. Flink. "Anthocyanin colourants from elderberry (*Sambucus nigra* L.). 1. Process considerations for production of the liquid extract." Journal of Food Technology. 20 (1985): 703-711.
- Cao, Y., and R. Cao. "Angiogenesis inhibited by drinking tea." Nature. 398 (1999): 381.
- Chia, L-S. et al. "Analysis and biological activities of anthocyanins." Phytochemistry. 64 (2003): 923-933.
- Chiriboga, C., and F. J. Francis. "An anthocyanin recovery system from cranberry pomace." Journal of the American Society for Horticultural Science. 95 (1970): 233-236.
- Cooper-Driver, G., and M. Bhattacharya. "Role of phenolics in plant evolution." Phytochemistry. 49 (1998): 1165-1174.

- Davin, L. B., and N. G. Lewis. "Phenylpropanoid metabolism: biosynthesis of monolignols, lignans and neolignans, lignins and suberins." Recent Advances in Phytochemistry. 26 (1992): 325-375.
- De, B., A. Banerjee, and N. Dasgupta. "In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit." Food Chemistry. 90 (2005): 727-733.
- Ferreira, D., and X-C. Li. "Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles." Natural Product Reports. 17 (2000): 193-212.
- Folin, O., and V. Ciocalteu. "On Tyrosine and Tryptophane Determination in proteins." Journal of Biological Chemistry. 73 (1927): 627.
- Francis, F. J. "Food colorants: anthocyanins." Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 28 (1989): 273-314.
- Gulcin, I. et al. "Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach." Journal of Ethnopharmacology. 79 (2002): 325-329.
- Harborne, J. B. Comparative Biochemistry of the Flavonoids. London : Academic Press, 1967.
- Harborne, J. B. Plant Pigments. London: Academic Press, 1988 298-343.
- Harborne, J. B. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 3rd ed. London: Chapman & Hall (1998).
- Holton, T. A., and E. C. Cornish. "Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis." Plant Cell. 7 (1995): 1071-1083.
- Hopkins, W. G., and N. P. A. Huner. Introduction to plant physiology. 3rd ed. New York: John Wiley, (2004) 296-297, 508-510.
- Huang, D., B. Ou., and R. L. Prior. "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays." Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53 (2005): 1841-1856.
- Jagetia, G. C., and M. S. Baliga. "*Syzygium cumini* (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study." Toxicology Letters. 132 (2002): 19-25
- Jiang, Y. et al. "Purification and structural analysis of anthocyanins from litchi pericarp." Food Chemistry. 84 (2004): 601-604.
- Jongen, W. Fruit and vegetable processing : improving quality. Cambridge: Woodhead Publishing, 2002

- Kellog, E. W., and I. Fridovich. "Superoxide hydrogen and singlet oxygen in lipid peroxidizing by a xanthine oxidase system." Journal of Biological Chemistry. 250 (1975): 8812-8817.
- Khanbabaee, K., and T. Van Ree. "Tannins: Classification and Definition." Natural Product Reports. 18 (2001): 641-649.
- Korkina, L.G., and I. B. Afanas'ev. Advances in Pharmacology. San Diego: Academic Press, 1997 151-163.
- Lai, C. S., and L. H. Piette. "Hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation of rat liver microsomes." Biochemical and Biophysical Research Communication. 78 (1977): 51-59.
- Lo, K. M., and P. C. K. Cheung. "Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*." Food Chemistry. 89 (2005): 533-539
- Martinez, S. B., and M. J. Del Valle. "Storage stability and sensory quality of duhat (*Syzygium cumini* Linn.) anthocyanins as food colorant." UP Home Economic Journal. 9 (1981)
- Mazza, G., and E. Miniati. Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains. Florida: CRC Press, (1993)
- Metivier, R. P., F. J. Francis, and F. M. Clydesdale. "Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace." Journal of Food Science. 45 (1980): 1099-1100
- Mol, J. N. M. Polyphenolic Phenomena. Paris: Institut national de la recherche agronomique, (1993)
- Morton, Julia F. Fruits of warm climates. Miami: B&W photographs, 1987 375-378.
- Neelwarne, B et al. "Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *syzygium cumini* Skeels." Food Chemistry. 105 (2007): 619-627
- Ozawa, T., T.H. Lilley and E. Haslam. "Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit." Phytochemistry. 26 (1987): 2937-2942.
- Perkampus, H.-H. UV-Vis Atlas of Organic Compounds. 2nd ed. New York: VCH (1991) 1139.
- Pietta, P.G. "Flavonoids as Antioxidants." Journal of Natural Products. 63 (2000): 1035-1042.
- Pratt, D. E., and B. J. F. Hudson. Food Antioxidants. London: Elsevier Applied Science, (1990)
- Prior, R. L. et al. "Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species." Journal of Agricultural and Food Chemist. 46 (1998): 2686-2693.

- Pulido, R., L. Bravo and F. Saura-Calixto. "Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay." Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48 (2000): 3396-3402.
- Rastogi, R.M., and B. N. Mehrotra. Compendium of Indian Medicinal Plants. New Delhi: Publication and Information Directorate, 1990 388-389.
- Rice-Evans, C., N. Miller, and G. Paganga. "Antioxidant properties of phenolic compounds." Trends in plant science. 2 (1999) : 152-159.
- Robards, K. et al. "Methods for testing antioxidant activity." The Analyst. 127 (2002) : 183-198.
- Seymour, G. B., J. E. Taylor, and G. A. Tucker. Biochemistry of fruit ripening. London: Chapman & Hall, 1993.
- Shahidi, F., and M. Naczk. Phenolics in Food and Nutraeuticals. New York: CRC Press, 2004.
- Singleton, V. L., and J. A. Rossi Jr. "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents." American Journal of Enology and Viticulture. 16 (1965): 144-158.
- Škerget, M. et al. "Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities." Food Chemistry. 89 (2005): 191-198.
- Southon, S., and R. Faulks. Fruit and vegetable processing. Improving quality. Cambridge: Woodhead Publishing, 2002.
- Stintzing, F. C. et al. "Color and Antioxidant Properties of Cyanidin-Based Anthocyanin Pigments." Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50 (2002): 6172-3181.
- Tanaka, T. "Cancer chemoprevention by natural products." Oncology Report. 1 (1994): 1139-1155.
- Tsuda, T. et al. "Antioxidative Activity of the Anthocyanin Pigments Cyanidin 3-O-β-D-Glucoside and Cyanidin." Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42 (1994): 2407-2410.
- Venkateswarlu, G. "On the nature of the colouring matter of the jambul fruit (*Eugenia jambolana*)." Journal of Indian Chemical Society. 29 (1952): 434-437.
- Vinson, J. A et al. "Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits." Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49 (2001): 5315-5321.

- Wang, S. Y., and H-S. Lin. "Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage." Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48 (2000): 140-146.
- Warrier, P.K. et al. Indian Medicinal Plants: a compendium of 500 species. 2nd ed. Kottallal: Orient Longman 1995.
- Wealth of India. Raw materials (Vol X). New Delhi: CSIR 1976 100-104.
- Wiseman, H., and B. Halliwell. "Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer." Biochemistry Journal. 313 (1996): 17-29
- Wrolstad, R. E. Color and pigment analysis in fruit products (Station Bulletin Vol 6). Oregon State University, Agricultural Experiment Station, OR, USA 1976 621.
- Yildirim, A. et al. "Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC), sage (*Salvia triloba* L.), and black tea (*Camellia sinensis*) extracts." Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48 (2000): 5030-5034.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธี DPPH

การคำนวณ %Remaining DPPH[•] ค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และ ค่า Vitamin C Equivalent antioxidant capacity (VCEAC)

การคำนวณ %Remaining DPPH[•]

สารละลายมาตรฐาน trolox ความเข้มข้น 0.104 mg/mL มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm = 0.87539 ค่า Abs control = 1.3171

$$\begin{aligned}\% \text{Remaining DPPH}^{\bullet} &= (\text{Abs sample} / \text{Abs control}) \times 100 \\ &= (0.87539 / 1.3171) \times 100 \\ &= 66.46\end{aligned}$$

การคำนวณหาค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

ในการคำนวณหาค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) นั้นคำนวณได้จากเทียบค่า EC₅₀ ของ Trolox กับค่า EC₅₀ ของสารสกัดตัวอย่าง โดยค่า EC₅₀ ของ Trolox = 0.154 (mg/mL) และค่า EC₅₀ ของสารสกัดตัวอย่าง (FBS-HMeOH) = 0.233 mg/mL

∴ สารสกัดตัวอย่าง 0.233 mg equivalent กับ Trolox 0.154 mg

$$\text{สารสกัดตัวอย่าง } 1 \text{ g equivalent กับ Trolox } \frac{0.154 \text{ mg} \times 1 \text{ g}}{0.233 \text{ mg}}$$

$$\begin{aligned}\text{equivalent กับ Trolox} &= 0.661 \text{ g} \\ &= 661 \text{ mg/g extract}\end{aligned}$$

สารสกัดเมล็ดลูกหว้าสดระยะผลสุกมีค่า Trolox equivalent 661 mg/g extract

การคำนวณหาค่า Vitamin C Equivalent antioxidant capacity (VCEAC)

ในการคำนวณหาค่า Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) นั้นคำนวณได้จากเทียบค่า EC_{50} ของ Vitamin C กับค่า EC_{50} ของสารสกัดตัวอย่าง โดยค่า EC_{50} ของ Vitamin C = 0.121 (mg/mL) และ ค่า EC_{50} ของสารสกัดตัวอย่าง(FBS-HMeOH) = 0.233 mg/mL

$$\begin{aligned} \therefore \text{สารสกัดตัวอย่าง } 0.233 \text{ mg} & \quad \text{equivalent กับ Vitamin C } 0.121 \text{ mg} \\ \text{สารสกัดตัวอย่าง } 1 \text{ g} & \quad \text{equivalent กับ Vitamin C } \frac{0.121 \text{ mg} \times 1 \text{ g}}{0.233 \text{ mg}} \\ & \quad \text{equivalent กับ Vitamin C} = 0.519 \text{ g} \\ & \quad = 519 \text{ mg/g extract} \end{aligned}$$

สารสกัดเมล็ดลูกหว้าสเคราะห์ผลสุกมีค่า VCEAC เท่ากับ 519 mg/g extract

ภาคผนวก ข

วิธี ABTS

การคำนวณ % Remaining ABTS⁺⁺ ค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และ ค่า Vitamin C Equivalent antioxidant capacity (VCEAC)

การคำนวณ % Remaining ABTS⁺⁺

สารสกัดตัวอย่าง (DPP-MeOH) ความเข้มข้น 3.00 mg/mL มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm = 0.3138 และค่า Abs control = 0.7121

$$\begin{aligned} \% \text{Remaining ABTS}^{++} &= (\text{Abs sample} / \text{Abs control}) \times 100 \\ &= (0.3138 / 0.7121) \times 100 \\ &= 44.07 \end{aligned}$$

การคำนวณหาค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

ในการคำนวณหาค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) นั้นคำนวณได้จากเทียบค่า EC_{50} ของ Trolox กับค่า EC_{50} ของสารสกัดตัวอย่าง โดยค่า EC_{50} ของ Trolox = 0.149 (mg/mL) และค่า EC_{50} ของสารสกัดตัวอย่าง (DPP-MeOH) = 2.72 mg/mL

∴ สารสกัดตัวอย่าง 2.72 mg equivalent กับ Trolox 0.149 mg

สารสกัดตัวอย่าง 1 g equivalent กับ Trolox $\frac{0.149 \text{ mg} \times 1 \text{ g}}{2.72 \text{ mg}}$

$$\begin{aligned} \text{equivalent กับ Trolox} &= 0.0548 \text{ g} \\ &= 54.8 \text{ mg/g extract} \end{aligned}$$

สารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าแก่อบแห้งมีค่า TEAC เท่ากับ 54.8 mg/g extract

การคำนวณหาค่า Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC)

ในการคำนวณหาค่า Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) นั้นคำนวณได้จากเทียบค่า EC_{50} ของ Vitamin C กับค่า EC_{50} ของสารสกัดตัวอย่าง โดยค่า EC_{50} ของ Vitamin C = 0.138 (mg/mL) และค่า EC_{50} ของสารสกัดตัวอย่าง (DPP-MeOH) = 2.72 mg/mL

∴ สารสกัดตัวอย่าง 2.72 mg equivalent กับ Vitamin C 0.138 mg

สารสกัดตัวอย่าง 1 g equivalent กับ Vitamin C $\frac{0.138 \text{ mg} \times 1 \text{ g}}{2.72 \text{ mg}}$

$$\begin{aligned} \text{equivalent กับ Vitamin C} &= 0.0507 \text{ g} \\ &= 50.7 \text{ mg/g extract} \end{aligned}$$

สารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าแก่อบแห้งมีค่า VCEAC เท่ากับ 50.7 mg/g extract

ภาคผนวก ก

วิธี FRAP

การคำนวณความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ของสารตัวอย่าง และ ค่า FRAP values

การคำนวณความเข้มข้นของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ของสารตัวอย่างจากกราฟ

จากกราฟรูปที่ 46 ได้สมการของกราฟมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ดังนี้คือ

$$y = 1.081x + 0.026$$

$$y = \text{ผลต่างของ Abs ที่วัดได้} - \text{Abs control วัดที่ความยาวคลื่น 593 nm}$$

$$x = \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O (mM)}$$

สารตัวอย่างสารสกัดเนื้อมะพร้าวสกัดด้วยเมทานอล (FBP-MeOH) ความเข้มข้น 5.01 mg/mL ได้ค่าเฉลี่ย ($A_{593}\text{Sam} - A_{593}\text{Con}$) เท่ากับ 0.8513

$$y = 1.081x + 0.026$$

$$0.8513 = 1.081x + 0.026$$

$$x = \frac{(0.8513 - 0.026)}{1.081}$$

$$x = 0.763 \text{ mM}$$

การคำนวณหาค่า FRAP values

FRAP values คือ mmol equivalent ของ Fe(II)/L กับ สารสกัดตัวอย่าง g/L

สารสกัดตัวอย่าง (FBP-MeOH) ความเข้มข้นของตัวอย่าง 5.01 g/L มีค่า $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เท่ากับ 0.763 mM หรือ 0.763 mmol/L

หมายความว่า สารสกัดตัวอย่าง 5.01 g	มีค่า FRAP values	0.763 mmol
ถ้า สารสกัดตัวอย่าง 1 g	มีค่า FRAP values	$\frac{0.763 \text{ mmol} \times 1 \text{ g}}{5.01 \text{ g}}$
		= 0.152 mmol

สารสกัดเนื้อมะพร้าวสกัดด้วยสุกมีค่า FRAP values 0.152 mmol/g extract

ภาคผนวก ง

ใช้ Folin-Ciocalteu method

การคำนวณความเข้มข้นของ Gallic acid ของสารตัวอย่าง และ ค่า Gallic acid equivalent (GAE)

การคำนวณความเข้มข้นของ Gallic acid ของสารตัวอย่างจากกราฟ

จากกราฟรูปที่ 50 ได้สมการของกราฟมาตรฐาน Gallic acid ดังนี้คือ

$$y = 10.40x - 0.038$$

$$y = \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm}$$

$$x = \text{Gallic acid (mg/mL)}$$

สารตัวอย่างสารสกัดเนื้อเปลือกลูกหว้าสีม่วงดำอบแห้งสกัดด้วยเมทานอล (DBP-MeOH)

ความเข้มข้น 6.00 mg/mL ได้ค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.89756

$$y = 10.40x - 0.038$$

$$0.89756 = 10.40x - 0.038$$

$$x = \frac{(0.89756 + 0.038)}{10.40}$$

$$x = 0.0900 \text{ mg/mL}$$

การคำนวณหาค่า Gallic acid equivalent (GAE) (mg/g extract)

สารสกัดตัวอย่าง (DBP-MeOH) ความเข้มข้น 6.00 mg/mL มี Gallic acid เท่ากับ 0.0900 mg/mL

หมายความว่า สารสกัดตัวอย่าง 6.00 mg มีค่า Gallic acid equivalent 0.0900 mg

$$\text{ถ้า สารสกัดตัวอย่าง 1 g มีค่า Gallic acid equivalent } \frac{0.0900 \text{ mg} \times 1 \text{ g}}{6.00 \text{ mg}}$$

$$= 15.0 \text{ mg}$$

สารสกัดเมล็ดลูกหว้าสีม่วงดำอบแห้งมีค่า Gallic acid equivalent 15.0 mg /g extract

ภาคผนวก จ

วิธี pH differential

การคำนวณความเข้มข้นของ แอนโทไซยานินและ ปริมาณ แอนโทไซยานิน (mg / g extract) ใน
 เทอมของ pelargonidin-3-glucoside (PGD-3-glu)

การคำนวณหาค่า ความเข้มข้นของ แอนโทไซยานิน ในเทอมของ pelargonidin-3-glucoside
 (PGD-3-glu)

ความเข้มข้นของ Anthocyanin ในเทอมของ pelargonidin-3-glucoside (PGD-3-glu) ได้จาก

$$\text{Absorbance}(A) = (A_{520\text{pH}1} - A_{700\text{pH}1}) - (A_{520\text{pH}4.5} - A_{700\text{pH}4.5})$$

$$\text{Total Anthocyanin}(\text{mg/L}) = (A/22400^a)(433.2^b)(5^c)(10^3)$$

$$\text{เมื่อ } 10^3 = \text{conversion factor}$$

$$a = \text{molar extinction coefficient of PGD-3-glu}$$

$$b = \text{PGD-3-glu molecular weight}$$

$$c = \text{dilution factor}$$

การคำนวณความเข้มข้นของแอนโทไซยานินในเทอมของ pelargonidin-3-glucoside (PGD-3-glu) ของ FBP-MeOH ดังนี้

$$\text{Absorbance}(A) = (A_{520\text{pH}1} - A_{700\text{pH}1}) - (A_{520\text{pH}4.5} - A_{700\text{pH}4.5})$$

$$\text{Absorbance}(A) = (0.4068 - 0.0322) - (0.0159 - 0.0077)$$

$$= 0.3664$$

$$\text{ความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน}(\text{mg/L}) = (A/22400^a)(433.2^b)(5^c)(10^3)$$

$$= (0.3664 / 22400) \times 433.2 \times 5 \times 1000$$

$$= 35.43 \text{ mg/L}$$

ในการทำนองเดียวกันการคำนวณความเข้มข้นของแอนโทไซยานินในเทอมของ malvidin-3,5-diglucoside(Mvd-3,5-diglu) ใช้ค่า molar extinction coefficient เท่ากับ 37,700 และ molecular weight เท่ากับ 655.5 แทนของ PGD-3-glu

การคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานิน (mg / g extract)

ตัวอย่าง FBP-MeOH มีความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน มีค่าเท่ากับ 35.43 mg / L

ตัวอย่างเจือจาง 20 เท่า จาก 1.0975 g/10.00 mL

∴ ความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน มีค่าเท่ากับ $35.43 \times 20 \text{ mg / L} = 708.6 \text{ mg/L}$

สารละลาย 1000 mL มีปริมาณแอนโทไซยานิน	708.6 mg
สารละลาย 5.00 mL มีปริมาณแอนโทไซยานิน	$708.6 \text{ mg} \times 5.00 \text{ mL}$
	1000 mL
	= 3.543 mg
สารสกัดลูกหว้า 1.00 mL มีปริมาณแอนโทไซยานิน	3.543 mg
สารสกัดลูกหว้า 10.00 mL มีปริมาณแอนโทไซยานิน	$3.543 \text{ mg} \times 10.00 \text{ mL}$
	1.00mL
	= 35.43 mg
สารสกัดลูกหว้า 1.0975 g มีปริมาณแอนโทไซยานิน	35.43 mg
สารสกัดลูกหว้า 1.0000 g มีปริมาณแอนโทไซยานิน	$35.43 \text{ mg} \times 1.000 \text{ g}$
	1.0975 g
	= 32.28 mg

สารสกัดเนื้อกับเปลือกลูกหว้าสุก(FBP-MeOH) มีปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 32.28 mg
(PGD-3-glu) / g extract และเท่ากับ 29.01 mg(Mvd-3,5-diglu) / g extract

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวนิตยา เพ็ญอ่อน
ที่อยู่	75/515 ตำบลบางตลาด อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี 11120
ที่ทำงาน	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวัง สนามจันทร์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000 โทรศัพท์ (034) 255797
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2543	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต วิชาเอกเคมี จากมหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม
พ.ศ. 2546	ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเคมีศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประวัติการทำงาน	
พ.ศ. 2543-ปัจจุบัน	ผู้ช่วยสอน ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม