รหัสโครงการ SUT1-104-48-24-06

รายงานการวิจัย

การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารแอนติออกซิแดนท์ในเมล็ดมะขามและผลิตภัณฑ์

(Determination of Biochemical Properties of Antioxidative Compounds in Tamarind Seeds (*Tarmarindus indica* Linn.) and Their Products)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ **SUT1-104-48-24-06**

รายงานการวิจัย

การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารแอนติออกซิแดนท์ในเมล็ดมะขามและผลิตภัณฑ์

(Determination of Biochemical Properties of Antioxidative Compounds in Tamarind Seeds (*Tarmarindus indica* Linn.) and Their Products)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์

สาขาวิชาเภสัชวิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ศาสตราจารย์ ดร. ไมตรี สุทธจิตต์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะเนตร จันทร์ถิระติกุล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประไพรัตน์ สีพลไกร

อาจารย์ ดร. สุจินต์ อังกุราวิรุทธ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2557

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2549 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่เล็งเห็นความสำคัญและให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้อย่างต่อเนื่องรวมทั้งความอดกลั้นที่โครงการนี้ล่าช้ากว่ากำหนด ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันวิจัยและพัฒนา สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยนเรศวร (วิทยาเขตพะเยา) สำหรับสถานที่ทำการวิจัย อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย ตลอดจนการอำนวยความสะดวกและบริการในทุก ๆส่วนที่เกี่ยวข้อง ความล่าช้าที่เกิดขึ้นของโครงการวิจัยนี้อยู่ที่การเขียนรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ซึ่งมีเหตุผลหลายประการที่ทำให้เกิดความล่าช้าโดยใช่เหตุ ทั้งนี้หัวหน้าโครงการวิจัยมีความประสงค์ให้รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ออกมาในรูปแบบที่มีคุณภาพเพื่อให้คุ้มกับเวลาและเงินทุนที่ใช้ในการทำวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยขอรับผิดแต่เพียงผู้เดียวในความล่าช้าและความบกพร่องที่อาจพบในรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้ ส่วนความดี หรือประโยชน์อันใดที่อาจเกิดขึ้นสืบเนื่องจากโครงการวิจัยนี้ ขอยกประโยชน์ให้มหาวิทยาลัยที่เกี่ยวข้อง คณาจารย์ผู้ร่วมวิจัย และทีมงานทุกคน โดยเฉพาะผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะเนตร จันทร์ถิระติกุล ศาสตราจารย์ ดร. ไมตรี สุทธจิตต์ และผู้ช่วยวิจัยที่ทำงานอย่างแข็งขัน นางสาวขวัญยืน เลี่ยมสำโรงที่ช่วยผลักดันให้โครงการสำเร็จลุล่วงไปได้ดี

ขอขอบคุณ รศ. ดร. นวลน้อย จูฑะพงษ์ และ นางสาวจิตานันท์ ติกุลที่กรุณาให้คำแนะนำด้านการวิเคราะห์ทางสถิติ ดร. พัชรวรรณ สิทธิศาสตร์ นางสาวรัตนา เกียรติทรงชัย นางสาวเบญจวรรณ ดุนขุนทด และนางสาวเบญจมาศ ศาลางามที่ให้ความช่วยเหลือในงานด้านเอกสาร การกรอกข้อมูลและวิเคราะห์ทางสถิติ ความดี ความสดใสและความมีน้ำใจต่อกันของลูกศิษย์ที่น่ารักทุกคนเป็นแรงผลักดันให้ผู้วิจัยสามารถทำงานอย่างมีความสุข ลืมความเหน็ดเหนื่อย และไม่เคยย่อท้อต่ออุปสรรคนานาประการ

ท้ายสุดขอขอบคุณคุณพ่อ-คุณแม่ สมาชิกในครอบครัว รศ. ดร. ทวิช จิตรสมบูรณ์ และ นายโพธิพล จิตรสมบูรณ์ที่เป็นขวัญและกำลังใจ เป็นน้ำหล่อเลี้ยงให้มีพลังในการทำงานและฟันฝ่าอุปสรรคทั้งปวงจนท้ายสุดสามารถปิดโครงการวิจัยและสามารถเขียนรายงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงได้ดี แม้จะใช้ระยะเวลานานมากกว่าที่คาดหวังไว้

เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขาม (*Tamarindus indica* Linn.) โดยตัวทำละลายต่างชนิดคือ เอธานอล (EtOH) เมธานอล (MeOH) น้ำกลั่น (W) น้ำกับอะซิโตน (1:1 v/v) (W+Ac) เมธานอลกับอะซิโตน (1:1 v/v) (MeOH+Ac) ด้วยวิธี soxlet และเมธานอลกับอะซิโตน (1:1 v/v) ด้วยวิธีการแช่ก่อนสกัดต่อด้วย soxlet (MeOH+Ac) (แช่) พบว่า EtOH เป็นตัวทำละลายที่สกัดสารได้สูงสุดคือ ร้อยละ 63.06 (กรัมต่อ น.น.กรัมแห้ง) และสารที่สกัดด้วย MeOH+Ac (แช่) มีปริมาณฟีนอลรวมและ procyanidin สูงกว่าสารที่สกัดด้วย MeOH+Ac และ W+Ac ตามลำดับ ผลการทำให้บริสุทธิ์ของสารที่สกัดด้วย MeOH+Ac (แช่) โดยคอลัมน์ sephadex LH 20 และแยกเป็นแฟรกชัน พบว่าแฟรกชัน F2 และ F3 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงกว่าแฟรกชันอื่นและดีกว่าสารสกัดที่ยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดด้วยวิธี TLC, UV-VIS spectrometry, FT-IR spectrometry และ การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของสารกลุ่มฟีนอลลิกให้ผลสอดคล้องกัน คือสารสกัดประกอบด้วยสารกลุ่ม oligomeric proanthocyanidins, catechin และ epicatechin การวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าสารที่สกัดด้วย MeOH+Ac (แช่) และ MeOH มีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลลิกสูงสุด และสารส่วนใหญ่เป็น catechin, epicatechin, myricetin และ procyanidin B1 การศึกษาฤทธิ์และกลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน พบว่าในวิธี DPPH สารที่สกัดด้วย MeOH+Ac (แช่) MeOH W+Ac และ MeOH+Ac มีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกัน และมีฤทธิ์สูงกว่าสารมาตรฐาน rutin แต่ต่ำกว่าสารมาตรฐาน gallic acid และ quercetin การทดสอบสารที่สกัดด้วย MeOH+Ac (แช่) W+Ac MeOH+Ac ด้วยวิธี $ABTS^{\bullet+}$และ chelating property พบว่า สารสกัดทั้งสามมีฤทธิ์ทัดเทียมกันและมีค่าเทียบเท่าสารมาตรฐานของแต่ละวิธีการทดสอบ การตรวจสอบด้วยวิธี FRAP พบว่าสารสกัดด้วย MeOH+Ac (แช่) มีฤทธิ์สูงกว่าสารที่สกัดด้วย W+Ac และ MeOH+Ac ตามลำดับ และมีค่าสูงกว่าสารมาตรฐาน trolox นอกจากนั้น สารที่สกัดด้วย MeOH+Ac (แช่) ยังมีฤทธิ์ต้าน hemolysis สูงกว่าสารมาตรฐาน trolox เช่นกัน โดยภาพรวม สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยกลไกหลายรูปแบบ และมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารมาตรฐานต่าง ๆ ดังนั้น จึงควรค่าต่อการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระในระดับเซลล์และสัตว์ทดลองต่อไป

Abstract

The antioxidant compounds from tamarind (*Tamarindus indica* Linn.) seed pericarps were extracted by different solvents, namely ethanol (EtOH), methanol (MeOH), distilled water (W), water and acetone (1:1 v/v) (W+Ac), methanol and acetone (1:1 v/v) (MeOH+Ac) using soxlet apparatus, and methanol and acetone (1:1 v/v) using maceration before soxlet extraction $(MeOH+Ac)_{(mac)}$. The EtOH extract had the highest recovery yield of 63.06% (g/g dry wt.), while the MeOH+Ac $_{(mac)}$ extract provided the greatest contents of total phenolic and procyanidin. Further purification and fractionation of MeOH+Ac $_{(mac)}$ extract by sephadex LH 20 revealed that the fractions F2 and F3 had higher antioxidant activity than any other fractions including the unpurified extract, as assessed by the DPPH assay. The identification of polyphenolic components of the extract, using TLC, UV-VIS spectrometry, FT-IR spectrometry, and the basic tests of phenolic compounds, indicated the similarity of major constituents of oligomeric proanthocyanidins, catechin and epicatechin. The HPLC analysis confirmed that MeOH+Ac $_{(mac)}$ and MeOH extracts possess the highest total phenolic content, and the dominant polyphenolic profiles were catechin, epicatechin, myricetin, and procyanidin B1. The study of antioxidant capacity of the extracts, assessed by various methods with different underlying mechanisms, revealed that the extracts of MeOH+Ac $_{(mac)}$, MeOH, W+Ac, and MeOH+Ac has similar IC_{50} values in the DPPH assay. Their antioxidant activities were higher than the antioxidant standard rutin but lower than gallic acid and quercetin. The studies of $ABTS^{\bullet+}$ and chelating property also showed similar antioxidant activities of MeOH+Ac $_{(mac.)}$, W+Ac, and MeOH+Ac extracts, and their activities were comparable to their corresponding antioxidant standards in each assay. In the FRAP assay, MeOH+Ac $_{(mac)}$ displayed the highest reducing capability than W+Ac and MeOH+Ac extracts, respectively, and the activity was higher than the standard trolox. Similarly, MeOH+Ac $_{(mac)}$ also exhibited higher inhibitory effect on hemolysis of human red blood cells than the standard trolox. Overall, the polyphenolic compounds extracted from tamarind seed pericarps possess high antioxidant potential as comparable to many gold standards, and the antioxidant activities can occur through different defense mechanisms. The antioxidant-related biologic activity of the extract *in vitro* and *in vivo* should be worthwhile for further investigation.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพประกอบ	ซ
สารบัญแผนภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
3. ขอบเขตงานวิจัย	2
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 การวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพ	4
1. บทบาทอนุมูลอิสระต่อสุขภาพและการเกิดโรค	6
2. แหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ	9
3. สารต้านอนุมูลอิสระ	10
4. การหาขีดความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
1. ประเภทของงานวิจัย	22
2. วัสดุอุปกรณ์ในการวิจัย	22
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	22
2.2 สารเคมี	23
3. วิธีการทดลองแผนการวิจัย	
3.1 การเตรียมตัวอย่างเปลือกเมล็ดมะขาม	24
3.2 ขั้นตอนการสกัด	24

สารบัญเรื่อง

บทที่	หน้า
3.3 ขั้นตอนการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sepadex LH20	26
3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม	29
3.5 การวัดปริมาณสารออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ	32
3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	33
3.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด	36
4. การวิเคราะห์ข้อมูล	37
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์การทดลอง	
1. ผลการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ	38
2. ผลการทำสารสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20	39
3. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม	43
4. ผลทดสอบการหาปริมาณสารออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ	59
5. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในตัวทำละลายต่างชนิด	59
6. ผลทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด	65
7. ผลการตกตะกอนแทนนินด้วยนมสด	67
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	68
บรรณานุกรม	70
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก ผลการหาปริมาณฟีนอลรวม และปริมาณ procyanidin ของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม	79
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณ สารประกอบฟีนอลลิก ด้วยเครื่อง HPLC	84
ประวัติผู้วิจัย	92

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1. Reactive oxygen และ nitrogen species ที่มีความสำคัญทางชีวภาพ 5
2. สรุปวิธีการตรวจวัดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ใช้กันโดยทั่วไป 17
3. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 23
4. การตรวจสอบฟลาโวนอยด์โดยทำปฏิกิริยากับด่าง และสีที่พบหลังปฏิกิริยา 30
5. สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC 31
6. การตั้งโปรแกรมที่ใช้ในระบบการชะล้างแบบเกรเดียนท์ของคอลัมน์ HPLC ในการหา ปริมาณฟลาโวนอยด์ 32
7. การตั้งโปรแกรมที่ใช้ในระบบการชะล้างแบบเกรเดียนท์ของคอลัมน์ HPLC ในการหาปริมาณกรดฟีโนลิกในสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม 32
8. น้ำหนักของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยตัวทำละลายต่างชนิด 38
9. ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยตัวทำลายต่างชนิด 39
10. น้ำหนักของสารสกัดและ % Recovery ของสารสกัดก่อนและหลังการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20 42
11. ค่า R_f ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามและสารมาตรฐาน 53
12. เวลารีเทนชัน สมการเส้นตรง และค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ของสารมาตรฐานที่ใช้อ้างอิงในเทคนิคโครมาโทการฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง 55
13. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามโดยวิธี HPLC 56
14. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามซึ่งผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20 โดยวิธี HPLC 57
15. ปริมาณฟีนอลรวมและปริมาณ procyanidin ในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม 59
16. ค่า IC_{50}, TEAC, AEAC ของสารมาตรฐานและสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม 61
17. ค่า IC_{50} และ AEAC ของสารมาตรฐานและสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม 62
18. ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน และสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม 62
19. ปริมาณฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ค่า TEAC ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม 63
20. ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน และสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม เมื่อตรวจสอบโดยวิธี chelating property 64

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
21. ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามเปรียบเทียบมาตรฐาน trolox เมื่อตรวจสอบโดย FRAP assay	65
ก.1 ผลค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของ gallic acid และสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม	80
ก. 2 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสารมาตรฐาน และสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม	82

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1. โครงสร้างของสารประกอบบางชนิดในกลุ่มฟีนอล 16
2. โครงสร้างตัวอย่างของ oligomeric proanthrocyhanidin ชนิดหนึ่งที่พบในเมล็ดองุ่น 20
3. โครงสร้างพื้นฐานและการเรียงลำดับตำแหน่งต่าง ๆ ในโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ 20
4. สเปคตรัมของสารมาตรฐาน OPCs 43
5. สเปคตรัมของสารมาตรฐาน rutin 44
6. สเปคตรัมของสารมาตรฐาน quercetin 44
7. สเปคตรัมของสารมาตรฐาน gallic acid 45
8. สเปคตรัมของสารมาตรฐาน catechin 45
9. สเปคตรัมของสารมาตรฐาน epicatechin 45
10. สเปคตรัมของสารมาตรฐาน luteolin 46
11. สเปคตรัมของสารมาตรฐาน apigenin 46
12. สเปคตรัมของสารมาตรฐาน myricetin 47
13. สเปคตรัมของสารมาตรฐาน keamferol 47
14. สเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม ด้วยตัวทำละลายต่างชนิด 47
15. สเปคตรัมของสารมาตรฐานกับสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม 48
16. สเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (EtOH) 49
17. สเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (MeOH) 49
18. สเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (W) 49
19. สเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (MeOH+Ac) 50
20. สเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (W+Ac) 50
21. สเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (MeOH+Ac(แช่)) 50
22. การเคลื่อนที่ของสารมาตรฐานและสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามบนแผ่น TLCและพ่นด้วยสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.2 M 51
23. การเคลื่อนที่ของสารมาตรฐานและสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามบนแผ่น TLC และพ่นด้วยสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.2 M 52

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

24. ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition ของสารมาตรฐานกับสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$ 63
25. ความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการแตกหักของเม็ดเลือดแดงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน trolox 66
26. ความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการแตกหักของเม็ดเลือดแดงกับความเข้มข้นจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) 66
27. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณนมที่ใช้ในการตกตะกอนแทนนินของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามกับปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัด 67

ข.1 กราฟมาตรฐานของ catechin 85

ข.2 กราฟมาตรฐานของ epicatechin 85

ข.3 กราฟมาตรฐานของ rutin 86

ข.4 กราฟมาตรฐานของ quercetin 86

ข.5 กราฟมาตรฐานของ procyanidin B1 86

ข.6 กราฟมาตรฐานของ procyanidin B2 87

ข.7 กราฟมาตรฐานของ keamferol 87

ข.8 กราฟมาตรฐานของ naringenin 87

ข.9 กราฟมาตรฐานของ myricetin 88

ข.10 โครมาโตรแกรมของสารมาตรฐานในกลุ่มฟลาโวนอยด์ หมายเลข 2 คือ procyanidin B1 หมายเลข 3 คือ naringenin และหมายเลข 4 คือ kaemferol 88

ข.11 โครมาโตรแกรมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยอะซิโตนกับเมธานอล (แช่) 89

ข.12 โครมาโตรแกรมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (F1) 89

ข.13 โครมาโตรแกรมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (F2) 89

ข.14 โครมาโตรแกรมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (F5) 90

ข.15 โครมาโตรแกรมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (F6) 90

บัญชีแผนภาพ

แผนภาพ **หน้า**

1. ขั้นตอนการสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเอธานอล 25
2. ขั้นตอนการสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยอะซิโตนกับเมธานอล (แช่) 26
3. ขั้นตอนการสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วย น้ำ เฮกเซน และเอทิลอะซิเตรต 27
4. ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบ EtAc ด้วย sephedex LH 20 28
5. ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบจากชั้น F2 ด้วย sephedex LH 20 28
6. ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบจากชั้น F3 ด้วย sephedex LH 20 29
7. ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบจากชั้น F4 ด้วย sephedex LH 20 29
8. ผลของการเตรียมสารสกัดก่อนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20 40
9. ผลการแยกสารสกัดหยาบ EtAc ด้วย sephedex LH 20 40
10. ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบจากชั้น F2 ด้วย sephedex LH 41
11. ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบจากชั้น F3 ด้วย sephedex LH 20 41
12. ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบจากชั้น F4 ด้วย sephedex LH 20 41

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นอะตอม โมเลกุล หรืออิออนที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ (unpaired electron) อยู่วงโคจรรอบนอก ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นลูกโซ่อย่างต่อเนื่อง สามารถดึงอิเล็กตรอนจากสารชีวโมเลกุลหลายชนิด เช่น ไขมัน โปรตีน และ ดีเอ็นเอ ทำให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์ และก่อให้เกิดโรคและความเสื่อมหลายอย่าง (Halliwell and Gutteridge 1999; Cross et al., 1987) การตรวจวัดอนุมูลอิสระโดยตรงกระทำได้ยาก เนื่องจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาสูงมาก จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง เช่น electron spin resonance เป็นต้น อย่างไรก็ดี การวัดปริมาณอนุมูลอิสระสามารถกระทำได้ทางอ้อม โดยวัดการออกฤทธิ์ (activity) ของสารแอนติออกซิแดนท์ หรือที่นิยมเรียกกันว่าสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ พบได้หลายกลุ่ม ได้แก่ วิตามิน และฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารกลุ่มหลังพบมากที่สุดในสารประเภทพฤกษเคมี (phytochemicals) และในปัจจุบันเป็นกลุ่มสารที่กำลังได้รับความนิยมและความสนใจอย่างยิ่งในหลายวงการ เนื่องจากมีการนำไปประยุกต์ใช้ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดภายในร่างกายอันเป็นสาเหตุหลักของความเสื่อมสภาพ การก่อโรค หรือเพิ่มความรุนแรงในโรคต่าง ๆ มากมาย แม้กลไกการทำงานของสารกลุ่มพฤกษเคมีโดยเฉพาะกลุ่มฟลาโวนอยด์ยังไม่เป็นที่ทราบเด่นชัด แต่ในปัจจุบันมีหลายบริษัทที่ผลิตสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมออกจำหน่ายอย่างแพร่หลาย เช่น สารสกัดจากแปะก๊วย เปลือกต้นสน เมล็ดองุ่น และชาเขียว เป็นต้น (ไมตรี สุทธจิตต์ และคณะ 2541)

ผลมะขาม *(Tamarindus indica* L.*)* มีคุณค่าทางอาหารและสุขภาพหลายด้าน เนื้อมะขามใช้ประกอบอาหารทำให้มีรสชาติอร่อย ทำเป็นเครื่องดื่มแก้กระหายน้ำ และใช้เป็นยาระบายท้องได้ดี เมล็ดมะขามมีส่วนประกอบสำคัญที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเฉพาะเนื้อในของเมล็ดมะขามมีสารอาหารหลายชนิด ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต เส้นใยอาหาร โปรตีน วิตามิน เช่น ไนอะซิน ไธอามีน โรโบฟลาวิน และแร่ธาตุต่าง ๆได้แก่ แคลเซียม เหล็ก ฟอตเฟต และมีสารสำคัญทางชีวภาพ เช่น สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันคือ เบต้า-กลูแคน สารต้านการติดเชื้อ สารฆ่าพยาธิ และสารลดคอเลสเตอรอลและไลโปโปรตีนฯลฯ (Bhadoriya et al., 2011; Caluwé et al., 2010; Martinello et al., 2006) ส่วนที่เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีสารสำคัญทางชีวภาพหลายชนิด โดยเฉพาะสารกลุ่ม oligomeric proanthocyanidins (OPC) (Caluwé et al., 2010; Martinello et al., 2006) ซึ่งเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันจากสารเคมีและรังสีอัลตราไวโอเลต และต่อต้าน

การอักเสบ ต้านจุลินทรีย์ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นอีกมากมาย (Bagchi et al., 2000; Packer et al., 1999)

เมล็ดมะขามเป็นส่วนที่เหลือทิ้งจากการรับประทานและจากอุตสาหกรรมมะขาม เปลือกหรือส่วนนอกของเมล็ดมะขามเป็นส่วนที่มีสีแดงเข้มและมีรสฝาดอยู่มาก ในอัฟริกาใช้แก้บิด และต้มเอาน้ำมาชะล้างแผล ฝี ในภาคเหนือของประเทศไทย มีการเติมสารสกัดจากเปลือกมะขามลงในกาแฟโบราณ มีรายงานว่าสารสกัดเอธานอลจากเปลือกของเมล็ดมะขามมีความสามารถต้านออกซิเดชั่น (antioxidant capacity) ซึ่งวัดโดยวิธีการยับยั้งการเกิดสีในปฏิกิริยาของ 2,2′ -azino-bis (3-ethylvenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) / metmyoglobin / H_2O_2 โดยเปลือกเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมากเมื่อเทียบกับส่วนอื่น ๆ ของมะขาม และเมล็ดของพืชชนิดอื่น ๆ (Pumthong, 1999)

จากการค้นพบว่าส่วนประกอบของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีสาร OPC ซึ่งมีฤทธิ์ชีวภาพมากมายเป็นองค์ประกอบ และเปลือกของเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับส่วนประกอบทางเคมีของเมล็ดมะขามยังมีปริมาณจำกัด และกลไกการทำงานทางชีวภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในเปลือกเมล็ดมะขามยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน งานวิจัยด้านชีวเคมีและการพัฒนาสารสกัดที่มีสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากเปลือกเมล็ดมะขาม จึงมีความสำคัญยิ่ง และควรค่าต่อการวิจัยอย่างเร่งด่วน เพราะมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไปในอนาคต

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้านชนิดและโครงสร้างของสารประกอบโพลีฟีนอล และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในเปลือกเมล็ดมะขาม

2.2 เพื่อหากลไกการออกฤทธิ์ของสารแอนติออกซิแดนท์กลุ่มโพลีฟีนอลที่สกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

2.3 เพื่อหาแนวทางพัฒนาสารสกัดและควบคุมคุณภาพของสารต้านอนุมูลอิสระสำหรับการเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพต่อไป

3. ขอบเขตงานวิจัย

3.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม ด้วยเทคนิคยูวี – วิสซิเบิล สเปคโทรโฟโตรเมตรี (UV-VIS spectrometry) เทคนิคอินฟาเรด- สเปคโตรเมตรี (FT-IR-spectrometry) เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography; TLC) ศึกษาคุณสมบัติ

เบื้องต้นของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ และวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกในสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโตรกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC)

3.2 ศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม โดยหาปริมาณฟีนอลรวม และปริมาณโปรไซยานิดิน

3.3 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและกลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม ด้วยวิธี DPPH, ABTS, ferrozine (chelating property), FRAP assay และ ต้านการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (hemolysis)

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

4.1 องค์ความรู้ทางเคมีของชนิดและโครงสร้างของสารประกอบโพลิฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

4.2 แนวทางพัฒนาสารสกัดต้านอนุมูลอิสระเพื่อเป็นประโยชน์ในการเสริมสร้างสุขภาพและการบำบัด หรือป้องกันโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่นเดียวกับการนำเอาผงสารสกัดเข้มข้นจากเมล็ดองุ่นแดงซึ่งมีปริมาณ OPC สูงออกมาทำผลิตภัณฑ์หลายรูปแบบ เช่น ผงสกัด แคปซูล และเม็ดยา เพื่อจำหน่ายอย่างแพร่หลายทั่วโลก

บทที่ 2
การวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพ

อนุมูลอิสระคืออะตอมที่มีอิเล็คตรอนโดดเดี่ยว หรือไม่มีคู่อยู่ในวงโคจรของอิเล็คตรอนวงนอกสุด (valence electron) ความหมายของอนุมูลอิสระยังครอบคลุมถึงสารอื่นที่มีความไวและเกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ (related reactive species) เช่น สารที่อยู่ในสภาวะเร้า (excited states) ที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ หรือสารที่เป็นผลพวงจากปฏิกริยาของอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Devasagayam et al., 2004) โดยทั่วไปอิเล็คตรอนที่โดดเดี่ยวจะพยายามเข้าคู่กับอิเล็คตรอนอื่น เพื่อช่วยให้โมเลกุลของมันเสถียร จึงทำให้อนุมูลอิสระมีความว่องไวเป็นพิเศษในการเกิดปฏิกริยาทางเคมี เนื่องจากอนุมูลอิสระสามารถดึงอิเล็คตรอนออกจากโมเลกุลของสารอื่นข้างเคียง เพื่อจับคู่กับอิเล็คตรอนที่ไร้คู่ ทำให้โมเลกุลของสารอื่นที่สูญเสียอิเล็คตรอนไปเกิดเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งสามารถดึงอิเล็คตรอนออกจากโมเลกุลของสารอื่นต่อเนื่องกันเป็นทอด ๆ เกิดปฏิกริยาลูกโซ่ (chain reaction) ดังนั้น แม้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นเพียงไม่กี่โมเลกุลก็สามารถเหนี่ยวนำให้ปฏิกริยาเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง และเกิดอนุมูลอิสระต่าง ๆ ได้หลากหลายชนิด (Noguchi and Niki, 1999) อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพจำแนกเป็นกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบหลัก เรียกว่า reactive oxygen species (ROSs) และกลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลัก เรียกว่า reactive nitrogen species (RNS) ROSs สามารถจำแนกเป็นกลุ่ม oxygen centered radicals ได้แก่ superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$), hydroxyl radical ($HO^{\bullet}$), alkoxyl radicals ($RO^{\bullet}$) และ peroxyl radicals ($ROO^{\bullet}$) เป็นต้น และกลุ่ม oxygen centered non radicals ได้แก่ hydrogen peroxide (H_2O_2), และ singlet oxygen ($^1O_2$) เป็นต้น สำหรับตัวอย่างของ RNS ได้แก่ nitric oxide ($NO^{\bullet}$), nitric dioxide ($NO^{\bullet}_2$) และ peroxynitrite ($OONO^-$) (El-Bahr, 2013; Halliwell, 2006) โดยทั่วไป อนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ มีอายุสั้นมาก เวลาครึ่งชีวิต (half life) อาจเป็น 1 หรือ 10^{-3}-10^{-9} วินาที ตารางที่ 1 แสดงเวลาครึ่งชีวิตและบทบาทของอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆที่มีความสำคัญทางชีวภาพ (Devasagayam et al., 2004)

ตารางที่ 1 Reactive oxygen และ nitrogen species ที่มีความสำคัญทางชีวภาพ (ดัดแปลงจาก Devasagayam et al., 2004)

Reactive species	**สัญลักษณ์**	**เวลาครึ่งชีวิต**	**ความว่องไวในการทำปฏิกริยา /แหล่งกำเนิด**
Reactive oxygen species: Superoxide	$O_2^{\bullet -}$	10^{-6} วินาที	สร้างใน mitochondria ระบบหัวใจและหลอดเลือด
Hydroxyl radical	$OH^{\bullet}$	10^{-9} วินาที	มีความว่องไวสูง สร้างในร่างกายเมื่อมีสภาวะเหล็กสูง
Hydrogen peroxide	H_2O_2	มีความเสถียร	สร้างจากหลายปฏิกริยาในร่างกาย และก่อให้เกิด •OH
Peroxyl radical	$ROO^{\bullet}$	เป็นหน่วยวินาที	มีความไว สร้างจากไขมัน โปรตีน DNA และน้ำตาลในสภาวะเครียดออกซิเดชัน
Organic hydroperoxide	ROOH	มีความเสถียร	ทำปฏิกริยากับ transient metal ions ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระอื่น
Singlet oxygen	$^1O_2$	10^{-6} วินาที	มีความว่องไวสูง สร้างเมื่อเกิดปฏิกริยา Photosensitization และจากปฏิกริยาเคมีอื่น
Ozone	O_3	เป็นหน่วยวินาที	อยู่ในมลพิษทางอากาศ สามารถทำปฏิกริยากับหลายโมเลกุล ก่อให้เกิด $^1O_2$
Reactive nitrogen species: Nitric oxide	$NO^{\bullet}$	เป็นหน่วยวินาที	เป็นสารสื่อประสาท ควบคุมความดันโลหิต ก่อให้เกิดสารออกซิแดนท์ต่าง ๆ ขณะเกิดพยาธิสภาพ
Peroxynitrite	$ONOO^-$	10^{-3} วินาที	มีความไวสูง สร้างจาก NO และ superoxide
Peroxynitrous acid	ONOOH	มีความเสถียรปานกลาง	เป็น protonated form ของ $ONOO^-$
Nitrogen dioxide	NO_2	เป็นหน่วยวินาที	สร้างระหว่างการเกิดมลพิษในบรรยากาศ

2. บทบาทของอนุมูลอิสระต่อสุขภาพและการเกิดโรค

อนุมูลอิสระมีทั้งประโยชน์และโทษต่อร่างกาย มีความสำคัญทั้งด้านสุขภาพและการก่อโรค อนุมูลอิสระที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ จะถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม เพื่อช่วยในการทำหน้าที่และรักษาสภาวะสมดุล (homeostasis) ภายในเซลล์ ประโยชน์ของอนุมูลอิสระที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของกระบวนการต่าง ๆภายในเซลล์ (Devasagayam et al., 2004) มีดังนี้คือ

1. การสังเคราะห์ ATP จาก ADP ด้วยกระบวนการ oxidative phosphorylation ที่เกิดภายใน mitochondria

2. การทำงานของกลุ่มเอนไซม์ cytochrome P450 ในปฏิกริยาออกซิเดชั่นเพื่อลดความเป็นพิษของสารแปลกปลอมต่อร่างกาย (xenobiotics)

3. รูปแบบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ที่ใช้ในการกำจัดเซลล์ที่ชำรุด หรือเป็นอันตรายต่อร่างกาย

4. การทำลายจุลินทรีย์ หรือเซลล์มะเร็งโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว macrophage และ cytotoxic T lymphocyte

5. การทำงานของเอนไซม์ oxygenase เช่น cyclo-oxygenase (COX) และ lipoxygenase (LOX) ในการสังเคราะห์ prostaglandins และ leukotrienes

6. การกระตุ้น transcription factors ต่าง ๆ และการแสดงออกของยีน (gene expression)

7. กระบวนการส่งสัญญาณและการสื่อสารของเซลล์ (signal transduction) เช่น $O_2^{\bullet -}$, $NO^{\bullet}$ และ H_2O_2 ทำหน้าที่เป็น secondary messenger ภายในเซลล์ นอกจากนั้น $NO^{\bullet}$ ยังมีผลในเชิงสรีรวิทยา ช่วยให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodiation)

8. บทบาทของ $O_2^{\bullet -}$ ในการควบคุมการเจริญของเซลล์ (El-Bahr, 2013)

สภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) เป็นสภาวะขาดความสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและการจัดการของระบบต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ส่งผลให้ปริมาณอนุมูลอิสระในร่างกายสูงเกินไป (Scandalios, 2002) อนุมูลอิสระในภาวะเครียดออกซิเดชั่นก่อให้เกิดโทษต่อร่างกายมากมาย สามารถทำปฏิกริยากับสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecules) ในร่างกาย เช่น ไขมัน (lipid) โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ DNA ด้วยปฏิกริยาต่าง ๆ เช่น hydrogen atom transfer reaction, addition, aromatic substitution, beta-scission และ coupling reactions เป็นต้น (Noguchi and Niki, 1999) ผลกระทบของอนุมูลอิสระที่อาจเกิดต่อสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ในร่างกาย (El-

Bahr, 2013; Khansari et al., 2009; Devasagayam et al., 2004 ; Manini et al., 2006; Spiteller, 2006) มีดังนี้คือ

1. ไขมัน อนุมูลอิสระทำให้เกิดปฏิกริยา lipid peroxidation ก่อให้เกิดสารพิษต่าง ๆ ที่เป็นผลผลิต (product) ของปฏิกริยา เช่น malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE) และ 2-alkenals รวมทั้ง isoprostanes ที่เป็นผลิตผลจำเพาะของ lipid peroxidation ของ arachiodonic acid การเพิ่ม lipid peroxidation ของ phospholipid bilayer ของ cell membrane ลดความต้านทานต่อการสูญเสียสภาพจากความร้อน (thermal denaturation resistance) และลดสภาวะการเป็นของไหลของไขมันในระดับโมเลกุล (lipid molecular mobility) MDA ที่เกิดจาก lipid peroxidation สามารถทำปฏิกริยากับกลุ่มอมิโนอิสระ (free amino group) ของโปรตีน ทำปฏิกริยากับ phospholipid และ nucleic acid เป็นต้น ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดตีบ (atherosclerosis) และโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) มีปริมาณของ lipid oxidation product ในร่างกายเพิ่มขึ้น นอกจากนั้น การเกิดออกซิเดชันของ low density lipoprotein ยังมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของโรคหลอดเลือดตีบ และโรคหัวใจและหลอดเลือด

2. โปรตีน การออกซิไดซ์โปรตีนโดย ROS/RNS ทำให้เกิดออกซิเดชันของหมู่ฟังก์ชั่นของกรดอมิโน (oxidation of amino acid side chain) การเกาะกัน (cross linkage) และการแตกหัก (fragmentation) ของโปรตีน และเกิด protein hydroperoxides ซึ่งสามารถทำปฏิกริยากับ transition metal ion ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระอื่นต่อไป ตัวอย่างดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพของสภาวะเครียดออกซิเดชั่นของโปรตีน (oxidative stress of protein) ได้แก่ methionine sulfoxide, 2-oxohistidine และ protein peroxide เป็นต้น การออกซิไดซ์ histidine เป็น 2-oxohistidine การเกิดออกซิไดซ์ของหมู่ thiol และการเกิดอนุพันธ์ของหมู่ carbonyl ของกรดอมิโนเป็นตัวอย่างของโครงสร้างโปรตีนที่ถูกดัดแปลงไป MDA และ 4-HNE ซึ่งเป็นผลผลิตจาก lipid peroxidation สามารถทำปฏิกริยากับกรดอมิโนได้ อนุมูล $NO^{\bullet}$ และ $ONOO^{-}$ สามารถออกซิไดซ์โปรตีนได้เช่นกัน โดยรวมอนุมูลอิสระส่งผลให้การทำงานของโปรตีนลดลง หรือสูญเสียไป เช่น ลดหรือสูญเสียการทำงานของเอนไซม์ โปรตีนที่สูญเสียการทำหน้าที่มักจะถูกกำจัดอย่างรวดเร็ว หรือในบางกรณีอาจถูกเก็บสะสม ก่อให้เกิดผลเสียหรือทำความเสียหายต่อเซลล์ภายหลัง เช่น lipofuscin เป็น peroxidized ของไขมันและโปรตีนเกาะรวมกัน สะสมใน lysosomes ของเซลล์ที่ชราภาพ (aged cell) และในเซลล์สมองของคนไข้ที่ป่วยด้วยโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease)

3. คาร์โบไฮเดรต $HO^{\bullet}$ ทำปฏิกริยากับคาร์โบไฮเดรตโดยดึง hydrogen atom ออกจาก carbon atom ก่อให้เกิด carbon-centered radical ทำให้เกิดการแตกหักของโมเลกุลที่มี

ความสำคัญต่าง ๆ เช่น ทำลาย hyaluronic acid เป็นต้น คาร์โบไฮเดรตถูกสลายด้วยการออกซิไดซ์ (oxidative breakdown) โดย lipid hydroperoxide และ อิออนของเหล็ก ได้ dicarbonyl compound เช่น glycoaldehyde และ glyoxal ใน *in vivo* glyoxal เป็น α-oxoaldehyde metabolite ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ มีพิษต่อสารพันธุกรรม ทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis และหยุดการเจริญ (cell growth arrest) เนื่องจาก glyoxal สามารถสร้างพันธะแบบโควาเลนต์กับกรดนิวคลิอิกและโปรตีนแบบไม่ย้อนกลับ (irreversible adduct) ก่อให้เกิดการสร้าง advanced glycation endproduct ต่าง ๆ

4. DNA การออกซิไดซ์ DNA โดย ROS /RNS หรือการดึง hydrogen atom ออกจากส่วนที่เป็นน้ำตาลของ DNA ทำให้ DNA เกิดความเสียหาย ส่วนที่เป็น double bond ของ C4-C5 ของ pyrimidine มีความไวต่อ $HO^{\cdot}$ ผลผลิตจาก oxidative pyrimidine ที่เสียหาย (oxidative pyrimidine damage products) มีมากมาย เช่น thymine glycol, uracil glycol, urea residue, 5 hydroxydeoxy-uridine, 5-hydroxydeoxycytidine และ hydantoin เป็นต้น ในทำนองเดียวกัน $HO^{\cdot}$ ทำปฏิกริยากับ purine ได้ 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), 8-hydroxydeoxyadenosine, formamidopyrimidines เป็นต้น 8-OHdG เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง และเป็นดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ของ DNA ที่เสียหายจากออกซิเดชั่น (oxidative DNA damage) เนื่องจาก DNA ใน mitochondria ปราศจากโปรตีน histone ที่ช่วยป้องกันความเสียหายต่อ DNA เหมือนดัง ใน nucleus และกระบวนการสังเคราะห์ ATP ใน mitochondria ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ ดังนั้น DNA ใน mitochondria จึงมีความไวต่อความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระเป็นพิเศษ

มีงานวิจัยมากมายที่แสดงว่าอนุมูลอิสระในสภาวะเครียดออกซิเดชั่นเป็นสาเหตุ (etiology) หรือสัมพันธ์กับโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อม (degenerative diseases) และการแก่ (aging) ของร่างกาย ตัวอย่างโรคเหล่านี้ได้แก่ โรคหัวใจและหลอดเลือด (atherosclerosis) ภาวการณ์หดตัวของหลอดเลือด (vasospasm) มะเร็ง การเกิดบาดแผล (trauma) โรคหลอดเลือดสมองตีบตัน (stroke) หอบหืด (asthma) ภาวะเป็นพิษเนื่องจากออกซิเจนมากเกินไป (hyperoxia) โรคไขข้ออักเสบ (arthritis) โรคหัวใจ (heart attack) การสร้างเม็ดสีในคนแก่ (age pigments) ผิวหนังอักเสบ (dermatitis) การเกิดต้อกระจก (cataractogenesis) ความเสียหายต่อเรตินา (retinal damage) และการบาดเจ็บของตับ (liver injury) การชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis รวมทั้งโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของเมตาบอลิซึม (metabolic disorder) เช่น โรคเบาหวาน โรคกล้ามเนื้อสลาย (rhabdomyolysis) เป็นต้น (El-Bahr, 2013; Khansari et al., 2009; Devasagayam et al., 2004; Halliwell and Gutteridge, 1999)

3. แหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระมีแหล่งกำเนิดทั้งจากภายใน (intrinsic source) และภายนอก (extrinsic source)ร่างกาย แหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระต่าง ๆ มีดังนี้คือ

1. อนุมูลอิสระที่เกิดจากแหล่งภายในร่างกาย (Umammaheswari and Chatterjee, 2008; Sachdev and Davies, 2008; http://naturespeed.com/HealthInfo/ free_radicals_en.html) มี 5 กลไกหลักคือ

1.1 การหายใจแบบใช้ออกซิเจนของเซลล์ (aerobic cellular respiration) ในกระบวนการหายใจเอาออกซิเจนเข้ามาเผาผลาญอาหารให้เกิดเป็นพลังงานในรูปของATP ไฮโดรเจนถูกสกัดออกจากสารอาหารและอิเล็กตรอนถูกส่งต่อกันเป็นทอด ๆ ในระบบการขนส่งอิเล็กตรอนแบบลูกโซ่ (electron transport chain) ซึ่งเกิดภายใน inner membrane ของ mitochondria โดยมีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย และถูกรีดิวส์ให้เป็นโมเลกุลของน้ำเมื่อเกิดการสังเคราะห์ ATP ในกรณีที่ออกซิเจนเกิดรีดักชันไม่สมบูรณ์ (incomplete reduction) จะเกิดอนุมูลอิสระ $O_2^{\bullet -}$, $OH^{\bullet}$ และ H_2O_2 เป็นผลผลิตอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ มีผู้คาดเดาว่าประมาณ 2% ของออกซิเจนที่ใช้ใน mitochondria จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระ

1.2 การทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว เซลล์เม็ดเลือดขาว เช่นเซลล์แมคโคฟาจ (macrophage) เมื่อกลืนกิน (phagocytosis) จุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น พาราไซต์ (parasite) แบคทีเรียหรือไวรัสจะถูกกระตุ้นให้ทำลายจุลินทรีย์ที่กลืนกินเข้าไปด้วยการสร้างสารอนุมูลอิสระต่าง ๆ เช่น $NO^{\bullet}$, $O_2^{\bullet -}$, $OH^{\bullet}$และ H_2O_2 เป็นต้น ดังนั้น ในกรณีการติดเชื้อเรื้อรัง (chronic infection) ซึ่งมีการกลืนกินจุลินทรีย์ต่าง ๆ อย่างต่อเนื่อง เนื้อเยื่อของร่างกายมีโอกาสพลอยถูกทำลายโดยสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ด้วย

1.3 กระบวนการในเพอรอกซิโซม (peroxisome) ในกระบวนการทำลายกรดไขมัน (fattty acid) และโมเลกุลอื่นในเพอรอกซิโซม จะเกิด H_2O_2 เป็นผลผลิต H_2O_2 ที่เกิดขึ้นถูกทำลายโดยเอนไซม์ catalase แต่บางโมเลกุลของ H_2O_2 สามารถหลุดออกสู่ส่วนอื่นของเซลล์ H_2O_2 สามารถทำปฏิกริยากับเหล็กเกิด Fenton reaction ให้อนุมูล $OH^{\cdot}$ ดังสมการ

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

1.4 การทำงานของเอนไซม์บางชนิด ในปฏิกริยาออกซิเดชัน หรือการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ที่จำเพาะบางชนิด ก่อให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเอนไซม์เหล่านี้ได้แก่ cytochrome P450, oxidases, lipoxygenases, cyclo-oxygenases, dehydrogenases และ peroxidases เป็นต้น

1.5 การออกกำลังกายแบบหักโหม การออกกำลังกายที่หักโหมก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในปริมาณสูงกว่าขีดจำกัดของการจัดการของระบบต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ จึงสามารถก่อให้ เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกายได้

2. อนุมูลอิสระที่เกิดจากแหล่งภายนอกร่างกาย (Mena et al., 2009; Umammaheswari and Chatterjee, 2008) ในสิ่งแวดล้อมมีอนุมูลอิสระมากมาย เราสามารถรับอนุมูลอิสระได้ 3 ทางคือ จากอาหารที่รับประทานเข้าไป อากาศที่หายใจ และรังสี (radiation) ตัวอย่างแหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระจากภายนอกได้แก่ อาหารปิ้ง ย่าง ทอดเกรียม หรืออาหารที่ทอดในน้ำมันทอดซ้ำ อาหารปนเปื้อนด้วยสารเคมี เช่นยากำจัดศัตรูพืช ฟีนอล สารกันบูด สีผสมอาหาร การดื่มสุราเรื้อรัง (alcoholism) ยาบางชนิด มลภาวะทางอากาศ (air pollutans) เขม่า ควันเสียจากรถยนต์ กากของเสียอันตรายจากโรงงานต่าง ๆ ควันบุหรี่ รังสีชนิดต่าง ๆ ที่เกิดจากกระบวนการในโรงงานอุตสาหกรรม จากแสงอาทิตย์ รังสีคอสมิค (cosmic rays) และ X-ray ที่ใช้ทางการแพทย์ การติดเชื้อไวรัสบางชนิด เช่น human papilloma virus, hepatitis B virus, โลหะหนักต่าง ๆ เช่น ทองแดง เหล็ก แคดเมียม สารหนู ปรอท โครเมียม เงิน นิเกิล แมงกานีส สังกะสี โคบอลต์ที่สามารถถ่ายทอดอิเล็กตรอน ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ หรือช่วยส่งเสริมการเกิดปฏิกริยาของอนุมูลอิสระในร่างกาย

4. สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) หรือที่นิยมเรียกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ หมายถึงสารที่ทำหน้าที่ยับยั้ง ทำลาย หรือกำจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระเป็นกลไกในการป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระของร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ประเภท คือประเภทที่ร่างกายสร้างขึ้น และประเภทที่ได้รับจากภายนอกร่างกาย

1. สารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นภายในร่างกาย มี 2 ประเภทคือ พวกที่จัดเป็นเอนไซม์ และ พวกที่ไม่จัดเป็นเอนไซม์

1.1 สารต้านอนุมูลอิสระที่จัดเป็นเอนไซม์

Superoxide dismutase (SOD) เป็นกลไกแรกในการป้องกันอนุมูลอิสระต่อเซลล์ SOD เป็นเอนไซม์ที่ทำงานร่วมกับโลหะ (metal enzyme) ในเซลล์ eurkaryote SOD ที่อยู่ใน cytoplasm (cytosolic SOD) ใช้ทองแดงและสังกะสีช่วยในการทำงาน หรือเป็น prosthetic group ในขณะที่ SOD ใน mitochondria (mitochondrial SOD)ใช้แมงกานีส การทำงานของ SOD เกิดปฏิกริยาทั้งออกซิเดชันและรีดักชันพร้อมกัน เรียกว่าดิสมิวเทชัน (dismutation) SOD รีดิวซ์ 1 โมเลกุลของ $O_2^{\bullet-}$ ให้เป็น H_2O_2 และออกซิไดซ์อีก 1 โมเลกุลของ $O_2^{\bullet-}$ ให้เป็นออกซิเจน

$$2\,O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Catalase (CAT) เป็นเอนไซม์ที่กำจัด H_2O_2 จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายและป้องกันการก่อตัวของอนุมูลอิสระชนิดอื่นที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย SOD และ catalase มักพบร่วมกันในธรรมชาติ การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสองจะทำให้เกิดระบบต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Glutathione peroxidase (GPx) เป็นเอนไซม์ที่พบทั้งใน cytoplasm และใน mitochondria เอนไซม์ GPx ทำงานร่วมกับซีลิเนียม จัดเป็น selenoenzyme ทำหน้าที่กำจัด hydroperoxides โดยอาศัยรีดิวซ์กลูตาไทโอน (reduced glutathione) ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็นออกซิไดซ์กลูตาไทโอน (oxidized glutathione) พร้อมทั้งเกิดการรีดิวซ์ hydroperoxide หรือ lipid hydroperoxide (LOOH)

$$H_2O_2 + 2\ GSH \longrightarrow 2\ H_2O + GSSG$$

$$LOOH + 2\ GSH \longrightarrow LOH + H_2O + GSSG$$

Peroxidase เป็นเอนไซม์ที่สลาย H_2O_2 และ LOOH

$$H_2O_2 + AH_2 \longrightarrow 2\ H_2O + A$$

$$LOOH + AH_2 \longrightarrow LOH + H_2O + A$$

Glutathione S transferase (GSH transferase) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดสารพิษต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกายใน conjugation reaction เอนไซม์ GSH transferase สามารถสลาย LOOH (El-Bahr, 2013; Noguchi and Niki, 1999)

1.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่จัดเป็นเอนไซม์

สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย และไม่ใช่เอนไซม์มีหลายชนิด เช่น glutathione, lipoic acid, ceruloplasmin, albumin, transferrin, lactoferrin, ceruloplasmin, hepatoglobin, hemopexin, bilirubin และ uric acid ซึ่งมีบทบาททั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ (pro-oxidant) (Sautin and Johnson, 2008; Noguchi and Niki, 1999)

2. สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากภายนอก พบมากในอาหารจำพวก พืช ผัก ผลไม้ ถั่วต่าง ๆ สมุนไพรหลายชนิด (Aljadi and Kamaruddin, 2004; Cheel et al., 2007; Duan et al., 2007; Li et al., 2006; Prahbakar et al., 2007; Zhou and Yu, 2006) ซึ่งในแต่ละส่วนของพืชจะมีปริมาณและชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันออกไป สารต้านอนุมูลอิสระที่รู้จักกันดีได้แก่

วิตามินอี (tocopherols) เป็นวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมัน จึงมีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายส่วนที่ละลายในไขมัน แม้วิตามินอีที่พบในอาหารจะมีทั้งหมด 8 isomer คือ α-, β-, δ-และ γ-tocopherols และ α-, β-, δ-, γ-ticotrienols แต่คนต้องการเฉพาะวิตามินอี

ในรูปของ α-tocopherol เนื่องจาก isomer อื่นไม่สามารถถูกจดจำโดยโปรตีนที่ขนส่งวิตามินอี (heptic α-tocopherol transfer protein; α-TTP) α-tocopherol พบมากสุดที่ lipoprotein และทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระกลุ่ม peroxyl ซึ่งละลายในไขมัน (lipid-soluble peroxyl radical scavenger) ช่วยหยุดปฏิกริยาลูกโซ่ของการเกิด lipid peroxidation เพื่อป้องกันอันตรายและรักษาไว้ซึ่งคุณสมบัติทางชีวภาพ (bioactivity) ของ polyunsaturated fatty acid ที่เยื่อ membrane ของเซลล์ วิตามินอีทำหน้าที่ให้ hydrogen atom แก่อนุมูล peroxyl ส่งผลให้เกิด อนุมูล α-tocopherol ซึ่งสามารถทำปฏิกริยากับอนุมูล peroxyl อื่นได้สารที่มีความเสถียร และหยุดปฏิกริยาลูกโซ่ได้ดังสมการ

$$LOO^{\bullet} + \alpha\text{-tocopherol} \longrightarrow LOOH + \alpha\text{-tocopherol}^{\bullet}$$

$$LOO^{\bullet} + \alpha\text{-tocopherol}^{\bullet} \longrightarrow LOO\text{-}\alpha\text{-tocopherol}$$

บทบาทในการ scavenge อนุมูล peroxyl ของวิตามินอีมีหลักฐานทั้ง *in vitro* และ *in vivo* วิตามินอีช่วยลด lipid peroxidation และการตายของเซลล์ Jurkat ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ขาด Selenium และในเซลล์ประสาท (immature primary cortical neuron) ที่ขาด glutamate การศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าวิตามินอีช่วยป้องกันความเสียหายต่อตับในหนูแรทที่ได้รับ carbon tetrachloride ซึ่งมีกลไกการเกิดพิษต่อตับผ่านกระบวนการอนุมูลอิสระ และมีรายงานวิจัยว่าการได้รับวิตามินอีช่วยลดปฏิกริยา lipid peroxidation และช่วยเพิ่มความทรงจำในหนูเม้าส์ Ts65Dn ซึ่งใช้เป็นโมเดลของโรค Down Syndrome อย่างไรก็ดี งานวิจัยในปัจจุบันชี้แนะว่าการเป็น peroxyl radical scavenger เป็นกลไกหลักหรืออาจเป็นเพียงกลไกเดียวในการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี และวิตามินอีไม่มีประสิทธิภาพในการ scavenge อนุมูล hydroxyl, alkoxyl, nitrogen dioxide, และ thiyl ใน *in vivo* ดังนั้น ในการเกิดประสิทธิภาพสูงสุด วิตามินอีต้องทำงานร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น เช่น วิตามินซี และซิลิเนียม เป็นต้น (Niki, 2013; Traber and Atkinson, 2007; Abudu et al., 2004) วิตามินอีสามารถพบได้ในน้ำมันจากเมล็ดพืชต่าง ๆ เช่น ดอกคำฝอย เมล็ดทานตะวัน เมล็ดฝ้าย ข้าวโพด ถั่วเหลือง และน้ำมันรำข้าว เป็นต้น

วิตามินเอ (retinoids) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) วิตามินเอเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต การพัฒนาการ การมองเห็น และช่วยการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน วิตามินเอที่ได้จากสัตว์ เช่นตับ น้ำมันปลา ไข่แดง และผลิตภัณฑ์นมต่าง ๆ อยู่ในรูปที่ละลายได้ดีในไขมันคือ retinol, retinal และ retinoic acid ภายในร่างกาย วิตามินเอในรูปของ retinol (free alcohol form) ถูกเปลี่ยนโดย retinol dehydrogenase ได้ retinal ที่เป็น aldehyde และเป็น active form ของวิตามินเอในเนื้อเยื่อ retinal ถูกเปลี่ยนต่อโดย retinal oxidase ได้ retinoic acid ซึ่งเป็น transcription factor ที่สำคัญ (Palace et al., 1999) เนื่องจากกลุ่ม retinoids มี bioavailable สูง และสะสมในเนื้อเยื่อ วิตามินเอที่ได้รับจากสัตว์มากเกินไปจึงก่อให้เกิดพิษ แหล่งของวิตามินเอที่ได้รับจากพืชอยู่ในรูปของแคโรทีนอยด์ที่ร่างกายสามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์โปรวิตามินเอ (provitamin A) แคโรทีนอยด์

เป็นกลุ่มรงควัตถุธรรมชาติ (natural pigment) ที่พบในพืช จุลินทรีย์และสัตว์บางชนิด เช่นใน lobster แคโรทีนอยด์มีอยู่มากในผักและผลไม้ที่มีสีเหลือง แดง และส้มซึ่งเป็นคุณสมบัติของ conjugated polyenes สายยาว (long chain of conjugated polyenes) ที่พบในโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ส่วนใหญ่ ในธรรมชาติมีแคโรทีนอยด์กว่า 600 ชนิดจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มหลักคือ carotenes, xanthophylls และ lycopene อย่างไรก็ตาม มีแคโรทีนอยด์เพียง 50 ชนิดเท่านั้นที่ใช้ในการสังเคราะห์วิตามินเอในร่างกาย หรือมี provitamin A activity แคโรทีนอยด์ที่ได้จากอาหารและพบในพลาสมาของคนคือ α-, β-carotene, lycopene, cryptoxanthin และ lutein ซึ่งอยู่ร่วมกับ lipoprotein แต่เฉพาะ α-, β-carotene และ β-crytoxanthin มี provitamin A activity ส่วน lutein, canthaxanthin, zeaxanthin และ lycopene มี activity ต่ำหรือไม่มี activity ร่างกายเก็บวิตามินเอในรูปของ long chain fatty ester และในรูปของ provitamin carotenoid ที่ตับ ไต และในเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) β-carotenoid เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญที่สุดในการสังเคราะห์วิตามินเอ แคโรทีนอยด์เป็นโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ จึงทำหน้าที่ในบริเวณที่เป็น hydrophobic ของเซลล์ มีงานวิจัยแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของวิตามิน A_1 (reinol) และ A_2 (dehydroretinol) รวมทั้ง pro-vitamin A โดยเฉพาะ β- และ α- carotenes การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นใน *in vitro* lipid peroxidation ได้ผลเรียงตามลำดับดังนี้คือ retinol ≥ retinal > retinyl palmitate > retinoic acid (Palace et al., 1999; Jomova and Valko, 2013) ส่วนฤทธิ์ยับยั้ง *in vitro* lipid peroxidation ของ β-carotene มีประสิทธิภาพในกรณีที่ความเข้มข้นของออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมมีระดับต่ำเท่านั้น และจะสูญเสียฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนสูง เพราะเกิดภาวะ auto-oxidation (Halliwell and Gutteridge, 1999; Jaswir et al., 2012) คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของทั้งวิตามินเอและแคโรทีนอยด์เกิดผ่านส่วนที่เป็น hydrophobic chain ของ polyene ที่ต้าน thiyl ($RS^{\bullet}$) และ peroxyl radical และระงับสัญญาณ (Quench) singlet oxygen โดยทั่วไป ถ้าสายของ polyene (polyene chain) ยิ่งยาว ความสามารถในการทำให้ peroxyl radical เสถียรยิ่งสูง แคโรทีนอยด์มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ต้านสภาวะอ้วน (anti-obesity) ช่วยการสื่อสารระหว่างเซลล์ผ่าน gap junction ด้วยการสร้างโปรตีน connexin และมีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดโดยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ที่ metabolize สารก่อมะเร็ง (Paclace et al., 1999; Halliwell and Gutteridge, 1999; Jaswir et al., 2012) นอกจากนั้น มีหลักฐานทางระบาดวิทยาชี้แนะว่าทั้งวิตามินเอและแคโรทีนอยด์เป็นสารอาหารสำคัญช่วยลดปัญหาโรคหัวใจ (Palace et al., 1999)

วิตามินซี (ascorbic acid) เป็นวิตามินที่ละลายน้ำได้ดี สลายตัวง่ายเมื่อได้รับความร้อน แสง และอากาศที่มีความชื้น วิตามินซีพบมากในพืชจำพวก ส้ม ฝรั่ง มะเขือเทศ กะหล่ำปลี และผักสีเขียว นอกจากนั้น ยังพบในอาหารที่มีฤทธิ์เป็นกรด วิตามินซีมีสูตรโมเลกุลคล้ายกลูโคส ในพืชมีน้ำตาลหลายชนิดที่สามารถถูกเปลี่ยนเป็นวิตามินซีได้ โดยอาศัยเอนไซม์ L-gulonolactone oxidase

พืชและสัตว์ส่วนใหญ่จึงสามารถสังเคราะห์วิตามินซีได้เอง แต่คนขาดเอนไซม์ L-gulonolactone oxidase จึงไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินซีในร่างกาย ต้องได้รับวิตามินซีจากแหล่งภายนอก วิตามินซีมีบทบาทและหน้าที่ต่าง ๆ มากมายในร่างกาย เช่น ช่วยสังเคราะห์และป้องกันความเสียหายที่เกิดต่อ collagen วิตามินซีเพิ่มระดับของ procollagen messenger RNA และช่วยลำเลียง procollagen ออกจากเซลล์ วิตามินซีมีฤทธิ์ช่วยสมานบาดแผล ดูแลรักษาหลอดเลือด กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และ hormone ช่วยสังเคราะห์ thyroid hormone ส่งเสริมภูมิคุ้มกันให้แข็งแรง เช่นช่วยกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) ของเม็ดเลือดขาว ช่วยในกระบวนการเมตาบอลิซึม ของ tyrosine, folic acid และ tryptophan ช่วยลดระดับ cholesterol ในกระแสโลหิต เป็นโคเอนไซม์ทำลายสารพิษ ช่วยลดความเป็นพิษของ histamine ช่วยสังเคราะห์ carnitine และ catecholamines ที่ควบคุมระบบประสาท นอกจากนั้น ยังช่วยในการดูดซึมแคลเซียมและธาตุเหล็ก เป็นต้น วิตามินซีเป็นสารต้านออกซิเดชั่นที่ดี ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระ (neutralize free radical) ได้ทั้งภายในเซลล์และใน plasma เนื่องจากมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี และให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล $O_2^{\bullet -}$, $OH^{\bullet}$ ได้ง่าย วิตามินซีสามารถกำจัด (scavenge) hypochlorous acid, tyrosyl radical และป้องกันไขมันจากการออกซิเดชั่น โดย RNS นอกจากนั้น วิตามินซียังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการต้านออกซิเดชั่นของวิตามินอีในร่างกาย โดยการรีดิวซ์ tocopheroxyl radical (α-tocopherol$^{\cdot}$) ให้กลับสู่สภาพเดิม (α-tocopherol) วิตามินซีช่วยป้องกันความเสียหายต่อ DNA จากอนุมูลอิสระและสารก่อกลายพันธุ์ (mutagens) และป้องกันความเสียหายต่อปอดและระบบประสาทจากอนุมูลอิสระ(Walingo, 2005; Iqbal et al., 2004; Abudu et al., 2004; Handelman and Pryor, 1999)

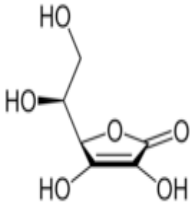
แม้การศึกษาโดยเฉพาะงานวิจัย ใน *in vitro* จะชี้แนะบทบาทและความสำคัญของวิตามินอี วิตามินซี วิตามินเอ และแคโรทีนอยด์ในการต้านออกซิเดชั่น แต่ปฏิกริยา และกลไกในการต้านออกซิเดชั่นภายในร่างกายมีความสลับซับซ้อนกว่าระบบใน *in vitro* และมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องมากมาย ดังตัวอย่างงานวิจัยทางระบาดวิทยาและด้านคลินิกที่ชี้แนะว่า สารต้านอนุมูลอิสระเช่น วิตามินอี วิตามินซี วิตามินอี และแคโรทีนอยด์ในบางบริบทอาจเป็นสาเหตุให้เกิดอนุมูลอิสระเอง (prooxidant) และก่อให้เกิดโทษแทนประโยชน์ (Niki, 2013; Traber and Atkinson, 2007; Abudu et al., 2004; Palace et al., 1999) เช่นโครงการศึกษา alpha-tocopherol beta-carotene (ATBC) ซึ่งหนึ่งในโครงการย่อยศึกษาในประเทศ Findland ใช้กลุ่มตัวอย่างเพศชายที่สูบบุหรี่จัด จำนวน 29,133 คน ผู้วิจัยพบว่ากลุ่มที่ได้รับ β-carotene ปริมาณ 20 mg ต่อวัน เป็นระยะเวลา 5-8 ปี นอกจากไม่ช่วยบรรเทาปัญหาโรคหัวใจ (coronary disease) β-carotene ยังก่อให้เกิดอัตราการตายที่สูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับวิตามินด้วย ส่งผลให้งานวิจัยในส่วนที่เหลือจำเป็นต้องถูกยกเลิก เช่นเดียวกับโครงการ β-carotene and retinol efficacy trial (CARET) ในประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ศึกษาผู้สูบบุหรี่จำนวน 18,314 คนในกลุ่มที่เป็นคนงานปกติและกลุ่มที่มีโอกาสเสี่ยงเป็นมะเร็งปอดสูง (ทำงานเกี่ยวข้องกับ

asbestos) โดยให้ 30 mg β-carotene และ 25,000 IU retinol palmitate ต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 ปี การศึกษาต้องถูกยกเลิกกลางคันใน 21 เดือนต่อมาเช่นกัน เพราะกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับวิตามินป่วยเป็นโรคมะเร็งปอดสูงกว่า และ มีอัตราการตายด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือดสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวิตามิน 28% (Palace et al., 1999) ในปัจจุบันมีหลายทฤษฎีที่พยายามอธิบายบทบาทของสารต้านออกซิเดชันในการป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดออกซิเดชัน สภาวะแวดล้อมที่เป็นบริบทให้สารต้านอนุมูลอิสระเปลี่ยนเป็นสารอนุมูลอิสระเอง รวมทั้งสมมุติฐานว่าพืชมีส่วนประกอบอื่นนอกเหนือจากวิตามินหรือสารต้านออกซิเดชั่นที่สามารถมีฤทธิ์ป้องกันหรือบรรเทาความเสี่ยงต่อโรคมะเร็งและโรคหัวใจ (Temple, 2000; Thomson et al., 2007; Lazzeroni et al., 2011; Jomova and Valko, 2013)

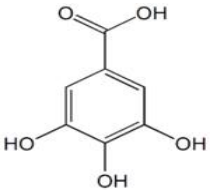
สารประกอบโพลิฟีนอล (phenolic compounds) เป็นสารกลุ่มฟีนอลที่สามารถละลายน้ำได้ พบได้ในพืชผักและผลไม้ทั่วไป เช่น องุ่น หม่อน เปลือกมะขาม ชา บล็อกเคอลี่ เป็นต้น สูตรโครงสร้างเคมีของสารประกอบโพลิฟีนอลเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่า สารประกอบโพลีฟีนอลที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลากหลายชนิดซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ดังตัวอย่างที่แสดงในภาพประกอบที่ 1 สารประกอบโพลิฟีนอลสามารถจำแนกเป็นกลุ่มที่มีฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และกลุ่มที่ไม่มีฟลาโวนอยด์ (non-flavonoids) กลุ่มที่ใหญ่ที่สุดคือกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีสารประกอบมากกว่า 2000 ชนิด ตัวอย่างสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในผัก ผลไม้และธัญญาพืชใน 6 กลุ่มย่อย คือ flavanols (flavan-3-ols) (เช่น catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate เป็นต้น) flavanones (เช่น naringin, taxifolin เป็นต้น), flavonols (เช่น kaempferol, quercetin, myricetin เป็นต้น), flavones (เช่น chrysin, apigenin เป็นต้น), anthocyanidins (เช่น cyanidin, malvidin, apigenidin เป็นต้น) และ isoflavonoids (เช่น genistein, daidzein เป็นต้น) ตัวอย่างสารประกอบโพลีฟีนอลที่ไม่ใช่ฟลาโวนอยด์ที่เป็นที่รู้จักกันดีได้แก่ trans-resveratrol ซึ่งเป็นสารสกัดจากเมล็ดองุ่น คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบโพลีฟีนอลเกิดได้หลายกลไก เช่น เป็นตัวให้ไฮโดรเจน กำจัดอนุมูล peroxyl และหยุดปฏิกริยาลูกโซ่ (chain-breaking peroxyl-radical scavenger) ยับยั้ง lipid peroxidation กำจัด ROS โดยตรง เช่น scavenge $OH^{\cdot}$, ONOOH และ HOCl เป็นต้น ทำหน้าที่เป็นสารคีเลต (chelator) สามารถดักจับ transition metal ions โดยเฉพาะเหล็กและทองแดงที่สามารถเร่งปฏิกริยาของอนุมูลอิสระ (Halliwell and Gutteridge,1999) มีงานวิจัยมากมายที่ชี้แนะว่าสารโพลิฟีนอลที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งโรคต่าง ๆ หรือบรรเทาพยาธิสภาพที่เกี่ยวโยงกับการถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง โรคความเสื่อมของประสาท (neurodegenerative diseases) โรคภูมิแพ้ โรคไวรัส โรคเบาหวาน และโรคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเรื้อรังอื่น ๆ เป็นต้น (Devasagayam et

al., 2004; Choi et al., 2012; Ramassamy, 2006; Wootton-Beard and Ryan, 2011; Wang et al., 2011; Bishayee, 2009)

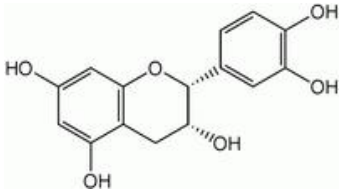
Ascorbic acid



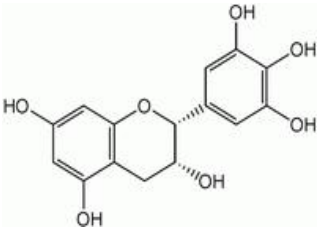
Gallic acid



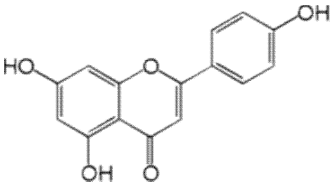
Epicatechin



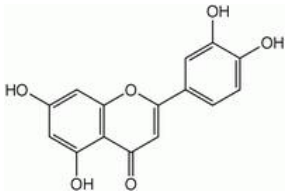
Tangeritin



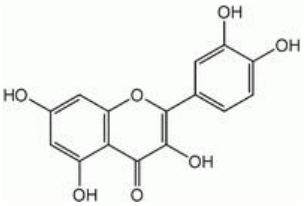
Apigenin



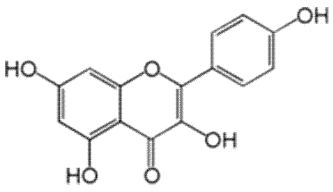
Luteolin



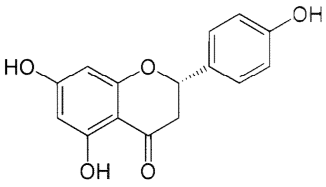
Quercetin



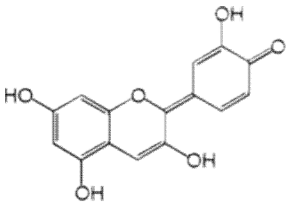
Kaempferol



Naringenin



Cyanidin



ภาพประกอบที่ 1 โครงสร้างของสารประกอบบางชนิดในกลุ่มฟีนอล (รวบรวมจากรูปที่แสดงใน http:// en.wikipedia.org/wiki)

5. **การหาขีดความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ**

หลักการส่วนใหญ่ในการหาขีดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระคือ ในขั้นตอนแรกทำการชักนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ แล้วจึงเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป หลังจากนั้นทำการตรวจวัดอนุมูลอิสระที่เหลือ ซึ่งหลักการนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับหลากหลายวิธีของการทดสอบ ขึ้นกับการเลือกชนิดของตัวกำเนิดอนุมูลอิสระและวิธีการตรวจวัดอนุมูลอิสระ ตารางที่ 2.2 เป็นวิธีการตรวจวัดขีดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับความนิยมและใช้ในงานวิจัยต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย (http://www.gpo.or.th/rdi/html/antioxidants.html)

ตาราง 2 สรุปวิธีการตรวจวัดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ใช้กันโดยทั่วไป (ดัดแปลงจาก พรทิพย์ วิรัชวงศ์)

แหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ	วิธีการตรวจวัดอนุมูลอิสระ	เวลาที่ใช้ (นาที)
DPPH radical	DPPH assay	5-10 นาที
Methyloleate + O_2	Peroxide	12-16 ชั่วโมง
Brain homogenate + O_2	O_2 Consumption	1 ชั่วโมง
Oil + O_2	Electro-conductivity	1-3 ชั่วโมง
Luminol + UVA	Chemiluminescence	1-3 ชั่วโมง
Egg yolk + Fe^{2+}	Chemiluminescence	10-20 นาที
ABTS + Peroxidase + H_2O	VIS - spectrometry	5 นาที
APPH (ORAC test)	Fluorencence R- phycoerythrin	70 นาทีต่อตัวอย่าง
ABAP (TRAP test)	Fluorencence R- phycoerythrin	20-40 นาที
Luminol + H_2O_2	Chemiluminescence	10-20

AAPH : 2'2 –azo-bis-(2,amidinpropane) dihydrochoride

ABAP : 2'2 –azo-bis-(-(2,amidinpropane)

ABTS : 2'2 –azo-bis-(3-ethylbenzoline-6-sulfonic acid)

เทคนิคที่ใช้ในการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่ใช้ในปัจจุบันมีหลายวิธี เช่น ABTS/H_2O_2 หรือABTS/potassium persulfate method (Nunes et al., 2012) โดยวัดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองซึ่งมีสารอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง methemogobin ที่ถูกออกซิไดซ์โดย hydrogen peroxide ได้ ferryl myoglobin ที่สามารถออกซิไดซ์ ABTS (2,2-azinobis-3-etthylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ให้เป็น radical cation $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งมีสีน้ำเงิน หรือการใช้ sodium persulfate ในการ oxidize ABTS ให้ได้ $ABTS^{\bullet+}$ (Pisoschi et al., 2011) สารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติในการ reduce radical cation ที่เกิดขึ้นโดยการให้ hydrogen (hydrogen-donating

antioxidants) สามารถยับยั้งปฏิกิริยาที่เกิดสี นำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงไปพลอตกราฟเทียบกับสารละลายมาตรฐาน trolox

วิธี DPPH (Burits and Bucar, 2000) สารสีม่วง DPPH (2,2-diphhynyl-1-picrylhy radicals) เป็น nitrogen-radical ที่เสถียร มีประโยชน์ในการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติจับอนุมูลอิสระโดยตรง วิธีการทดสอบคือเติมสารละลายของสารสกัดซึ่งอยู่ใน tris-HCl buffer 7.4 และสารละลาย DPPH ที่ละลายในเอทานอลลงในหลอดทดลองด้วยกัน เขย่าตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงต่อเวลาที่กำหนดไปพลอตกราฟและเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน trolox

การตรวจวัด chelating property (Korkina and Afanas'ev, 1997) เหล็กสามารถกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระได้โดยการเกิด Fenton reaction สารใดที่มีความสามารถในการจับเหล็กและยับยั้งการเกิด Fenton reaction ได้จัดว่าสารนั้นมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ การศึกษากระทำโดยเติมสารตัวอย่างลงใน 2 mM $FeCl_2$ จากนั้นเติม ferrozine 5 mM เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 nm เทียบกับสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid

การวัดปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอล ใช้ Folin-Ciocalteu method (Singleton and Rossi, 1965) สารประกอบฟีนอลรีดิวซ์ phosphotungstic acid และ phosphomolybdic acid ในตัวกลางที่เป็นเบสได้สารสีน้ำเงิน molybdenum oxide และ tungsten oxide วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 nm เทียบกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid

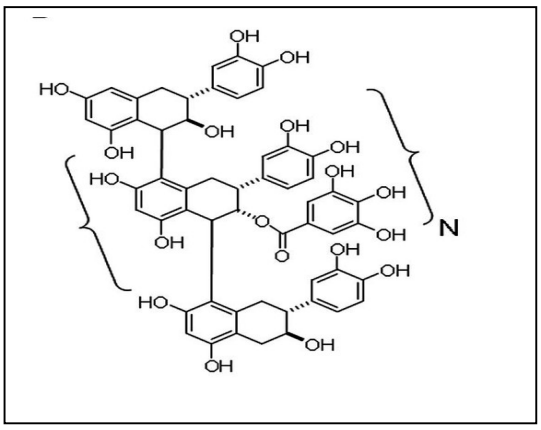
FRAP assay (ferric reducing antioxidant power) (Benzie and Straia, 1999) วัดค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งหมด (total antioxidant power) โดยวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridiyltriazine (Fe(III)-TPTZ) ให้เป็น (Fe(II)-TPTZ) ซึ่งให้สารสีฟ้า และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm

เปลือกเมล็ดมะขามเป็นส่วนของเมล็ดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (Tsuda et al., 1993; Tsuda et al., 1994) Pumthong (1999) ทำการวิเคราะห์เปลือกเมล็ดมะขามทางชีวเคมีและ HPLC พบสารจำพวก 2-hydroxy 3′,4′dihydroxyaceto-phenone (TAO), methyl 3,4-dihydroxybenzoate (TA1), 3,4-dihydroxyphenyl acetate (TA2) และ (-)-epicatechin (TA2) ซึ่งเมื่อศึกษาโดยวิธี thiocyanate และ thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) พบว่า TAO, TA1 และ TA2 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามยังคงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงแม้เมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึง 100 ºC เป็นเวลา 2 ชม. และที่ pH 5.0 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าที่ pH 3, 7 และ 9.0 (Tsuda et al., 1995)

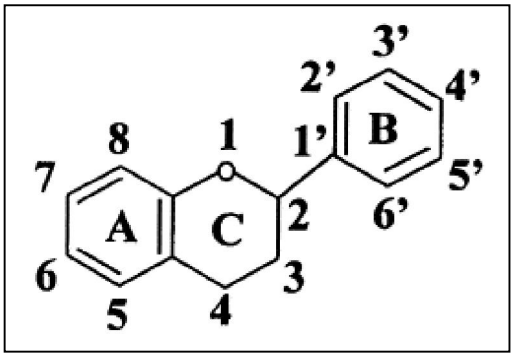
จากรายงานวิจัยของ Pumthong (1999) พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามน่าจะเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และมีการเสนอแนะว่าสารดังกล่าวมีโครงสร้างเหมือน

สาร oligomeric proanthocyanidin (OPC) (ภาพประกอบที่ 1) เป็น oligomer ของ flavan-3-ol ประกอบไปด้วย 4-6 monomer (Gupta and Haslam, 1980) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม condensed tannin นอกจากนี้ งานวิจัยหลายแห่งพบอีกว่า สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามสามารถยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระออกซิเจนชนิดเปอร์ออกซิล (peroxyl radicals) ในปฏิกิริยาของ ABTS/H_2O_2/peroxidase และ ABTS/H_2O_2/ metmyoglobin และยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radicals) ในปฏิกิริยาของ ABTS/H_2O_2/$FeCl_3$ รวมทั้งยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (super- oxide anion radicals) ในปฏิกิริยาของ hypoxanthine-xanthine oxidase (neotetrazolium) ในการวิจัยเดียวกัน ยังพบว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามสามารถป้องกันการทำลาย Ca^{2+}-ATPase ในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง (Pumthong, 1999) condensed tannin มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า phenolics เดี่ยว ๆ (Hagerman et al., 1998) มีรายงานว่าเปลือกเมล็ดมะขามมี tannin สูงถึง 32 % ซึ่งประกอบด้วย phobatannin 35 % ที่เหลือเป็น catecholtannin (Watt and Breyer-Brandwijk, 1962) phobatannin เป็นสารชนิดเดียวกันกับ condensed tannin เนื่องจากเมื่อต้มกับกรดแล้วให้ตะกอนสีแดงเรียกว่า phlobaphene หรือ tannin-red และพบว่าส่วนประกอบที่สำคัญที่พบมากใน phobatannin คือ catechin (Hathway and Seakins, 1957)

ในกลุ่มของเมล็ดพืชต่าง ๆ มีรายงานวิจัยว่า เมล็ดองุ่นมีสารต้านอนุมูลอิสระเป็น OPC เป็นสารที่มีความปลอดภัยและมีฤทธิ์เป็น free radical scavenger ทั้งในโมเดล *in vitro* และ *in vivo* โดยสามารถป้องกัน lipid peroxidation และ ความเสียหายต่อ DNA ได้มากกว่าวิตามิน C, E และบีต้าแคโรทีนหลายเท่า (Bagchi et al., 2000) เช่นเดียวกันกับสารสกัดจากเปลือกต้นสน *(Pinus maritima)* ก็มีสารต้านอนุมูลอิสระประเภท OPC มีชื่อทางการค้าว่า Pycnogenol® ที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นกัน (Packer et al., 1999) มีรายงานว่า OPC สามารถควบคุมเมตาบอลิซึมของ nitric oxide (NO) ในเซลล์ macrophage โดย quenching NO radical (Van Acker et al., 1995) และยับยั้ง inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA expression และ iNOS activity (Kobuchi et al., 1999) แต่ในทางกลับกัน OPC สามารถกระตุ้นการสร้าง NO ใน endothelial cells ได้ ปริมาณ NO ที่เหมาะสมช่วยลดการเกาะกลุ่มของ platelet (platelet aggregation) และยับยั้ง low-density lipoprotein (LDL) cholesterol oxidation (Fitzpatrick, Bing, and Rohdewald, 1998) สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็น peroxynitrite scavengers โดยหมู่ catechol ใน ring B และหมู่ hydroxyl ในตำแหน่งที่ 3 (ภาพประกอบที่ 2) เป็นหมู่สำคัญที่ทำหน้าที่เป็น peroxynitrite scavengers (Heijnen et al., 2001)



ภาพประกอบที่ 2 โครงสร้างตัวอย่างของ oligomeric proanthrocyanidin ชนิดหนึ่งที่พบในเมล็ดองุ่น (http://www.springerimages.com/Images/RSS/5-10.1186_1743-7075-5-29-1)



ภาพประกอบที่ 3 โครงสร้างพื้นฐานและการเรียงลำดับตำแหน่งต่างๆในโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ (Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., and Bobilya, D.J., 2002)

การศึกษาหาสารต่อต้านอนุมูลอิสระในเปลือกเมล็ดมะขามเพื่อนำมาเป็นอาหารเสริม หรือส่งเสริมสุขภาพ ช่วยชะลอความเสื่อมทางชีวภาพและใช้ในการถนอมผลิตภัณฑ์อาหารมิให้ถูกทำลายโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในโครงการวิจัยนี้ต้องการสกัดสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขาม เนื่องจากมีรายงานว่าเปลือกเมล็ดมะขามมีสาร OPC ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูงมาก โดยเฉพาะต่ออนุมูลอิสระชนิด peroxl, hydroxyl และ superoxide ในหลอดทดลอง รวมทั้งยังสามารถป้องกันปฏิกิริยา lipid peroxidation นอกจากนี้ เปลือกเมล็ดมะขามที่นำมาศึกษายังปลอดภัยเมื่อนำมาบริโภค อีกทั้งเมล็ดมะขามเป็นวัสดุธรรมชาติเหลือใช้ที่ทิ้งแล้ว สามารถหาได้ง่ายและมีราคาถูกมากอีกด้วย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัด ทดสอบทางเคมี และการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดกลุ่มโพลีฟีนอลจากเปลือกเมล็ดมะขาม ผลที่ได้จะเป็นแนวทางที่จะนำสารสกัดดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ การเสริมความงาม และโภชนาการต่อไป อีกทั้งยังเป็นการช่วยเพิ่มคุณค่าและมูลค่าของวัสดุธรรมชาติเหลือใช้อีกด้วย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

โครงการวิจัยนี้นำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดมาศึกษาองค์ประกอบโครงสร้างทางเคมี และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยกลไกที่แตกต่างกัน ดังมีรายละเอียดวิธีดำเนินการวิจัยดังนี้

1. ประเภทของงานวิจัย

งานวิจัยในโครงการนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research)

2. วัสดุอุปกรณ์ในการวิจัย

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

ชุดสกัด (soxhlet extraction)

ตู้อบบริษัท Binder รุ่น contherm thermtee 200

เครื่องชั่งละเอียด (analyitcal balance) บริษัท Mettler Toledo รุ่น AB204-S

เครื่อง UV-VIS spectrophotometer บริษัท Perkin Elmer รุ่น Lambda Bio 40

เครื่อง FT-IR spectrometer บริษัท Perkin Elmer รุ่น spectrum GX

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) บริษัท Shimazu รุ่น LC solution ประกอบด้วย degasser รุ่น DGV-20A50 ปั๊ม รุ่น LC-20AD คอลัมน์ C18 ของบริษัท Altech ความยาว 250 x 4.6 mm ระบบตรวจวัด แบบ diode array detector รุ่น SPD-10ASVP และ injector รุ่น SiL-10ADVP

เครื่องผสม (vortex) บริษัท Fisher scientific model 232

เครื่องปั่นเหวี่ยง บริษัท Sorvoll รุ่น ST16

เครื่องระเหยแห้ง (rotary vacuum evaporator) บริษัท Bucchi model R205

เครื่องสกัด (soxlet extraction apparatus) บริษัท Bucchi model B-811

อุปกรณ์เครื่องแก้วต่าง ๆ

2.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

Chemical Reagent	Formula	Grade	บริษัท
ABTS (2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline -6-sulfonic acid)	$C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$	AR	Fluka Chemika
Acetic acid	$C_2H_4O_2$	AR	BHD
Ascorbic acid	$C_6H_8O_6$	AR	BHD
Apigenin	$C_{15}H_{10}O_5$	HPLC	Sigma
Butyl hydroxyl anisole	$C_{15}H_{24}O$	AR	Fluka Chemika
Butyl hydroxyl toluene	$C_{11}H_{16}O_2$	AR	Fluka Chemika
Catechin	$C_{15}H_{13}O_6$	HPLC	Fluka Chemika S
DPPH (2,2-diphynyl-1-picrylhydrazyl)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	AR	Fluka Chemika
Epicatechin	$C_{15}H_{13}O_7$	HPLC	Fluka Chemika
Ethanol	C_2H_6O	AR	BHD
Folin Ciocalteu reagent	-	AR	Carbera reagent
Ferric chloride hexahydrate	$FeCl_3.6H_2O$	AR	Fluka Chemika
Ferrous sulfate heptahydrate	Fe_2SO_4	AR	BHD
Ferrozine	$C_{20}H_{13}N_4O_6S_2$	AR	Sigma
Gallic acid	$C_7H_6O_5$	AR	Fluka Chemika
Hexane	C_6H_{14}	AR	BHD
Hydrochloric acid	HCl	AR	BHD
Hydrogen peroxide	H_2O_2	AR	UNIVAR
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	HPLC	Sigma
Lactic acid	$C_3H_6O_3$	HPLC	Sigma
Luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$	HPLC	Sigma
Methanol	CH_3OH	AR	BHD
Myricetin	$C_{15}H_{10}O_8$	HPLC	Sigma
Naringenin	$C_{15}H_{12}O_5$	HPLC	Sigma

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Chemical Reagent	Formula	Grade	บริษัท
Potassium chloride	KCl	AR	Carbera reagent
Potassium sulfate	$K_2S_2O_8$	AR	BHD
Potassium dihydrogen orthophosphate	KH_2PO_4	AR	UNIVAR
Procyanidin B1	$C_{30}H_{26}O_{12}$	HPLC	Fluka Chemika
Procyanidin B2	$C_{30}H_{26}O_{12}$	HPLC	Fluka Chemika
Quercetin	$C_{15}H_{12}O_7$	HPLC	Sigma
Rutin	$C_{27}H_{30}O_{15}$	HPLC	Sigma
Sodium acetate	$C_2H_3NaO_{23}H_2O$	AR	BHD
Sodium carbonate anhydrous	Na_2CO_3	AR	Fluka Chemika
Sodium Chloride	NaCl	AR	Fluka Chemika
TPTZ(2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine)	$C_{18}H_{12}N_6$	AR	Fluka Chemika
Trolox	$C_{14}H_{18}O_4$	AR	Fluka Chemika
Vanilic acid	$C_8H_8O_4$	HPLC	Sigma

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมตัวอย่างเปลือกเมล็ดมะขาม

นำเมล็ดมะขามมาอบที่อุณหภูมิ 80 ºC นาน 42 ชม. จากนั้นกะเทาะเปลือกออก นำส่วนที่เป็นเปลือกมาบดให้เป็นผงละเอียด นำผงเปลือกเมล็ดมะขามเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น ก่อนนำไปสกัด

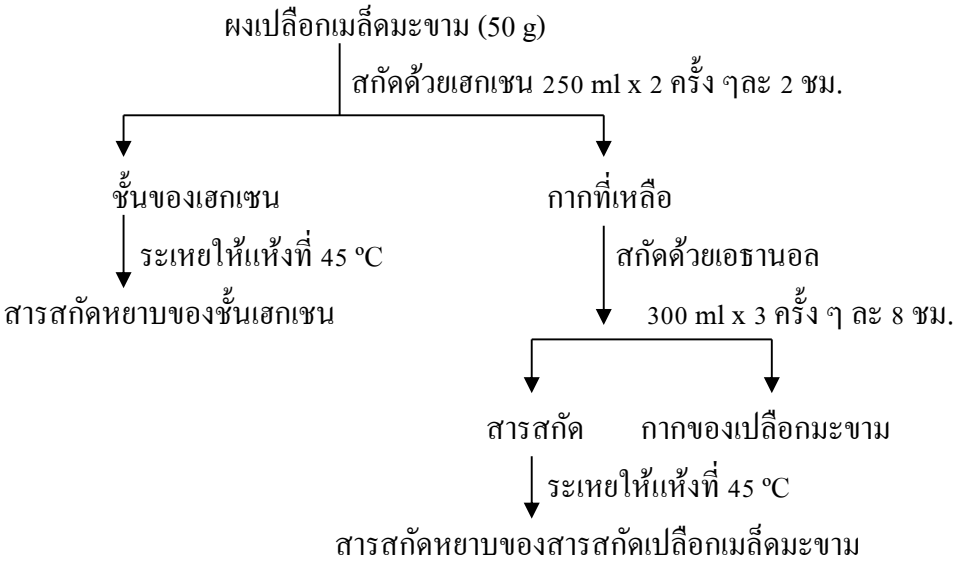
3.2 ขั้นตอนการสกัด

ในการสกัดเปลือกเมล็ดมะขามเพื่อศึกษาใช้การสกัดแบบ soxhlet ด้วยตัวทำละลายต่างชนิด คือ เอธานอล (EtOH) เมธานอล (MeOH) น้ำกลั่น (W) เมธานอลกับอะซิโตน (MeOH+Ac) อัตราส่วน 1 : 1 v/v น้ำกับอะซิโตน (W+Ac) อัตราส่วน 1 : 1 v/v และเมธานอลกับอะซิโตนโดยวิธีการแช่ (maceration) (MeOH+Ac (แช่)) อัตราส่วน 1 : 1 v/v

3.2.1 ขั้นตอนการสกัดสารจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยวิธี soxhlet

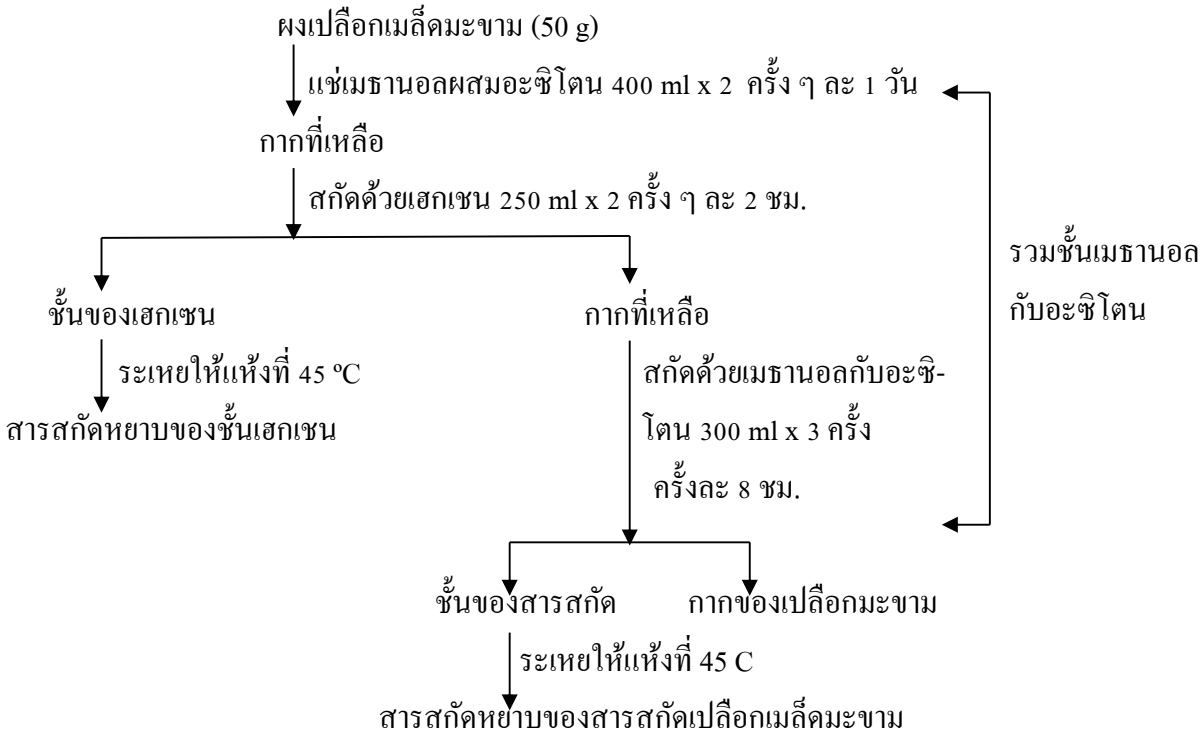
นำผงเปลือกเมล็ดมะขามแห้ง ใส่ลงในทิมเบิ้ล (thimble) ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นสกัดด้วยวิธี soxhlet ด้วยเฮกเซน ครั้งละ 250 ml ซ้ำ 2 ครั้ง ๆ ละ 2 ชม. นำส่วนที่เป็นกากมาทำ

การสกัดต่อด้วยวิธี soxhlet ด้วยเอธานอล ครั้งละ 300 ml ทำซ้ำ 3 ครั้ง ๆ ละ 8 ชม. จากนั้นนำส่วนที่ได้จากการสกัดไประเหยเอาตัวทำละลายออก ด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 45 ºC ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง กระทั่งได้สารสกัดหยาบ (crude) จากเปลือกเมล็ดมะขามที่แห้ง นำเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อเตรียมไว้ใช้ในการทดลองครั้งต่อไป ขั้นตอนการสกัดสารจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเอธานอล แสดงในแผนภาพที่ 1



แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเอธานอล

ตัวทำละลายอื่นที่ใช้ในการสกัดคือ เมธานอล น้ำกลั่น เมธานอลกับอะซิโตน และน้ำกับอะซิโตน นอกจากนั้นยังเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโดยการนำผงเปลือกเมล็ดมะขามไปแช่ก่อนนำมาสกัดโดย soxhlet ด้วยเมธานอลกับอะซิโตน ขั้นตอนการสกัดด้วยการแช่ แสดงในแผนภาพที่ 2

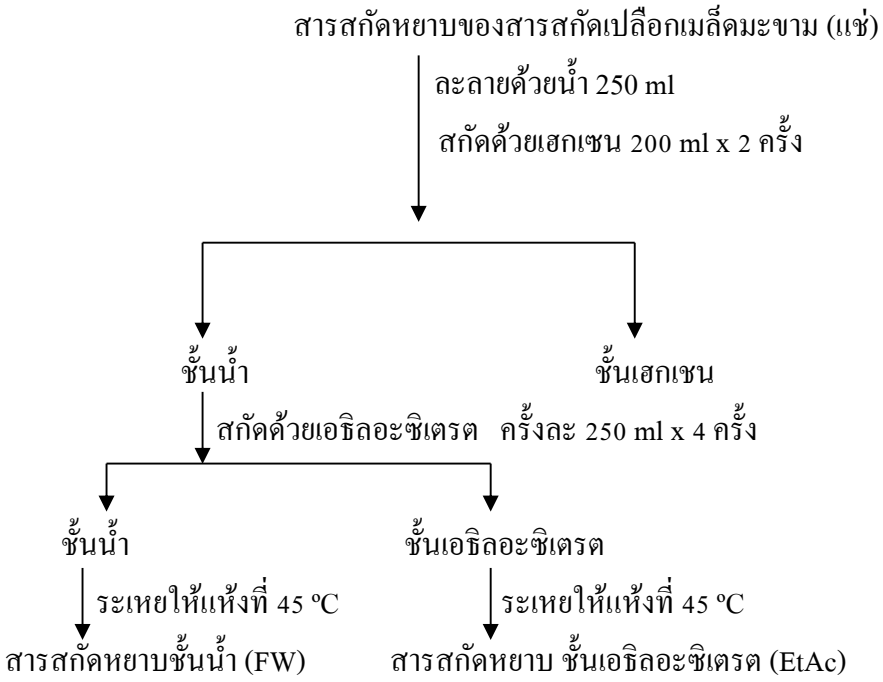


แผนภาพที่ 2 ขั้นตอนการสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยอะซิโตนกับเมธานอล (แช่)

3.3 ขั้นตอนการแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20 (Molan et al., 2004)

3.3.1 การเตรียมสารสกัดก่อนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20

นำสารสกัดหยาบของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม (MeOH+Ac (แช่) มาละลายด้วยน้ำ 250 ml แบ่งสารสกัดออกเป็นสองส่วนเท่า ๆ กัน ใส่ลงในกรวยสกัด จากนั้นเติมเฮกเซน 200 ml ทำซ้ำ 2 ครั้ง นำชั้นของน้ำมาสกัดต่อด้วยเอธิลอะซิเตรต ครั้งละ 250 ml ทำซ้ำ 4 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้จากชั้นน้ำมารวมกัน และนำไประเหยเอาตัวละลายออกด้วย rotary vacuum evaporator ส่วนสารสกัดที่ได้จากชั้นเอธิลอะซิเตรตนำไปรวมกัน และระเหยเอาตัวทำละลายออก เหมือนกันกับสารสกัดที่ได้จากชั้นน้ำ ขั้นตอนการสกัดสารจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แสดงในแผนภาพที่ 3



แผนภาพที่ 3 ขั้นตอนการสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วย น้ำ เฮกเซน และเอธิลอะซิเตรต

3.3.2 ขั้นตอนการเตรียมคอลัมน์ sephadex LH 20

นำ sephadex LH 20 เติมเมธานอลลงไปจน sephadex LH 20 อิ่มตัวด้วยเมธานอลโดย sephadex LH 20 จะมีลักษณะกึ่งข้นกึ่งเหลว เติม sephadex LH 20 ในคอลัมน์ขนาดความยาว 12 นิ้ว เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยเมธานอล

3.3.3 การแยกสารสกัดหยาบ EtAc ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20

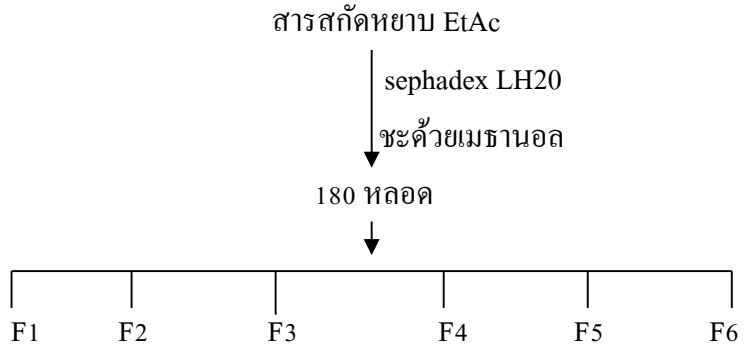
3.3.3.1 นำสารสกัดหยาบ EtAc มาละลายด้วยเมธานอล 3 ml ก่อนเติมสารที่ต้องการแยกลงในคอลัมน์ ต้องไขก๊อกให้ตัวทำละลายอยู่ในระดับเดียวกันกับผิวหน้าของ sephadex LH 20 หลังจากนั้นค่อย ๆ เติมสารสกัดลงไปในคอลัมน์ เปิดก๊อกเพื่อปรับระดับสารละลายให้อยู่ในระดับเดียวกันกับ sephadex LH 20

3.3.3.2 เติมตัวทำละลายลงในคอลัมน์อย่างระมัดระวัง เริ่มไขก๊อกและเก็บตัวทำละลายออกจากคอลัมน์ โดยเก็บหลอดละ 10 ml

3.3.3.3 นำแต่ละหลอดไปตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วย TLC (ตัวทำละลาย เมธานอล : เอธิลอะซิเตรต : กรดอะซิติก 50 % อัตราส่วน 1 : 9 : 0.1) แล้วนำไปส่องด้วยแสงยูวี ที่ความยาวคลื่น 254 nm

3.3.3.4 รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้ 6 ส่วน นำทั้ง 6 ส่วน ไประเหยโดยเครื่อง rotary vacuum evaporator ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบในชั้น EtAc แสดงในแผนภาพที่

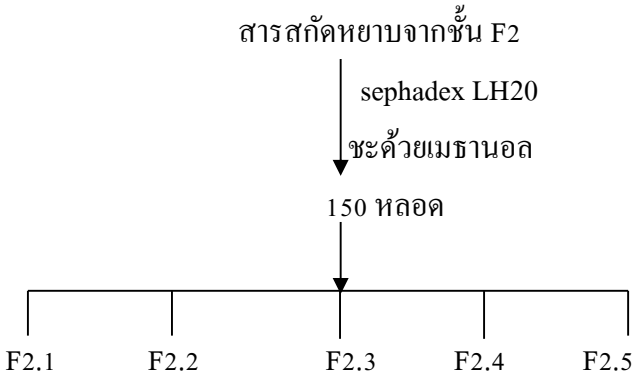
4 จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า ส่วน (fraction) ที่ 2 (F2), 3 (F3) และ 4 (F4) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าส่วนอื่น ดังนั้นจึงได้นำ F 2, F3 และ F4 มาแยกสกัดด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20 ซ้ำ



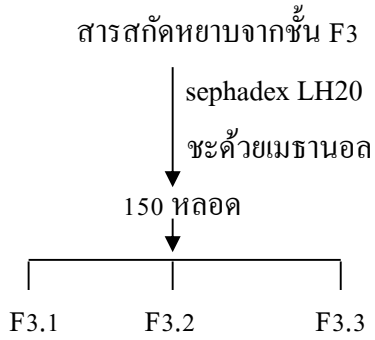
แผนภาพที่ 4 ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบ EtAc ด้วย sephadex LH 20

3.3.4 การแยกสารสกัดหยาบชั้น F2, F3 และ F4 ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20

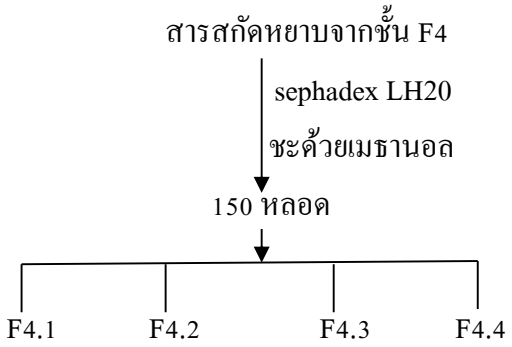
ขั้นตอนการแยกสารสกัดในชั้น F2, F3 และ F4 เหมือนกันกับข้อที่ 3.3.3.1-3.3.3.3 ซึ่งสารสกัดใน F2 สามารถรวมส่วนที่เหมือนกันได้ 5 ส่วน สารสกัดใน F3 สามารถรวมส่วนที่เหมือนกันได้ 3 ส่วน และสารสกัดใน F4 สามารถรวมส่วนที่เหมือนกันได้ 4 ส่วน โดยขั้นตอนของการแยกสารสกัดในชั้น F2, F3 และ F4 แสดงในแผนภาพที่ 5, 6 และ7 ตามลำดับ



แผนภาพที่ 5 ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบจากชั้น F2 ด้วย sephadex LH 20



แผนภาพที่ 6 ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบจากชั้น F3 ด้วย sephadex LH 20



แผนภาพที่ 7 ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบจากชั้น F4 ด้วย sephadex LH 20

3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

3.4.1 วิธี ยูวี-วิซิเบิ้ล สเปคโตรโฟโตเมตรี (UV-VIS spectrometry) นำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ กัน มาสแกน UV-VIS spectrum ที่ความยาวคลื่นในช่วง 200-800 nm เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คือ quercetin, rutin, catechin และ oligomeric proanthocyanidin (OPC)

3.4.2 วิธี อินฟาเรด สเปคโตรโฟโตเมตรี (FT-IR spectrometry) นำสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามบดให้ละเอียด เติม KBr จากนั้นนำไปสแกนหา spectrum ด้วยเครื่อง FTIR เพื่อหาหมู่ฟังก์ชั่นที่อยู่ในโมเลกุล

3.4.3 วิธี thin layer chromatography (TLC) เป็นการพิสูจน์องค์ประกอบของสารแอนติออกซิแดนท์กับสารมาตรฐาน คือ quercetin rutin และ OPC ด้วยการใช้ sillca gel GF 254 เป็นเฟสคงที่ในตัวทำละลาย toluene : acetone : formic acid ในอัตราส่วน 6 : 6 : 1 โดยปริมาตร ตรวจหาสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนท์โดยพ่นด้วย DPPH ซึ่งมีสีม่วง หากพบสารใดที่มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนท์จะทำให้สีม่วงจางลงเปลี่ยนเป็นไม่มีสี

3.4.4 การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ การตรวจสอบใช้วิธีมาตรฐานของการคัดกรองสารพฤกษเคมี (phytochemicals) โดย Farnsworth, 1966.

3.4.4.1 การเตรียมสารสกัด ชั่งสารสกัดจากเปลือกมะขาม 0.5 g ละลายด้วยเอธานอล 25 ml เพื่อเตรียมไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.4.4.2 การตรวจสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

ตรวจสอบ flavanonol หรือ flavonol-3-glycoside ปิเปตสารสกัด 1 ml ลงในหลอดทดลอง เติมผงสังกะสี 0.5 g และ 2 N ของกรดไฮโดรคลอริก 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน ประมาณ 1 นาที เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 หยด ถ้าเกิดสีแดงเข้มภายใน 2-5 นาที แสดงว่ามี flavanonol หรือ flavonol-3-glycoside ส่วน flavanone และ flavonol จะให้สีแดงจางๆ

การทดสอบการทำปฏิกิริยากับด่าง ปิเปตสารสกัด 1 ml ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายแอมโมเนีย (ammonia T.S.) ทีละหยด สังเกตสีและระบุชนิดฟลาโว-นอยด์ตามเกณฑ์ที่แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 4 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์โดยทำปฏิกิริยากับด่าง และสีที่พบหลังปฏิกิริยา

ชนิดของฟลาโวนอยด์	สีที่พบหลังปฏิกิริยา
Flavone, flavonol, xanthone	สีเหลือง
Flavanone	ส้มออกแดง
Chalcone, aurone	แดง
Flavanonol	น้ำตาลออกส้ม

3.4.4.3 การตรวจสอบแอนโธไซยานิน

นำสารสกัด 1 ml เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 N 1 หยด จะได้สีแดงเกิดขึ้น ค่อย ๆ เติม ammonia T.S. ทีละหยด ถ้าพบแอนโธไซยานิน สารสกัดจะเปลี่ยนสีจากแดงเป็นน้ำเงิน

3.4.4.4 การตรวจสอบลิวโคแอนโธไซยานิน

นำสารสกัด 1 ml เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 N ปริมาตร 2 ml ต้มในอ่างอังไอน้ำ ถ้าพบ catechin จะให้สีเหลืองออกน้ำตาล ส่วน leucoanthocyanin ให้สีแดงของ anthocyanidin และละลายได้ใน amyl alcohol

3.4.5 วิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) (Fang et al., 2007)

3.4.5.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยชั่ง catechin 0.0250 g ละลายด้วยเมธานอลปรับปริมาตรให้ครบ 25 ml จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 0.5 – 100 μg/ml กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm สำหรับสารมาตรฐานอื่นที่ใช้ได้แก่ catechin, epicatechin, rutin, procyanidin B1, procyanidin B2, quercetin, keampferol, naringenin, apigenin, luteolin, myricitin, resveratrol, ascorbic acid, gallic acid, vanilic acid และ lactic acid

3.4.5.2 เตรียมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเมธานอล ชั่งสารสกัด 0.0500 g ละลายด้วยเมธานอล กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับปริมาตรให้ครบ 5 ml นำไปกรองอีกครั้งผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 μm สำหรับการเตรียมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ เตรียมเช่นเดียวกับสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเมธานอล เพียงแต่ละลายในตัวทำละลายอื่นตามต้องการ

3.4.5.3 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่

สารละลาย A ได้แก่ น้ำ (ปราศจากไอออน) 97.8% อะซิโตไนไตรด์ 2 % และกรดฟอสฟอริก 0.2 %

สารละลาย B ได้แก่ อะซิโตไนไตรด์ 97.8 % น้ำ (ปราศจากไอออน) 2 % และกรดฟอสฟอริก 0.2 %

3.4.5.4 สภาวะของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ระบบชะล้างแบบเกรเดียนท์ในการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ และกรดฟีโนลิก แสดงในตารางที่ 3-5

ตารางที่ 5 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการทดลอง

สภาวะ	พารามิเตอร์
คอลัมน์	คอลัมน์ C18 ความยาว 250 x 4.6 mm
อุณหภูมิคอลัมน์	40 ºC
เฟสเคลื่อนที่	สารละลายเอ และสารละลายบี
อัตราการไหล	0.6 ml/min
ปริมาณที่ฉีด	20 μl
เครื่องตรวจวัด	ไดโอดอาร์เรย์ที่ความยาวคลื่น 270 nm

ตารางที่ 6 การตั้งโปรแกรมที่ใช้ในระบบการชะล้างแบบเกรเดียนท์ของคอลัมน์ HPLC ในการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

เวลา (min)	สารละลาย B (%)	สารละลาย A (%)	อัตราการไหล (ml/min)
0-30	20-50	50-80	0.6
30-35	50-60	40-50	0.6
34-40	60-20	40-80	0.6
40-55	20	80	0.6

ตารางที่ 7 การตั้งโปรแกรมที่ใช้ในระบบการชะล้างแบบเกรเดียนท์ของคอลัมน์ HPLC ในการหาปริมาณกรดฟีโนลิกในสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

เวลา (min)	สารละลาย B (%)	สารละลาย A (%)	อัตราการไหล (ml/min)
0-10	10	90	0.6
10-40	10-70	90-30	0.6
40-42	70-10	30-90	0.6
42-55	10	90	0.6

3.5 การวัดปริมาณสารออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

3.5.1 การวัดปริมาณฟีนอลรวม (Folin-Ciocalteu method) (Singleton and Ross, 1965 และ Meda et al., 2005)

3.5.1.1 เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent เข้มข้น 0.2 M โดยปิเปต Folin-Ciocalteu reagent เข้มข้น 2 M 10 ml ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

3.5.1.2 เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 75 g/l โดยชั่ง โซเดียมคาร์บอเนต 7.5 g ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

3.5.1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 100 μg/ml โดยชั่ง 0.0100 g ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 10-100 μg/ml

3.5.1.4 เตรียมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม เข้มข้น 50 μg/ml โดยชั่งสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม 0.0050 g ละลายในเอธานอล 2 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

3.5.1.5 ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัด 0.5 ml เติม Folin-Ciocalteu reagent 2.5 ml เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2.0 ml เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 1 ชม. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm

3.5.2 การวัดปริมาณโปรไซยานิดิน ใช้วิธี vanillin-HCl (Sun et al., 1998 และ Nakamura et al., 2003) ซึ่งดัดแปลงเล็กน้อย

3.5.2.1 เตรียม กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.5 M โดยปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 12.08 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml

3.5.2.2 เตรียมวานิลินเข้มข้น 4 % ในเมธานอล โดยชั่งวานิลิน 4 g ละลายด้วยเมธานอล และปรับปริมาตรจนครบ 100 ml

3.5.2.3 เตรียมสารมาตรฐาน catechin เข้มข้น 200 μg/ml โดยชั่ง catechin 0.0200 g ละลายด้วยเมธานอล 2 ml และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-100 μg/ml

3.5.2.4 เตรียมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม เข้มข้น 400 μg/ml โดยชั่งสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม 0.0100 g ละลายด้วยเอธานอลและปรับปริมาตรให้ครบ 25 ml ด้วยน้ำกลั่น

3.5.2.5 ปิเปตสารมาตรฐานหรือสารสกัด 0.5 ml เติม 3 ml วานิลินเข้มข้น 4 % เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม 1.5 ml กรดไฮโดรคลอริก 1.5 M เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm

3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.6.1 วิธี DPPH (Schlesier et al., 2002)

3.6.1.1 เตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.01 mM โดยการชั่ง DPPH 0.0040 g ละลายในเอธานอล ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

3.6.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน (trolox, rutin, quercetin, ascorbic acid และ gallic acid) หรือสารสกัด โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง 100 μg/ml โดยชั่งสารมาตรฐานหรือสารสกัด 0.0100 g ละลายด้วยเอธานอล ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามต้องการด้วยน้ำกลั่น ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข ตาราง ข1

3.6.1.3 ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง 0.5 ml เติม สารละลาย DPPH 0.5 ml (ใช้สารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างกับสารละลาย DPPH ในอัตราส่วน 1: 1) เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืด 3 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

3.6.1.4 นำค่าดูดกลืนแสงไปคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (%Inhibition) ตามสมการที่ (1) (Abdelwahed et al., 2007)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{OD_{blank} - OD_{sample}}{OD_{blank}} \times 100 \quad \text{.....(1)}$$

เมื่อ OD_{blank} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลายซึ่งไม่ได้เติมสารมาตรฐานหรือสารสกัด

OD_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลายซึ่งเติมสารมาตรฐานหรือสารสกัด

3.6.2 วิธี $ABTS^{\bullet+}$ (Re et al., 1999 และ Arts et al., 2004)

3.6.2.1 เตรียม ABTS ให้อยู่ในรูปของ $ABTS^{\bullet+}$ โดยใช้ ABTS 7.0 mM ผสมกับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 2.45 mM ในอัตราส่วน 1 : 1 ตั้งไว้ในที่มืด 16 ชม. ก่อนนำมาใช้

3.6.2.2 เตรียมสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน ascorbic acid ความเข้มข้น 1000 μg/ml โดยชั่งสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 0.1000 g ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml นำไปเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 100-1000 μg/ml

3.6.2.3 ปิเปต $ABTS^{\bullet+}$ 1ml และปิเปต สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 33 μl เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 414 nm

3.6.2.4 นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) ตามสมการที่ (1)

3.6.3 วิธีวัดความสามารถในการจับเหล็ก (chelating property) (Dinis et al., 1994 และ Prathapan et al., 2010)

3.6.3.1 เตรียมสารละลาย ferrous chloride 0.2 mM โดยชั่ง ferrous chloride 0.0099 g ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 25 ml

3.6.3.2 เตรียม ferrozine 0.5 mM โดยชั่ง ferrozine 0.0615 g ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 25 ml

3.6.3.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน BHA 1000 μg/ml โดยชั่ง BHA 0.1 g ละลายในเอธานอล ปรับปริมาตรด้วยเอธานอลให้ครบ 100 ml นำมาเจือจางด้วยเอธานอลให้มีความเข้มข้นในช่วง 200-1000 μg/ml

3.6.3.4 เตรียมสารละลายตัวอย่าง 5000 μg/ml โดยชั่งสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม 0.5 g ละลายด้วยเอธานอลและ ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยน้ำกลั่น นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นในช่วง 50 -5000 μg/ml

3.6.3.5 ปิเปตสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม หรือสารมาตรฐาน มา 1 ml เติม 15 μl ferrous chloride 0.2 mM เขย่าให้เข้ากันประมาณ 30 วินาที จากนั้น เติม30 μl ferrozine 0.5 mM เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 nm

3.6.3.6 นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) ตามสมการที่ (1)

3.6.4 วิธี FRAP (ferric reducing antioxidant power assay) (Benzie and Strain, 1996)

3.6.4.1 เตรียม 300 mM acetate buffer pH 3.6 โดยชั่ง sodium acetate ($C_2H_3NaO_2.3H_2O$) 3.1 g เติม glacial acetic acid 16 ml ปรับ pH ด้วย acetic acid และปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ml ด้วยน้ำกลั่น

3.6.4.2 เตรียมสารละลาย TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 10 mM ใน 40 mM กรดเกลือเข้มข้น ชั่ง 3.1234 g TPTZ เติมกรดเกลือเข้มข้น 40 mM ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml

3.6.4.3 เตรียมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 mM โดยปิเปตกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น (37%, 12.1 M) 3.31 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml ด้วยน้ำกลั่น

3.6.4.4 เตรียม ferric chloride ความเข้มข้น 20 mM ชั่ง ferric chloride ($FeCl_3.3H_2O$) 5.406 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml

3.6.4.5 เตรียม FRAP รีเอเจนท์ โดยนำอะซิเตตบัฟเฟอร์ 25 ml ผสมกับสารละลาย TPTZ 2.5 ml และเฟอร์ริกคลอไรด์ 2.5 ml (ผสมในอัตราส่วน 10:1:1 และเตรียมสดก่อนใช้งาน)

3.6.4.6 เตรียมสารมาตรฐาน ferrous sulfate เข้มข้น 1000 mM โดยชั่ง ferrous sulfate 0.0278 g ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ml นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นในช่วง 100-1000 mM

3.6.4.7 เตรียมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 50 μg/ml จาก stock solution 1000 μg/ml ปิเปตมา 1.25 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 25 ml ด้วยน้ำกลั่น

3.6.4.8 ปิเปต FRAP รีเอเจนท์ 1 ml เติม สารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หรือสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม 33 μl เขย่าให้เข้ากันนาน 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm

3.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

3.7.1 วิธีวัดการต้านการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) ดัดแปลงเล็กน้อยจากหลักการของ hydrogen peroxide fragility test (Melhorn et al., 1971; Fontaine and Valli, 1977)

3.7.1.1 เตรียมสารละลาย phosphate buffer (PBS) เข้มข้น 0.1 M โดยชั่ง เกลือ sodium chloride 5 g disodium hydrogen phosphate 0.12 g เกลือ potassium chloride 0.12 g และ potassium dihydrogen orthophosphate 0.12 g นำสารทั้งหมดมาละลายด้วยน้ำกลั่นพร้อมทั้งปรับ pH ด้วย sodium hydroxide 4.0605 M ให้ได้ pH 7.4 และปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml ด้วยน้ำกลั่น

3.7.1.2 เตรียมเม็ดเลือดแดง (RBC) วัดปริมาตร hematocrit ด้วยเครื่องวัด hematocrit (เพื่อให้ทราบปริมาตรที่แน่นอนของเม็ดเลือดแดง) นำเลือดปริมาณ 10 ml เติม EDTA 0.0010 g เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBS 0.1 M ซ้ำ 3 ครั้ง ๆ ละ 15 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 4 ºC ต้อง เติม PBS ให้เท่ากับปริมาตรของ plasma เมื่อเริ่มต้น

3.7.1.3 เตรียมสารละลาย hydrogen peroxide เข้มข้น 6 % โดยนำสารละลาย PBS เข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 72 ml ผสมกับ hydrogen peroxide เข้มข้น 30 % ปริมาตร 18 ml เขย่าให้เข้ากันเก็บไว้ในที่เย็น

3.7.1.4 เตรียมสารมาตรฐาน trolox หรือสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม โดยชั่ง 0.025 g ละลายด้วยเอธานอล 1.5 ml จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 25 ml ด้วย สารละลาย PBS เข้มข้น 0.1 M และเตรียมสารสกัดและสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นในช่วง 0.25-1000 µg/ml

3.7.1.5 ปิเปตสารละลาย PBS เข้มข้น 0.1 M 850 µl ปิเปตเม็ดเลือดแดง 150 µl เขย่าให้เข้ากัน เติมสารมาตรฐานหรือสารสกัด 0.5 ml เขย่าให้เข้ากัน เติม hydrogen peroxide เข้มข้น 6 % 1 ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปเขย่าและบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC 45 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm (Lalitha, Phil, and Selvam, 1999)

3.7.1.6 นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) ตามสมการที่ (1)

3.8 การตกตะกอนแทนนินด้วยนมสด (Hagerman and Butler, 1980)

3.8.1 ชั่งสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม 0.38 กรัม ทำการละลายสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเอธานอล 5 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 25 ml แบ่งเป็นหลอดละ 3 ml

3.8.2 ปิเปตนมสดพร่องมันเนยตราหมี ในอัตราส่วนที่ต่างกัน ตั้งแต่ 100-1800 μl ลงในสารสกัด เขย่าให้เข้ากันตั้งไว้ตกตะกอน 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 g ประมาณ 15 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณฟีนอลรวมเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่มีการวิเคราะห์ทางสถิติได้จากการทดลองที่มีจำนวนซ้ำของการทดลองเท่ากับ 3 ข้อมูลนำเสนอในรูปของค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 17 ทดสอบความแตกต่างของค่าความผันแปร (variation) ของข้อมูลในแต่ละกลุ่ม (test of homogeneity of variances) ด้วยสถิติทดสอบ Levene ถ้าค่าความผันแปรของข้อมูลในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (equal variances assumed) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของทุกกลุ่มด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way ANOVA (analysis of variances) ถ้ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละคู่ด้วยวิธี Tukey ในกรณีที่ข้อมูลในแต่ละกลุ่มมีค่าความผันแปรไม่เท่ากัน (equal variance not assumed) ทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของทุกกลุ่มโดย Welch และ Brown-Forsythe test ถ้าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างคู่ที่แตกต่างด้วยวิธี Dunnett's T3 ในโครงการวิจัยนี้ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์การทดลอง

1. ผลการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

การสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม โดยใช้การสกัดแบบ soxhlet ด้วยตัวทำละลายต่างชนิดคือ เอธานอล เมธานอล น้ำกลั่น อะซิโตน เอทิลอะซิเตรต เฮกเซน ผลการทดลองแสดงว่า สารสกัดจากเอธานอลมีร้อยละของการสกัดมากที่สุด รองลงไปคือ เมธานอล น้ำกลั่น เมธานอลกับอะซิโตน (แช่) เมธานอลกับอะซิโตนซึ่งสกัดได้ใกล้เคียงกับน้ำกับอะซิโตนตามลำดับ (ตารางที่ 8) ผลการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันทำให้ ลักษณะทางกายภาพ คือสีของสารสกัดและความสามารถในการละลายแตกต่างกัน สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ ระเหยได้ง่าย คือเมธานอล เมธานอลกับอะซิโตน สารที่สกัดได้มีลักษณะแข็งจับตัวเป็นก้อน ละลายได้ดีในตัวทำละลาย เช่น เมธานอล เอธานอล เป็นต้น และใช้เวลาไม่นานเพื่อระเหยตัวทำละลายออกไป ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีจุดเดือดสูง ระเหยได้ยาก คือ เอธานอล น้ำกลั่น มีลักษณะข้นเหลวหรือเป็นวุ้น ละลายได้ยาก และใช้เวลานานในการระเหยตัวทำละลายออกไป สารที่มีความสามารถในการละลายในเอธานอลสูงสุด ได้จากการสกัดด้วยเมธานอล รองลงมาคือสารสกัดจากเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) น้ำกับอะซิโตน เมธานอลกับอะซิโตน น้ำกลั่น และเอธานอล ตามลำดับ นอกจากนั้น สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน สามารถละลายในเมธานอลได้ดีที่สุด รองลงมาคือเอธานอล และน้ำกลั่น ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 8 น้ำหนักของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิด

ตัวทำละลาย	น้ำหนักก่อนสกัด (g)	น้ำหนักหลังสกัด (g)	% การสกัด
EtOH	50.00	31.53	63.06
MeOH	50.00	29.84	59.68
W	50.00	23.10	46.21
MeOH+Ac	50.00	12.04	23.97
W +Ac	50.00	12.45	23.95
MeOH+Ac (แช่)	52.00	19.80	37.83

สารสกัดที่ได้จากวิธี soxlet: EtOH หมายถึงสารสกัดจากเอธานอล MeOH หมายถึงสารสกัดจากเมธานอล W หมายถึงสารสกัดจากน้ำ MeOH+Ac หมายถึงสารสกัดจากเมธานอลกับอะซิโตน (1:1 v/v) W +Ac หมายถึงสารสกัดจากน้ำกับอะซิโตน (1:1 v/v)

MeOH+Ac (แช่) หมายถึงสารสกัดจากเมธานอลกับอะซิโตนด้วยวิธีการแช่ (1:1 v/v) ก่อนสกัดต่อด้วยวิธี soxlet

ตารางที่ 9 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยตัวทำลายต่างชนิด

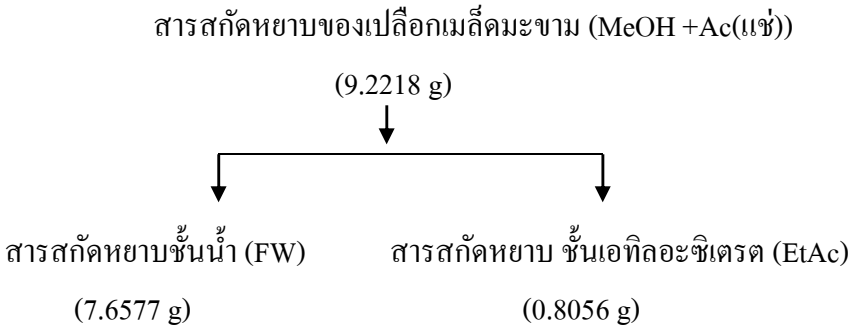
ตัวทำละลาย	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัด
EtOH	เป็นวุ้นกึ่งแข็งกึ่งเหลว สีแดงเลือดนก มันวาว ละลายได้ยาก เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากตัวทำละลายอื่น ๆ กากที่เหลือจากการละลายมีลักษณะเป็นวุ้นสีแดงขนาดเล็ก
MeOH	เป็นของแข็ง สีแดงเลือดนก มันวาว ละลายได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากตัวทำละลายอื่น ๆ
W	เป็นของเหลวข้น สีแดงเลือดนก มีความสามารถละลายมากกว่า เมื่อเทียบกับสารสกัดจาก เอธานอล ตะกอนที่เหลือจากการละลายมีลักษณะเป็นแผ่นสีแดงขนาดเล็ก
MeOH +Ac	เป็นของแข็ง สีแดงเลือดนก มันวาว ละลายได้ง่าย ตะกอนที่เหลือจากการละลาย มีลักษณะเป็นผงสีดำแดงขนาดเล็ก
W +Ac	เป็นของแข็ง สีแดงเลือดนก มันวาว ละลายได้ง่าย ตะกอนที่เหลือจากการละลาย มีลักษณะเป็นผงสีดำแดงขนาดเล็ก
MeOH +Ac(แช่)	เป็นของแข็ง สีแดงเลือดนก มันวาว ละลายได้ง่าย ตะกอนที่เหลือจากการละลาย มีลักษณะเป็นผงสีดำแดงขนาดเล็ก

สารสกัดที่ได้จากวิธี soxlet: EtOH หมายถึงสารสกัดจากเอธานอล MeOH หมายถึงสารสกัดจากเมธานอล W หมายถึงสารสกัดจากน้ำ MeOH+Ac หมายถึงสารสกัดจากเมธานอลกับอะซิโตน (1:1 v/v) W +Ac หมายถึงสารสกัดจากน้ำกับอะซิโตน (1:1 v/v)

MeOH+Ac (แช่) หมายถึงสารสกัดจากเมธานอลกับอะซิโตนด้วยวิธีการแช่ (1:1 v/v) ก่อนสกัดต่อด้วยวิธี soxlet

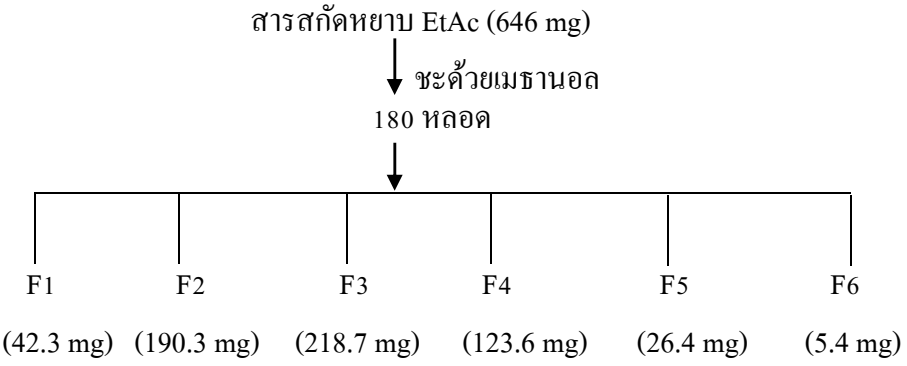
2. ผลการทำสารสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20

ก่อนที่จะทำสารสกัดจากเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) ให้กึ่งบริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์ sephadex LH 20 ได้ทำการสกัดซ้ำด้วยน้ำและเอทิลอะซิเตรต เพื่อทำการแยกสารสกัดออกเป็น 2 ส่วน โดยคาดว่าสารที่อยู่ในชั้นเอทิลอะซิเตรตนั้นเป็นกลุ่มสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากผลการสกัดซ้ำด้วยน้ำ และเอทิลอะซิเตรต พบว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามส่วนใหญ่อยู่ในชั้นของน้ำ ทำให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นน้ำ และเอทิลอะซิเตรต ดังผลการทดลองในแผนภาพที่ 8

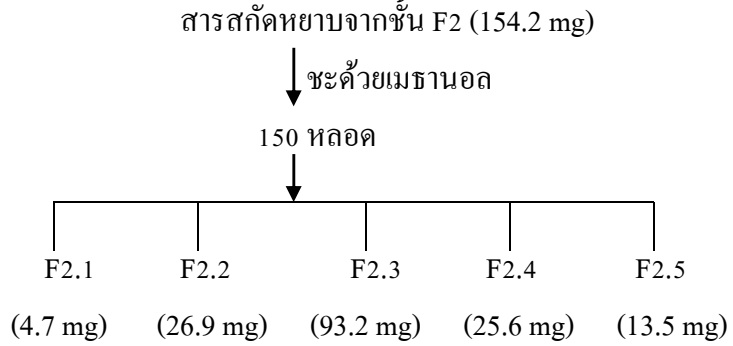


แผนภาพที่ 8 ผลของการเตรียมสารสกัดก่อนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20

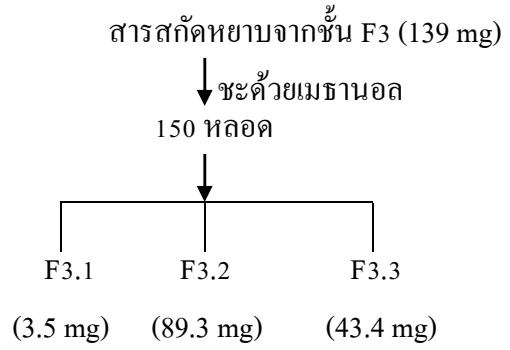
จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากชั้น EtAc มาทำให้กึ่งบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20 ทำการชะด้วยเมธานอล แยกสารสกัดออกเป็นแต่ละแฟรกชันได้ทั้งหมด 6 แฟรกชัน (F1, F2, F3, F4, F5 และ F6) นำแต่ละแฟรกชันมาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า F2, F3 และ F4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าแฟรกชันอื่น หลังจากนั้น นำแฟรกชัน F2, F3 และ F4 มาทำกึ่งบริสุทธิ์อีกครั้งด้วย sephadex LH 20 พบว่าแฟรกชัน F2 สามารถแยกออกเป็น 5 แฟรกชัน ได้แก่ F2.1- F2.5 แฟรกชัน F3 สามารถแยกออกเป็น 3 แฟรกชันได้แก่ F3.1- F3.3 แฟรกชัน F4 สามารถแยกออกเป็น 4 แฟรกชัน ได้แก่ F4.1-F4.4 จากนั้น นำแฟรกชันย่อย F2.1-F2.4 มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ผลของการแยกสารสกัดหยาบ EtAc การทำบริสุทธิ์ของแฟรกชัน F2, F3 และ F4 แสดงในแผนภาพที่ 9-12 ตามลำดับ และสรุปรวมในตารางที่ 10



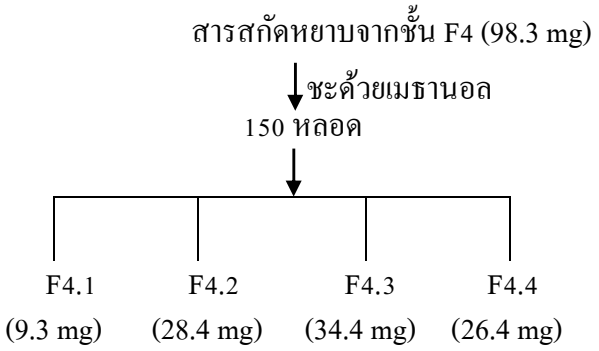
แผนภาพที่ 9 ผลการแยกสารสกัดหยาบ EtAc ด้วย sephedex LH 20



แผนภาพที่ 10 ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบจากชั้น F2 ด้วย sephedex LH 20



แผนภาพที่ 11 ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบจากชั้น F3 ด้วย sephedex LH 20



แผนภาพที่ 12 ขั้นตอนในการแยกสารสกัดหยาบจากชั้น F4 ด้วย sephedex LH 20

ตารางที่ 10 น้ำหนักของสารสกัด และ % recovery ของสารสกัดก่อนและหลังการทำบริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20

สารสกัด	น้ำหนัก (mg)	% Recovery
MeOH+Ac*	9.2218×10^3	-
EtAc	805.6	8.73
FW	7.6577×10^3	83.03
F1	42.3	6.54
F2	190.3	29.45
F3	218.7	33.85
F4	123.6	19.13
F5	26.4	4.08
F6	5.4	0.83
F2.1	4.7	3.04
F2.2	26.9	17.44
F2.3	93.2	60.44
F2.4	25.6	16.60
F2.5	13.5	8.75
F3.1	3.5	2.51
F3.2	89.3	64.24
F3.3	43.4	31.22
F4.1	9.3	9.46
F4.2	28.4	28.89
F4.3	34.4	34.99
F4.4	26.4	26.85

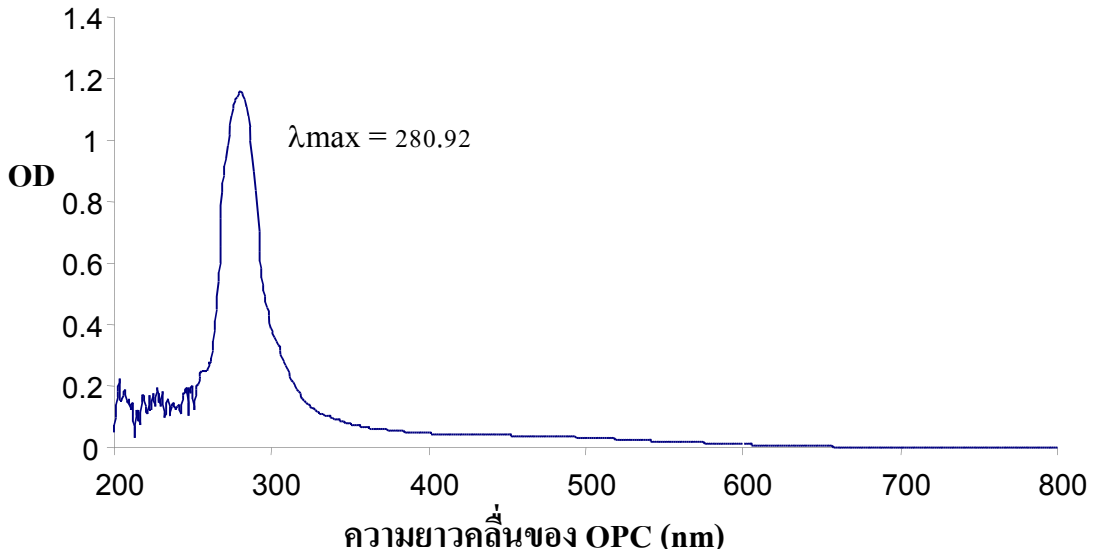
*สารสกัดก่อนทำบริสุทธิ์ด้วย sephadex LH 20

แฟรกชัน F2.5, F3.1-F3.3, F4.1-F 4.4) ไม่ได้ตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ DPPH เนื่องจากสารมีปริมาณน้อยมาก

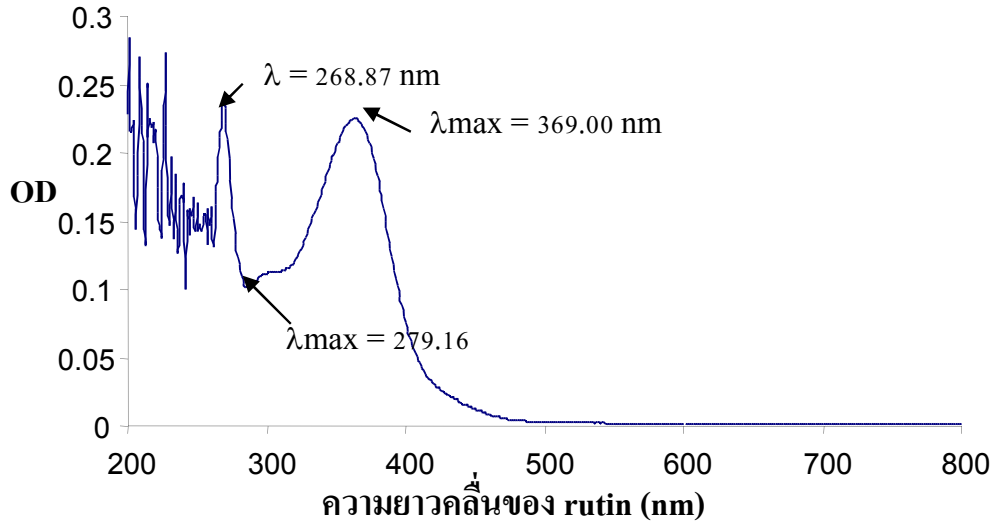
3. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม

การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม เพื่อบ่งบอกคุณลักษณะเบื้องต้นของสารสกัดใช้เทคนิคทาง UV-VIS spectrometry, FT-IR, การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และวิธี HPLC

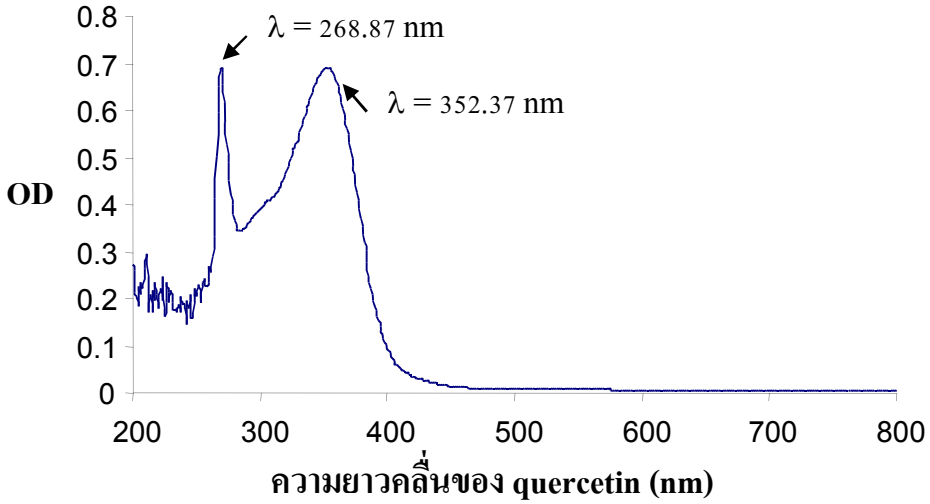
3.1 UV-Vis spectrometry เป็นการอาศัยลักษณะการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นตั้งแต่ 200-800 nm ของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วย oligomeric proanthocyanidins (OPCs), rutin, quercetin, gallic acid, catechin, epicatechin, luteolin, apigenin และ myricetin ผลการทดลองพบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน มีลักษณะของสเปคตรัมและ λ_{max} ใกล้เคียงกันกับ OPCs, catechin และ epicatechin ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 280.92 nm แสดงว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม มี OPCs, catechin และ epicatechin เป็นองค์ประกอบ ภาพสเปคตรัมของสารมาตรฐานต่าง ๆ แสดงในภาพประกอบที่ 4-14 ส่วนสเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดแสดงในภาพประกอบที่ 15



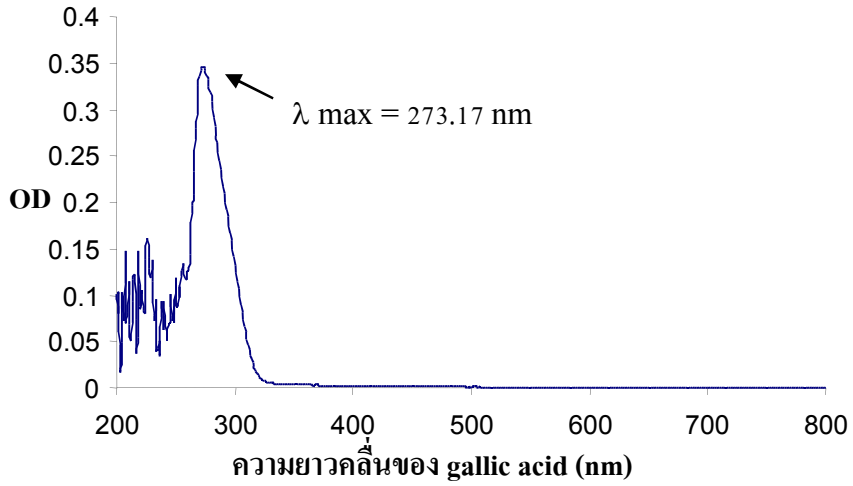
ภาพประกอบที่ 4 สเปคตรัมของสารมาตรฐาน OPCs



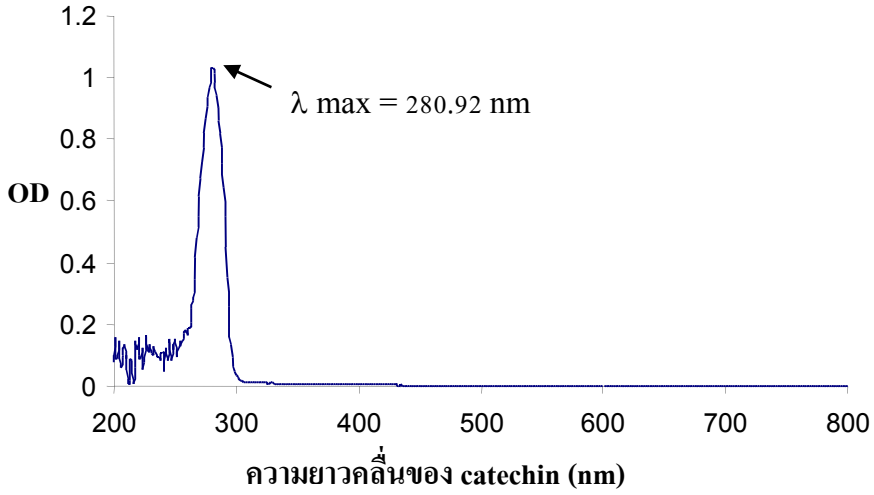
ภาพประกอบที่ 5 สเปคตรัมของสารมาตรฐาน rutin



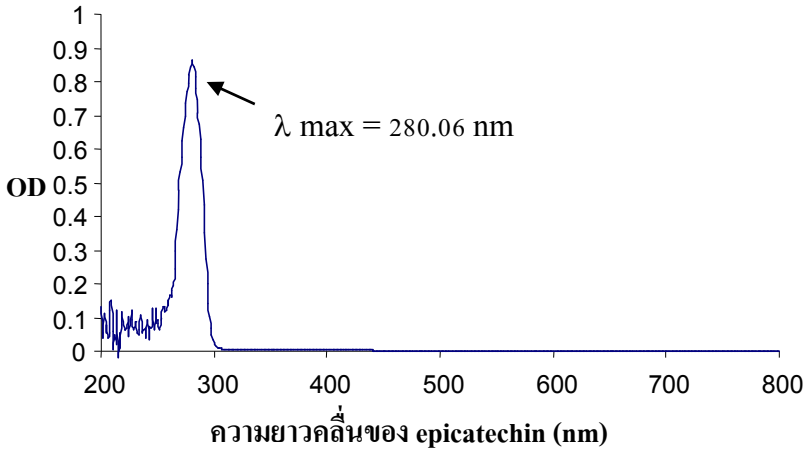
ภาพประกอบที่ 6 สเปคตรัมของสารมาตรฐาน quercetin



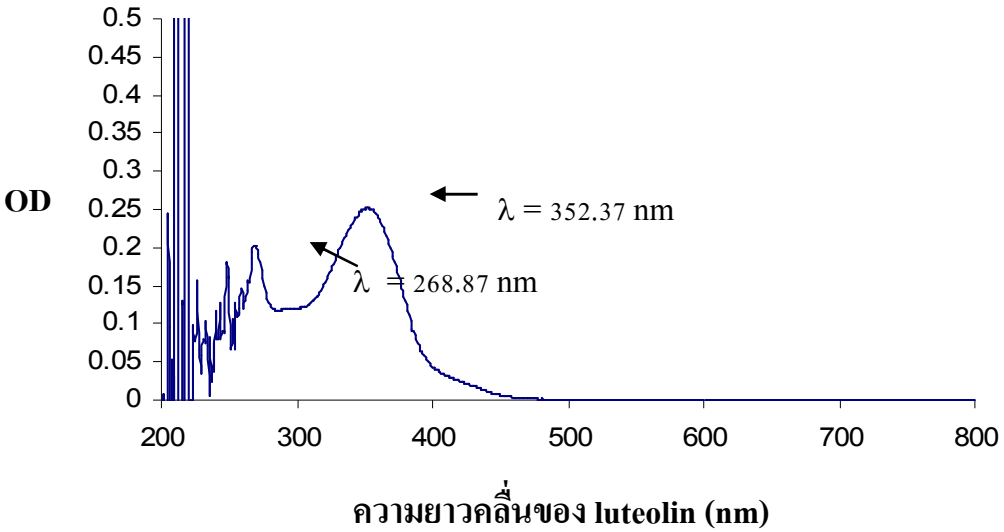
ภาพประกอบที่ 7 สเปคตรัมของสารมาตรฐาน gallic acid



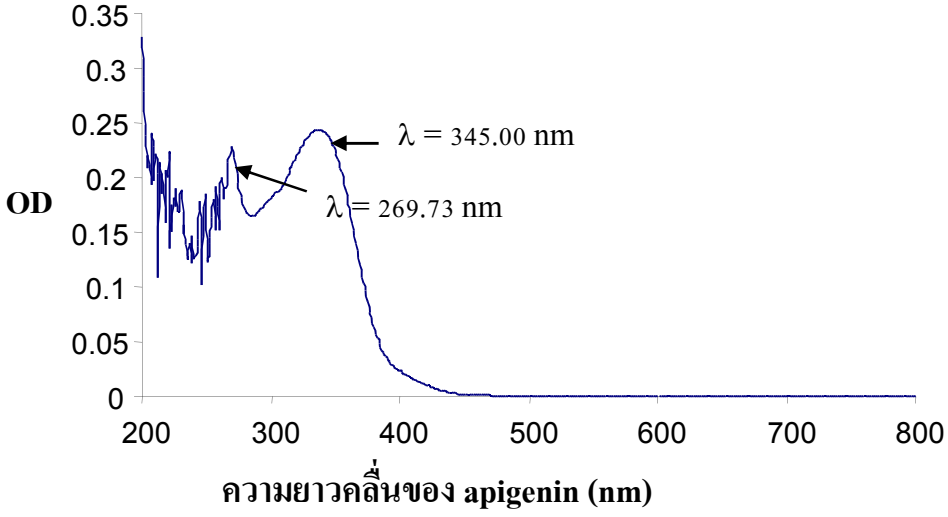
ภาพประกอบที่ 8 สเปคตรัมของสารมาตรฐาน catechin



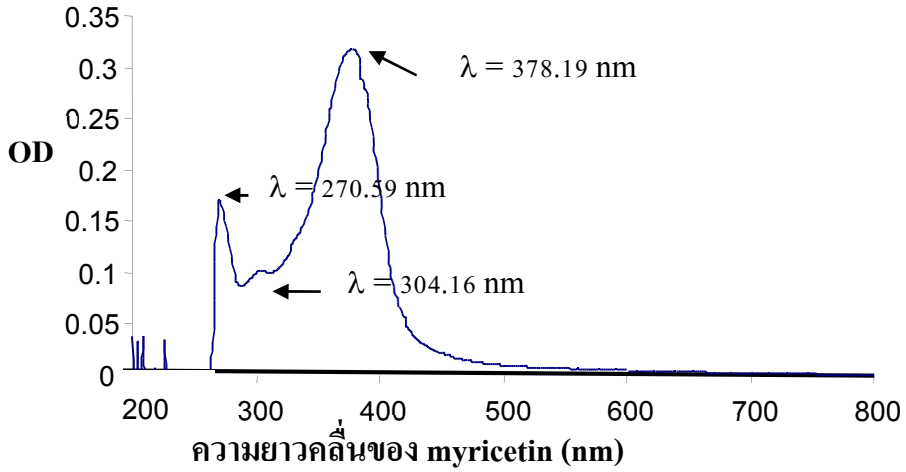
ภาพประกอบที่ 9 สเปคตรัมของสารมาตรฐาน epicatechin



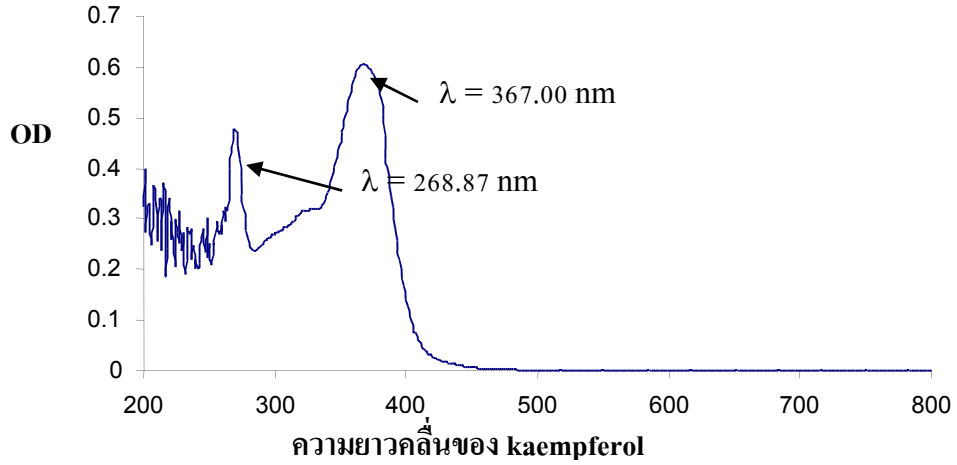
ภาพประกอบที่ 10 สเปคตรัมของสารมาตรฐาน luteolin



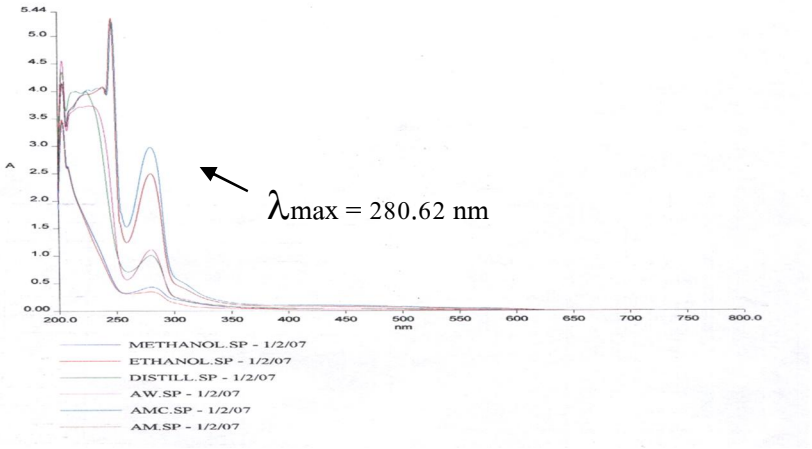
ภาพประกอบที่ 11 สเปคตรัมของสารมาตรฐาน apigenin



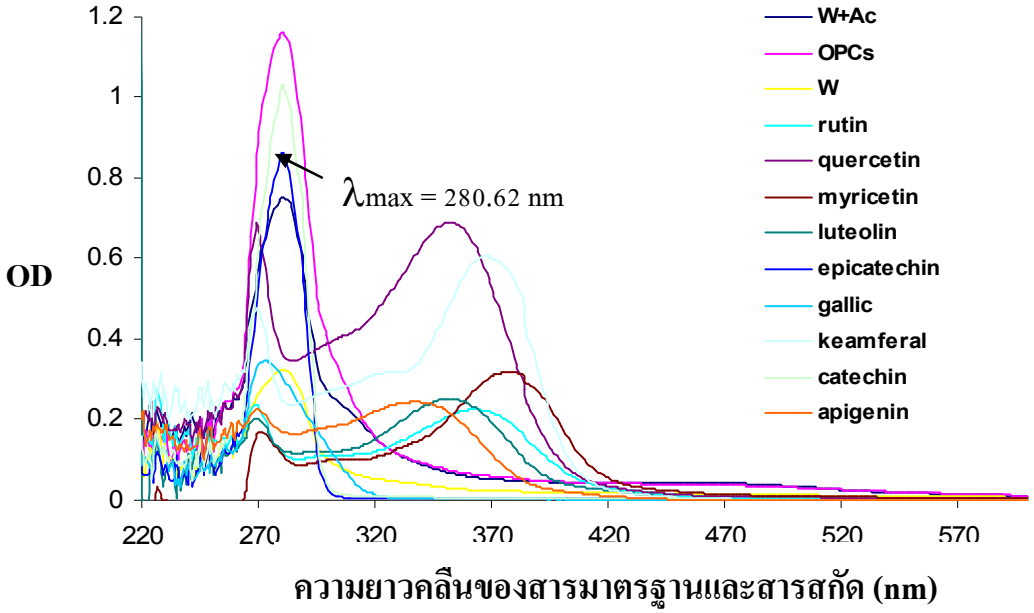
ภาพประกอบที่ 12 สเปคตรัมของสารมาตรฐาน myricetin



ภาพประกอบที่ 13 สเปคตรัมของสารมาตรฐาน kaempferol

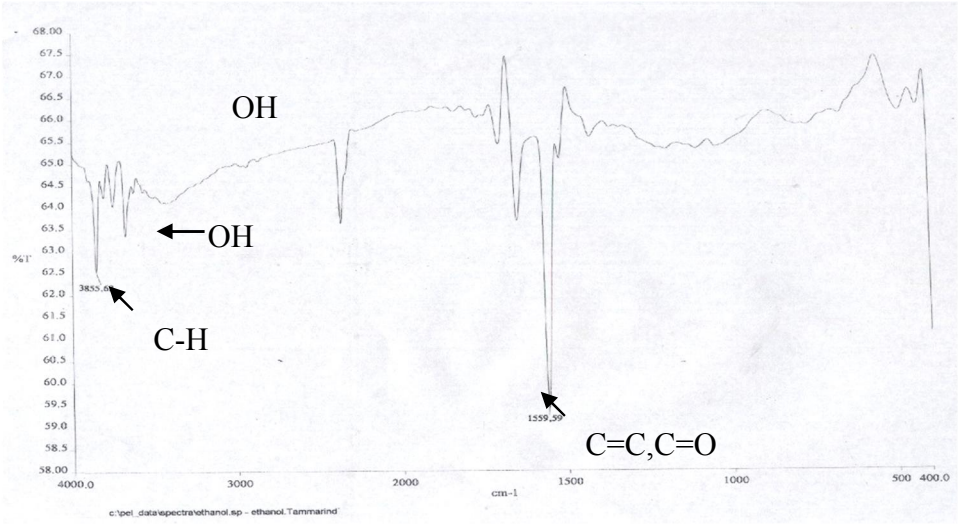


ภาพประกอบที่ 14 สเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยตัวทำละลายต่างชนิด

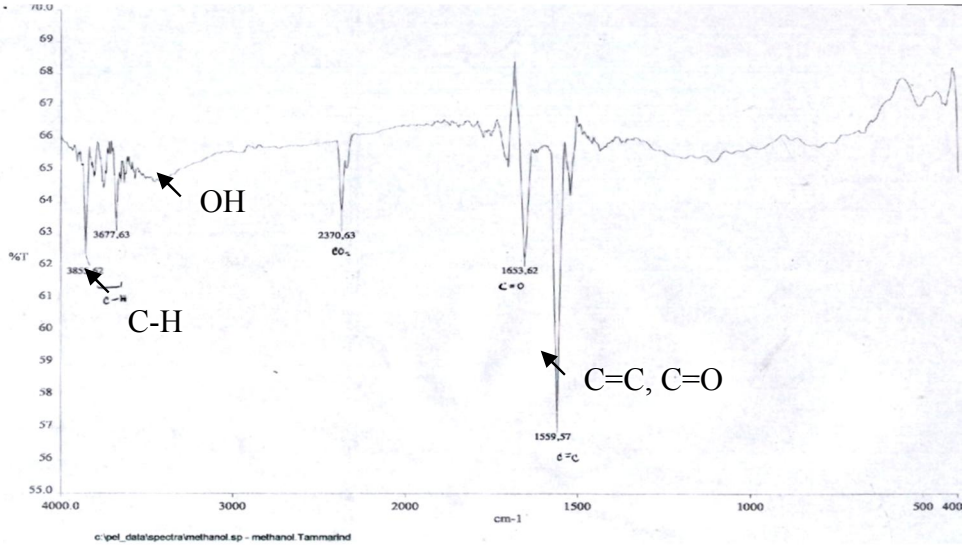


ภาพประกอบที่ 15 สเปคตรัมของสารมาตรฐานกับสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม

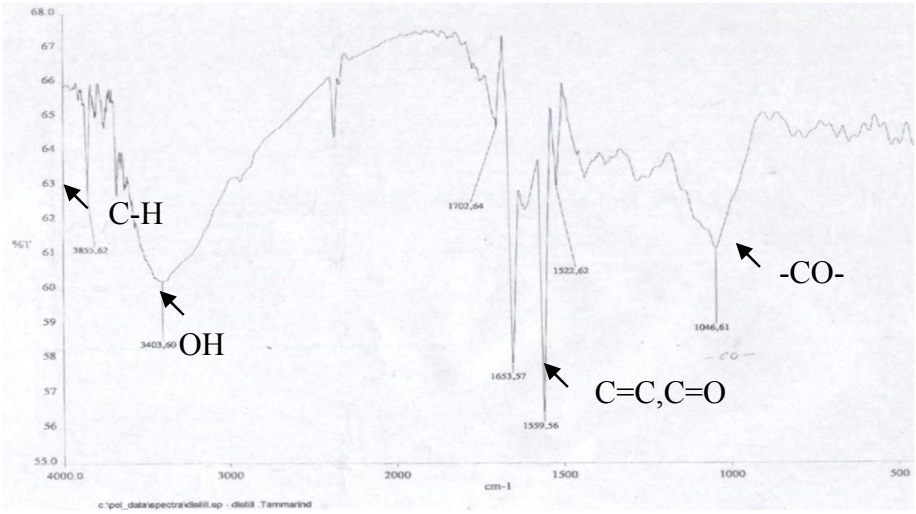
3.2 เทคนิค FT-IR หมู่ฟังก์ชั่นที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิด เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR พบว่ามีลักษณะของสเปคตรัมที่คล้ายคลึงกัน ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันหลักที่เหมือนกัน ได้แก่ C=C, C=O,-CO- และ หมู่ –OH ซึ่งหมู่ฟังก์ชันหลักเหล่านี้เหมือนกับหมู่ฟังก์ชันที่พบในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลริก ดังนั้น จึงต้องมีการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคอื่น เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้าง เช่น MS หรือ NMR เป็นต้น ลักษณะของสเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยสารละลายต่างชนิด แสดงในภาพประกอบที่ 16-21



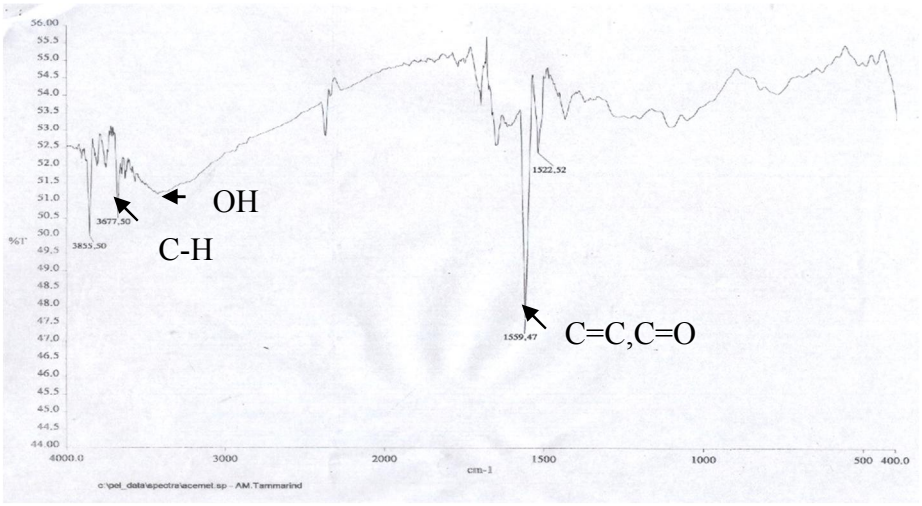
ภาพประกอบที่ 16 สเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (EtOH)



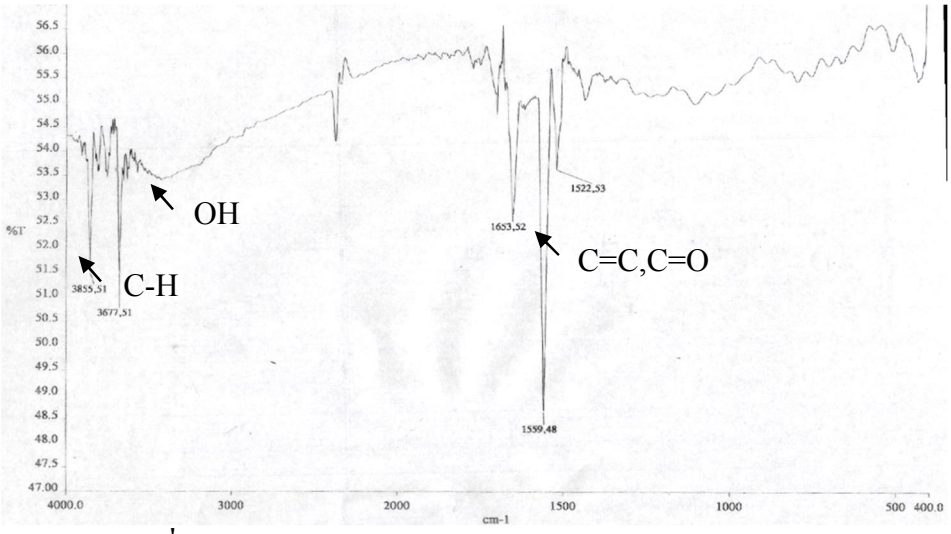
ภาพประกอบที่ 17 สเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (MeOH)



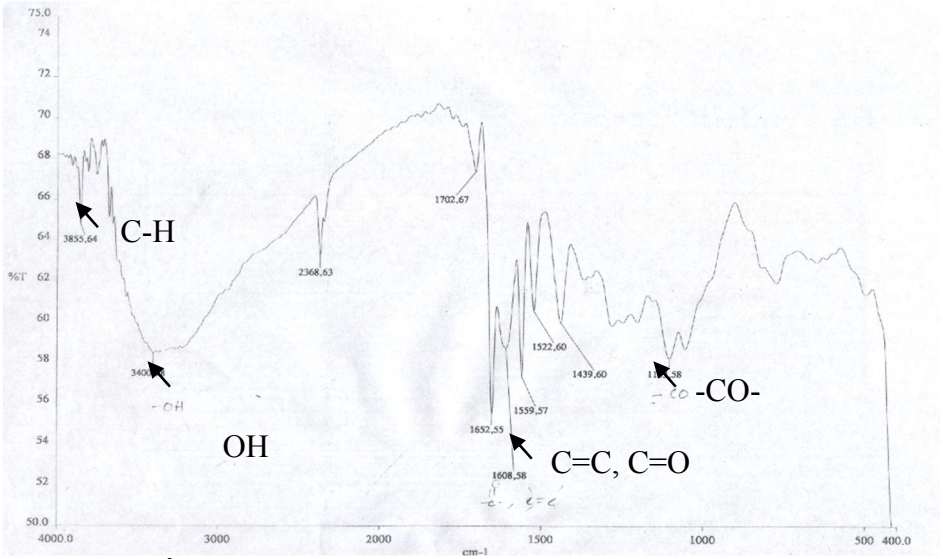
รภาพประกอบที่ 18 สเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (W)



ภาพประกอบที่ 19 สเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (MeOH+Ac)

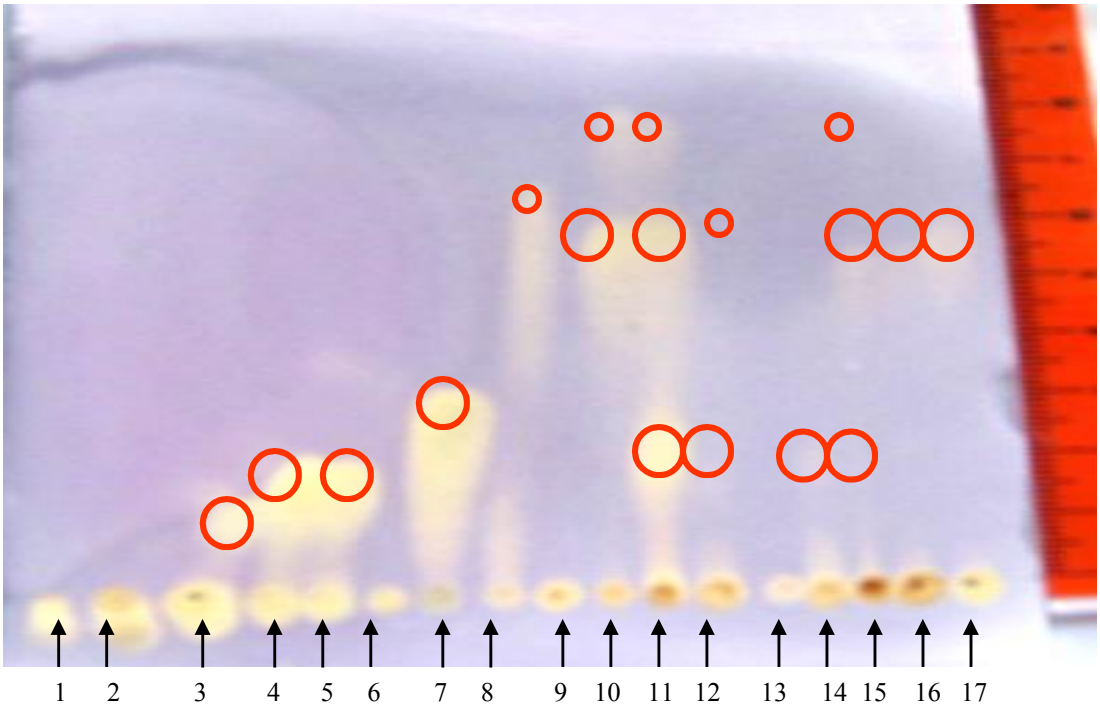


ภาพประกอบที่ 20 สเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (W+Ac)



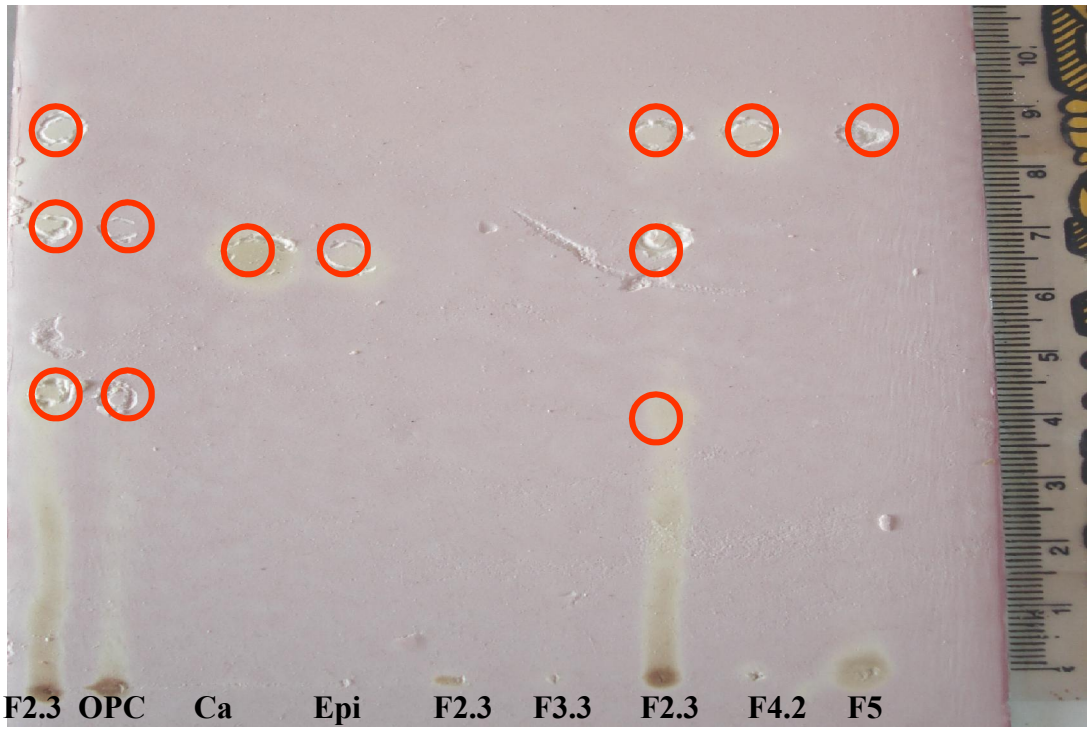
ภาพประกอบที่ 21 สเปคตรัมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (MeOH+Ac (แช่))

3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดด้วยเทคนิค TLC เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีองค์ประกอบของ OPCs, catechin และ epicatechin โดยสังเกตจากค่า R_f ซึ่งผลการทดลองนี้ (ภาพประกอบที่ 22-23 และตารางที่ 11) สอดคล้องกันกับการศึกษาด้วยเทคนิค UV-VIS spectrophotometry



ภาพประกอบที่ 22 การเคลื่อนที่ของสารมาตรฐานและสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามบนแผ่น TLC และพ่นด้วยสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.2 M

หมายเลข 1 = rutin 2 = quercetin 3 = epicatechin gallate
4 = catechin 5 = epicatechin 6 = gallic acid
7 = myricetin 8 = naringenin 9 = apigenin
10 = สารสกัดจากเมล็ดองุ่น (OPCs) 11= MeOH
12 = EtOH 13 = W 14 = MeOH+W
15 = MeOH+Ac(แช่) 16 = MeOH +Ac
17 = FW



*Ca หมายถึง catechin, Epi หมายถึง epicatechin

ภาพประกอบที่ 23 การเคลื่อนที่ของสารมาตรฐานและสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามบนแผ่น TLC และพ่นด้วยสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.2 M

ตารางที่ 11 ค่า R_f ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน/สารสกัด	ระยะทาง (cm)	ค่า R_f
Apigenin	-	-
Catechin	2.2	0.23
Epicatechin	2.2	0.23
Epicatechin gallate	1.4	0.15
Gallic acid	-	-
Myricetin	3.2	0.34
Naringenin	6.6	0.71
OPCs	6.1, 7.9	0.66, 0.85
Quercetin	-	-
Rutin	-	-
EtOH	2.2, 6.0	0.23, 0.65
MeOH	2.2, 6.1, 7.9	0.23, 0.66, 0.85
W	-	-
MeOH+Ac	6.1	0.66
MeOH+W	2.2	0.23
MeOH+Ac (แช่)	2.2, 6.1, 7.9	0.23, 0.66, 0.85
Solvent front	9.2	-

3.4 การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

3.4.1 ผลการตรวจสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

จาก Pew test พบว่าสารสกัดเมื่อทำปฏิกิริยากับผงสังกะสี และกรด HCl เกิดเป็นสีแดงอ่อน แสดงว่าในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีสารกลุ่ม flavonol

การทดสอบปฏิกิริยากับด่าง พบว่าสารสกัดเมื่อทำปฏิกิริยากับ ammonia T.S. เกิดเป็นสีส้มออกน้ำตาล แสดงว่าในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีสารกลุ่ม flavanonol

3.4.2 ผลการตรวจสอบแอนโธไซยานิน

จากการทดลองพบว่า เมื่อหยด ammonia T.S. สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมีสารกลุ่มแอนโธไซยานิน

3.4.3 ผลการตรวจสอบลิวโคแอนโธไซยานิน

จากการทดลองพบว่า เมื่อนำสารสกัดเติมกรด HCl แล้วนำไปต้ม สังเกตเห็นเหลืองออกน้ำตาล แสดงว่าในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามมี catechin

จากผลตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้น พบว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ แอนโธไซยานิน และลิวโคแอนโธไซยานิน ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tsuda et al. (1994) และ Sudjaroen et al. (2005) ที่มีการรายงานก่อนหน้านี้

3.5 การตรวจสอบโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ชนิดและปริมาณของสารประสอบฟีนอลลิกของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยตัวทำละลายต่างชนิด และสารสกัดที่ทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20 ได้รับการตรวจสอบโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานคือ catechin, epicatechin, rutin, quercetin, procyanidin B1, procyanidin B2, myricetin, luteolin, resveratrol, naringenin, apigenin และ keampferol ทำให้ทราบเวลารีเทนชัน (R_t) และพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานข้างต้น นำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีค รวมถึงคำนวณหาปริมาณสารประกอบ ฟีนอลริก ผลการทดลองในตารางที่ 11 พบว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) และเมธานอล มีปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลริกลิกมากที่สุด ซึ่งสารที่พบส่วนใหญ่ประกอบด้วย catechin, epicatechin, myricetin, และ procyanidin B1 เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความเป็นขั้ว (dielectric constant) แตกต่างกัน ทำให้มีความสามารถในการสกัดแตกต่างกัน โดยอาศัยหลักการว่าสารประเภทเดียวกันจะละลายได้ในตัวทำละลายประเภทเดียวกัน (like dissolves like) น้ำมีความเป็นขั้วมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ เมธานอล เอทานอล และอะซิโตนตามลำดับ ดังนั้น เมธานอล จึงเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัด แต่ข้อเสียของเมธานอลคือระเหยได้ช้ากว่าอะซิโตน จึงได้นำอะซิโตนมาผสมกับเมธานอลเพื่อช่วยลดเวลาในการระเหยตัวทำละลาย จากการทดลอง (ตารางที่ 11) เมธานอลสามารถสกัด catechin, naringenin, apigenin, และ ascorbic acid ได้สูงสุด สังเกตได้ว่าถ้าสกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตนโดยวิธี soxhlet สามารถสกัดสารกลุ่มฟีนอลริกได้น้อยกว่าการสกัดแบบเย็น (แช่ทิ้งไว้ก่อน) แล้วสกัดต่อโดย soxhlet ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะการสกัดแบบเย็นช่วยป้องกันการสลายตัวของสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด ซึ่งจะสลายตัวเมื่อได้รับความร้อนที่สูงเกินไป การสกัดแบบเย็นยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัดให้สูงขึ้น โดยสารสกัด MeOH+Ac (แช่) สามารถสกัดสาร epicatechin, quercetin, myricetin, gallic acid และ vanillic acid ได้สูงสุดและสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลลิกได้หลากหลายชนิด เมื่อเทียบกับตัวทำละลายอื่น ส่วนผลการตรวจวัดปริมาณสารกลุ่มฟีนอลริกในสารสกัดผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20 (ตารางที่ 12) พบว่าปริมาณสารกลุ่มฟีนอลริกในแต่ละแฟรกชันมีความแตกต่างกัน แฟรกชัน

F2.2 และ F2.3 พบสารประกอบฟีนอลลิกสูงกว่าแฟรกชันอื่น โดย แฟรกชัน F2.3 พบสารกลุ่มฟีนอลริกในปริมาณสูงและหลายชนิดสุด มีข้อน่าสังเกตคือ สารที่พบในแฟรกชันส่วนใหญ่เหมือนกันกับที่พบในสารสกัดก่อนทำบริสุทธิ์ เช่น catechin, epicatechin และ naringenin เป็นต้น ดังนั้น ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัด ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีความแปรปรวน น่าจะสามารถใช้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลลิกที่พบในปริมาณสูง เช่น myricetin, catechin และ epicatechin เพื่อเป็นดัชนีชี้แนะฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดที่ได้ทำให้บริสุทธิ์นั้น แต่ละแฟรกชันมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันขึ้นกับขนาดของโมเลกุลของสารต้านอนุมูลอิสระ ถ้าสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะถูกชะออกมาก่อนสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ตารางที่ 12 แสดงค่า retention time และค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (correlation coefficient) ของสารมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตารางที่ 13 และ 14 แสดงค่าการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยทำตัวละลายต่างชนิดและที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์sephadex LH 20 ตามลำดับ

ตารางที่ 12 เวลารีเทนชัน สมการเส้นตรง และค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ ของสารมาตรฐานที่ใช้อ้างอิงในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

สารมาตรฐาน	R_t	สมการเส้นตรง	R^2
Catechin	8.960	Y = 8.089x-4882.7	0.9998
Epicatechin	10.151	Y = 5949.9x-568.19	0.9996
Kaempferol	32.303	Y = 92607x-23185	0.9991
Luteolin	30.098	Y = 93464x+4295.8	0.9999
Myricetin	24.142	Y = 62581x-32510	0.9989
Naringenin	32.303	Y = 2256.6+1003.7	0.9995
Proanthocynin B1	13.678	Y = 1667.5x+31041	0.9941
Proanthocynin B2	16.586	Y = 2039.3x+115656	0.9989
Rutin	11.542	Y = 52454x-6272.2	0.9993
Resveratrol	26.368	Y = 30173x-75411	0.9984
Quercetin	20.8882	Y = 51892x-1367.4	1.0000

R_t หมายถึงค่า retention time, R^2 หมายถึงค่าสัมประสิทธิ์แห่งความสัมพันธ์

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก ในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม ที่สกัดด้วยสารละลายต่าง ๆ โดยวิธี HPLC

สารมาตรฐาน	EtOH	MeOH	W	MeOH+Ac	W+Ac	MeOH+Ac (แช่)
	Mean (mg/g) ±SD	Mean (mg/g) ±SD	Mean (mg/g) ±SD	Mean (mg/g) ± SD	Mean (mg/g) ± SD	mean(mg/g)±SD
Catechin	16.44 ± 0.30	41.85±0.31	3.52 ± 0.04	4.98 ± 0.15	1.96 ± 0.04	17.51 ± 0.66
Epicatechin	0.28 ± 0.00	0.20±0.74	0.07 ± 0.00	0.39 ± 0.01	0.53 ± 0.00	3.27 ± 0.02
ProcyanidinB1	3.01 ± 0.10	not found	<0.025	0.78 ± 0.20	0.74 ± 0.02	2.42 ± 0.02
ProcyanidinB2	0.025 ± 0.02	not found	< 0.05 (μg/g)	0.40 ± 0.00	0.60 ± 0.00	not found
Quercetin	0.012 ± 0.00	0.20 ± 0.02	not found	0.039 ± 0.00	not found	1.91 ± 0.04
Myricetin	0.18 ±0.05	14.02 ± 1.49	8.54 ± 2.54	0.038 ± 0.00	17.15 ± 0.54	38.15 ± 2.03
Luteolin	not found	not found	not found	0.016 ± 0.02	not found	0.005 ± 0.00
Naringenin	0.034 ± 0.00	0.69 ± 0.08	not found	not found	0.016 ± 0.00	0.11 ± 0.00
Apigenin	0.034 ± 0.00	0.98 ± 0.00	not found	not found	0.02 ± 0.00	0.029 ± 0.00
Ascorbic acid	0.18 ± 0.00	3.42 ± 0.02	0.95±0.05	0.54 ±0.07	0.40 ± 0.01	0.79 ± 0.05
Gallic acid	0.47 ± 0.04	not found	not found	not found	0.34 ± 0.00	0.41 ± 0.00
Vanillic acid	0.04 ± 0.00	not found	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.14 ± 0.00
Lactic acid	0.034 ± 0.00	not found	not found	not found	0.004 ± 0.00	0.01 ± 0.00
รวม	20.76	61.39	13.23	7.31	21.88	64.80
ร้อยละ/กรัมแห้ง (g/100g)	2.76	6.14	1.32	0.731	2.18	6.48

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของสารประกอบฟีนอลิกที่วิเคราะห์ด้วย HPLC จำนวน 3 ซ้ำของแต่ละตัวอย่าง

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก ในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม ซึ่งผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20 โดยวิธี HPLC

สารมาตรฐาน	**F21**	**F22**	**F23**	**F24**	**F25**
	mean(μg/g)±SD	mean(μg/g)±SD	mean(μg/g)±SD	mean(μg/g)±SD	mean(μg/g)±SD
Catechin	0.83 ± 0.00	1135.26 ± 8.50	1600.00 ± 30.00	12.14 ± 0.24	4.42±0.11
Epicatechin	0.06 8± 0.001	29.37 ± 1.49	93.00 ± 0.00	0.498 ± 0.02	0.120±0.012
ProcyanidinB1	＜25	89.90 ± 4.62	310.00 ±0.00	＜25	＜25
ProcyanidinB2	not found	66.33 ± 4.72	240.00 ± 30.00	0.519 ± 0.075	43.398±0.00
Quercetin	0.11 ± 0.00	1.80 ± 0.03	10.00 ± 0.00	0.288±0.003	0.157±0.003
Myricetin	not found	0.220 ± 0.00	1.00 ± 0.00	not found	not found
Luteolin	not found	not found	0.041±0.02	＜0.01 μg/g)	0.025±0.001
Naringenin	63.52 ± 3.28	not found	2.85 ± 0.24	not found	not found
Apigenin	not found	not found	1.85 ± 0.03	not found	not found
Ascorbic acid	2.23 ±0.08	1.56 ± 0.00	30.00 ±0.00	5.35 ± 0.01	3.396±0.016
Gallic acid	not found	not found	40.00 ±0.00	5.58 ± 0.75	1.130±0.318
Vanillic acid	4.48 ± 0.58	0.27 ± 0.02	not found	0.80 ± 0.05	not found
Lactic acid	not found	not found	10.00 ±0.00	not found	not found
รวม	71.24	1324.74	2360.00	25.19	52.652
ร้อยละ/กรัมแห้ง (g/100g)	0.007	0.132	0.237	0.003	0.005

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของสารประกอบฟีนอลิกที่วิเคราะห์ด้วย HPLC จำนวน 3 ซ้ำของแต่ละตัวอย่าง

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สารมาตรฐาน	F31	F32	F33	F41	F42	F43	F44
	mean(μg/g) ± SD	mean(μg/g) ±SD	mean(μg/g) ±SD	mean(μg/g)±SD	mean(μg/g)±SD	mean(μg/g)±SD	mean(μg/g)±SD
Catechin	1.12 ± 0.00	3.06 ± 0.01	23.39 ± 0.14	0.478±0.011	40.91 ± 0.71	19.95 ± 0.11	9.64 ± 0.24
Epicatechin	not found	0.15 ± 0.01	0.20 ± 0.01	not found	0.30 ± 0.10	0.24 ± 0.01	not found
ProcyanidinB1	＜25	not found	not found	＜25	＜25	＜25	not found
ProcyanidinB2	＜0.05	0.16 ± 0.030	＜0.05	＜0.05	＜0.05	＜0.05	＜0.05
Quercetin	0.017 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.27 ± 0.00	not found	2.40 ± 0.00	not found	not found
Myricetin	not found	0.053 ± 0.00	0.35 ± 0.01	not found	0.45 ± 0.00	0.47 ±0.01	not found
Luteolin	< 0.01	0.006 ± 0.00	0.26 ± 0.00	not found	0.09 ± 0.00	0.23 ± 0.01	0.04 ± 0.00
Naringenin	0.98 ± 0.02	0.045 ± 0.00	not found	0.666 ± 0.000	1.51 ± 0.02	2.42 ± 0.05	not found
Apigenin	not found	0.092 ± 0.00	not found	not found	0.56 ± 0.00	0.67 ±0.00	not found
Ascorbic acid	1.47 ± 0.00	0.92 ± 0.03	3.08 ± 0.03	3.013 ± 0.041	4.26 ± 0.02	5.05 ±0.04	4.49 ± 0.02
Gallic acid	not found	0.88 ± 0.02	2.51 ± 0.12	not found	11.11 ± 0.71	5.38 ± 0.26	4.43 ± 0.13
Vanillic acid	not found	0.10 ± 0.00	0.56 ± 0.00	not found	1.23 ± 0.02	0.58 ± 0.06	not found
Lactic acid	not found	0.06 ± 0.00	0.34 ± 0.01	not found	0.15 ± 0.00	not found	not found
รวม	3.605	5.682	31.002	4.157	63.017	35.024	18.616
ร้อยละ/กรัมแห้ง (g/100g)	0.0003	0.001	0.003	0.0004	0.006	0.004	0.002

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของสารประกอบฟีนอลิกที่วิเคราะห์ด้วย HPLC จำนวน 3 ซ้ำของแต่ละตัวอย่าง

4. ผลทดสอบการหาปริมาณสารออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณ procyanidin ในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยวิธีและตัวทำละลายที่แตกต่างกันจากตารางที่ 15 แสดงว่าสารที่สกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตนแช่ มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำกับอะซิโตน และเมธานอลกับอะซิโตน ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน ปริมาณ procyanidin มีค่าสูงสุดในสารที่สกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตนแช่ ส่วนสารที่สกัดด้วยน้ำกับอะซิโตน และเมธานอลกับอะซิโตนมีปริมาณ procyanidin ที่ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้เป็นผลสืบเนื่องจากวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่แตกต่างกัน การสกัดแบบเย็น (แช่) ช่วยลดการสลายตัวของสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระไม่สลายไปกับความร้อนที่ใช้ในการสกัด ส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณ procyanidin มีค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยวิธีอื่น

ตารางที่ 15 ปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณ procyanidin ในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม

สารสกัด	ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg/g แห้งของเปลือกมะขาม) ± SD	ปริมาณ procyanidin (mg/gแห้งของเปลือกมะขาม) ± SD
MeOH+Ac	128.27 ± 1.01[a]	9.54 ± 1.02[a]
W+Ac	157.97 ± 1.95[b]	10.79 ± 0.80[a]
MeOH+Ac(แช่)	221.74 ± 5.82[c]	42.24 ± 0.61[b]

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในตัวทำละลายต่างชนิด

5.1 การตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน และสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิด รวมถึงแฟรกชันต่าง ๆ ที่ผ่านการทำให้กึ่งบริสุทธิ์ แสดงในตารางที่ 16-18 ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยตัวทำละลายต่างชนิด (ตารางที่ 16) พบว่าในกรณีที่ใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวในการสกัดสาร ตัวทำละลายเมธานอล สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ > เอธานอล > น้ำ ($p \leq 0.05$) สารที่สกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน, เมธานอลกับอะซิโตนแช่, น้ำกับอะซิโตน และ เมธานอล มีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกัน คือปริมาณ 6.76- 8.43 μg/ml และสารที่สกัดได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารที่ได้จากการสกัดด้วยเอธานอล และน้ำกลั่น ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 16) เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารสกัดกับสารมาตรฐานพบว่าให้ผลที่แตกต่างกัน ขึ้นกับว่าเปรียบเทียบ

ฤทธิ์ของสารสกัดกับสารมาตรฐานใด สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน, เมธานอลกับอะซิโตน (แช่), น้ำกับอะซิโตน และ เมธานอล มีค่า IC_{50} ไม่แตกต่างจากสารมาตรฐาน trolox และ ascorbic acid แต่มีฤทธิ์ต่ำกว่าสารมาตรฐาน quercetin และ gallic acid และมีฤทธิ์สูงกว่าสารมาตรฐาน rutin ($p \leq 0.05$)

ในกรณีที่เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกับสารมาตรฐาน trolox และ ascorbic acid โดยรายงานเป็นค่า TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) และค่า AEAC (ascorbic acid equivalent antioxidant capacity) ตามลำดับ (ตารางที่ 16) พบว่าสารที่ได้จากการสกัดด้วย เมธานอลกับอะซิโตน, เมธานอลกับอะซิโตน (แช่) และน้ำกับอะซิโตน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน และมีค่าสูงกว่าสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกันแต่ปราศจากอะซิโตน คือตัวทำละลาย เอธานอล เมธานอล และน้ำ (ในกรณีของ TEAC) และตัวทำละลายเอธานอลและน้ำ (ในกรณีของ AEAC) ดังนั้น การใช้ตัวทำละลายมากกว่าหนึ่งชนิด หรือใช้อะซิโตนเป็นสารสกัดร่วมสามารถส่งเสริมการสกัดสารที่มีฤทธิ์กำจัดอนุลอิสระของ DPPH ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเฉพาะเมื่อพิจารณาในกรณีของน้ำ ที่เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพต่ำสุดในการสกัดสาร ไม่ว่าจะแสดงค่าเป็น IC_{50}, TEAC หรือ AEAC ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 16) แต่ถ้าใช้อะซิโตนเป็นสารสกัดร่วม (W+Ac) อะซิโตนสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารให้เทียบเท่าตัวทำละลายเดี่ยวชนิดอื่นที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าในการสกัด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน, เมธานอลกับอะซิโตน (แช่) และน้ำกับอะซิโตน เมื่อเทียบเป็นค่า TEAC และ AEAC มีค่าดีกว่าสารมาตรฐาน rutin แต่ด้อยกว่าสารมาตรฐานอื่น คือ trolox, ascorbic acid, quercetin และ gallic acid อนึ่ง ในบรรดาสารมาตรฐานที่ใช้ gallic acid และ rutin เป็นสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงสุดและต่ำสุดตามลำดับ

ส่วนสารที่สกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) ตามด้วยการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephedex LH 20 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เมื่อแสดงเป็นค่า IC_{50} และ TEAC (ในแฟรคชัน F2 และ F3) ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 17) โดยแฟรกชัน F2 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในสารสกัดหยาบที่ยังไม่ได้ผ่านการทำบริสุทธิ์ อาจมีสารชนิดอื่นซึ่งไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรวมอยู่ด้วย แต่เมื่อนำสารสกัดมาทำการสกัดซ้ำ และทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20 จึงทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในแฟรกชัน F2 และ F3 ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ส่งผลให้ได้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น

เมื่อนำแฟรกชัน F2 ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดมาทำให้กึ่งบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นอีกโดยผ่านคอลัมน์ sephadex LH20 และแยกแฟรกชันพบว่า เมื่อแฟรกชันมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น นอกจากไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าแฟรกชัน F2 ที่ยังไม่ผ่านการทำให้กึ่งบริสุทธิ์ (ตารางที่ 18) ทุกแฟรกชันกลับมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลง ทั้งนี้อาจแป็นเพราะลักษณะตามธรรมชาติของสารในกลุ่มพีนอล

ริก กลุ่มสารที่ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีนั้น จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสารชนิดต่าง ๆ แต่เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์ สารชนิดต่าง ๆ ถูกแยกออกไปในแต่ละแฟรกชัน ทำให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของแต่ละแฟรกชันลดลง ดังนั้นการทำสารสกัดให้บริสุทธิ์มีทั้งข้อดี และข้อเสีย การทำสารสกัดให้บริสุทธิ์ต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสม จึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แต่ถ้าสารสกัดถูกทำให้บริสุทธิ์มากเกินไป ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจจะมีค่าลดลง ทั้งนี้ขึ้นกับส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ต่าง ๆ ในสารสกัดที่จะมีปฏิกริยาร่วมกันในการทำงาน ซึ่งอาจแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของสารสกัด

ตารางที่ 16 ค่า IC_{50}, TEAC, AEAC ของสารมาตรฐานและสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิด (เมื่อตรวจสอบโดยวิธี DPPH)

สาร	IC_{50} (µg /ml) ± SD	mgTEAC/mg ± SD	mgAEAC/mg ± SD
Trolox	5.31 ± 0.12^{cdf}	1.00 ± 0.00^{hi}	0.93 ± 0.02^{hi}
Rutin	15.12 ± 0.48^{i}	0.35 ± 0.01^{c}	0.33 ± 0.01^{c}
Quercetin	3.29 ± 0.09^{b}	1.62 ± 0.05^{j}	1.50 ± 0.04^{j}
Ascorbic acid	4.93 ± 0.02^{cdf}	1.08 ± 0.03^{hi}	1.00 ± 0.00^{hi}
Gallic acid	0.77 ± 0.01^{a}	6.93 ± 0.27^{k}	6.43 ± 0.10^{k}
EtOH	50.07 ± 0.72^{j}	0.11 ± 0.00^{b}	0.10 ± 0.00^{b}
MeOH	8.43 ± 0.12^{fh}	0.44 ± 0.33^{d}	0.41 ± 0.31^{df}
W	117.09 ± 0.33^{k}	0.05 ± 0.00^{a}	0.04 ± 00^{a}
MeOH+Ac	6.76 ± 0.24^{efg}	0.79 ± 0.01^{efg}	0.73 ± 0.03^{efg}
W+Ac	6.99 ± 0.21^{efg}	0.76 ± 0.01^{efg}	0.71 ± 0.02^{efg}
MeOH+Ac(แช่)	6.98 ± 0.39^{cdefgh}	0.76 ± 0.03^{efg}	0.71 ± 0.04^{defg}

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 17 ค่า IC_{50}, TEAC, AEAC ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH +Ac (แช่) และนำมาทำให้กึ่งบริสุทธิ์โดยการแยกแฟรกชัน (เมื่อตรวจสอบโดยวิธี DPPH)

สาร	IC_{50} (µg /ml) ± SD	mgTEAC/mg ± SD	mgAEAC/mg ± SD
MeOH + Ac (แช่)	6.98 ± 0.39^{c}	0.76 ± 0.03^{b}	0.71 ± 0.04^{cde}
F2	5.02 ± 0.24^{a}	1.06 ± 0.06^{d}	0.98 ± 0.04^{ef}
F3	5.72 ± 0.06^{b}	0.93 ± 0.02^{c}	0.86 ± 0.01^{def}
F4	7.05 ± 0.24^{c}	0.75 ± 0.02^{b}	0.70 ± 0.03^{cd}
F5	15.12 ± 0.27^{e}	0.35 ± 0.01^{a}	0.33 ± 0.01^{a}
F6	13.51 ± 0.15^{d}	0.39 ± 0.01^{a}	0.37 ± 0.01^{b}

*แฟรกชัน F1 ประกอบด้วยสารที่ใช้ชะล้างคอลัมน์เป็นหลัก จึงไม่ได้นำมาวิเคราะห์สถิติ

ตารางที่ 18 ค่า IC_{50}, TEAC, AEAC ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามแฟรกชัน 2 ที่นำมาทำให้กึ่งบริสุทธิ์อีกครั้งโดยแยกแฟรกชัน (เมื่อตรวจสอบโดยวิธี DPPH)

สาร	IC_{50} (µg /ml) ± SD	mgTEAC/mg ± SD	mgAEAC/mg ± SD
F2	5.02 ± 0.24^{a}	1.06 ± 0.06^{d}	0.98 ± 0.04^{d}
F2.2	16.77 ± 1.23^{d}	0.32 ± 0.02^{a}	0.30 ± 0.02^{a}
F2.3	8.38 ± 0.69^{b}	0.64 ± 0.04^{c}	0.59 ± 0.05^{c}
F2.4	11.12 ± 0.19^{c}	0.48 ± 0.02^{b}	0.44 ± 0.01^{b}

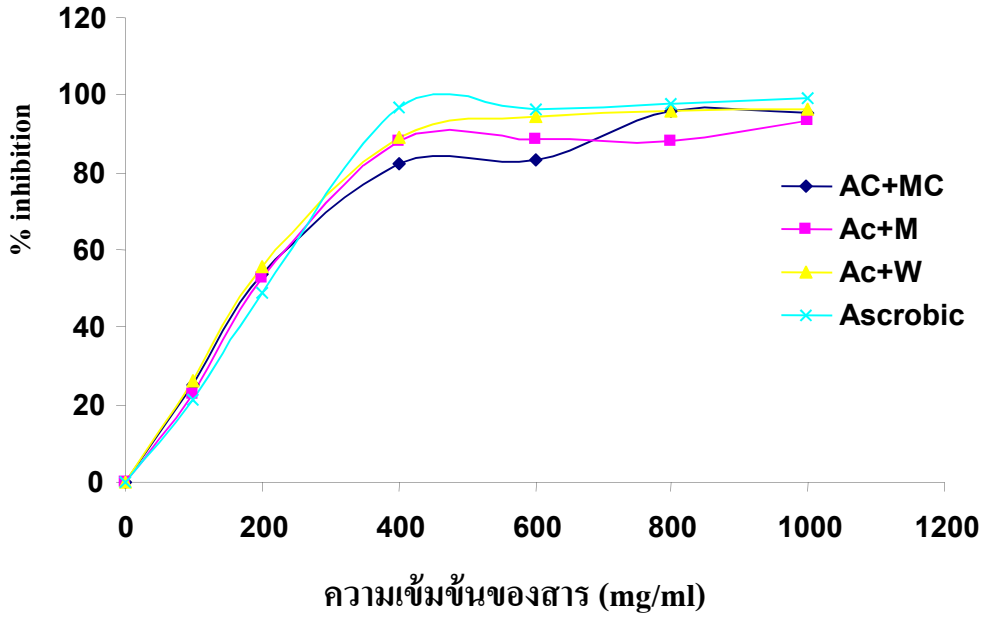
*แฟรกชัน F2.1 มีปริมาณน้อยมาก ไม่สามารถวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้

5.2 การตรวจสอบโดยวิธี ABTS$^{\bullet+}$ ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน มีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกันประมาณ 0.20 mg/ml ซึ่งใกล้เคียงกับค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน ascorbic acid แสดงว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เทียบเท่าสารมาตรฐาน ascorbic acid เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$ ดังสังเกตจากค่า AEAC ซึ่งมีค่าใกล้เคียงหรือเท่ากับ 1 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลที่ตรวจสอบโดยวิธี DPPH โดยสารสกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) เมธานอลกับอะซิโตน และน้ำกับอะซิโตน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 19 และภาพประกอบที่ 24)

ตารางที่ 19 ค่า IC_{50} และ AEAC ของสารมาตรฐานและสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม เมื่อตรวจสอบโดยวิธี ABTS$^{\bullet+}$

สารมาตรฐาน/สารสกัด	IC_{50} (mg/ml) ± SD	mgAEAC /mg ± SD
Ascorbic acid	0.19 ± 0.01[a]	1.00 ± 0.00[a]
MeOH+Ac	0.20 ± 0.03[a]	0.98 ± 0.28[a]
W+Ac	0.18 ± 0.01[a]	1.07 ± 0.05[a]
MeOH+Ac (แช่)	0.18 ± 0.01[a]	1.03 ± 0.06[a]

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพประกอบที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition ของสารมาตรฐานกับสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี ABTS$^{\bullet+}$

5.3 การตรวจสอบโดยวิธี chelating property ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามทั้ง 3 ชนิดมี chelate activity ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 20) และสารสกัดทั้ง 3 ชนิดมีค่า IC_{50} เทียบเท่าสารมาตรฐาน butyl hydroxyl anisole (BHA) แสดงว่าสารสกัดมีความสามารถในการแย่ง ferrozine ในการจับกับ Fe^{+2} เทียบเท่าสารมาตรฐาน BHA หรือสารสกัดสามารถ chelate Fe^{+2}

เท่า BHA คุณสมบัติของสารสกัดที่สามารถ chelate กับ Fe^{+2} มีความสำคัญยิ่ง เนื่องจาก transition metals โดยเฉพาะ Fe^{+2} มีบทบาทชักนำให้เกิดปฏิกริยา Fenton (Fenton reaction) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต สารตัวกลางที่มีฤทธิ์ออกซิไดซ (oxidizing intermediate) จากปฏิกริยา Fenton เช่น superoxide และ hydroxyl radical สามารถชักนำให้เกิดความเสียหายต่อ macromolecule ต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น ทำให้เกิด initiation และ propagation ของ lipid peroxidation ที่ membrane เกิดการออกซิไดซ์กรดอะมิโน และ DNA งานวิจัยในปัจจุบันชี้ชัดถึงบทบาทและความสำคัญของ Fenton chemistry ในทางชีววิทยาที่เป็นสาเหตุหรือเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพที่พบในโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น กระบวนการแก่ (aging process) การเกิดมะเร็ง โรคเกี่ยวกับความเสื่อมของระบบประสาท และโรคหัวใจ เป็นต้น (Halliwell, 2006; Prousek, 2007; Barbusiński, 2009) ดังนั้น สารสกัดที่มีคุณสมบัติเป็น chelating agent สำหรับ Fe^{+2} จึงสามารถลดปริมาณ transition metals ที่ชักนำให้เกิด lipid peroxidation และลดความเสียหายของ macromolecule อื่นภายในเซลล์ โดยลดปริมาณของสารตัวกลางที่มีฤทธิ์ออกซิไดซ์ต่าง ๆ ที่เกิดจากปฏิกริยา Fenton

ตารางที่ 20 ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน และสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม เมื่อตรวจสอบโดยวิธี chelating property

สาร	IC_{50}(mgของสารสกัด/ml) ± SD
BHA	0.91 ± 0.05^{a}
MeOH+Ac	0.86 ± 0.06^{a}
W+Ac	0.85 ± 0.18^{a}
MeOH+Ac(แช่)	0.99 ± 0.11^{a}

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5.4 การตรวจสอบโดยวิธี FRAP ผลการตรวจสอบ (ตารางที่ 21) พบว่าสารที่ได้จากการสกัดเปลือกเมล็ดมะขามด้วยเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) มีความสามารถสูงสุดเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายอื่น ($p \leq 0.05$) ในการรีดิวซ์ Fe (TPTZ)(III) ให้เปลี่ยนเป็น Fe (TPTZ)(II) ซึ่งมีสีน้ำเงินเข้มขึ้นตามความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดที่ได้จากเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงกว่าสารมาตรฐาน trolox 23.76% ความสามารถในการรีดักชันของสารที่สกัดด้วยน้ำกับอะซิโตน มีค่าเทียบเท่าสารมาตรฐาน trolox ส่วนสารที่ได้จากการสกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน มีฤทธิ์ต่ำสุด โดยมีความสามารถในการรีดิวซ์น้อยกว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) .....% ดังนั้น ถึงแม้จะใช้ตัวทำละลายแบบเดียวกันใน

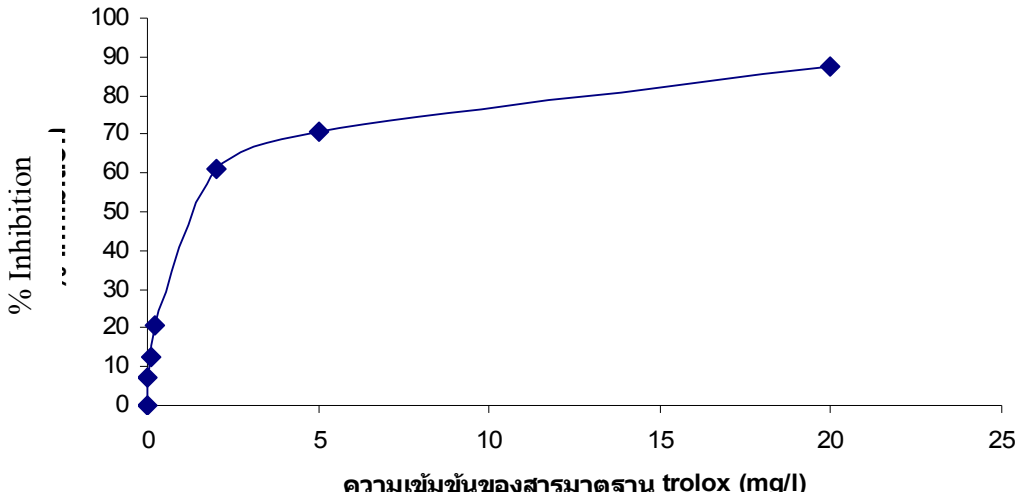
การสกัด แต่วิธีการสกัดที่ใช้แตกต่างกัน คือใช้ soxlet (ในกรณีของ เมธานอลกับอะซิโตน) และ maceration (ในกรณีของ เมธานอลกับอะซิโตน (แช่)) สารสกัดที่ได้จะมีความสามารถในการรีดิวซ์ต่างกัน จึงเป็นไปได้ว่า ขั้นตอนของการสกัดแบบเย็นโดยแช่ทิ้งไว้ก่อน ต่อด้วยการสกัดด้วย soxlet มีผลลดการทำลายสารออกฤทธิ์ในปฏิกริยารีดักชันได้ดีกว่า ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระผ่านกลไกอื่น เช่น การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ ABTS$^{\bullet+}$ และคุณสมบัติในการ chelate Fe^{+2} ไม่มีอิทธิพลของวิธีการสกัดโดยใช้ soxlet หรือการทำ maceration ก่อนแต่อย่างใด (ตารางที่ 16 และตารางที่ 19-20)

ตารางที่ 21 ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน trolox เมื่อตรวจสอบโดย FRAP assay

สารสกัด	mgTEAC/mg สารสกัด ± SD
Trolox	1.01 ± 0.02^{bc}
MeOH +Ac	0.72 ± 0.06^{a}
W + Ac	0.92 ± 0.08^{bc}
MeOH+Ac (แช่)	1.25 ± 0.04^{d}

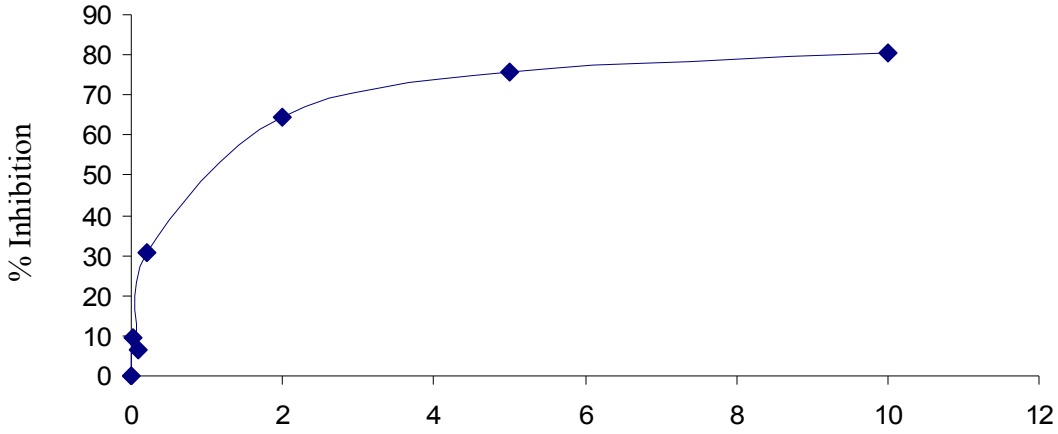
6. ผลทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

การตรวจสอบโดยวิธีการต้านการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ผลการตรวจสอบพบว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) มีฤทธิ์ต้านการแตกตัวของเม็ดเลือดได้ดีกว่าสารมาตรฐาน trolox เล็กน้อย เมื่อเทียบที่ความเข้มข้นเดียวกัน (ภาพประกอบที่ 25 และ 26)



ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน trolox (mg/l)

ภาพประกอบที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox

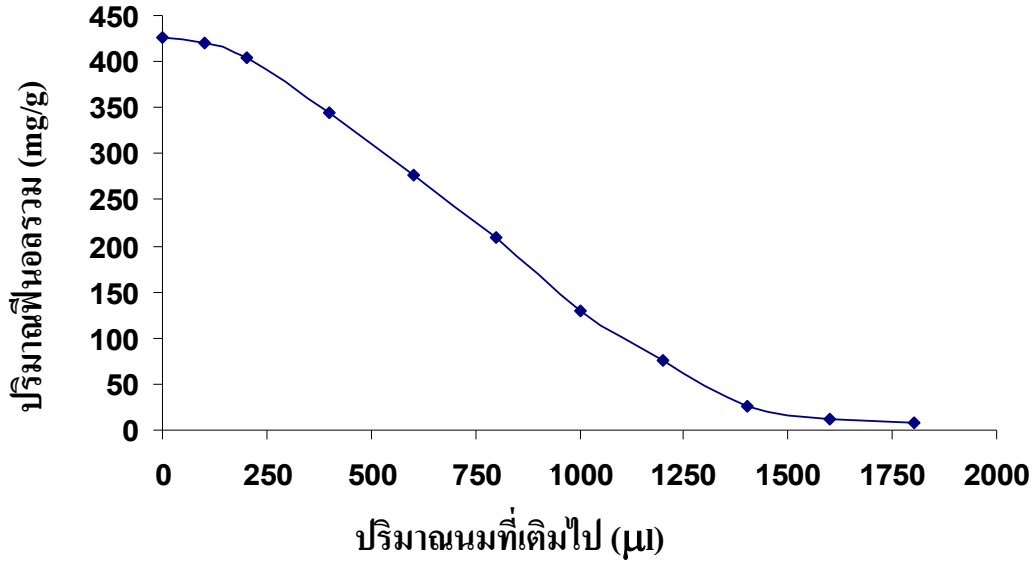


ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (mg/l)

ภาพประกอบที่ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างการยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงกับความเข้มข้นของสารสกัดจากเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน (แช่)

7. ผลการตกตะกอนแทนนินด้วยนมสด

เนื่องจากสารในกลุ่มแทนนินเป็นสารที่มีความเป็นพิษเมื่อนำมาใช้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงมีการศึกษาการตกตะกอนแทนนินเพื่อกำจัดส่วนที่เป็นพิษออกก่อนที่จะนำมาศึกษาในขั้นต่อ ๆ ไป จากผลการทดลองพบว่าโปรตีนจากนมสด (พร่องมันเนย ตราหมี) ในปริมาณ 200 µl เป็นปริมาณสูงสุดที่เหมาะสมในการตกตะกอนแทนนิน เพราะถ้าใส่โปรตีนจากนมสดมากเกินไป จะทำให้สารต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามตกตะกอนออกมาด้วย ทำให้ปริมาณโพลิฟีนอลน้อย และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอาจจะลดลงด้วย ผลการทดลองการตกตะกอนแทนนินของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามแสดงในภาพประกอบที่ 27



ภาพประกอบที่ 27 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณนมที่ใช้ในการตกตะกอนแทนนินของสารสกัดจากเมล็ดมะขามกับปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัด

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขาม โดยใช้การสกัดแบบ soxlet ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เอธานอล เมธานอล น้ำกลั่น น้ำกับอะซิโตน เมธานอลกับอะซิโตน และเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) พบว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม ซึ่งสกัดด้วย เอธานอลมีร้อยละของการสกัดมากที่สุด (63%) สารสกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) มีปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณ procyanidin สูงสุด จากการนำสารสกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) มาทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ sephadex LH 20 พบว่าทั้งแฟรกชัน F2 และ F3 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เมื่อแสดงค่าเป็น IC_{50} และ TEAC ดีกว่าสารสกัดที่ยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ และมีค่าสูงกว่า fraction อื่น ๆ ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วย วิธีต่าง ๆ คือ TLC, UV-VIS spectrometry FT-IR และการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของสารประกอบฟีนอลลิก พบว่าผลการทดลองนั้นสอดคล้องกัน คือสารสกัดมีองค์ประกอบของ OPCs, catechin และ epicatechin ผลตรวจวัดปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) และเมธานอล มีปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลลิกสูงสุด และเมื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งทางเคมีและชีวภาพ ด้วยวิธีต่าง ๆ คือ DPPH, $ABTS^{+}$ chelating property และ FRAP พบว่าสารสกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) เมธานอลกับอะซิโตน และ น้ำกับอะซิโตนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นในกรณีของการทดสอบด้วยวิธี FRAP ที่สารสกัดจากเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) ให้ค่าสูงสุด และสารสกัดจากเมธานอลกับอะซิโตนให้ค่าต่ำกว่าประมาณ 42%

ข้อเสนอแนะ

1. สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี ดังนั้นควรนำสารสกัดมาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาในด้านอื่นๆ เช่น เภสัชศาสตร์ เครื่องสำอาง และอาหารเสริมสุขภาพ เป็นต้น
2. ในการพัฒนาสารสกัดเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้โดยทำสารสกัดให้บริสุทธิ์ขึ้นในระดับหนึ่ง แต่ถ้าพยายามทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น ประสิทธิภาพของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแทนที่จะเพิ่มขึ้นกลับลดลง ดังนั้นในรูปของผลิตภัณฑ์ที่จะถูกพัฒนาในเชิงการค้าไม่ควรใช้ในรูปของสารบริสุทธิ์ แต่ควรอยู่ในรูปของสารสกัดที่ถูกทำให้กึ่งบริสุทธิ์ในระดับที่เหมาะสม
3. แม้การวิเคราะห์ทางสถิติแสดงว่าสารที่สกัดด้วยน้ำกับอะซิโตน เมธานอลกับอะซิโตน และเมธานอลกับอะซิโตน (แช่) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$ แต่มีข้อน่าสังเกตว่าค่าตัวเลขที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกลุ่มที่สกัดด้วยเมธานอลกับอะซิโตน

(แช่) มักมีค่าสูงกว่าทุกครั้งในหลากหลายวิธีทดสอบที่ใช้ และมีค่าสูงกว่าสารสกัดอื่นเมื่อทดสอบโดยใช้วิธี FRAP ดังนั้น จึงขอเสนอแนะว่า ในการสกัดสารจากเปลือกเมล็ดมะขามครั้งต่อไป ควรเลือกวิธีการสกัดแบบเย็น (คือการแช่ทิ้งไว้) ตามด้วยการสกัดแบบร้อน (soxhlet) ทั้งนี้เพราะว่าการสกัดแบบเย็นนั้นช่วยลดการสลายตัวของสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด และการสกัดโดยใช้ soxhlet ช่วยให้มีร้อยละของการสกัดเพิ่มมากขึ้น เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด และตัวทำละลายที่ใช้ควรเป็นเมธานอลกับอะซีโตนในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร

4. งานวิจัยนี้ชี้แนะว่า วิธีที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมสารสกัดคือทำให้กึ่งบริสุทธิ์ เพราะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด กรรมวิธีคือนำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วย เมธานอลกับอะซิโตนด้วยวิธีการแช่ มาสกัดต่ออีก 2 ครั้ง ด้วยการใช้น้ำและเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 (โดยปริมาตร) ทั้งนี้เพื่อกำจัดสารกลุ่ม nonpolar เช่น ไขมัน wax และ คลอโรฟิลล์ ออกไปกับเฮกเซน นำชั้นน้ำมาสกัดต่อด้วยเอธิลอะซิเตรต ระเหยแห้งที่ 45°C ได้สารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตรต ที่นำมาทำให้กึ่งบริสุทธิ์อีกครั้งโดยการผ่านคอลัมน์ sephadex LH20 และเก็บแฟรคชันที่เหมาะสม โดยตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแต่ละแฟรคชันที่เก็บ ทั้งนี้แฟรคชันที่เหมาะสมน่าจะอยู่ในส่วนต้นประมาณแฟรคชัน 2-4

5. เนื่องจากสารสกัดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติซึ่งมักมีความแปรปรวนและความแตกต่างในเรื่ององค์ประกอบทางเคมี การควบคุมคุณภาพของสารสกัดจึงมีความสำคัญและจำเป็นยิ่ง ผลจากงานวิจัยพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเป็นผลจากสารออกฤทธิ์หลายชนิด เพราะยิ่งพยายามทำสารสกัดให้บริสุทธิ์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระยิ่งลดลง ดังนั้น ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดควรใช้ปริมาณของ catechin, epicatechin และ myricetin เป็นดัชนีควบคุมคุณภาพของสารสกัด โดยกระทำเพิ่มเติมจากการวัดปริมาณฟีนอลรวมและ procyanidin ของสารสกัด ทั้งนี้ เนื่องจากทั้งสามสารที่ระบุเป็นสารประกอบฟีนอลลิกที่พบในปริมาณสูง และพบทั้งในสารสกัดก่อนทำให้บริสุทธิ์ และพบในแฟรกชันภายหลังผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ที่ยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

บรรณานุกรม

พรทิพย์ วิรัชวงศ์. อนุมูลอิสระ (Free radicals)/สารต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidants) [online]. สืบค้นเมื่อ: 16 พฤษภาคม 2554. สืบค้นจาก: http://www.gpo.or.th/rdi/html/antioxidants.html.

ไมตรี สุทธจิตต์ กรรณิการ์ แซ่เตียว จันทร์จิรา มีคำ ปาริชาติ ฤทธิ์ฉิ้ม ปองพล วรปาณี อภิญญา วงแก้ว สุภกิจ ฉัตรไชยาฤกษ์ ฉัตรณรงค์ รัตนวงศ์ ปกฤษฎางค์ แก้วสุยะ. 2541 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นในผักและเมล็ดพืชที่ใช้เป็นอาหาร การประชุมวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 9 เรื่องวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อชีวิตและเศรษฐกิจไทย 4-5 มิถุนายน 2541 ณ โรงแรมเจ้าพระยาปารค์ กรุงเทพมหานคร.

Abdelwahed, A., Bouhlel, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman, R., Mariotte, A. M., Ghedira, K., Laporte, F., Dijoux-Franca, M.G., and Chekir-Ghedira, L. 2007. Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6,-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus* confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-Biological Interactions 165*: 1-13.

Abudu, N., Miller, J.J., Attaelmannan, M., and Levinson, S.S. 2004. Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clinical Chimica Acta* 339: 11-25.

Aljadi, A. M., and Kamaruddin, M. Y. 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry,* 85 (4): 513-518.

and Harman, D. 1987. Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine* 107: 526-545.

Arts, M.J.T.J., Dallinga, J.S., Voss, H., Haenen, G.R.M.M., and Bast, A. 2004. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry* 88: 567-570.

Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S.J., Das, D.K., Ray, S.D., Kuszynski, C.A., Joshi, S.S., and Pruess, H.G. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 148(2-3), Aug 7, 187-97.

Barbuskiski, K. 2009. Fenton reaction-controversy concerning the chemistry. *Ecological Chemistry and Engineering* 16(3): 347-358.

Benzie I. F. F., and Strain, J. J. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous

measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299: 15-27.

Benzie, I.F.F., and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.

Bhadoriya, S.S., Ganeshpurkar, A., Narwaria, J., Rai, G., Jain, A.P. 2011. *Tamarindus indica*: Extent of explored potential. *Pharmacognosy Reviews* 5(9): 73-81.

Bishayee, A. 2009. Cancer prevention and treatment with resveratrol: From rodent studies to clinical trials. *Cancer Prevention Research* 2: 409-418.

Burits, M., and Bucar, F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research* 14: 323-328.

Caluwé, E.D., Halamová, K., and Damme, P.V. 2010. *Tamarindus indica* L.-A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *African Focus* 23(1): 53-83

Cheel, J., Theoduloz, C., Rodriguez, J. A., Caligari, P. D. S., and Schmeda-Hirschmann, G. 2007. Free radical scavenging activity and phenolic content in achenes and thalamus from *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis, F. vesca* and *F. x ananassa* cv. Chandler. *Food Chemistry*: 102, 36-44.

Choi, D-Y., Lee, Y-J., Hong J.T., and Lee, H-J. 2012. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin* 87: 144-153.

Cross C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R. L., Mccord, J. M. and Harman, D. 1987. Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine* 107: 526-545.

Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Boloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., and Lele, R.D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *Journals of the Association of Physicians of India* 52: 794-804.

Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C. and Almeida, L.M. 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salycilate and 5-aminosalcilate) as inhibitors of membrane lipid peroxidaton and as peroxyl radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315:161-169.

Duan, X., Jiang, Y., Su, X., Zhang, Z. and Shi, J. 2007. Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. *Food Chemistry* 101: 1165-1371.

El-Bahr, S.M. 2013. Biochemistry of free radicals and oxidative stress. Science International 1(5): 111-117.

Emmy De Caluwé, E. D., Halamová, K., and Damme, P. V. 2010. *Tamarindus indica* L. – A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Afrika Focus 23(1): 53-83.

Fang, F., Li, J., Pan, Q., and Huang, W. 2007. Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chemistry*101: 428-433.

Farnsworth NR. 1966. Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 55(3): 225-69.

Fitzpatrick, D.F., Bing, B., and Rohdewald, P. (1998) Endothelium-dependent vascular effects of pycnogenol. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 32(4): 509-515.

Fontaine, M. and Valli, V. 1977. Studies on vitamin E and selenium deficiency in young pigs II. The hydrogen peroxide hemolysis test and the meadure of red cell lipid peroxides as indices of vitamin E and selenium status. *Canadian Journal of comparative Medicine* 41: 52-56.

Free radical theory of aging. Available: http://naturespeed.com/HealthInfo/free_radicals_en.html

Gupta, R.K., and Haslam, E. 1980. Vegetative tannins: structure and biosynthesis. In J.H. Hulse, éd. Polyphenols in cereals and legumes pp. 15-24. Centre de recherche pour le développement international, Ottawa.

Hagerman, A.E., and Butler, L.G. 1980. Determination of protein in tannin-protein precipitates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28: 944-947.

Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., and Riechel, T.L. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (Tannins) as biological antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (5):1887-1892.

Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants redox biology. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiology 141: 312-322.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. pp. 22, 246-350. Oxford University Press: Oxford.

Handelman, G.J., and Pryor, W.A. 1999. Evaluation of antioxidant staus in humans. In *Antioxidant status, diet, nutrition and health*. A.M. Papas (ed.) pp.38-62. CRC Press, Boca Raton.

Hathway, D.E., and Seakins, J.W.T.. 1957. Enzymatic oxidation of catechin to a polymer structurally related to phlobatannins. *Biochemical Journal* 67: 239-245.

Heijnen C. G. M., Haenen G.R.M.M., van Acker, F.A.A., van der Vijgh, W.J F. and Bast, A.(2001) flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups, *Toxicology in Vitro* 15: 3-6

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13(10): 572-584.

http://www.springerimages.com/Images/RSS/5-10.1186_1743-7075-5-29-1)

Iqbal, K., Khan, A., and Khattak, M.M.A.K. 2004. Biological significance of ascorbic acid (vitamin C) in human health-A review. *Pakistan Journal of Nutrition* 3(1): 5-13.

Jaswir, I., Kobayashi, M., Koyama, T., Kotake-Nara, E., ແຄ Nagao, A. 2012. Antioxidant behavior of carotenoids highly accumulated in HepG2 Cells. *Food Chemistry* 132: 865-872.

Jomovo, K., and Valko, M. 2013. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. European Journal of Medicinal Chemistry (in press).

Khansari, N., Shakiba, Y., and Mahmoudi, M. 2009. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 3(1): 73-80.

Kobuchi, H., Virgili, F., and Packer, L. 1999. Assay of inducible form of nitric oxide synthase activity: effect of flavonoids and plant extracts. *Methods in Enzymology* 301: 504-513.

Korkina, L.G., and Afanas'ev, I.B. 1997. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Advances in Pharmacology* 38: 151-163

Lalitha, S., Phil, M., and Selvam, R. 1999. Prevention of H_2O_2-induced red blood cell lipid peroxidation and hemolysis by aqueous extracted turmeric. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 8*: 113-114.

Lazzeroni, M., Gandini, S., Puntoni, M., Bonanni, B., Gernnari, A., and DeCensi, A. 2011. The science behind vitamins and natural compounds for breast cancer prevention. Getting the most prevention out of it. *The Breast* 20: S36-S41.

Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., and Cheng, S. 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry* 96: 254-260.

Manini, P., Pietra, P.L., Panzella, L., Napolitano, A., and d'Ischia, M. 2006. Glyoxal formation by Fenton-induced degradation of carbohydrates and related compounds. *Carbohydrate Research* 341: 1828-1833.

Maria, A. Panagiotis, K., Vassilios, P.P., Andreana, N.A., and Dimitrios, B. 2006. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry* 94: 9-25.

Martinello, F., Soares, S.M., Franco, J.J., Santos, A.C., Sugohara, A., Garcia, S.B., Curti, C. and Uyemura, S.A. 2006. Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. *Food and Chemical Toxicology* 44: 810-818.

Martinello, F., Soares, S.M., Franco, J.J., Santos, A.C., Sugohara, A., Garcia, S.B., Curti, C. and Uyemura, S.A. 2006. Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. *Food and Chemical Toxicology* 44 : 810-818.

Marwah, R.G., Fatope, M. O., Mahrooqi, R. A., Varma, G. B., Abadi, H. A., and Al-Burtamani S.S.. 2007. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food Chemistry* 101: 465-470.

Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., and Nacoulma, O. G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* 91:571-577.

Melhorn, D. K., Gross, S., Lake, G.A., and Leu, J.A. (1971). The hydrogen peroxide fragility test and serum tocopherol level in anemias of various etiologies. *Blood* 37(4): 438-446.

Mena, S., Ortego, A., and Estrela, J.M. 2009. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. Mutation Research 674: 36-44.

Middleton, E., Kandaswami, C., and Theoharides, T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52(4): 673-751.

Molan, A.L., Sivakumaran, S., Spencer, P.A., Meagher, L.P. 2004. Green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins inhibit the motility of infective larvae of *Teladorsagia circumcinctaand Trichostrongylus colubriformis in vitro*. *Research in Veterinary Science* 77:239–243.

Nakamura, Y., Tsuji, S., and Tonogai, Y. 2003. Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. *Journal of Health Science* 49(1): 45-54.

Niki, E. 2013. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxyl radical scavenger: *in vitro* and *in vivo* evidence. *Free Radical Biology and Medicine* (in press).

Noguchi, N., and Niki, E. 1999. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In *Antioxidant status, diet, nutrition and health*. A.M. Papas (ed.) pp.3-20. CRC Press, Boca Raton.

Nunes, X.P., Silva, F.S., Almeida, J.R.G.S., Lima, J.T., Ribeiro, L.A.A., Júnior, L.J.Q., and Filho, J.M.B. 2012. Biological oxidations and antioxidant activity of natural products, phytochemicals as nutraceuticals-Global approaches to their role in nutrition and health. Dr Venketeshwer Rao (Ed.) ISBN: 978-953-51-0203-8, InTech. Available from: http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-as-nutraceuticals-global approaches-to-their-role-in-nutrition-and-health/biological-oxidations-and-antioxidant-activity-of-natural-products.

Packer L., Rimbach G., and Virgili, F. 1999. Antioxidant activity and biological properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark: pycnogenol. *Free Radical Biology&Medicine* 27(5-6): 704-724.

Palace, V.P., Khaper, N., Qin, Q., and Singal, P.K. 1999. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology & Medicine* 26(5/6): 746-761.

Pisoschi, A.M., and Negulescu, G.P. 2011. Methods for total antioxidant determination: A review. Biochemistry and Analytical Biochemistry 1:106. Doi:10.4172/2161-1009.100106.

Prabhakar, K.R., Veerapur, V.P., Bansal, P., Parihar, V.K., Reddy Kandadi, M., Bhagath Kumar, P., Priyadarsini, K.I., and Unnikrishnan, M.K. 2007. Antioxidant and radioprotective effect of the active fraction of *Pilea microphylla* (L.) ethanolic extract. *Chemico-Biological Interactions* 165 (1): 22-32.

Prathapan, A., Singh, M.K., Anusree, S.S., Kumar, D.R.S., Sundaresan, A., and Raghu, K.G. 2010. Antiperoxidative, free readical scavenging and metal chelating activities of *Boerhaavia diffusa* L. *Journal of Food Biochemistry* 35(2): 1548-1554.

Prousek, J. 2007. Fenton chemistry in biology and medicine. Pure and Applied Chemistry 79(12): 2325-2338.

Pumthong, G. 1999. Antioxidative activity of polyphenolic compounds extracted from seed coat of *Tamarindus indica* Linn. Master Thesis of Science. Department of Biochemistry, Chiang Mai University.

Ramassamy, C. 2006. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *European journal of Pharmacology* 545: 51-64.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine,* 26(9/10): 1231-1237.

Sachdev, S., and Davies, K.J.A. 2008. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine* 44: 215-223.

Sautin, Y.Y., and Johnson, R.J. 2008. Uric acid: The oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27(6): 608-619.

Scandalios J.G. 2002. Oxidative stess responses-what have gonome-scale studies taught us ? Genome Biology 3(7): reviews 1019.1-1019.6.

Scandalios, J. G. 1997. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.

Schlesier, K., Harat, M., HÖhm, V., Bitsch, R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research* 36: 177-187.

Singleton, V.L., and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture* 16 (3): 144-158.

Spiteller, G. 2006. Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radical Biology & Medicine* 41: 362-387.

Staško, A., Polovka, M., Brezová, V., Biskupič, S., and Malik, F. 2006. Tokaj wines as scavengers of free radicals (an EPR study). *Food Chemistry* 96 : 185-196.

Sudajaroen, Y., Haubner, R., Würtele, G., Hull, W.E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Changbumrung, S., Bartsch, H., and Owen, R.W. 2005. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food and Chemical Toxicology* 43: 1673-1682.

Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., and Spranger, I. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4267-4274.

Temple, N.J. 2000. Antioxidants and disease: More questions than answers. *Nutrition Research* 20(3): 449-459.

Thomson, M.J., and Puntmann, V., and Kaski, J-C. 2007. Atherosclerosis and oxidative stress: The end of the road for antioxidant vitamin treatment. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 21: 195-210.

Traber, M., and Atkinson, J. 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine* 43: 4-15.

Tsuda T., Watanabe, M., Ohshima, K., Yamamoto, A., Kawakishi, S., and Osawa, T. 1994. Antioxidative components isolated from the seed of tamarind (*Tamarindus indica* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42(12): 2671-2674.

Tsuda, T., Fukaya, Y., Ohshima, K., Yamamoto, A., Kawakishi, S., and Osawa, T. 1995. Antioxidative activity of tamarind extract prepared from the seed coat (Japanese). *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 42(6): 430-435.

Tsuda, T., Mkino, Y., and Kato, H. 1993. Screening for antioxidative activity of edible pulses. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 57(9): 1606-1608.

Umamaheswari, M., and Chatterjee, T.K. 2008. *In vitro* antioxidant activities of the fractions of *Coccinia grandis* L. leaf extract. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 5(1): 61-73.

Van Acker, S.A., Tromp, M. N., Haenen, G.R., van der Vijgh W.J., and Bast, A. 1995. Flavonoids as scavenger of nitric oxide radical. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 214: 755-759.

Walingo, K.M. 2005. Role of vitamin C (Ascorbic acid) on human health-A review. *African Journal of Food Agriculture and Nutritional Development* 5(1): 1-13.

Wang, S., Melnyk, J.P., Tsao, R., and Marcone, M.F. 2011. How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research Interantional* 44: 14-22.

Watt, J.M., and Breyer-Brandwijk, M.G. 1962. *The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa*. 2nd ed. E. & S. Livingstone: Edinburgh and London.

Wikipedia. 2013. Antioxidant effect of polyphenols and natural phenols. [on-line]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Polyphenol_antioxidant

Wikipedia. 2013. Cardiovascular disease [On-line]. Available: http://enwikipedia.org/ wiki/cardiovascular disease.

Wikipedia. 2013. Neurodegeneration. [on-line]. Available: http://en.wikipedia.org/ wiki/Neurodegenerative_disease

Wikipedia. 2556. วิตามินอี [ออนไลน์] ได้จาก: http://th.wikipedia.org/wiki/วิตามินอี

Wootton-Beard, P.C., and Ryan, L. 2011. Improving public health?: The role of antioxidant-rich and vegetable beverages. *Food Research International* 44: 3135-3148.

Zhou, K., and Yu, L. (2006). Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado. *LWT-Food Science and Technology* 39(10): 1155-1162.

ภาคผนวก ก

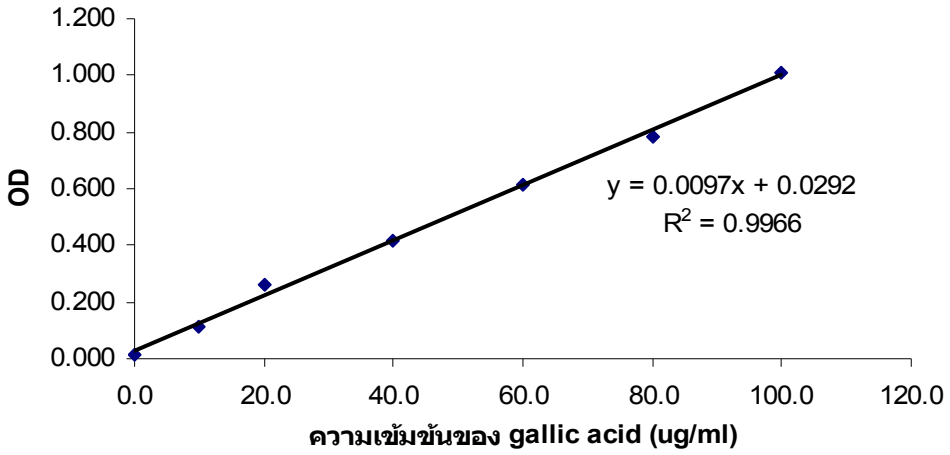
ผลการหาปริมาณฟีนอลรวม และปริมาณ procyanidin ของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

1. การหาปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

1.1 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของ gallic acid ที่เป็นสารมาตรฐาน และสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามเพื่อทดสอบปริมาณฟีนอลรวม ดังตาราง ก.1 และภาพประกอบ ก.1

ตาราง ก.1 ผลค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของ gallic acid และสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (ppm)	OD			ค่าเฉลี่ย ± SD
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	
gallic acid	0.0	0.018	0.010	0.011	0.013 ± 0.004
	10.0	0.114	0.114	0.114	0.114 ± 0.000
	20.0	0.261	0.268	0.264	0.264 ± 0.004
	40.0	0.422	0.416	0.407	0.415 ± 0.008
	60.0	0.608	0.611	0.617	0.612 ± 0.005
	80.0	0.776	0.798	0.778	0.784 ± 0.012
	100.0	1.025	1.009	0.998	1.011 ± 0.014
MeOH+Ac	50.0	0.305	0.301	0.258	0.288 ± 26.680
	50.0	0.267	0.295	0.294	0.285 ± 26.405
	50.0	0.284	0.293	0.291	0.289 ± 26.818
W+Ac	50.0	0.325	0.334	0.339	0.333 ± 31.285
	50.0	0.333	0.352	0.335	0.340 ± 32.041
	50.0	0.341	0.338	0.335	0.338 ± 31.835
MeOH+Ac(แช่)	50.0	0.315	0.300	0.292	0.302 ± 28.158
	50.0	0.315	0.308	0.298	0.307 ± 28.639
	50.0	0.298	0.296	0.285	0.293 ± 27.196



ภาพประกอบ ก.1 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน gallic acid

1.2 การคำนวณปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

ในการคำนวณปริมาณฟีนอลรวม ของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามความเข้มข้น 50 μg/ml เทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน gallic acid พบว่าเมื่อนำค่า OD ของสารสกัดไปคำนวณในสมการเส้นตรง ในภาพประกอบ ก.1 ได้ปริมาณเทียบเท่ากับ gallic acid เท่ากับ 26.68 μg/ml

จากสมการ

พบว่าในสารสกัด 1 ml จะมีปริมาณฟีนอลรวม เท่ากับ 26.68 μg

แสดงว่าในสารสกัด 50 μg จะมีปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ 26.68 μg

ถ้าสารสกัด 12.04 g จะมีปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ $\frac{26.68 \times 12.04}{50}$ = 6.42 g

ดังนั้น ผงเปลือกเมล็ดมะขาม 50 g จะมีปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ 6.42 g

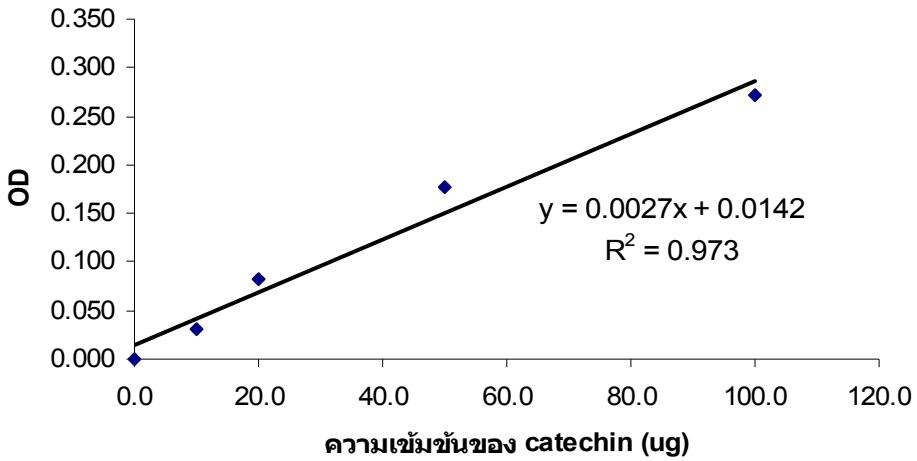
ถ้าผงเปลือกเมล็ดมะขาม 1 g จะมีปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ 128.49 mg

2 . การหาปริมาณ procyanidin ของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

2.1 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของ catechin ที่เป็นสารมาตรฐาน และสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามเพื่อทดสอบปริมาณ procyanidin ดังตาราง ก.2 และภาพประกอบ ก.2

ตาราง ก.2 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสารมาตรฐาน และสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

สาร	ความเข้มข้นของสาร(μg)	OD			ค่าเฉลี่ย ± SD
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3	
catechin	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000 ± 0.000
	10.0	0.030	0.033	0.032	0.032 ± 0.002
	20.0	0.082	0.081	0.081	0.081 ± 0.001
	50.0	0.181	0.174	0.174	0.176 ± 0.004
	100.0	0.278	0.247	0.291	0.272 ± 0.023
MeOH+Ac	200.0	0.058	0.052	0.061	0.057 ± 0.005
W+Ac	200.0	0.057	0.063	0.063	0.061 ± 0.003
MeOH+Ac*	200.0	0.136	0.133	0.133	0.134 ± 0.002



ภาพประกอบ ก.2 กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐาน cetechin

2.2 การคำนวณปริมาณ procyanidin ของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

ในการคำนวณปริมาณ procyanidin ของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม 200 μg เทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน catechin พบว่าเมื่อนำค่า OD ของสารสกัดไปคำนวณในสมการเส้นตรง ในภาพประกอบ ก.2 สมมุติว่าได้ปริมาณเทียบเท่ากับ procyanidin เท่ากับ 16.22 μg

จากสมการ

พบว่าในสารสกัด 200 μg จะมีปริมาณ procyanidin เท่ากับ 16.22 μg

ถ้าสารสกัด 12.04 g จะมีปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ $\frac{16.22 \times 12.04}{200}$ = 976.44 mg

ผงเปลือกเมล็ดมะขาม 50 g จะมีปริมาณ procyanidin เท่ากับ 976.44 mg

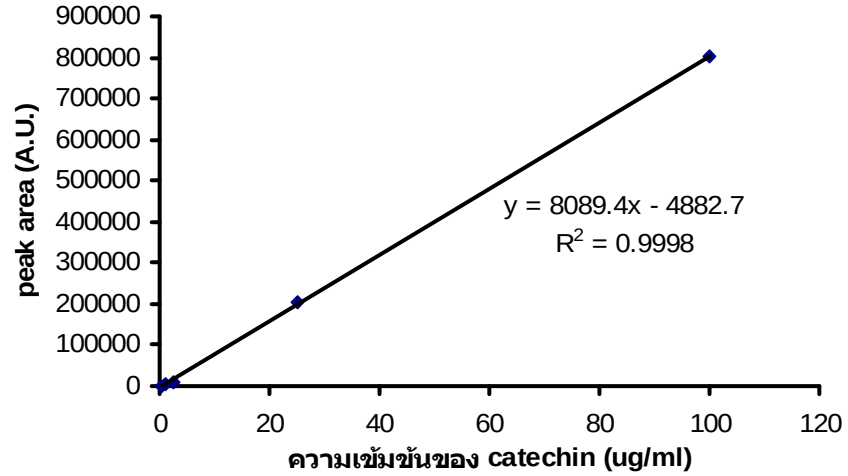
ดังนั้น ผงเปลือกเมล็ดมะขาม 1 g จะมีปริมาณ procyanidin เท่ากับ 19.52 mg

ภาคผนวก ข

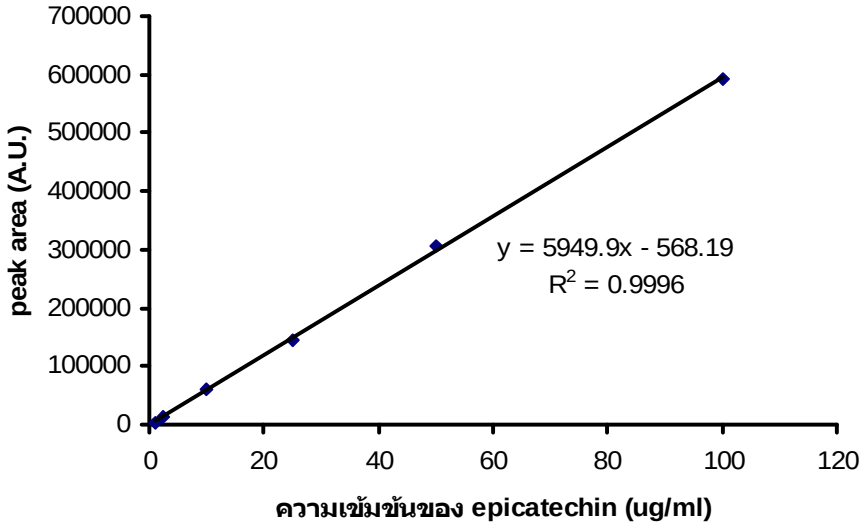
กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก ด้วยเครื่อง HPLC

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก ในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม ด้วยเครื่อง HPLC

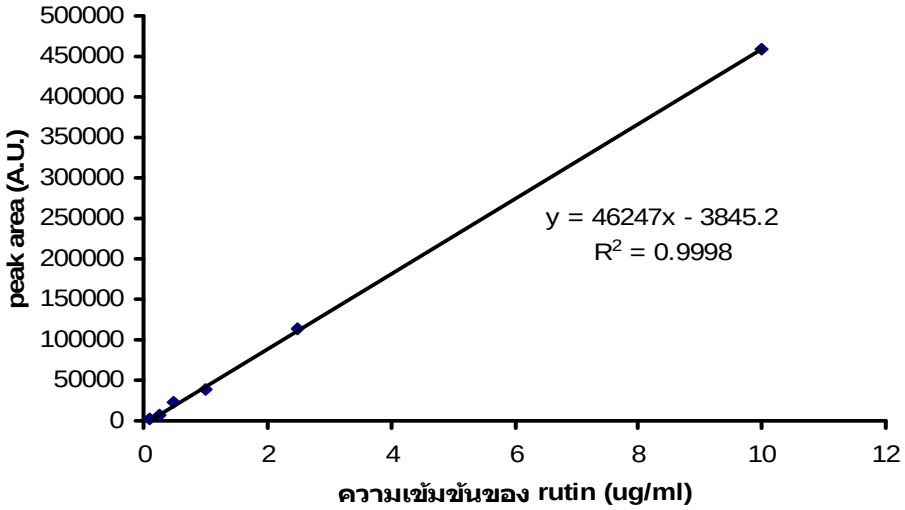
พื้นที่ใต้พีคในแต่ละความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ดังนี้ catechin epicatechin, rutin, quercetin, procyanidin B1, procyanidin B2, keampferol, naringenin, myricitin, resveratol, ascorbic acid, gallic acid, vanilic acid และ lactic acid เป็นต้น ดังภาพประกอบที่ ค.1-ค.14



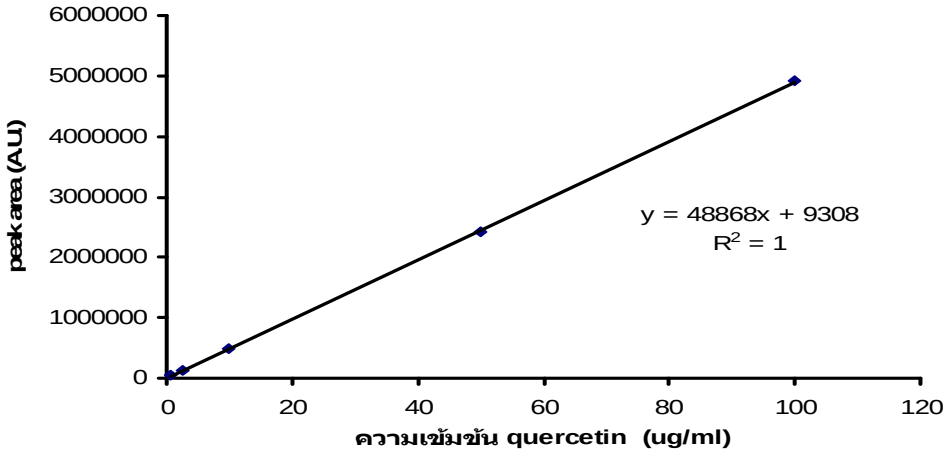
ภาพประกอบที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของ catechin



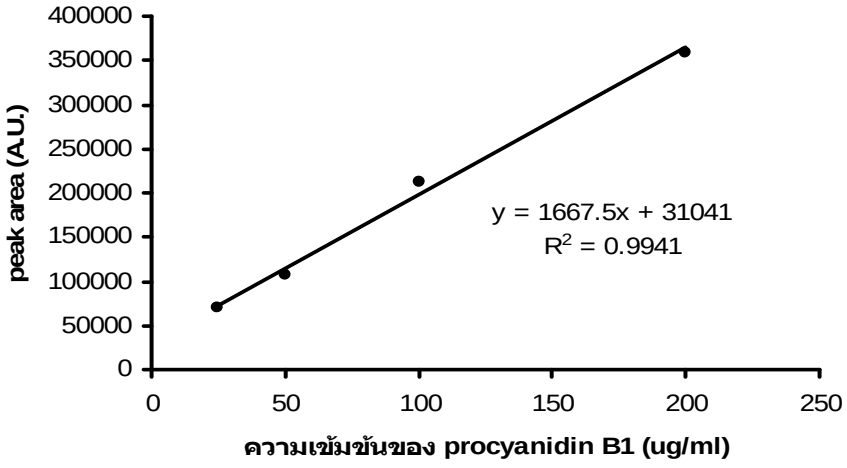
ภาพประกอบที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของ epicatechin



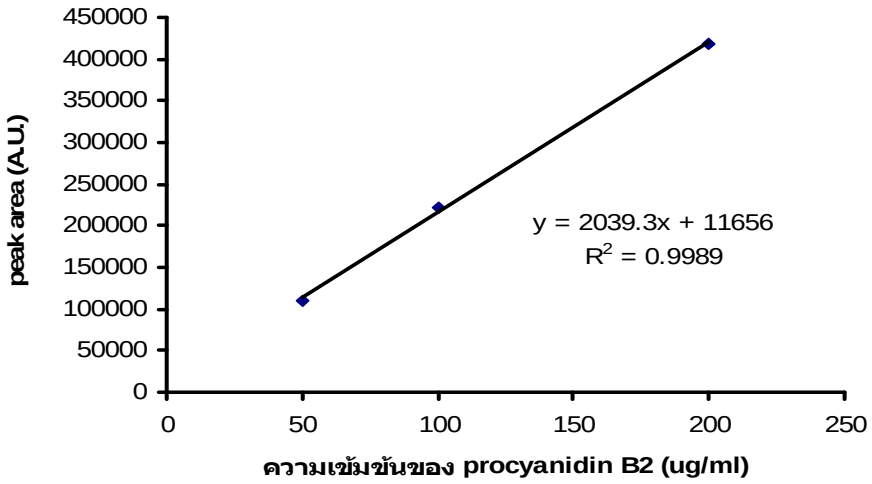
ภาพประกอบที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของ rutin



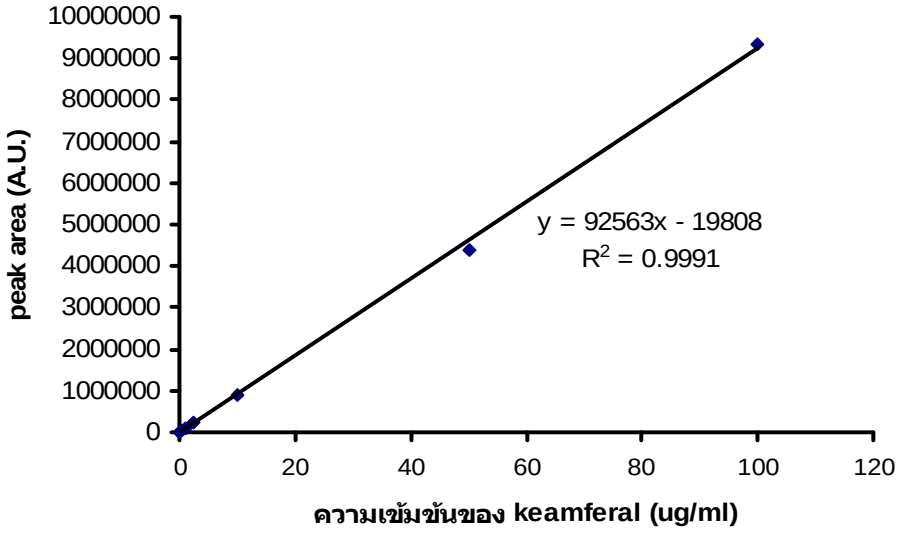
ภาพประกอบที่ ข.4 กราฟมาตรฐานของ quercetin



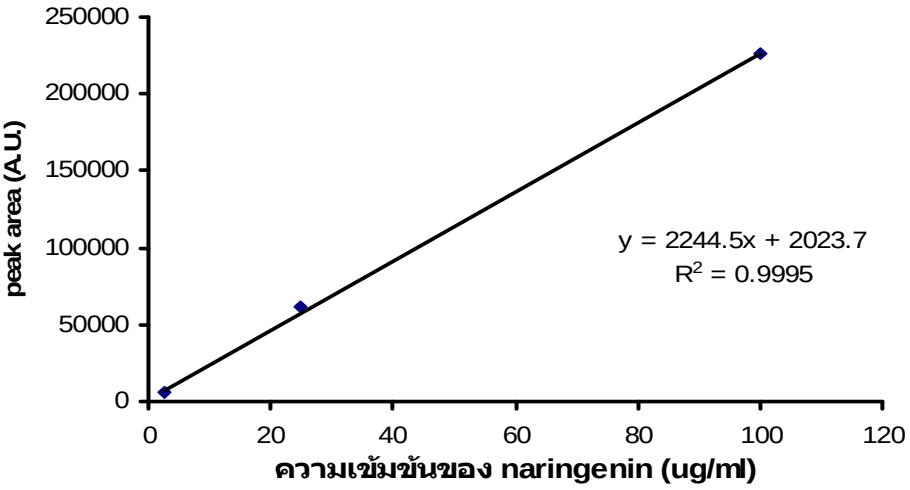
ภาพประกอบที่ ข.5 กราฟมาตรฐานของ procyanidin B1



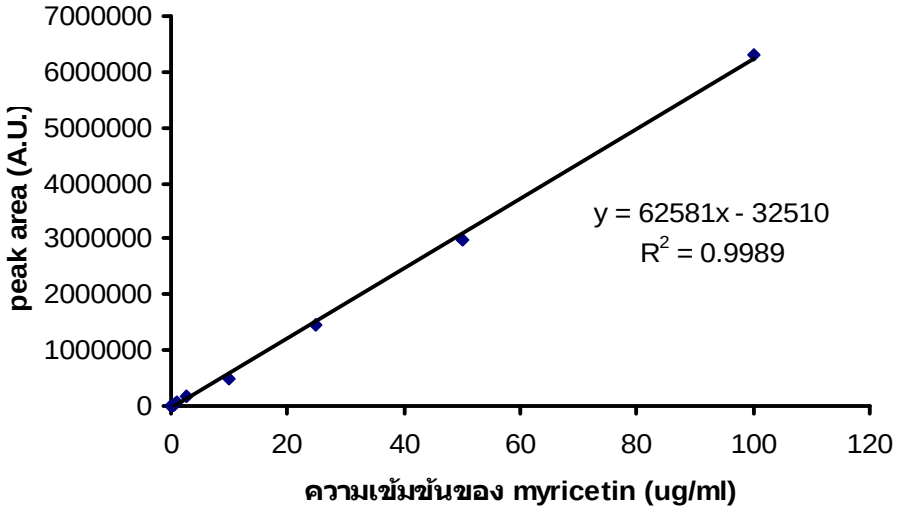
ภาพประกอบที่ ข.6 กราฟมาตรฐานของ procyanidin B2



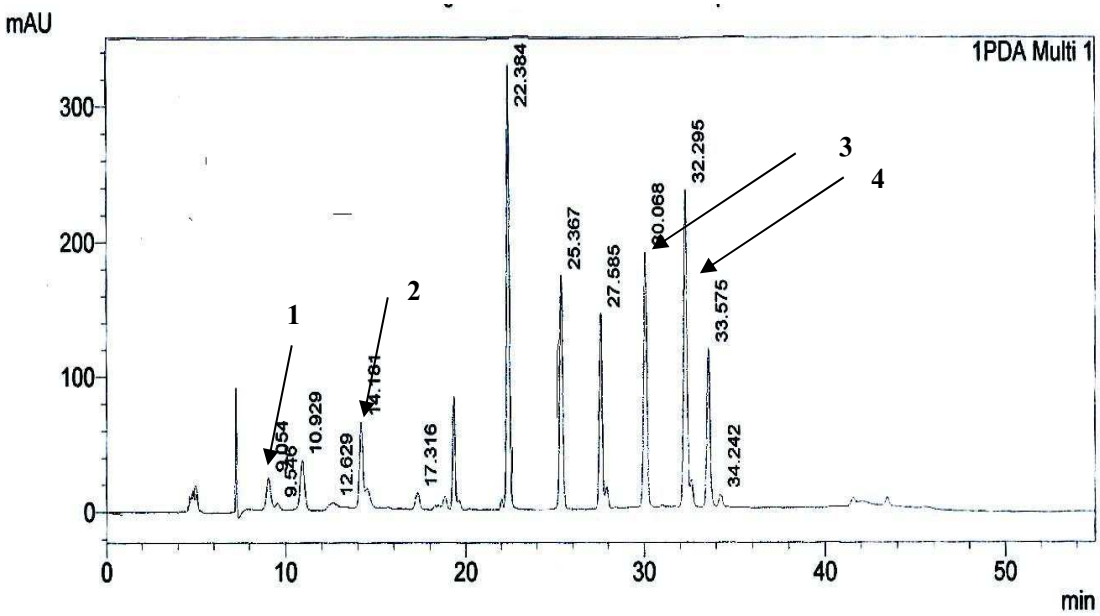
ภาพประกอบที่ ข.7 กราฟมาตรฐานของ keamperol



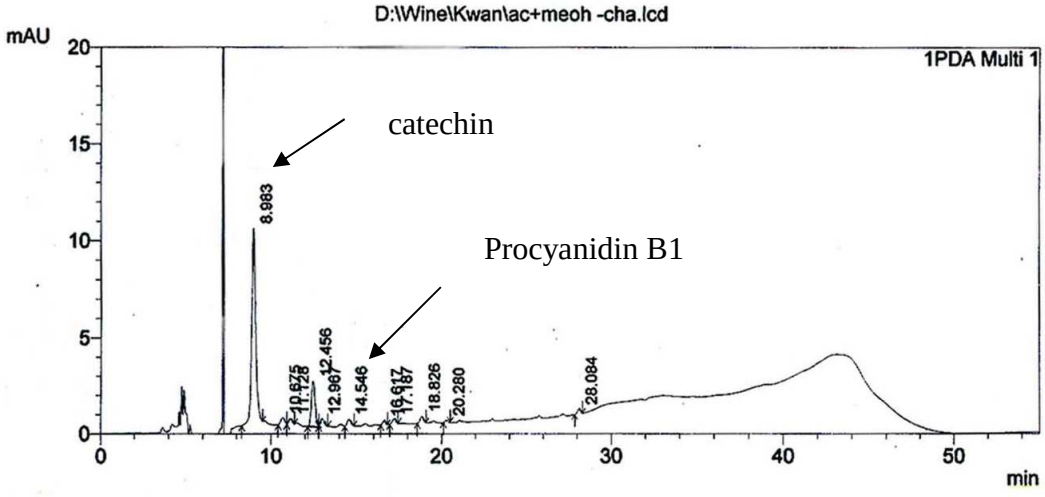
ภาพประกอบที่ ข.8 กราฟมาตรฐานของ naringenin



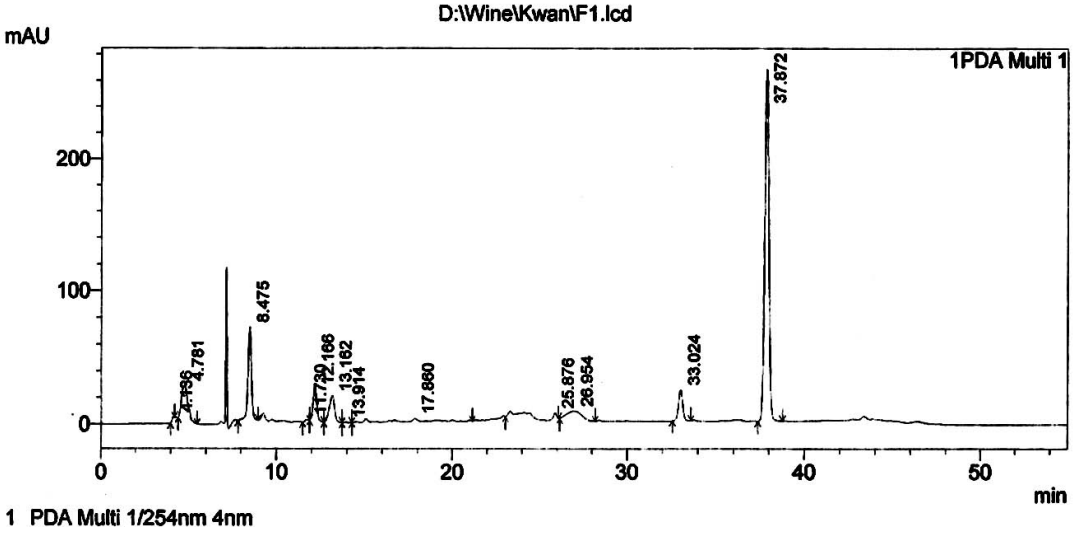
ภาพประกอบที่ ข.9 กราฟมาตรฐานของ myricetin



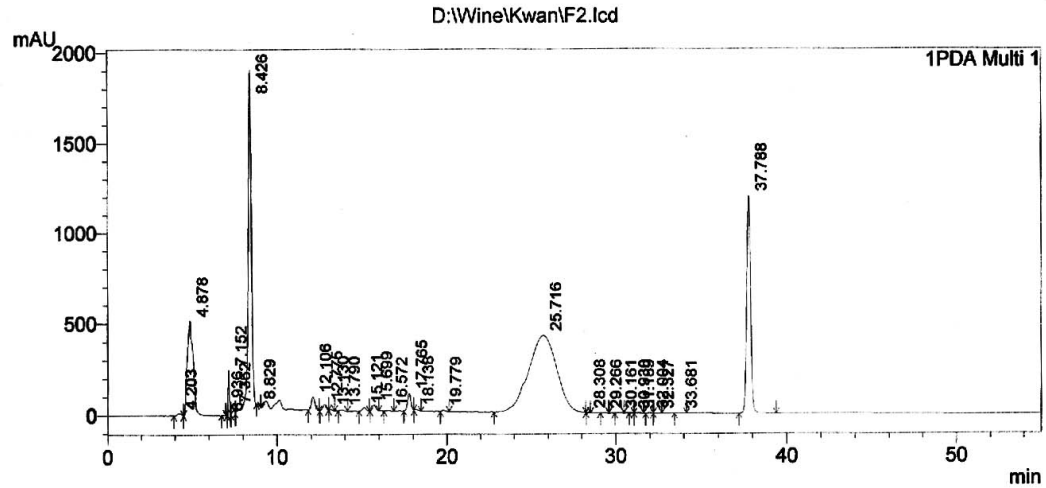
ภาพประกอบที่ ข.10 โครมาโตรแกรมของสารมาตรฐานในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เมื่อ
หมายเลข 1 คือ catechin หมายเลข 2 คือ procyanidin B1
หมายเลข 3 คือ naringenin และหมายเลข 4 คือ keamferol



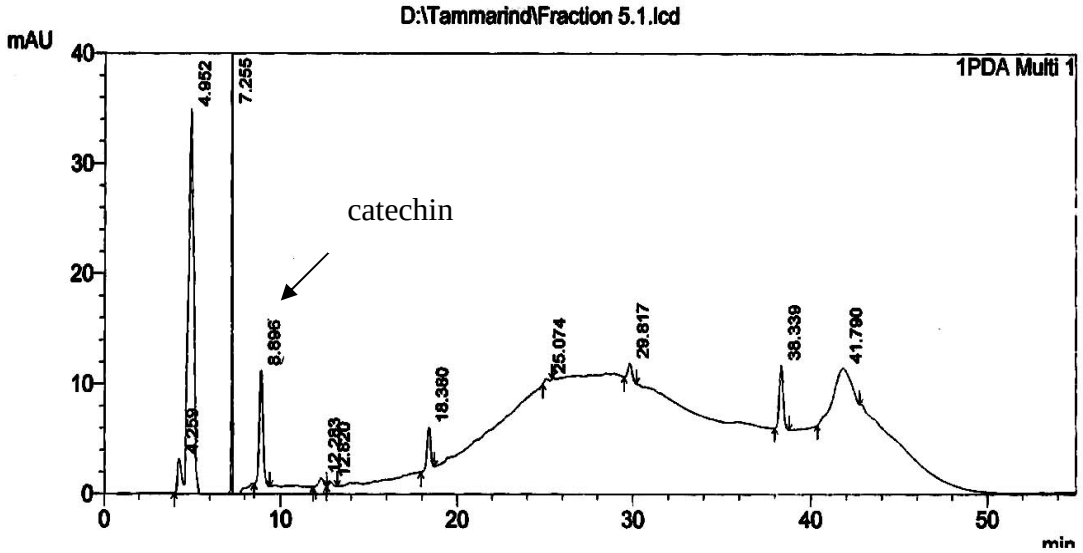
ภาพประกอบที่ ข.11 โครมาโตรแกรมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามด้วยอะซิโตนกับเมธานอล (แช่)



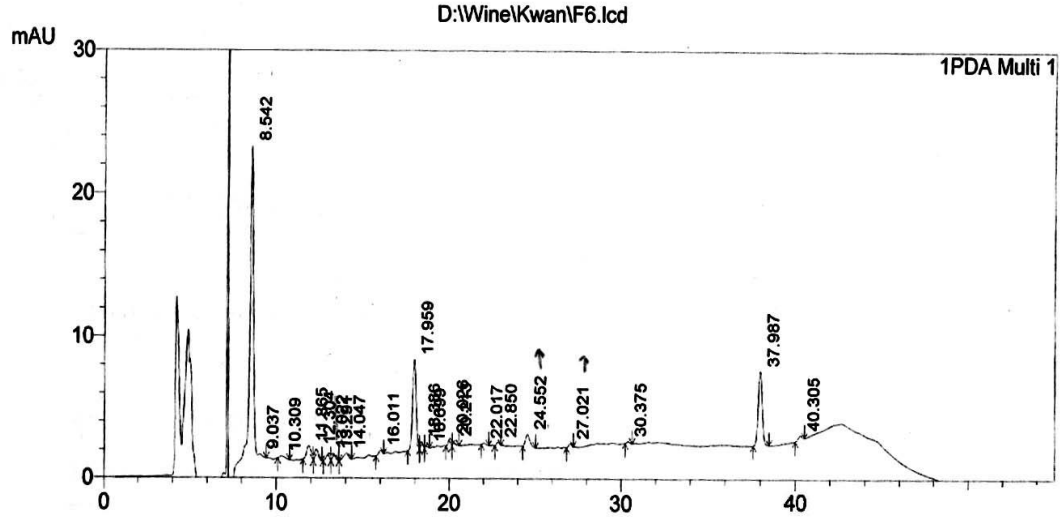
ภาพประกอบที่ ข.12 โครมาโตรแกรมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (F1)



ภาพประกอบที่ ข.13 โครมาโตรแกรมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (F2)



ภาพประกอบที่ ข.14 โครมาโตรแกรมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (F5)



ภาพประกอบที่ ข.15 โครมาโตรแกรมของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (F6)

วิธีการคำนวณการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่พบ ในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม ด้วย HPLC

ในการคำนวณปริมาณ catechin ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม (EtOH) ทราบพื้นที่ใต้พีคของสารสกัด นำไปคำนวณหาความเข้มข้นด้วยการเทียบกับกราฟมาตรฐาน เช่น สมมุติเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานทราบว่า สารสกัดมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 μg/ml

แสดงว่าในสารสกัด 1 ml มีปริมาณ catechin = 50 μg

ถ้าในตัวอย่าง 5 ml มีปริมาณ catechin = 50 x 5 μg

= 250 μg

ดังนั้น ในสารสกัด 0.050 g มีปริมาณ catechin = 250 μg

ถ้าในสารสกัด 31.53 g มีปริมาณ catechin = 250 x 31.53 /0.050

= 0.157 g

จาก สารตัวอย่าง (ผงมะขาม) 50 g มีปริมาณ catechin = 0.157 g

ถ้าในสารตัวอย่าง 1 g มีปริมาณ catechin = 0.157 x 1/50 mg

= 3.14 mg

ประวัติผู้วิจัย

ดร. เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์ จบการศึกษาปริญญาตรีสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป (เคมี-ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2516-2520) ได้รับทุนการศึกษากรรมการข้าราชการพลเรือน ไปศึกษาต่อระดับปริญญาโทสาขาวิชา Environmental Health ที่ University of Michigan ในประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2521-2523) และทุนเล่าเรียนดีระดับปริญญาเอกสาขาวิชา Toxicology ของมหาวิทยาลัย Utah State University ในประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2525-2529) ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาเภสัชวิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในด้านวิชาการและงานวิจัย ดร. เบ็ญจมาศ ทำงานเกี่ยวข้องกับสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง และการก่อกลายพันธุ์

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร. ไมตรี สุทธจิตต์ จบการศึกษาปริญญาตรีสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ (เคมี) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2500-2505) และปริญญาตรี (เกียรตินิยม) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยแพทยศาสตร์ (พ.ศ. 2506-2508) เข้าบรรจุเป็นอาจารย์ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต่อมาได้รับทุนการศึกษารัฐบาลไทย –สหรัฐอเมริกาไปศึกษาต่อที่ University of New York at Buffalo ประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ 2513-2517) ได้รับปริญญาเอกสาขาวิชาชีวเคมี กลับมาปฏิบัติงานสอนที่ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จนปลดเกษียณ (พ.ศ. 2542) หลังจากนั้น ได้รับเชิญให้เป็นผู้ทรงคุณวุฒิและอาจารย์พิเศษที่มหาวิทยาลัมหาสารคาม มหาวิทยาลัยนเรศวร วิทยาเขตพะเยา และมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย ศ. ดร. ไมตรีทำงานวิจัยในด้านอาหารสุขภาพ สารในพืชผัก สมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็ง สารพิษในสิ่งแวดล้อม สารก่อมะเร็ง สารพรีโอติก น้ำหมักชีวภาพโพรไบโอติก และได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดของสารแอฟฟล่าทอกซิน

ดร. ปิยะเนตร จันทร์ถิระติกุล จบการศึกษาระดับปริญญาตรี (พ.ศ. 2536) และ ปริญญาโท (พ.ศ. 2539) ใน สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้รับปริญญาเอกในสาขาวิชาเคมีวิเคราะห์ (พ.ศ. 2547) จาก Okayama University ประเทศญี่ปุ่น โดยได้รับทุน Monbukagakusho จากรัฐบาลประเทศญี่ปุ่น ปัจจุบัน ดร. ปิยะเนตร ดำรงตำแหน่งเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์ที่ภาควิชาเคมี คณะ

วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ในด้านวิชาการและงานวิจัย ดร. ปิยะเนตรทำงานวิจัยด้าน atomic spectroscopy flow based analysis และ environmental chemistry

ดร. สุจินต์ อังกุราวิรุฑธ์ จบการศึกษาปริญญาตรีสาขาวิชาเคมี จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง (เกียรตินิยม) พ.ศ. 2520 ปริญญาโท สาขาวิชาชีวเคมี จากมหาวิทยาลัยมหิดลในปี พ.ศ. 2523 และจบการศึกษาระดับปริญญาเอกสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ King's College, University of London ประเทศอังกฤษในปี พ.ศ. 2540 และในปีเดียวกัน ได้รับรางวัลผลการศึกษายอดเยี่ยมขั้นวิทยาศาสตรบัณฑิตจากมูลนิธิศาสตราจารย์ ดร. แถบ นีละนิธิ ในปัจจุบัน ดร. สุจินต์ ดำรงตำแหน่งหัวหน้าภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ดร. ประไพรัตน์ สีพลไกร จบการศึกษาระดับปริญญาตรี (เกียรตินิยม) ในสาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (พ.ศ. 2537-2541) และจบปริญญาเอกในสาขาวิชาเคมีอินทรีย์ (พ.ศ. 2541-2547) จากมหาวิทยาลัยมหิดล ปัจจุบัน ดร. ประไพรัตน์ ดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ในภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ในด้านวิชาการและงานวิจัย ดร. ไพรัตน์ทำงานวิจัยเกี่ยวกับเคมีของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยเฉพาะการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ของสารออกฤทธิ์จากผลิตภัณฑ์พืชสมุนไพร และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ต่าง ๆ