สารบาญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบาญตาราง	ฎ
สารบาญภาพ	ฐ
รายการอักษรย่อ	ด
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความหมายของอนุมูลอิสระ	1
1.2 คุณสมบัติของอนุมูลอิสระ	2
1.3 ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ	2
1.3.1 ขั้นตอนอินนิทิเอชัน (initiation step)	2
1.3.2 ขั้นตอนพรอพาเกชัน (propagation step)	4
1.3.3 ขั้นตอนเทอร์มิเนชัน (termination step)	4
1.4 ออกซิเจน และรีแอคทีฟ ออกซิเจน สปีชีส์	4
1.5 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)	5
1.6 ผลของสารต้านอนุมูลอิสระ	7
1.7 สารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด	7
1.7.1 วิตามินซี	7
1.7.2 วิตามินอี	8
1.7.3 แคโรทีนอยด์	11
1.7.4 สารประกอบฟีนอลิค	14
1.7.5 เอนไซม์และโปรตีนบางชนิด	18
1.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารต้านอนุมูลอิสระ	23
1.9 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	26
1.10 ขอบเขตการวิจัย	27

เรื่อง	หน้า
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	28
2.1 สารเคมี	28
2.2 เครื่องมือ	30
2.3 วัตถุดิบ	30
2.4 วิธีการทดลอง	30
2.4.1 การเตรียมตัวอย่าง	30
2.4.2 การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย	30
2.4.2.1 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่าง	30
2.4.2.2 การวิเคราะห์สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	31
2.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี	31
2.4.3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี	31
2.4.3.2 การทำกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี	32
2.4.3.3 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่าง	33
2.4.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี	33
2.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี	33
2.4.4.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี	34
2.4.4.2 การทำให้ตัวทำละลายบริสุทธิ์ขึ้น	35
2.4.4.3 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่าง	35
2.4.4.4 การกำจัดสารรบกวนโดยวิธี slight saponification	36
2.4.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี	36
2.4.4.6 การคำนวณปริมาณวิตามินอี	36
2.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนและแซนโทฟิลล์	37
2.4.5.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนและแซนโทฟิลล์	37

เรื่อง **หน้า**

2.4.5.2 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่าง 37

2.4.5.3 การทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี 38

2.4.5.4 การคำนวณปริมาณแคโรทีนและแซนโทฟิลล์ 39

2.4.6 การวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน 39

2.4.6.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน 39

2.4.6.2 การทำกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน 40

2.4.6.3 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่าง 40

2.4.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน 40

2.4.7 การวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพสารประกอบฟีนอลิค 41

2.4.7.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิค 41

2.4.7.2 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่าง 44

2.4.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค 46

2.4.7.4 การวิเคราะห์คุณภาพสารประกอบฟีนอลิคอิสระโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีบนกระดาษแบบสองทิศทาง 47

2.4.7.5 การแยก gallic acid จากฟ้าทะลายโจร และ sinapic acid จากหญ้าหวานโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีบนกระดาษแบบทิศทางเดียว 48

2.4.8 การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด วิตามินซี วิตามินอี แคโรทีน แซนโทฟิลล์ แทนนิน และสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด 49

2.4.9 การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิคอิสระ 49

2.4.9.1 การเตรียมสารละลาย 49

2.4.9.2 การทำโครมาโทกราฟีบนกระดาษแบบสองทิศทาง 49

เรื่อง	หน้า
บทที่ 3 ผลการทดลอง	50
3.1 ผลการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย	50
3.2 ผลการทำกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี	54
3.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีและวิตามินอี	55
3.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนและแซนโทฟิลล์	60
3.5 ผลการทำกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน	64
3.6 ผลการทำกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค	65
3.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแทนนินและสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด	66
3.8 ผลการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดวิตามินซี วิตามินอี แคโรทีน แซนโทฟิลล์ แทนนิน และสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดที่แยกจากตัวอย่าง	71
3.9 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคแต่ละประเภทของตัวอย่างทั้ง 12 ชนิด	72
3.10 ผลการวิเคราะห์คุณภาพสารประกอบฟีนอลิคโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีบนกระดาษแบบสองทิศทาง	73
3.11 ผลการแยก gallic acid จากฟ้าทะลายโจร และ sinapic acid จากหญ้าหวานโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีบนกระดาษแบบทิศทางเดียว	121
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	123
เอกสารอ้างอิง	135
ภาคผนวก	140
ประวัติผู้เขียน	153

สารบาญตาราง

ตาราง	หน้า
1.1 สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติบางชนิด	5
1.2 ตัวอย่างชนิดและหน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระใน antioxidant defense system	19
1.3 ชนิดและหน้าที่ของสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของโปรตีน	21
2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	28
2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	30
2.3 ปริมาตรและสารต่างๆที่ใช้สำหรับการทำกราฟมาตรฐานวิตามินซี	33
2.4 ปริมาตรและสารต่างๆที่ใช้สำหรับการทำกราฟมาตรฐานกรดแทนนิค	40
2.5 ปริมาตรและสารต่างๆที่ใช้สำหรับการทำกราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิค	47
3.1 ค่า antioxidant index ของสารสกัดเมธานอลจากตัวอย่างผักและสมุนไพร	50
3.2 ปริมาณวิตามินซีและวิตามินอีในตัวอย่างผักอบแห้งและสมุนไพร	56
3.3 ปริมาณแคโรทีนและแซนโทฟิลล์ในตัวอย่างผักอบแห้งและสมุนไพร	60
3.4 ปริมาณแทนนินและสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในตัวอย่างผักอบแห้งและสมุนไพร	67
3.5 ค่า antioxidant index ของสารสกัดวิตามินซี วิตามินอี แคโรทีน แซนโทฟิลล์ แทนนิน และสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของตัวอย่างทั้ง 12 ชนิด	71
3.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่อยู่ในประเภทต่างๆของตัวอย่างทั้ง 12 ชนิด	72
3.7 ค่า Rf และสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของสารมาตรฐานฟีนอลิคบางชนิด	114
3.8 ค่า Rf และสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากตัวอย่างทั้ง 12 ชนิด	116

สารบาญภาพ

รูป		หน้า
1.1	โครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง EDTA กับโลหะไอออน	7
1.2	โครงสร้างโมเลกุลของวิตามินอี	10
1.3	โครงสร้างโมเลกุลของแคโรทีนอยด์บางชนิด	12
1.4	การสังเคราะห์วิตามินเอจากสารตั้งต้นเบต้า-แคโรทีน	13
1.5	โครงสร้างเรโซแนนซ์ของโมเลกุลเบต้า-แคโรทีน	14
1.6	บริเวณ binding site ของเคอร์ซิตินที่จับกับไอออนของโลหะ	15
1.7	โครงสร้างสารประกอบฟีนอลิคบางชนิด	17
1.8	การทำงานของ antioxidant defense system ในร่างกาย	18
2.1	แผนภูมิแสดงการแยกสารประกอบฟีนอลิคในประเภทต่างๆ	44
3.1	กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี	55
3.2	กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน	65
3.3	กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค	66
3.4	โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของ caffeic acid โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ	74
3.5	โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของ chlorogenic acid โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ	75
3.6	โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของ coumaric acid โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ	76
3.7	โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของ gallic acid โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ	77
3.8	โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของ hydroquinone โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ	78
3.9	โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของ pyrogallol โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ	79
3.10	โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของ pyrocatechol โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ	80

รูป **หน้า**

3.11 โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของ sinapic acid โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 81

3.12 โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากกระถิน โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 82

3.13 โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากซะพลู โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 83

3.14 โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากผักชีล้อม โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 84

3.15 โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากผักเชียงดา โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 85

3.16 โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากผักหนามปู่ย่า โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 86

3.17 โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากผักฮ้วนหมู โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 87

3.18 โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากฟ้าทะลายโจร โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 88

3.19 โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากสะเดา โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 89

รูป **หน้า**

3.20 โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากสะระแหน่ โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 90

3.21 โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากหญ้าหวาน โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 91

3.22 โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากหม่อน โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 92

3.23 โครมาโทแกรมแบบสองทิศทางของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากโหระพาช้าง โดยมี BAW (6:1:2 v/v) และ 2% HOAc เป็นสารละลายตัวพาในทิศทางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 93

3.24 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน caffeic acid 94

3.25 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน chlorogenic acid 94

3.26 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน coumaric acid 95

3.27 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน gallic acid 95

3.28 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน hydroquinone 96

3.29 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน pyrocatechol 96

3.30 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน pyrogallol 97

3.31 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน sinapic acid 97

3.32 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากโครมาโทแกรมของกระถิน จุดที่ 1-4 ตามลำดับ 98

3.33 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากโครมาโทแกรมของชะพลู 100

3.34 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากโครมาโทแกรมของผักชีล้อม จุดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 101

3.35 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากโครมาโทแกรมของผักเชียงดา จุดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 102

รูป **หน้า**

3.36 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากโครมาโทแกรมของผักหนามปู่ย่า จุดที่ 1-3 ตามลำดับ 103

3.37 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากโครมาโทแกรมของผักฮ้วนหมู จุดที่ 1-4 ตามลำดับ 104

3.38 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากโครมาโทแกรมของฟ้าทะลายโจร จุดที่ 1-4 ตามลำดับ 106

3.39 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากโครมาโทแกรมของสะเดา จุดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 108

3.40 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากโครมาโทแกรมของสะระแหน่ จุดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 109

3.41 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากโครมาโทแกรมของหญ้าหวาน จุดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ 110

3.42 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากโครมาโทแกรมของหม่อน 111

3.43 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟีนอลิคอิสระที่แยกได้จากโครมาโทแกรมของโหระพาช้าง จุดที่ 1-5 ตามลำดับ 112

3.44 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของ gallic acid ที่แยกได้จากโครมาโทแกรมของฟ้าทะลายโจร โดยมี n-propanol : NH_4OH (7 : 3 v/v) เป็นสารละลายตัวพา 121

3.45 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของ sinapic acid ที่แยกได้จากโครมาโทแกรมของฟ้าทะลายโจร โดยมี BAW (4 : 1 : 1 v/v) เป็นสารละลายตัวพา 122

3.46 โครมาโทแกรมของสารประกอบฟีนอลิค ก) เพื่อแยก gallic acid จากฟ้าทะลายโจร โดยมี n-propanol : NH_4OH (7 : 3 v/v) เป็นสารละลายตัวพา ; ข) เพื่อแยก sinapic acid จากหญ้าหวาน โดยมี BAW (4 : 1 : 1 v/v) เป็นสารละลายตัวพา 122

4.1 โครงสร้างโมเลกุลสารประกอบฟีนอลิคบางชนิด A : gallic acid ; B : sinapic acid ; C : hydroquinone ; D : pyrocatechol ; E : pyrogallol 134

ผนวก 1 ลักษณะผักและสมุนไพรไทย 12 ชนิดที่เลือกมาศึกษาสารประกอบฟีนอลิค 152

รายการอักษรย่อ

ชม.	=	ชั่วโมง
ซม.	=	เซนติเมตร
มม.	=	มิลลิเมตร
น.น.	=	น้ำหนัก
มล. (ml.)	=	มิลลิลิตร
λmax	=	ความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงสูงสุด
A_{640}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร
A_{760}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร
^{o}C	=	องศาเซลเซียส
BAW	=	n-butanol : glacial acetic acid : water
DE	=	diethyl ether
EA	=	ethylacetate
EDTA	=	ethylene diamine tetraacetic acid
EtOH	=	ethanol
HOAc	=	glacial acetic acid
Kg.	=	กิโลกรัม
MeOH	=	methanol
mg. (มก.)	=	มิลลิกรัม
μg.	=	ไมโครกรัม
mM.	=	Milli Molar
M.	=	Molar
nm.	=	นาโนเมตร
NH_4OH =	=	ammonium hydroxide
rpm.	=	รอบต่อนาที
Sudan I	=	1-(phenylazo)-2-naphthol
UV	=	อุลตร้าไวโอเลต (ultraviolet)
v/v	=	โดยปริมาตร

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University