Research Article

Received: October 17, 2019; Accepted: January 9, 2020

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกระเทียมโทนดำ

Evaluation of the Antioxidant Activities of Black Single Bulb Form of Elephant Garlic (*Allium ampeloprasum* var. ampeloprasum)

ชุติมา แก้วพิบูลย์*

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93210

ณวงศ์ บุนนาค

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

วิทยาเขตสงขลา ตำบลเขารูปช้าง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

Chutima Kaewpiboon*

Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung Campus

Ban Phrao, Pa Payom, Phatthalung 93210

Nawong Boonnak

Department of Basic Science and Mathematics, Faculty of Science, Thaksin University,

Songkhla campus, Khoa Roob Chang, Muang, Songkhla 90000

บทคัดย่อ

กระเทียมโทนดำมีคุณค่าทางอาหารสูง รวมถึงมีเนื้อสัมผัส กลิ่น และรสชาติต่างจากกระเทียมโทนสด ส่งผลให้บริโภคได้ง่ายขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP เปรียบเทียบกับกระเทียมโทนสด ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetry พบว่ากระเทียมโทนดำมีปริมาณฟีนอลิก (31.15±0.39 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) มากกว่ากระเทียมโทนสด (9.76±0.60 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS กระเทียมโทนดำ (EC_{50} = 4.3±0.13 และ 3.80±0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) มีประสิทธิภาพดีกว่ากระเทียมโทนสด (EC_{50} = 15.91±0.33 และ 8.87±0.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) รวมถึงเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP กระเทียมโทนดำมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนมากกว่ากระเทียมโทนสด มีค่า FRAP value 443.05±21.24 และ 117.33±4.76 มิลลิโมลาร์ ของ Fe^{2+} ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ดังนั้นกระเทียมโทนดำมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น จึงเหมาะที่จะเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** chutima.k@tsu.ac.th

คำสำคัญ : กระเทียมโทนดำ; ปริมาณฟีนอลิกรวม; สารต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Black garlic has high nutritional value, with different texture, smell and taste from fresh garlic, resulting in easier intake. The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of black single bulb form of elephant garlic (BSBG) by using DPPH, ABTS and FRAP methods, compared with fresh garlic (FG). By means of Folin-Ciocalteu colorimetric method, total phenolic content in BSBG was higher than that of FG (31.15±0.39 and 9.76±0.60 mg GAE/g extract, respectively). Likewise, by using DPPH and ABTS assays, BSBG showed more antioxidant activities than FG. The EC_{50} values for DPPH were 4.30±0.13 and 3.80±0.16 mg/mL, while the EC_{50} values for ABTS were 15.91±0.33 and 8.87±0.26 mg/mL, respectively. In addition, by FRAP assay, BSBG possessed higher ferric ion reducing antioxidant power than FG, with FRAP values of 443.05± 21.24 and 117.33±4.76 mM Fe^{2+}/g extract, respectively. Therefore, BSBG is more effective antioxidant capacity compared to FG, and suitable to be a healthy food product.

Keywords: black single bulb form of elephant garlic; total phenolic compound; antioxidant

1. บทนำ

กระเทียมโทน (*Allium ampeloprasum* var. *ampeloprasum*) เป็นพืชที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมของอาหาร และใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น อาการท้องอืดท้องเฟ้อ ช่วยย่อยอาหาร ป้องกันโรคท้องร่วง [1] นอกจากนี้มีงานวิจัยรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของกระเทียมโทน ได้แก่ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ต้านเซลล์มะเร็ง ป้องกันไวรัส ต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น [2] เนื่องจากพบสารสำคัญในกระเทียมหลายชนิด ได้แก่ สารประกอบกำมะถัน ไดอัลลิลไดซัลไฟด์ (diallyldisulfide) อัลลิซิน (allicin) เป็นสารที่ให้กลิ่นฉุน สารประกอบกลุ่มฟีนอลิก เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีวิตามินหลายชนิดที่มีอยู่ในปริมาณมาก โดยเฉพาะวิตามินบี 1 เป็นต้น [3] แต่เนื่องจากกระเทียมโทนสดมีกลิ่นฉุน หากรับประทานจะส่งผลต่อกลิ่นลมหายใจของผู้บริโภค ทำให้ไม่ได้รับความนิยมของผู้บริโภคบางกลุ่ม จึงส่งผลให้เกิดข้อจำกัดการแปรรูปกระเทียมโทนสดให้เป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ดังนั้นการลดกลิ่นฉุนจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาการแปรรูปกระเทียมให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายขึ้น ได้แก่ กระเทียมโทนดอง กระเทียมโทนผง น้ำมันกระเทียมโทน [4] และกระเทียมโทนดำ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปกระเทียมโทนที่ได้รับความนิยมของผู้บริโภค เนื่องจากภายหลังกระบวนการบ่มกระเทียมที่อุณหภูมิ 60-90 องศาเซลเซียสและความชื้นสูง (60-90 %RH) [5] ทำให้กระเทียมโทนเปลี่ยนเป็นสีดำจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ส่งผลต่อเนื้อสัมผัส กลิ่น และรสชาติของกระเทียม [6] นอกจากนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารประกอบอัลลิซิน ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ไม่คงตัวและมีกลิ่นฉุน ให้เป็นสาร S-allylcysteine (SAC) และสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซึ่งเป็นสารที่มีความคงตัว ไม่มีกลิ่น

ฉุน [7] และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งความเสียหายที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ [8-10]

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกระเทียมโทนดำ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหารสุขภาพที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภค

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมสารสกัดกระเทียมโทนดำ

2.1.1 การบ่มกระเทียมโทน นำกระเทียมโทนสด (เส้นผ่านศูนย์ กลาง 4 เซนติเมตร) ซื้อจากตลาดในจังหวัดศรีสะเกษ ปริมาณ 1 กิโลกรัม บ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 80 ระยะเวลา 15 วัน เมื่อครบเวลานำกระเทียมดำที่ได้ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

2.1.2 การสกัดกระเทียมโทนดำ แกะเปลือกกระเทียมโทนสดและกระเทียมโทนดำ แล้วบดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แช่สกัดด้วยในเอทานอล 95 % อัตราส่วน 1 กรัม 4 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน โดยเขย่าทุกวัน จากนั้นนำกระเทียมโทนสดและกระเทียมโทนดำที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 แล้วระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบกระเทียมโทนสด และกระเทียมโทนดำ จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์สารสกัดหยาบ (% yield) และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu นำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 70 ไมโครลิตร ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 525 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปไว้ในที่มืด 1 นาที แล้วเติม 7.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 525 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) โดยวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในรูปมิลลิกรัมของสมมูลของกรดแกลลิก (gallic acid equivalents (GAE) ต่อกรัมของน้ำหนักของกระเทียมโทน (mg GAE/g extract)

2.3 วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

2.3.1 วิธี DPPH (DPPH radical scavenging activity assay) นำสารสกัดหยาบกระเทียมโทนดำ และกระเทียมโทนสด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10, 50, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เติมลงใน 96 well plate โดยเติมสารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมเอทานอล 50 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณหาค่าร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ (สมการที่ 1) เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์มีประสิทธิภาพกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50}) เทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซีเป็นตัวควบคุมการทดลองเชิงบวก

ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH = {[AC - (AS - A0)] ÷ AC} x 100 (1)

เมื่อ AC = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ; AS = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ; A0 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

2.3.2 วิธี ABTS (ABTS radical scavenging activity assay) นำสารสกัดนำสารสกัดหยาบกระเทียมโทนดำและกระเทียมโทนสดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10, 50, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เติมลงใน 96 well plate โดยเติมสารสกัดข้าวปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมเอทานอล 50 ไมโครลิตร และสารละลาย ABTS 50 ไมโครลิตร (โดยใช้ ABTS เป็นอนุมูลอิสระ เตรียมโดย 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6 - sulphonic acid) diam monium salt (ABTS) ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (K_2SO_4) เข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ บ่มในที่มืดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณหาค่าร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ (สมการที่ 2) เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์มีประสิทธิภาพกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50})

ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS = {[AC - (AS - A0)] ÷ AC} x 100 (2)

เมื่อ AC = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่ไม่มีสารทดสอบ; AS = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่มีสารทดสอบ; A0 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

2.3.3 วิธี Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP assay) นำสารสกัดหยาบกระเทียมโทนดำและกระเทียมโทนสดที่ความเข้มข้น 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate จากนั้นเติมสารละลาย FRAP ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณหาค่า FRAP value จากกราฟมาตรฐาน $FeSO_4$ (50-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นค่า FRAP value (มิลลิโมลาร์ของ Fe^{2+} ต่อกรัมของสารสกัด)

2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าที่ได้รายงานค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±S.D.) จากข้อมูลที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วย unpaired Student's t-test, one way ANOVA และ post Hoc test ด้วยวิธี Duncan's multiple range tests (DMRT) ของ SPSS v.14.0

3. ผลการทดลองและอภิปราย

3.1 การเตรียมสารสกัดกระเทียมโทนดำ

กระเทียมโทนผ่านการหมักที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตั้งแต่วันที่ 0 ถึง 15 มีลักษณะและสีแสดงดังรูปที่ 1 พบว่าเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของสีในวันที่ 3 วัน และเริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำในวันที่ 12 วัน จากนั้นสีดำจะเข้มขึ้น จนเข้มที่สุดเมื่อครบระยะเวลาการบ่ม 15 วัน ซึ่งลักษณะของเนื้อกระเทียมโทนจะมีความหนืด มีขนาดเล็กและลีบลงจากเดิม มีกลิ่นหอม ไม่มีกลิ่นฉุนเมื่อเปรียบเทียบกับกระเทียมโทนสด และรสชาติหวาน

การสกัดสารสกัดหยาบกระเทียมโทนดำและกระเทียมโทนสด ด้วยวิธีแช่สกัดในตัวทำละลาย 95 % เอทานอล ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน เมื่อระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบลดความดัน จะได้เป็นสารสกัดหยาบ มีเปอร์เซ็นต์การสกัดสารสกัดหยาบ (% extraction yield) ของกระเทียมโทนดำและกระเทียมโทนสด 10.29 และ 3.28 ตามลำดับ พบว่าสารสกัดหยาบกระเทียมโทนดำมีเปอร์เซ็นต์การสกัดมากกว่ากระเทียมโทนสดอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Figure 1 Black garlic: garlic during fermentation process 0-15 days (left to right)

ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่เคยมีมาก่อน โดยพบว่าการประเมินคุณภาพอาหารด้วยประสาทสัมผัสพบว่ากระเทียมดำจะมีสีดำสม่ำเสมอเมื่อใช้อุณหภูมิในการบ่มระหว่าง 60-80 องศาเซลเซียส เนื่องจากเมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส กระเทียมจะไม่เปลี่ยนเป็นสีดำทั้งหมด และหากอุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส กระเทียมดำที่ได้จะมีรสขม ทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด และปริมาณความชื้นควรอยู่ในช่วงร้อยละ 60-90 จะทำให้กระเทียมดำมีความนุ่ม และยืดหยุ่นเหมาะกับการรับประทาน หากปริมาณความชื้นน้อย จะทำให้กระเทียมดำแห้งและเหนียว อย่างไรก็ตาม คุณภาพของกระเทียมดำยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ อีก เช่น วิธีการหมัก คุณภาพของกระเทียม [11]

3.2 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu สามารถคำนวณโดยใช้สมการเส้นตรงของกรดแกลลิก คือ $y = 0.0105x - 0.079$, $R^2 = 0.9985$ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ซึ่งการคำนวณใช้สมการของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิคจากสมการเป็นตัวเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณฟีนอลิก (ตารางที่ 1) พบว่าสารสกัดหยาบกระเทียมโทนดำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมด 31.15±0.39 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูงกว่าสารสกัดหยาบกระเทียมโทนสด ซึ่งมีค่า 9.76±0.06 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1) ซึ่งมีรายงานว่ากระบวนการบ่มกระเทียมส่งผลต่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารประกอบอัลลิซิน ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ไม่คงตัวและมีกลิ่นฉุน เป็นสาร SSAC และสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารที่มีความคงตัว ไม่มีกลิ่นฉุน และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายน้ำได้ รายงานการวิจัยพบว่าในกระเทียมดำมีปริมาณ SAC เพิ่มขึ้น 6 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่ามีปริมาณสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกระเทียมสด [12] จึงส่งผลให้กระเทียมโทนดำมีปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกรวมสูงขึ้น รายงานของ Xu และคณะ พบว่าความร้อนจากกระบวนการบ่มกระเทียมสามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของกรดฟีนอลิกอิสระที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของสารกลุ่มเอสเทอร์และไกลโคไซด์ในกระเทียม [13]

3.3 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และABTS

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดหยาบกระเทียมโทนดำมีค่า EC_{50} 4.30±0.13 และ 3.80±0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กระเทียมโทนสด มีค่า EC_{50} 15.91±0.33

และ 8.87±0.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jang และคณะ ที่พบว่ากระเทียมดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่ากระเทียมสด [11] นอกจากนี้ผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดี สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sutharut และ Sudarat ที่รายงานว่าข้าวเหนียวดำงอก Niew Dam และ Hom Nil มีความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ [14] แม้ว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำกว่าการทดสอบด้วยวิธี ABTS แต่วิธีการทั้งสองแสดงแนวโน้มผลลัพธ์เดียวกัน ซึ่งเป็นผลจากอนุมูลอิสระ DPPH เป็นอนุมูอิสระสังเคราะห์ที่มีความเสถียร และโครงสร้างของ DPPH ที่มีขนาดใหญ่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ [15] สอดคล้องกับงานวิจัยของ Floegel และคณะ ที่เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของอาหารในสหรัฐอเมริกาที่อุดมด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ 50 อันดับ ซึ่งพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูล DPPH ต่ำกว่า ABTS [16]

3.4 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

วิธี FRAP เป็นการวัดความสามารถของสารสกัดหยาบกระเทียมโทนดำในการรับอิเล็กตรอนอิสระ (reducing agent) โดยอาศัยสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยา redox-linked colorimetric method โดยที่สารละลาย FRAP (ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ complex) จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารสกัดหยาบกระเทียมโทนดำที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดสารประกอบ Fe^{2+}-TPTZ complex ซึ่งมีสีน้ำเงิน จึงสามารถใช้วัด total reducing power ของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ Fe^{3+} เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} โดยผลปรากฏว่าสารสกัดหยาบจากกระเทียมโทนดำมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนได้ดีกว่าสารสกัดหยาบกระเทียมโทนสดอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีค่า FRAP value 443.05±21.24 และ 117.33±4.76 มิลลิโมลาร์ของ Fe^{2+} ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

Table 1 Total phenolics content (TPC) and antioxidant activities of fresh garlic (FG) and black single bulb form of elephant garlic (BSBG)

Samples	TPC mg GAE/g extract	Antioxidant activities (EC_{50}; mg/mL)		FRAP values (mM Fe^{2+}/g extract)
		DPPH assay	ABTS assay	
BSBG	31.15±0.39[a]	4.30±0.13[a]	3.80±0.16[a]	117.33±4.76[a]
FG	9.76±0.06[b]	15.91±0.33[b]	8.87±0.26[b]	443.05±21.24[b]
Ascorbic acid (positive control)	-	7.31×10^{-3}±0.15[c]	6.73×10^{-3}±0.17[c]	-

The values are mean±standard deviation (n = 3); [a-c]Means within each column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$) using unpaired Student's t-test and one-way ANOVA.

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jang และคณะ ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกระเทียมดำ ซึ่งพบว่ากระเทียมดำมีสมบัติในการให้อิเล็กตรอนได้ดีกว่ากระเทียมสด กล่าวคือก ระเทียมดำมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่านั่นเอง [17] ทั้งนี้เนื่องจากในกระเทียมดำมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกที่โครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก ซึ่งมีอิเล็กตรอนหนาแน่น ที่สามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ จากนั้นในวงแหวนอะโรมาติกสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (delocaliztion) ทำให้โครงสร้างเสถียรไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป [18] ปฏิกิริยาลูกโซ่จากอนุมูลอิสระจึงสิ้นสุดลง นอกจากนี้ผลการทดสอบยังสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS

4. สรุปผลการทดลอง

กระเทียมโทนดำที่ได้จากกระบวนการบ่มกระเทียมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นร้อยละ 80 เป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่ากระเทียมโทนดำที่ได้นั้นมีเนื้อสัมผัสยืดหยุ่น รสชาติที่หวานขึ้น ไม่มีกลิ่นฉุน สีที่น่ารับประทาน และรับประทานได้ง่าย รวมถึงมีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกรวม 31.15± 0.39 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ได้ดีกว่ากระเทียมโทนสด ดังนั้นกระเทียมโทนดำจึงเหมาะที่จะเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและเป็นการเพิ่มมูลค่าของกระเทียมโทน เพื่อช่วยเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรผู้ปลูกกระเทียมได้อีกด้วย

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ภายใต้โครงงานวิจัยระดับปริญญาตรี และขอขอบคุณข้อมูลสนับสนุนจากนางสาวณัฐกุล อินทร์ทอง

6. References

[1] Mikaili, P., Maadirad, S., Moloudizargari, M., Aghajanshakeri, S. and Sarahroodi, S., 2013, Therapeutic uses and pharmaco logical properties of garlic, shallot, and their biologically active compounds, Iran. J. Basic Med. Sci. 16: 1031-1048.

[2] Bayan, L., Koulivand, P.H. and Gorji, A., 2013, Garlic: A review of potential therapeutic effects, Avicenna J. Phytomed. 4: 1-14.

[3] Adaki, S., Adaki, R., Shah, K. and Karagir, A., 2014, Garlic: Review of literature, Ind. J. Cancer 51: 577-581.

[4] Choi, I.S., Cha, H.S. and Lee, Y.S., 2014, Physicochemical and antioxidant properties of black garlic, Molecules 19: 16811-16823.

[5] Kang, O.J., 2016, Physicochemical characteristics of black garlic after different thermal processing steps, Prev. Nutr. Food Sci. 21: 348-354.

[6] Kimura, S., Tung, Y.C., Pan, M.H., Su, N.W., Lai, Y.J. and Cheng, K.C., 2017, Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application, J. Food Drug Anal. 25: 62-70.

[7] Kim, J.S., Kang, O.J. and Gweon, O.C., 2013, Comparison of phenolic acids and

flavonoids in black garlic at different thermal processing steps, J. Func. Foods 5: 80-86.

[8] Yang, G.Q., Wang, D., Wang, Y.S., Wang, Y.Y. and Yang, K., 2013, Radiosensitization effect of black garlic extract on lung cancer cell line Lewis cells, Chin. J. Integr. Med. 33: 1093-1097.

[9] Ha, A.W., Ying, T. and Kim, W.K., 2015, The effects of black garlic (*Allium sativum*) extracts on lipid metabolism in rats fed a high fat diet, Nutr. Res. Pract. 9: 30-36.

[10] Tak, H.M., Kang, M.J., Kyoung, M.K., Kang, D., Han, S. and Shin, J.H., 2014, Anti-inflammatory activities of fermented black garlic, Korean J. Food Nutr. 43: 1527-1534.

[11] Jang, E.K., Seo, J.H. and Lee, S.P., 2008, Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract, Korean J. Food Sci. Technol. 40: 443-448.

[12] Toledano-Medina, M.A., Pérez-Aparicio, J., Moreno-Rojas, R. and Merinas-Amo, T., 2016, Evolution of some physicochemical and antioxidant properties of black garlic whole bulbs and peeled cloves Food Chem. 199: 135-139.

[13] Xu, G., Ye, X., Chen, J. and Liu, D., 2007, Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract, J. Agric. Food Chem. 55: 330-335.

[14] Sutharut, J. and Sudarat, J., 2012, Total anthocyanin content and antioxidant activity of germinated colored rice, Int Food Res. J. 19: 215-221.

[15] Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K., 2005, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, J. Agric. Food Chem. 53: 4290-4302.

[16] Floegel, A., Kim, D.O., Chung, S.J., Koo, S.I. and Chun, O.K., 2011, Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods, J. Food Comp. Anal. 24: 1043-1048.

[17] Jang, H.J., Lee, H.J., Yoon, D.K., Ji, D.S., Kim, J.H. and Lee, C.H., 2017, Antioxidant and antimicrobial activities of fresh garlic and aged garlic by-products extracted with different solvents, Food Sci. Biotechnol. 27: 219-225.

[18] Pietta, P.G., 2000, Flavonoids as anti oxidants, J. Nat. Prod. 63: 1035-1042.